



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK
LİSANS
TEZİ

HİPOTİROİDİK SIÇANLARDA ARI SÜTÜ TAKVİYESİNİN
OVARYUM ÜZERİNDEKİ OLASI KORUYUCU ETKİSİ

ÖZÜM ATLITÜRK

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2018



**HİPOTİROİDİK SIÇANLARDA ARI SÜTÜ TAKVİYESİNİN OVARYUM
ÜZERİNDEKİ OLASI KORUYUCU ETKİSİ**

Özüm ATLİTÜRK

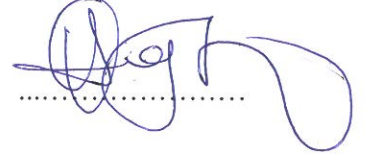
**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

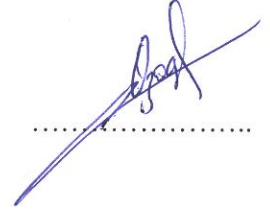
HAZİRAN 2018

Özüm ATILITÜRK tarafından hazırlanan “Hipotiroidik Sıçanlarda Arı Sütü TakviyesininOvaryum Üzerindeki OlasıKoruyucu Etkisi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Çiğdem ELMAS
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan :Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye :Doç. Dr. Ayten TÜRKKANI
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum



TezSavunmaTarihi: 19/06/2018

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Özüm ATLITÜRK

19.06/2018

HİPOTİROİDİK SIÇANLARDA ARI SÜTÜ TAKVİYESİNİN OVARYUM
ÜZERİNDEKİ OLASI KORUYUCU ETKİSİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Özüm ATLİTÜRK

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2018

ÖZET

Tiroid hormonlarının bazal metabolizmayı hızlandırması sonucunda reaktif oksijen türlerinin artması, hücresel oksidatif stresin oluşmasına neden olabilmektedir. Buna bağlı olarak hücresel hasarlar ve çeşitli patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır. Bu çalışmada, 30 adet 6-8 haftalık Wistar albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. 30 gün süren deney boyunca kontrol grubuna hiçbir uygulama yapılmazken, sham kontrol grubuna PTU çözücüsü olan serum fizyolojik (SF), hipotiroidi grubuna intraperitoneal (i.p) yolla 10 mg/kg/gün PTU, arı sütü grubuna gavaj ile 100 mg/kg/gün arı sütü ve arı sütü + hipotiroidi grubuna 10 mg/kg/gün PTU + 100 mg/kg/gün arı sütü uygulandı. Süre sonunda propiltiourasil (PTU) ile hipotiroidi modeli oluşturulmuş sıçan ovaryum dokularında meydana gelen oksidatif hasar immunohistokimyasal yöntem ile SOD-1 ve 8-OHdG antikorlarının immünreaktivitesi bakımından incelendi. Kontrol, sham kontrol ve arı sütü gruplarında germinal epitelde, teka yapılarında ve medulla stromasında zayıf immünreaktivite gözlenirken, hipotiroidi grubunda özellikle granüloza hücreleri ve teka yapılarında şiddetli reaktivite belirlendi. Arı sütü uygulaması ile birlikte ise her iki antikorun tutulumunun da zayıfladığı saptandı. Sonuç olarak, hipotiroidinin ovaryum dokusunda yaygın dejenerasyona yol açtığı ve arı sütünün bu dejeneratif değişimler üzerinde koruyucu etki gösterdiği kanısına varılmıştır.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : Ovaryum, Hipotiroidi, Arı sütü, SOD-1, 8-OHdG
Sayfa Adedi : 106
Danışman : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

THE POTENTIAL PROTECTIVE EFFECTS OF ROYAL JELLY SUPPLEMENTS
ON THE OVARIES IN HYPOTHYROIDISM-INDUCED FEMALE RAT MODEL

(M. Sc. Thesis)

Özüm ATLITÜRK

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2018

ABSTRACT

Thyroid hormones increase basal metabolic rate that enhances reactive oxygen species formation and cellular oxidative stress. Moreover, cellular degenerations and related pathological issues are arised according to that oxidative injuries. 6-8 weeks old, 30 female Wistar albino rats were used in our study. During the 30 days experimental period, on one hand no administration was done to the control group, on the otherhand PTU solvent (saline) to sham control group, 10 mg/kg/day (i. p) PTU to hypothyroidism group, 100 mg/kg/day to royal jelly group by gavage and 10 mg/kg/day (i. p) PTU + 100 mg/kg/day royal jelly to royal jelly treated hypothyroidism group were administered. At the end of the experimental period, ovarian tissues immunoreactivity was assesed by using SOD-1 and 8-OHdG, immunohistochemically. Immunohistochemical findings showed that SOD-1 and 8-OHdg immunoreactivities were higher in granulosa cells and theca structures in the Hypothyroidism group, but weaker in germinal epithelium, medulla stroma and theca structures of sham, control and royal jelly groups. Both immunoreactivities was decreased in royal jelly treated hypothyroidism group. It has been concluded that hypothyroidism lead to widespread degeneration of the ovarian tissue and royal jelly administration can be protective against that degenerative changes.

Science Code : 1033

Key Words : PTU, Hypothroidism, Ovary, Royal Jelly, SOD, 8OHdG

Page Number : 106

Advisor : Prof. Dr. Cigdem Elmas

TEŞEKKÜR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL başta olmak üzere, yüksek lisans öğrenimim süresince desteğini, ilgisini ve sabrını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam ve danışmanım Sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'A,

Yüksek lisans eğitimimde katkıları olan değerli hocalarım Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU, Prof. Dr. Deniz ERDOĞAN, Prof. Dr. Celal ILGAZ ve Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'NA, tezimin deney ve laboratuvar aşamalarında zamanlarını ve desteklerini esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Cemile Merve SEYMEN ve Arş. Gör. Ayşe ÇAKIR GÜNDOĞDU olmak üzere tüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı asistanlarına ve personeline,

Tezimin laboratuvar aşamalarında hiçbir zaman desteğini, bilgisini ve zamanını esirgemeyen Arş. Gör. Gökçe Nur ARIK'A ve dostum Patolog Cem KUŞÇEK'E,

Karşılaştığım tüm zorlukları aşmamı sağlayan, engin bilgisiyle bana her zaman yeni pencereler açan, tez dönemimdeki en büyük destekçim sevgili Uzm. Ecz. Zübeyir ELMAZOĞLU'NA,

Sonsuz sevgi ve emekleriyle beni bugünlere getiren, yaşamımın her döneminde kendi ayakları üzerinde durmamı sağlayan ve tüm inançlarıyla her zaman desteklerini hissettiğim biricik annem Sevinç ATLITÜRK ve canım babam Necmi ATLITÜRK'e,

Son olarak, uzak yıldızların birinde beni gördüğünü bildiğim, her geçen gün özleminin arttığı süper babaannem Ürke ATLITÜRK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma, 01/2016-18 kodlu proje kapsamında Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ovaryum.....	3
2.2. Ovaryum Embriyolojisi.....	3
2.2.1. Cinsiyetin belirlenmesi	3
2.2.2. Farklılaşmamış gonadlar.....	4
2.2.3. Ovaryumların gelişmesi	6
2.2.4. Oogenez	7
2.2.5. Folikülogenez.....	9
2.2.6. Ovulasyon.....	13
2.3. Ovaryum Anatomisi	14
2.3.1. Ovaryum tutunma yapıları.....	15
2.3.2. Ovaryum damarları	16
2.3.3. Ovaryum sinirleri.....	16
2.4. Ovaryum Histolojisi.....	17

	Sayfa
2.4.1. Primordiyal folikül	19
2.4.2. Primer folikül	19
2.4.3. Antral (Sekonder) folikül.....	20
2.4.4. Korpus luteum.....	22
2.5. Ovaryum Fizyolojisi	23
2.5.1. Hipotalamus-hipofiz-over aksı.....	24
2.6.Tiroid Bezi Histofizyolojisi ve Hipotiroidi	26
2.6.1. Tiroid bezi fizyolojisi	26
2.6.2. Hipotiroidizm	30
2.6.3. Tiroid hormonları ve oksidatif stres	31
2.6.4. Tiroid bezi ve ovaryum ilişkisi	32
2.6.5. Tiroid hormonlarının ovaryum üzerine etkileri	32
2.7. Arı Sütü	36
2.7.1. Arı sütü ve fertilité	38
2.8. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri	39
2.8.1. Serbest radikallerin hücre ve hücre yapılarında meydana getirdiği hasarlar.....	40
2.9. Süperoksit Dismutaz	40
2.10. 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin.....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM	45
3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma	45
3.2. Hipotiroidi Modeli Oluşturma	45
3.3. Işık Mikroskopik Yöntem	46
3.4. İmmunohistokimyasal Yöntem	46
4. BULGULAR	49
4.1. Histomorfolojik Bulgular.....	49

	Sayfa
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	59
4.2.1. SOD-1 bulguları	59
4.2.2. 8-OHdG bulguları.....	64
4.3. Foliküllerin Dağılım Grafikleri	68
4.4. İstatistiksel Bulgular.....	73
5. TARTIŞMA.....	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR.....	85
EKLER.....	103
EK-1.	104
ÖZGEÇMİŞ	106

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Arı sütünün bileşimi	37
Çizelge 2.2. SOD enzim formlarına ait genel bilgiler	41

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. a) 4 haftalık bir embriyoda gonadlar ve mezonefroz arasındaki ilişki b) 4 haftalık bir embriyoda genital kabartı ve mezonefrik kanal.	4
Şekil 2.2. 6 haftalık bir embriyonun lumbur bölgesinden geçen transvers kesitte farklanmamış gonad	6
Şekil 2.3. Gelişimin 7.haftasında, primitif cinsiyet kordonlarının dejenerasyonu ve kortikal kordonların oluşumu	7
Şekil 2.4. 20. haftadan itibaren atreziye uğrayan ve sayıları giderek azalan germ hücreleri	9
Şekil 2.5. Preantral-Antral folikül gelişimi.....	11
Şekil 2.6. Ovulasyon.....	14
Şekil 2.7. Overler ve Ligamentler	15
Şekil 2.8. Ovaryum dokusunun hematoksilin-eozin ile boyanmış kesiti. A: Antrum, GEp: Germinal epitel, TA: Tunika albuginea, ZP: Zona pellusida, PF: Primordiyal folliküller, SF: Sekonder folliküller.....	19
Şekil 2.9. Ovaryum folikülleri	22
Şekil 2.10. Hipotalamus-Hipofiz-Over Aksı	25
Şekil 2.11. Tiroid bezinde hormon sentezi ve salgılanması	29
Şekil 2.12. 10-HDA kimyasal yapısı.....	38
Şekil 2.13. SOD izoformlarının etki mekanizmaları	42
Şekil 2.14. 8-oHdG Formülasyonu	43
Şekil 4.1. Tüm gruplara ait Primordial Folikül dağılımları.....	69
Şekil 4.2. Tüm gruplara ait Unilaminar Primer Folikül dağılımları	70
Şekil 4.3. Tüm gruplara ait Multilaminar Primer Folikül dağılımları	71
Şekil 4.4. Tüm gruplara ait Sekonder Folikül dağılımları	72
Şekil 4.5. Tüm gruplara ait Tersiyer Folikül dağılımları	73
Şekil 4.6. Serum TSH düzeyleri.....	74
Şekil 4.7. Serum serbest T4 düzeyleri a: $p<0.05$; b: $p<0.001$; c: $p<0.001$	74
Şekil 4.8. Serum serbest T4 düzeyleri	74

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Bal peteği içine salgılanan arı sütü	36
Resim 4.1. Kontrol grubuna ait hemotoksilen-eozin boyamaları.....	50
Resim 4.2. Kontrol grubuna ait Mallory Azan Boyamalarında; Primordial Folikül (PF), Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Graaf Folikülü (GF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)	51
Resim 4.3. Sham kontrol grubuna ait hemotoksilen-eozin boyamaları	52
Resim 4.4. Kontrol Sham grubuna ait Mallory Azan boyamalarında, Primordial Folikül (PF), Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Graaf Folikülü (GF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)	53
Resim 4.5. Arı sütü grubuna ait hemotoksilen-eozin boyamaları.....	54
Resim 4.6. Arı sütü grubuna Ait Mallory Azan boyamalarında; Primordial Folikül (PF), Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Graaf Folikülü (GF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)	55
Resim 4.7. PTU indüklenen gruba ait h&e boyamaları	56
Resim 4.8. PTU indüklenen gruba ait Malory Azan Boyamalarında; Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Graaf Folikülü (GF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)	57
Resim 4.9. PTU ile birlikte Arı sütü verilen gruba ait h&e boyamaları	58
Resim 4.10. PTU ile birlikte arı sütü verilen gruba ait Mallory azan boyamalarında; Primordial Folikül (PF), Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Atretik Folikül (AF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)	59
Resim 4.11. Kontrol grubu SOD-1 açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A), Teka interna (Tİ), Teka Eksterna (TE)	60
Resim 4.12. Sham kontrol grubu SOD-1 açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)	61

Resim	Sayfa
Resim 4.13. Arı Sütü grubu SOD-1 açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Medulla (M), Antrum (A)	62
Resim 4.14. PTU indüklenen grubun SOD-1 açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Zona Pelusida (ZP), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)	63
Resim 4.15. PTU ile birlikte arı sütü verilen grubun SOD-1 açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Unilaminar Primer Folikül (UPF), Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Teka interna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Medulla (M), Antrum (A)	64
Resim 4.16. Kontrol grubunun 8-OHdG açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Teka interna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Medulla (M), Antrum (A)	65
Resim 4.17. Sham kontrol grubunun 8-OHdG açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Medulla (M), Antrum (A)	66
Resim 4.18. Arı sütü grubunun 8-OHdG açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Teka İnterna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Medulla (M), Antrum (A)	66
Resim 4.19. PTU indüklenen grubunun 8-OHdG açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Korpus Luteum (KL), Zona Pelusida (ZP), Teka İnterna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Medulla (M), Antrum (A)	67
Resim 4.20. PTU ile birlikte arı sütü verilen grubun 8-OHdG açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Zona Pelusida (ZP), Teka İnterna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Medulla (M), Antrum (A).....	68

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklamalar
8-OHdG	8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin
A	Antrum
AMH	Anti-mullerian hormon
BMP	Bone morphogenetic proteinler
ETS	Elektron Taşıma Sistemi
GE	Germinal epitel
KL	Kit-ligand
LF	Leukemia inhibitory factor
MPF	Multilaminar Primer Folikül
OMI	Oosit matürasyon inhibitor faktör
PF	Primordiyal folliküller
SF	Sekonder folliküller
SOD	Süperoksit Dismutaz
SRY	Sex determining region on Y
T3	Triiyodotronin
T4	Tiroksin
TA	Tunika albuginea
TBF	Testis Belirleyici Faktör
TGF- β :	Transforming growth factor-beta
TSH	Tiroit Stimüle Edici Hormon
UPF	Unilaminar Primer Folikül
ZP	Zona pellusida
GSH	Glutatyon
TAC	Total antioksidan kapasitesi

1. GİRİŞ

Tiroid hastalıklarının tüm formları, kadınlarda erkeklere göre 4-5 kat daha yaygındır ve aynı zamanda üreme fizyolojisine de etki etmektedir. Hem hipertiroidizm hem de hipotiroidizm, östrojen ve androjen metabolizması ve bunlarla bağlantılı olarak menstrüel siklus ve fertilité üzerinde de önemli fonksiyonlara sahiptir. Üreme çağındaki kadınlarda (20-40 yaş) hipotiroidizm görülme sıklığı % 2-4 arasında değişim göstermektedir.

Yüksek TSH (Tiroit Stimüle Edici Hormon) düzeyi, T3 (triiodotronin) ve T4 (tiroksin) seviyelerinin düşük seyretmesi olarak da isimlendirilen hipotiroidi, tekrarlı gebelik kayıplarının görüldüğü vakalarda etiyolojik bir etken olarak düşünülebilir. Bununla ilişkili olarak androjen ve östrojen metabolizması değişmektedir. Bu mekanizmanın değişmesi sonucunda menstrüel siklus bozuklukları ve tekrarlayan kanama problemleri olan kadınlarda hipotiroidi görülebilmektedir. Primer tiroid yetmezliğinde dolaşımdaki tiroid hormonu seviyesi azalır ve bu durum TSH salınımını arttırmak üzere hipofizi uyarır. Artmış TSH ve azalmış T4 söz konusu patolojideki tanıyı kesinleştirir. Hipotiroidi, TSH'ın T4 için uygun olmayan şekilde düşük olduğu durumlarda hipofiz yetmezliğine bağlı olarak da ortaya çıkmış olabilir.

Hipotiroidizm, anormal cinsel gelişimden başlayan ve infertiliteye kadar uzanan oldukça geniş çaplı üreme bozukluklarıyla ilişkilidir.

Hipotiroidizmin, dişi üreme sistemi organlarının (ovaryum, tuba uterina, uterus) histolojik yapısı üzerine etkisini araştırmaya yönelik yapılan çalışmalar çok azdır.

Ovaryumlar, dişi üreme hücresi ve dişi üreme hormonlarının üretiminden sorumlu olan hem ekzokrin hem de endokrin fonksiyon gören esas dişi üreme organıdır. Tiroid hormonları FSH-aracılı LH/hCG reseptörü ile sinerjik etki yaratarak granüloza hücrelerinin (progesteron üreten) üzerinde doğrudan uyarıcı etkiler oluşturabilir.

Puberteye girmiş dişi sıçanlarda hipotiroidinin ovaryumun histomorfolojik yapısında hasara neden olduğunu ve ovaryumlarının atrofik hale geldiğini düşünmekteyiz.

İnsanlarda, hipotiroidizm çeşitli organların bağ doku içerisindeki mukopolisakkaritlerin birikimi (hiyaluronik asit, kondroitin sülfat) ile karakterizedir. Hipotiroidinin ovaryumun parakrin ve otokrin iletişim mekanizmalarını değiştirmesinin, folikülogenez ve steroidogenezde bozukluklara neden olduğunu düşünmekteyiz.

Tiroid hormonları aracılığı ile bazal metabolizmanın artması sonucunda Elektron Taşıma Sistemi'ndeki (ETS) reaktif oksijen türlerin artması, hücresel oksidatif stresin oluşmasına neden olabilmektedir. Buna bağlı olarak hücresel hasarlar ve çeşitli patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır.

Hipotiroidizm, SOD (Süperoksit Dismutaz) aktivitesinde düşüşe neden olarak hücre membranını oksidatif hasara karşı hassas duruma getirmektedir.

Serbest oksijen radikalleri DNA'da baz ve şeker lezyonları, zincir kırıkları ve DNA'yı proteinlerin çapraz bağlanması gibi çoklu lezyonları içeren hasarlara neden olmaktadır. Bu hasarlar içerisinde en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en yüksek olan 8-OHdG (8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin)'dir.

Arı sütünün üreme sistemi, gelişme, bağışıklık sistemi, büyüme, ve antioksidan sistem üzerinde aktivite göstermektedir. Literatürde arı sütünün dişi üreme sistemi üzerindeki antioksidan etkilerine dair yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Biz de mevcut literatür verilerinden yola çıkarak hipotiroidinin ovaryumlar üzerinde oluşturduğu oksidatif hasara karşı arı sütünün antioksidan etkilerini histomorfolojik düzeyde araştırmayı hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

Ovaryumlar, *gametogenez* ve *steroidogenez* olarak birbiri ile bağlantılı iki temel göreve sahiptir. Dişi üreme hücresi oluşumu *oogenez* olarak adlandırılırken, oluşan gametler *oosit*, olgun gametler ise *ovum* olarak adlandırılmaktadır. Ovaryumlar başlıca iki temel hormon olan *östrojen* ve *progesteronun* salgılanmasında görev almaktadır.

Bu hormonlardan östrojen cinsiyet organlarının gelişimi ve olgunlaşmasından sorumludur. Ayrıca pubertede dişi karakteristiğinin oluşumunu sağlamakta birlikte meme dokusunun büyümesine de kanal ve stroma gelişimini uyararak aracılık ederler.

Dişiyi gebeliğe hazırlayan progesteronlar, uterusun endometrial sekretuar değişimlerinin uyarılmasında etkindirler. Ayrıca meme bezlerinde lobular çoğalmayı başlatarak canlıyı emzirme için hazırlamaktadırlar [1].

2.2. Ovaryum Embriyolojisi

2.2.1. Cinsiyetin belirlenmesi

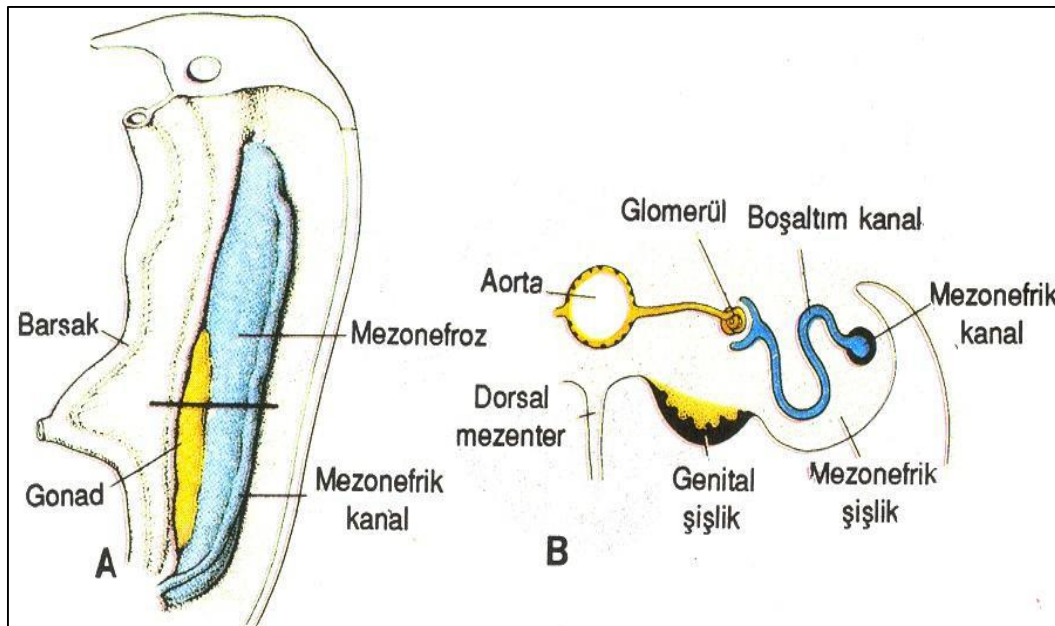
Cinsiyetin belirlenmesinde döllenme en önemli olaydır. Cinsiyetin belirlenmesi, X kromozomuna sahip ovum ile bir X veya Y kromozomuna sahip spermin döllenmesiyle gerçekleşmektedir. Sperm X kromozomuna sahip ise XX, Y kromozomuna sahip ise XY kromozom yapısındaki zigotlar oluşur [2-4].

Kompleks bir süreç olan cinsiyetin farklanması durumunda birçok gen rol oynamaktadır. Y kromozomunun kısa kolu üzerinde yer alan *Yp11* “cinsiyet belirleme bölgesinde” *SRY* (Sex determining region on Y) geni anahtar rol oynamaktadır. cinsiyet organlarının geleceği *SRY* geni tarafından kodlanan *TBF* (Testis Belirleyici Faktör) tarafından belirlenir. Fetusta *TBF* bulunduğunda fetus erkek, bulunmadığında ise dişi olarak gelişim göstermektedir [5-7].

2.2.2. Farklılaşmamış gonadlar

Döllenme ile embriyo cinsiyetinin belirlenmesine rağmen, gonadlar gelişimin 7. haftasına kadar cinsiyet karakteristiklerine sahip değildir. Dişi ve erkek gonadda da genital sistem oldukça benzer olduğundan bu döneme *farklılaşmamış (indifferent) dönem* denilmektedir.

Gonadal gelişme mezenşimal blastemin meydana gelmesi ile belirmektedir. Mezenşimal blastem; retroperitoneal bölgede, mezonefrozun medial kenarındaki sölomik epitelin kalınlaşması ve altındaki mezenşimal hücrelerin çoğalarak yoğunlaşması sonucu oluşmaktadır (Şekil 2.1a). 28 günlük bir embriyoda, orta hattın her iki yanında yer alan mezonefroz ve dorsal mezenterler arasında, uzunlamasına kabartılar şeklinde oluşan gonadlar *genital kabartı* ya da *gonadal kabartı* olarak isimlendirilirler. Embriyo gelişiminin 6. haftası ile birlikte germ hücreleri genital kabartılar (Şekil 2.1b) içerisinde görülmeye başlar [1-5].

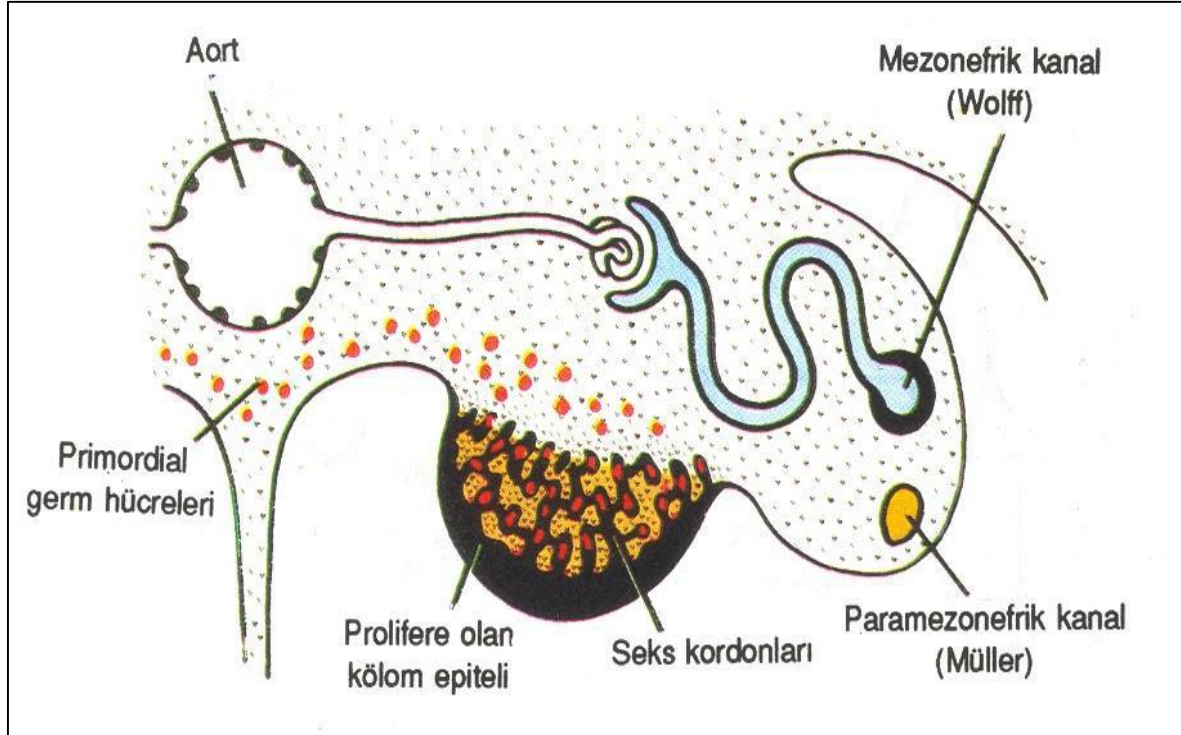


Şekil 2.1. a) 4 haftalık bir embriyoda gonadlar ve mezonefroz arasındaki ilişki b) 4 haftalık bir embriyoda genital kabartı ve mezonefrik kanal [5].

Primordial germ hücreleri gelişimin 21. gününde, vitellüs kesesinin allontoise yakın olan duvarında, endoderm hücrelerinin aralarında belirmektedirler. Ekstraembriyonik ektoderme komşu olan proksimal epiblasttan, ekstraembriyonik ektodermal kökenli *bone morphogenetic proteinler* (BMP) 4 ve 8b ile

ekstraembriyonik endodermal kökenli *BMP2* sinyali ile oositlerin öncülleri (progenitor) olan primordial germ hücreleri (PGH) gelişmektedir [8-10]. *BMP4*'e yanıt olarak epiblast, germ hücre özelliklerine sahip olmaya başlamaktadır. Bir tür transmembran proteini olan *fragilis*, interferon ile uyarılır ve böylece germ hücreleri üzerinde salınarak germ hücrelerinin yetkinlik kazanmasına aracılık etmektedir. Yetkinlik kazanan germ hücrelerinin gonada ulaşmaları arka bağırsak (hindgut) mezenteri üzerinden gerçekleşmektedir. Yalnızca germ hücreleri üzerinde bulunan *stella* geni, *fragilis* tarafından uyarılır. Uyarılan *stella* geni, germ hücrelerinin somatik hücrelere dönüşmesi ve pluripotensinin (tüm hücre tiplerine dönüşebilme) devam ettirilmesine olanak sağlamaktadır [10,11]. Germ hücreleri, endoderm hücreleri arasına yerleşmeleri sırasında geçirdikleri mitotik bölünmelerle sayılarını arttıırırlar. Germ hücreleri gonada ulaştıklarında da mitotik bölünmeleri sürdüren germ hücreleri, fertilizasyona hazır hale gelebilmek için *gametogenez* sürecine girerler. Gametogenez, kromozom sayısının azalması ile karakterize olan *mayoz* ve hücrelerin olgunlaşması ile tanımlanan *sitodiferansiyasyon* olaylarını kapsamaktadır. Germ hücreleri, gonadal kabartılara ulaşamazlarsa gonadlar gelişim göstermez. Düzensiz şekilli kordonlar olan *primitif cinsiyet kordonları*, primordial germ hücreleri ilkel gonadlara ulaştıktan sonra, genital kabartıdaki çoğalan sölom epitel hücrelerinin mezenşim dokusunun iç kısımlarına doğru ilerlemesiyle oluşmaktadır. Primordial germ hücreleriprimitif cinsiyet kordonlarının arasında yerleşim gösterirler. Bu kordonlar her iki cinsiyetteki embriyoda da yüzey epiteline bağlıdır. Erkek ve dişi embriyolar gelişimin bu evresinde birbirinden ayırt edilemediklerinden bu dönemdeki gonada *farklılaşmamış gonad* adı verilmektedir.

6. haftaya ulaşan embriyoda, mezenşim doku içerisinde yerleşim gösteren primitif germ kordonları çoğalmalarını sürdürürerek birbirleri ile anastomozlar yaparlar ve alttaki mezenkim dokusundan tamamen ayrılarak çok sayıda hücre kordonu oluştururlar (Şekil 2.2). XX cinsiyet kromozomuna sahip embriyoda medullanın gerilemesiyle korteksten ovaryum gelişmeye başlar. XY cinsiyet kromozomuna embriyoda ise, korteks gerileyerek medulla testise farklılanmaktadır [1,5-7].



Şekil 2.2. 6 haftalık bir embriyonun lumbar bölgesinden geçen transvers kesitte farklanmamış gonad [5]

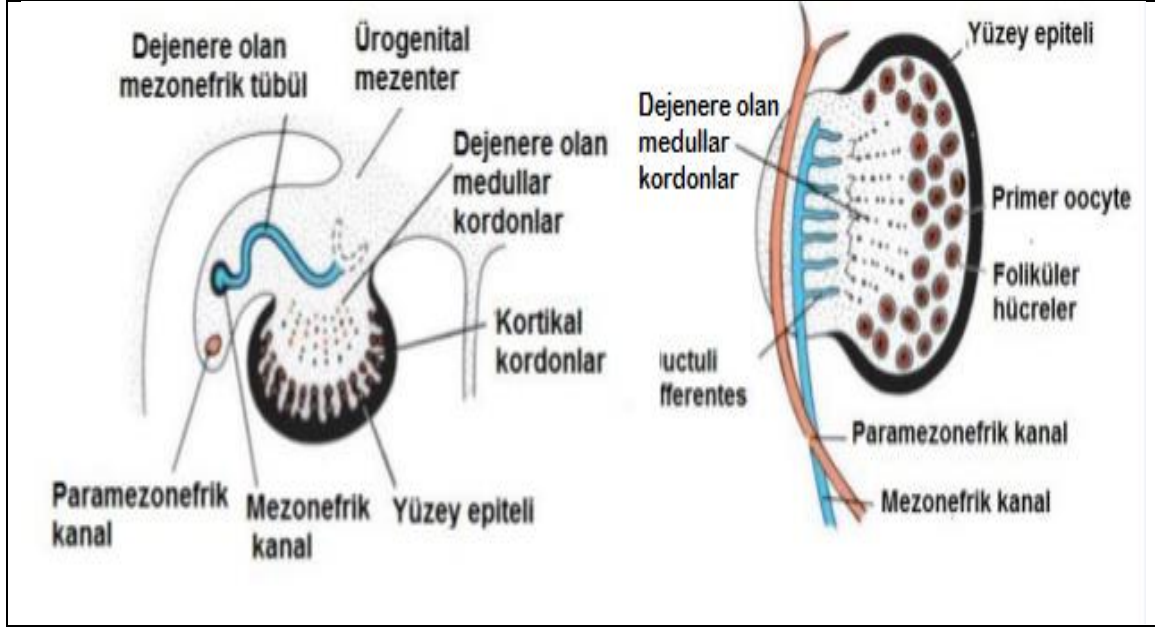
2.2.3. Ovaryumların Gelişimi

Cinsiyet kromozom yapısı XX olan ve Y kromozomuna sahip olmayan bir embriyoda, kordon özelliklerini kaybeden primitif cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümeleri halini alırlar. Daha çok ovaryumların medullar bölgesine yerleşmiş olan bu hücre kümeleri, primitif germ hücresi gruplarını içerir ve bir süre sonra kaybolarak yerlerini vasküler bir stromaya (medulla) bırakmaktadırlar [3,7].

Gelişiminin 7. haftasında, erkek gonaddan farklı olarak dişi gonadın yüzey epitelinin oluşturan sölom epiteli çoğalmaya devam eder. Hızla çoğalan sölom epiteli, altındaki mezenşim dokusunun içerisine gömülerek *sekonder germ kordonlarını* oluşturur (Şekil 2.3). Yeni oluşan sekonder germ kordonları sadece korteksde görülmektedir. Embriyonik gelişimin 10. Haftasında hacimleri artan kortikal kordonlarının içerisine primordial germ hücreleri yerleşmeye başlar [7].

Embriyo 16. haftasına ulaştığında, kortikal kordonların tümü bir veya daha fazla sayıda primitif germ hücresini çevreleyen izole hücre topluluklarına dönüşürler. Bu germ hücrelerinden zamanla oogonyumlar meydana gelirken, oluşan

oogonyumların yüzey epitelinden köken alan germ kordonları tarafından çevrenmesiyle de *folikül hücreleri* oluşur. Oluşan yapılar *primordial folikül* olarak adlandırılmaktadır (Şekil 2.3). Primordial folikülleri çevreleyen mezenşim dokusu ise *ovaryum stromasını* oluşturmaktadır [4,7].



Şekil 2.3. Gelişimin 7.haftasında, primitif cinsiyet kordonlarının dejenerasyonu ve kortikal kordonların oluşumu [5]

2.2.4. Oogenez

İlkel olan cinsiyet hücrelerinin olgunlaşma sürecine verilen isimdir. Oogenez, doğum öncesi dönemde başlamakta ve doğumdan sonraki dönemde de devam etmektedir.

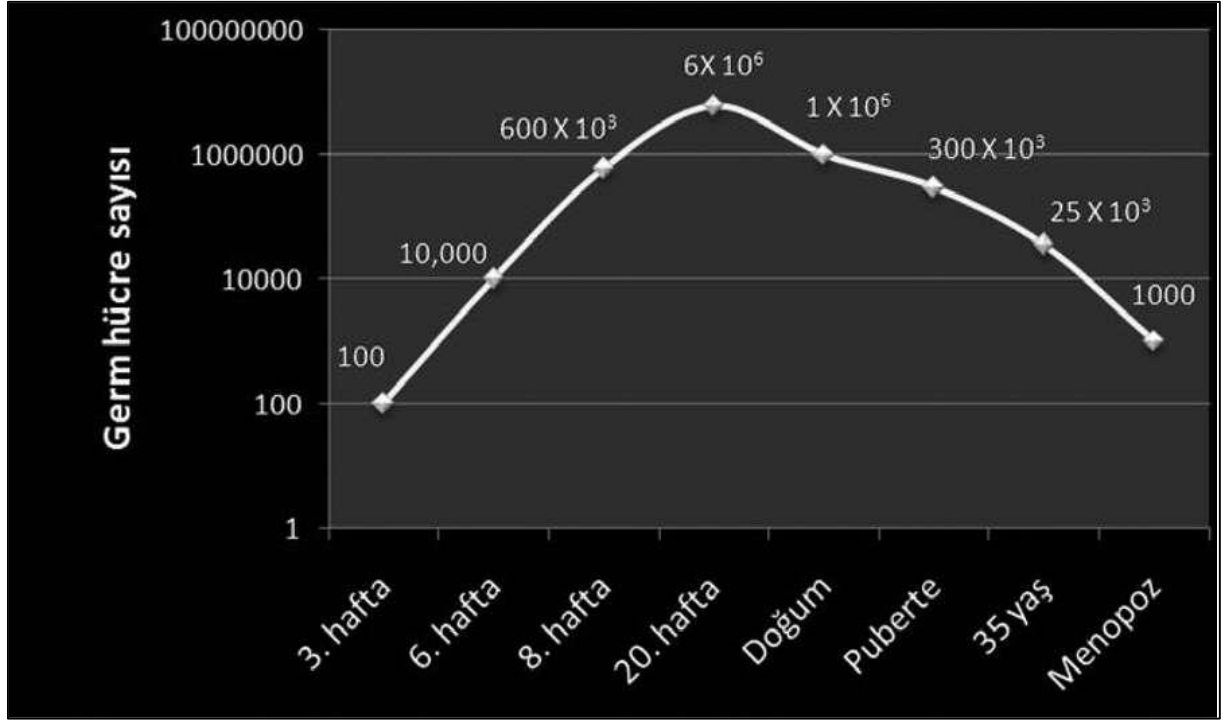
Doğum öncesi

İlkel cinsiyet hücrelerinin oogonyumlara farklanması, gonadlara taşınmalarının hemen ardından başlamaktadır. Oogonyumlar art arda geçirdikleri mitotik bölünmeler sonucu çoğalarak 3. ayın sonunda yassı epitel hücreleri ile çevrenmiş kümeler halinde dizilirler. Oogonyumların büyük bir çoğunluğu mitotik bölünmeleri sürdürmeye devam ederken, bir kısmı da 1. mayoz bölünmenin profaz evresinde bölünmesini durdurarak primer oositlere farklılanırlar. Hızla çoğalmaya devam eden oogonyumların sayısı 5. ayın sonunda yaklaşık 7 milyona ulaşır. Bu

aşamadan sonra hücre dejenerasyonu da başlar. Germ hücreleri ovaryumun oluşumu ve devamı için gereklidir çünkü hiç germ hücresi veya oositi olmayan ovaryum dokusu kord benzeri yapılara dejenere olmaktadır [7]. Bu nedenle oositler ve oogonyumların büyük bir kısmı dejenere olurlar. Dejenere olmayan primer oositler 1. mayoz bölünmeye girerek bölünmenin profaz 1 evresinde beklerler. Çevrelerindeki tek katlı yassı epitel ile birlikte primer oositler, *primordiyal follikül* olarak adlandırılırlar [1, 8, 9].

Doğum sonrası

Primer oositler 1. mayoz bölünmenin profaz aşamasını doğuma yakın bir zamanda bitirirler. Metafaz evresine girmeyerek, uzun bir dinlenme dönemine geçerler. Birinci mayoz bölünmenin tamamlanması pubertede ovulasyondan hemen önce gerçekleşmektedir. Primer oositlerin olgunlaşmasını bu zamana kadar engelleyen faktörün *OMI* (Oocyte maturation inhibitor factor) olduğu kabul edilmektedir. Dişi birey doğduğunda yaklaşık olarak 7×10^5 – 2×10^6 arasında primer oosite sahiptir. (Şekil 2.4) Fakat primer oositlerin birçoğu puberteye kadar atretik hale gelmektedir. Puberte başlangıcında yaklaşık 4×10^5 kadar primer oosit bulunmaktadır. Fertil dönem boyunca yaklaşık olarak 400-500 kadarı ovulasyon aşamasına gelebilmektedir. Primer oositler $2n$ (46) kromozoma sahiptir. Ovulasyona kadar 1. mayoz bölünmenin profaz evresinin, zigoten, pakiten, evrelerini geçirip, diploten evresinde kalırlar. Ovulasyona hazır hale geldiklerinde sekonder oosit oluşumunu sağlamak için metafaz evresi başlamaktadır. 1. mayoz bölünmenin sonunda n (23) kromozom içeren bir adet sekonder oosit ve bir adet de 1. polar cisim oluşmaktadır. Birinci sekonder oosit ve 1. polar cismin kromozom sayıları eşit fakat sitoplazma hacimleri farklılık göstermektedir. Daha sonra sekonder oosit 2. mayoz bölünme evresine geçer. Bu evrenin tamamlanması sperm ile döllenme sonrasında gerçekleşmektedir. Polar cisim kaybolur. İkinci mayoz bölünmede DNA replikasyonu olmaz. Dolayısıyla 23 adet kromozom içeren 2 hücre oluşur. Bunlardan birisi *ovum*, diğeri ise 2. *polar cisim* adını almaktadır [1, 8, 9].



Şekil 2.4. 20. haftadan itibaren atreziye uğrayan ve sayıları giderek azalan germ hücreleri [15]

2.2.5. Folikülogenez

Folikülogenez esas olarak folikül hücrelerinin ve bununla birlikte primer oositin ve folikülü çevreleyen stromanın büyümesi ile şekillenmektedir. Mayoz öncesi DNA sentezinin başlaması ile oogonial dönem sona ermekte ve oosit dönemi başlamaktadır. Oluşan oositler primer oosit adını almaktadır. Mayozun başlaması 8. ile 13. haftalar arasında, ilk folikülün olduğu 16. haftadan çok öncedir. Bu aşamada *Stra8* geni önemli bir yer tutar. Bu genin eksikliği farede premayotik DNA replikasyonunu, mayotik kromozom kondensasyonunu, kohezin, sinaps ve rekombinasyon oluşumunu engellemektedir [12]. Primordial folikülden primer folikül gelişimini neyin tetiklediği uzun yıllardır bilinmezken son zamanlarda özellikle transgenik hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar bize göstermektedir ki tek bir hormon ya da sinyal yolağından ziyade ovaryum içindeki farklı yapılardan (oosit, granuloza ve teka hücreleri, stroma) çıkan sinyallerin otokrin-parakrin etkileşimleri ile primordial foliküllerin primer foliküllere dönüştüğü bilinmektedir [13-16]. Bu veriler, neden izole edilen primordial foliküllerin kültür ortamında yaşayamadığı ancak doku kültürü içinde aktive olabildiklerini de açıklamaktadır

[17]. Ayrıca primordial foliküller FSH reseptörü barındırmadığından, primordial foliküllerin aktivasyonu için FSH'na gerek yoktur [16].

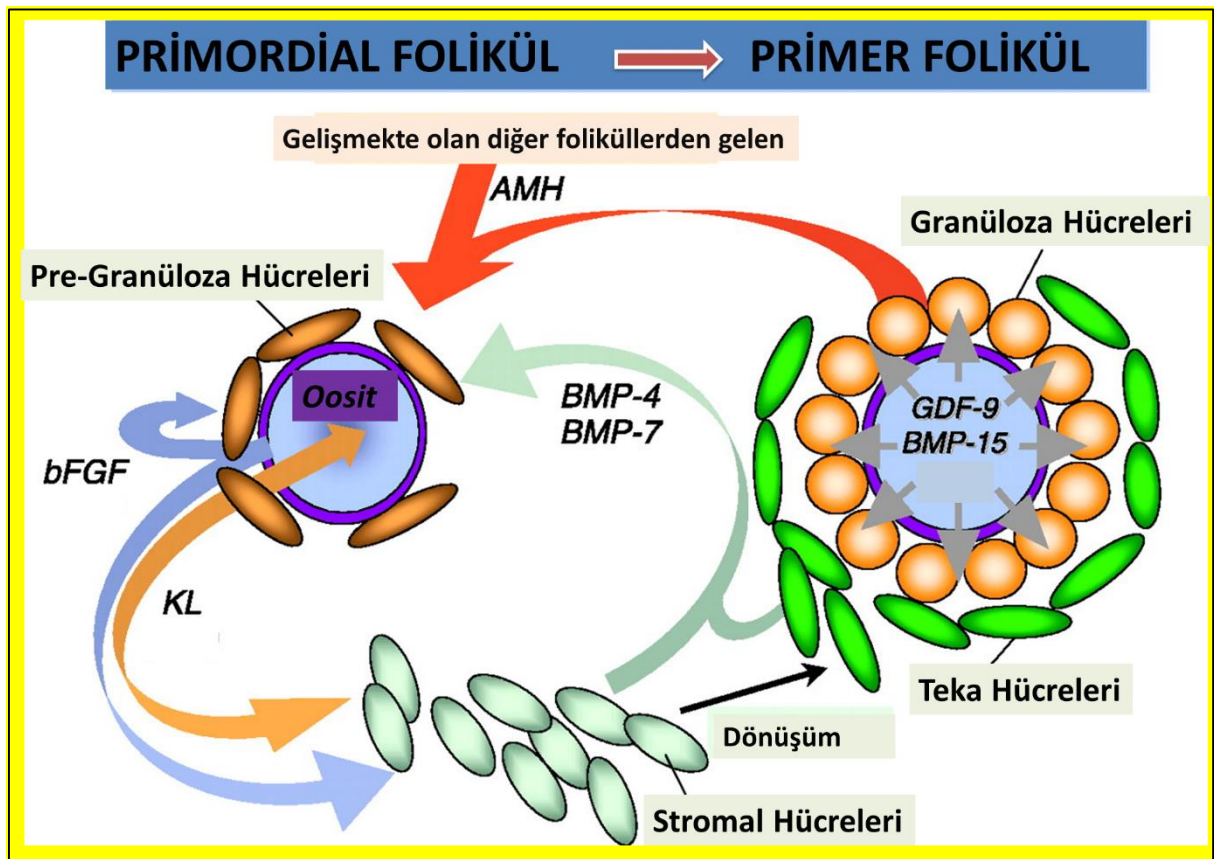
Anti-mullerian hormon (AMH, Mullerian inhibiting substance) transforming growth factor-beta (TGF- β) ailesinin bir üyesi olup, gelişmekte olan foliküllerin granüloza hücrelerinden salınmaktadır. AMH geni olmayan farelerde primordial foliküllerden primer folikül gelişimi hız kazanmaktadır. Bu durum AMH'un primordial folikülden primer foliküle geçişi inhibe ettiği görüşünü desteklemektedir [18,19]. Siklus içi ve siklusa AMH düzeylerinin az değişkenlik göstermesi nedeniyle son zamanlarda ovaryum rezervinin iyi bir belirteci haline gelmiştir. Yardımcı üreme tekniklerinden elde edilen oosit sayısı ve antral folikül sayısı da kan AMH düzeyleri ile ilişkilidir [20,21]

Primordial foliküllerin aktif olarak gelişmeye başlamasında rol alan bazı aktivatör sinyaller de bulunmaktadır. Transforming growth factor-beta (TGF- β) ailesinin bazı üyeleri bu aktivasyonda rol almaktadır. Bunlar; bone morphogenetic proteinler; BMP-4 ve BMP-7 (ovaryum stroma ve teka hücrelerinden salınan) [22,23]; büyüme farklılaşma faktörü-9 (growth differentiation factor-9) (oosit kaynaklı) [24-26]

Primordial folikülün primer foliküle gelişimini tetikleyen başka faktörler de bulunmaktadır. Bunlardan biri kök hücre faktörü olarak da bilinen *Kit-ligand* (KL)'dır. Granüloza hücrelerinde bulunur, reseptörü c-kit, oosit ve teka hücrelerinden salgılanmaktadır [27,28] Bir diğeri ise granüloza hücrelerinde salgılanan *lösemi inhibitör faktörü* (leukemia inhibitory factor = LIF)'dür [28]. LIF ayrıca, oosit büyümesi, primordial germ hücrelerinin çoğalması ve teka hücrelerinin stroma dokusundaki foliküllerin etrafına toplanmasına da aracılık etmektedir [27-29]. Yine teka hücreleri ve stromadan salınan *keratinosit büyüme faktörü* (fibroblast growth factor-7, FGF-7) ve FGF-2 de primordial folikülden primer folikül gelişimine hız kazandırmaktadır [27,30]. *İnsülin hormonu* da KL ve LIF ile aditif etki göstererek bu geçişi hızlandırmaktadır [28,31]. Germ hücrelerinden salınan *nobox* (newborn ovary homeobox) ve *Foxo3* (forkhead transcription factor) de primordial folikülün primer foliküle dönüşümünü

uyarmaktadır [32,33]. Ek olarak, ilerleyen yaş ve azalan ovaryum rezervi ile birlikte AMH düzeylerinin düşüşü daha fazla folikül büyümesini sağlamaya yöneliktir.

Preantral ve antral folikül gelişiminde TGF- β ailesinin üyelerinden ve granüloza hücrelerinden salınan aktivinler, teka hücrelerinden salınan BMP-4 ve BMP-7, oosit kaynaklı GDF-9 ve BMP-15 rol oynamaktadır (Şekil 2.5). İnsan ve kemirgen ovaryumlarından alınan doku kültürlerinde GDF-9 primer folikül ve büyümekte olan sekonder folikül sayısını arttırmaktadır [34-37]. GDF-9 geni olmayan farede folikül büyümesinin primer folikül aşamasında kalması da folikül büyümesinde GDF-9 geninin önemini göstermektedir [38-40]. Bunun yanı sıra, GDF-9 geni susturulmuş farelerde teka hücrelerinin bazal laminadaki yerleşimlerinde de bozulmalar tespit edilmiştir [41].



Şekil 2.5. Preantral-Antral folikül gelişimi

Preantral-antral aşamadaki folikül büyümesini uyaran bir başka faktör de *BMP-15*'dir. Oosit kaynaklı olan bu büyüme faktörü FSH'dan bağımsız olarak granüloza hücrelerinin proliferasyonundan sorumludur. Yani gonadotropine gereksinim

duyulmadığı erken folikül büyümesi döneminde, folikülün büyümesini BMP-15 sağlayabilmektedir. İlginç olarak, FSH reseptör ekspresyonu da BMP-15 tarafından inhibe edilebilmekte [42] ve follistatin BMP-15'in bu etkilerini antagonize etmektedir. *Follistatin* salgılanmasının en fazla dominant folikülde gerçekleşmesi, follistatinin dominant folikül seçimi sırasında folikülde yeterince FSH reseptörünün bulunmasını sağlamaktadır [43].

Preantral ve antral folikül gelişmesini hızlandıran diğer büyüme faktörleri *aktivin A* (granüloza kaynaklı) ve *TGF- β* (hem granüloza hem de teka hücrelerinden salınır) [44-48]. TGF- β 'nın 3 izoformu bulunmaktadır (TGF- β 1, β 2 ve β 3). TGF- β bioaktivitesi ilk olarak preantral folikülde görülmekte ve folikül büyüdükçe salınımı da artmaktadır [49,50]. İnsanda etkileri hala tam olarak netleşmemesine rağmen en azından rat modellerinde granüloza hücre proliferasyonu, progesteron üretimi ve FSH ile uyarılmış östrojen sentezinde rollerinin olduğu bilinmektedir [51,52].

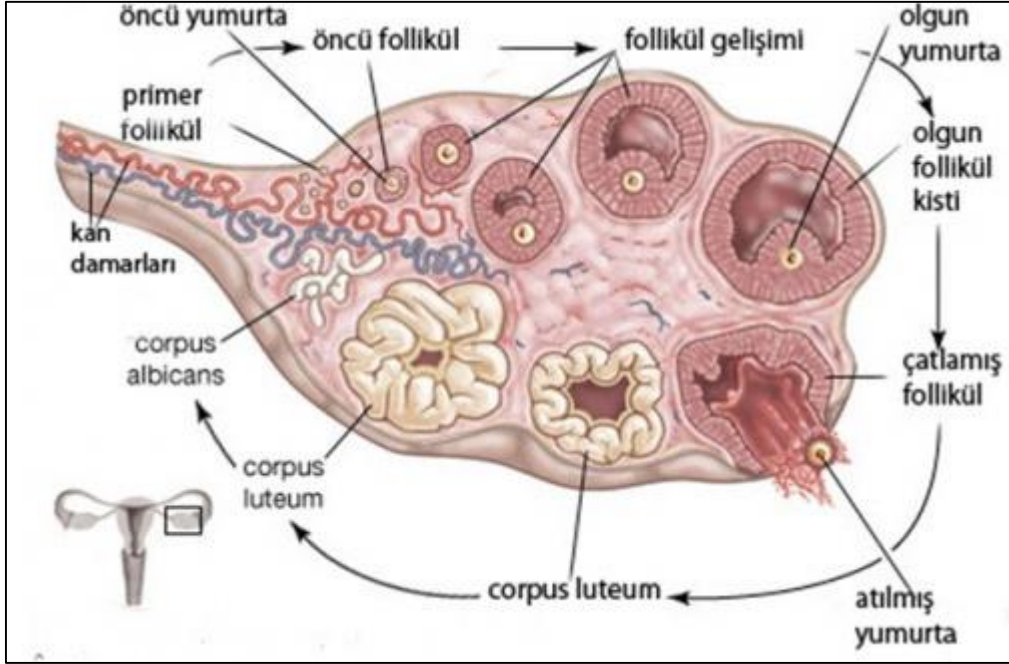
Granüloza hücrelerinde direkt kan akımının olmaması nedeniyle bazal lamina kan-folikül bariyeri gibi işlev görür ve granüloza hücrelerini damarlanmış teka hücrelerinden ayırır. Granüloza hücreleri geniş bir gap junction ağı ile kendi aralarında ve oositle sıkı bir ilişki kurarlar. *Connexin proteinlerinin* heksametik yapıdaki dizilimleri sayesinde hücreler arasında metabolik değişim, sinyal iletimi ve moleküllerin ulaşımı sağlanmaktadır. Yine bu sayede zona pellusida içinden oosit plazma membranına kadar uzanan gap junctionlar oosit ile de iletişim halindedirler. Connexin 43 ve 37 proteini yokluğunda folikül gelişimi primer ve preantral safhada kalmaktadır [52,53].

FSH, antral folikül döneminde folikül gelişiminin kritik bir belirleyicisidir. FSH'nun etkisiyle belli sayıda antral foliküllerden oluşan bir kohort büyümeye başlayarak dominant folikül seçimi için yarışa girer. Önceki yıllarda insan ovaryumunda tek bir büyüme faktörü ile siklik olarak antral foliküllerin seçildiği düşünülürken artık birden çok büyüme faktörünün varlığı antral folikül seçimini etkilediği kabul edilmektedir [54]. Antral foliküllerden oluşan kohort büyümeye devam ederken, kohortta yer alan foliküllerin steroidogenetik açıdan düzenlenmesi, gonadotropin yanıtlarının ve beraberinde olası bir prematür lüteinizasyonun inhibe edilmesi açısından kilit bir role sahiptir. Böylelikle belli foliküller FSH'na daha duyarlı kılınarak dominant folikül

seçimi için zemin oluşturulur. Mevcut bilgiler ışığında tüm bu olayların otokrin-parakrin düzeyde lokal olarak üretilen bazı hormonlar ile gerçekleştirildiğini göstermektedir [55,56]. Salgılama örüntüleri zaman ve mekansal özellik gösteren granüloza kaynaklı aktivin ve BMP-6, oosit kaynaklı GDF-9 ve BMP-15, teka kaynaklı BMP-2, -3b, -4 ve -7 olarak bu hormonlara örnektir [59].

2.2.6. Ovulasyon

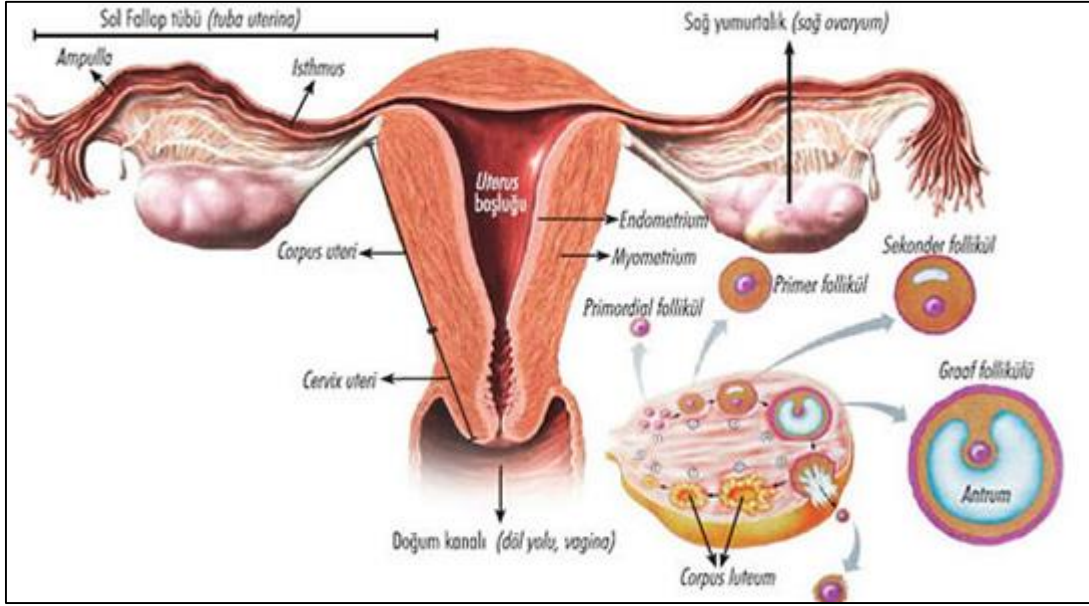
Yaklaşık olarak 28 gün süren menstrüel siklusun 13-15. günlerinde FSH ve LH'nin etkisiyle ovaryum folikülü olgunlaşarak ovaryum yüzeyinde kistik bir kabartı oluşur. Hemen ardından kabartının yüzeyinde *stigma* adı verilen küçük, damar ağı bulunmayan, nokta şeklinde bir yapı oluşur. Ortalama 12-24 saat içerisinde LH üretimindeki artışa bağlı olarak ovulasyon mekanizması tetiklenir. Ovulasyonun hemen öncesinde vezikül çıkıntısının üzerindeki ovaryan yüzeyin küçük bir alanında kan akımı durur. Daha sonra germinal epitelin makula pellusida ya da foliküler stigma adı verilen bölümü yükselerek yırtılır. Korona radiata ve kumulus ooforus hücreleriyle çevrelenmiş olan sekonder oosit yırtılan stigmadan folikül sıvısıyla birlikte atılır [57,58]. Bu atılım, prostaglandinin düz kasların kasılmasını uyararak folikül içi basıncını arttırması ile gerçekleşmektedir. Yırtılan folikülden çıkan sekonder oosit; zona pellusida, korona radiata ve kümülüs ooforus tabakası ile sarılarak *oosit-kumulus kompleksini* oluşturmaktadır. Öte yandan, LH artışına bağlı olarak primer oositin ilk mayoz bölünmesini tetiklediği düşünüldüğünden, sekonder oositlerin olgun ovaryum folikülünde bulunduğu bildirilmiştir (Şekil 2.6) [57-59].



Şekil 2.6. Ovulasyon [57]

2.3. Ovaryum Anatomisi

Uterusun her iki yanında yerleşmiş olan oval şekilli bir çift organdır. Ovaryumların boyutları erişkinlerde yaklaşık olarak 3-4/1.5-2/1 cm'dir. İç ve dış olmak üzere iki yüzü, ön (mezoovaryan) ve arka (serbest) olmak üzere iki kenarı, tubal (üst) ve uterin (alt) olmak üzere iki ucu vardır. Overler, uterusun iki yanında uteroovaryan ve infundubulopelvik (suspansor) ligamentlerle tutunmuş halde yerleşim göstermektedir [60]. Overler iç kenarından uteroovaryan ligament ile uterusu, dış kenarından infundubulopelvik ligament ile de pelvik duvarına bağlanmaktadır [61]. Overin damar ve sinirleri infundubulopelvik ligamentin içinde yer almaktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Overler ve Ligamentler

2.3.1. Ovaryum tutunma yapıları

Mesovarium: Ligamentum latum uterinin arka yaprağı olarak tanımlanır ve ovaryumun ön kenarına tutunmaktadır. Boyca kısa olduğundan ovaryumun sadece menteşe hareketini yapmasına olanak sağlamaktadır [62,63].

Ligamentum ovarii proprium: Ovaryumun alt ucunu, fundus uterinin yan köşesine bağlamaktadır. Yaklaşık olarak 2 - 3 cm uzunluğunda olup, kalınlığı ise 2 - 3 mm'dir. Yapısındaki düz kas ve elastik lifler gerektiğinde uzunluğunun değişmesine olanak sağlamaktadır. Lig. latum uterinin arka kıvrımını oluşturmasından dolayı önemli bir bağdır [62,63].

Fimbria ovarica: Tuba uterinadan başlayıp ovaryumlara doğru uzanan saçaksı uzantılara (fimbriae tubae uterinae) verilen isimdir. Ovaryumun üst ucuna uzanan bu uzantılar karın boşluğuna atılan ovumun tuba uterinaya taşınmasını sağlamaktadır [62].

Ligamentum suspensorium ovarii: Ovaryumun pelvis yan duvarında sabitlenmesini sağlayan periton katlantısıdır. Bu bağ aditus pelvisten başlayarak m. psoas major, a.iliaca externa, v. iliaca externa ve üreteri önden çaprazlayarak aşağıda

ovaryumun üst ucunda sonlanmaktadır. Elastik teller, düz kas lifleri ve ovaryumun damar ve sinirlerini içermektedir [62,63].

2.3.2. Ovaryum damarları

Ovaryumlar aorta abdominalis'ten 1. Lumbar vertebra düzeyinde ayrılan sağ ve sol arteria ovarica'dan beslenmektedirler [64]. Arteria ovarica, lig. suspensorium ovarii içinde ilerleyerek mesovariuma gelir ve mesovariumda arteria uterinanın bir yan dalı olan ramus ovaricus ile anastomoz yapmaktadır [65,66]. Ovaryuma hilum ovariden giren arter, pleksustan ayrılan medulla korteks sınırında oluşturduğu dallarıyla, foliküllerin çevresini saran zengin kapiller ağı oluşturmaktadır [67]. Damarların çapı döngü evrelerine göre değişim göstermektedir. Foliküllerin gelişimi sırasında genişleyen damarlar ovulasyondan sonra ise daralmaktadırlar [67].

Ovaryum venleri

Arterleri izleyerek hilum ovariden çıkan venler lig. latum içerisine uzanarak ovaryum ve tuba uterinanın yakınında plexus palpiniformis denilen venöz ağı oluşturmaktadırlar. Bu pleksustaki venler birleşerek tek bir ven olan v. ovaricayı meydana getirmektedir. Sağ vena ovarica v. cava inferior' a, sol vena ovarica ise v. renalis' e açılmaktadır [66,67].

Ovaryum lenf damarları

Ovaryumun lenf damarları a. - v. ovaricayı izleyerek, 1 - 2. Lumbar vertebra düzeyinde paraaortik lenf düğümüne (nodi lymphatici paraaorticus) açılmaktadırlar [65,68].

2.3.3. Ovaryum sinirleri

A. ovarica çevresinde yer alan plexus ovaricus aracılığı ile ovaryuma ait sinirler ovaryuma gelmektedir. Otonom sinir sistemine ait olan sempatik lifler, n. splanchnicus minor ve medulla spinalisin torakal segmentlerinden gelirken, parasempatik lifleri ise n. vagus aracılığı ile gelmektedir [68].

2.4. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumu dıştan *germinal epitel* denilen bir epitel tabakası çevrelemektedir. Bu epitelin hemen altında ise *tunica albuginea* adı verilen bir bağ dokusu tabakası bulunur. Ovaryum, korteks ve medulla olmak üzere iki esas kısımdan meydana gelmektedir.

Organın merkezi kısmını oluşturan *medulla*, gevşek fibroelastik bağ dokusu içerisinde çok sayıda geniş kıvrıntılı kan damarları, kollajen lif demetleri, elastik lif ağları, lenfatik damarlar, sinir demetleri ve çeşitli yönlerde uzanan düz kas liflerini bulundurlar. Elastik ve kollajen liflerin sayısı kortekse göre fazladır. Tüm bu yapıların yanı sıra medullada *interstisyel* ve *hilus* hücreleri de görülmektedir. Atrezik hale gelmekte olan foliküllerin teka interna hücrelerinden, küçük lipid damlacıkları içeren interstisyel hücrelerin olduğu düşünülmektedir. İnsanda menstruasyon öncesi insan ovaryumundaki bazı interstisyel hücreler östrojen salgılamaktadır. Bazı türlerde ise bu hücreler progesteron salgılamaktadır. İlk menstruasyon siklusu sırasında interstisyel hücrelerin çoğunluğu involusyon uğrar ve fonksiyonları azalır. Hilus hücrelerinin organel yapısı testisin leydig hücreleriyle benzerlik gösterir. Lipitçe zengindir ve hücre içinde reinke kristallerine benzer yapılar bulunmaktadır. Ayrıca hilus hücreleri steroid hormon olarak androjen salgılamaktadır [69-73].

Ovaryan *interstisyel hücreler*, kaynaklarına, gelişim ve farklılaşma dizilerine bağlı olarak birincil veya ikincil olarak tanımlanmaktadır. Birincil interstisyel hücreler, ilk olarak gelişmekte olan yumurtalığın fibroblastik doku içindeki stromal hücrelerinden farkedildiğinden foliküllerin büyümesi ile herhangi bir anatomik ilişkisi yoktur [74-76], ancak foliküllerden çıkıntı yapan granüloza hücre kordonları da bazı türlerde birincil interstisyel hücrelerin köken bölgesi olarak önerilmiştir [77].

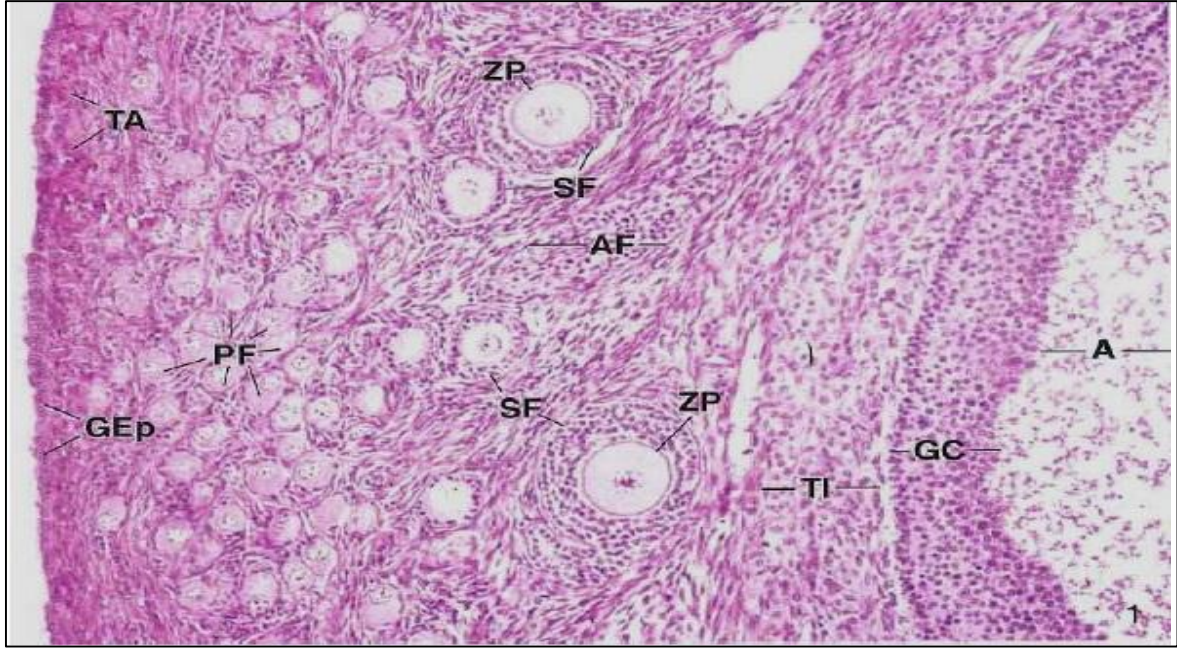
İkincil interstisyel hücrelerin ise atretik folikül hücrelerinden farkedildikleri bilinmektedir. Bu nedenle ikincil interstisyel hücreler, gelişmekte olan ve olgun ovaryumlarda folikül büyümesi ve atrezisi ile ilişkilidir. Bu işlevleri nedeniyle, teka tipi interstisyel hücreler olarak adlandırılmaktadır. Farklı memeli türlerinin yumurtalıklarında epitelyal kordonlar da dahil olmak üzere çeşitli interstisyel hücre

tipleri bulunduğu belirtilmekte ancak bu hücreler ile ilgili çalışmalar henüz tam olarak netlik kazanmış değildir [78,79]. Testiküler interstisyel Leydig hücreleri, endokrinoloji dahil olmak üzere elektron mikroskobu, histokimya, biyokimya ve fizyoloji gibi çeşitli tekniklerle kapsamlı bir şekilde araştırılmaları nedeniyle iyi bilinen steroidogenik hücrelerdir [80,81]. Ancak ovaryum interstisyel hücrelerinin steroidogenik aktivitesi tartışmalı olmaya devam etmektedir. Memeli ovaryum folikülleri ve korpus luteum karşılaştırıldığında, ovaryum interstisyel hücrelerin yapısına ve işlevine veya steroidogenik aktivitelerine ilişkin çok daha az veri bulunmaktadır. Bununla birlikte, elektron mikroskobik çalışmalar, her iki yapıdaki interstisyel hücrelerin, histokimyasal, biyokimyasal, fizyolojik ve endokrinolojik veriler tarafından da desteklenen bulgularla steroidogenik dokunun ultrastrüktürel özelliklerine sahip olduğunu göstermiştir [81].

Korteks, tunika albugineanın altında yer alan ve ovaryum foliküllerince zengin olan dış kısmı oluşturmaktadır. Ayrıca, bu foliküller bol miktarda hücre içeren bağ dokusu (stroma) içerisine gömülü halde yer alarak düz kas hücreleri tarafından çevrelenirler. Buna ek olarak, içsi yapıda fibroblast hücreleri de stroma içerisinde bulunmaktadır. Korteks ve medulla arasındaki sınır kesin olmamakla birlikte, hilumda korteks kesintiye uğrar ve mezovaryum medulla ile devam eder. *Rete ovarii* denen, fetal farklılaşmamış gonad artığı olan küçük, düzensiz, kör sonlanan kanallar da bu bölgede bulunabilmektedirler.

Primordial, sekonder (antral) ve tersiyer olmak üzere 3 ana başlık altında incelenen ovaryum folikülleri folikülogenez kısmında anlatılmıştır. Küboidal epitel, ovaryumları gelişimleri sırasında saran mezotelyal epitelden köken almıştır. Epitele germinal epitel adı verilmesinin sebebi ise, önceki yıllarda germ hücrelerinin buradan köken aldığı inancının yaygın olmasıdır. Zamanla bu inanış gerçekliğini kaybetmiş olsa da germinal epitel ismi kullanılmaya devam etmiştir. Günümüzde geçerli olan ise primordial germ hücrelerinin (hem erkek hem de dişide) gonad dışı bir kökene sahip olmasıdır. Primordial germ hücreleri farklılaşacakları embriyonik gonadın korteksine *yolk kesesi* duvarından göç ederler ve göç ettikleri embriyonik gonadın korteksinde ovaryumların farklılaşmalarını da uyarırlar. Germinal epitelin hemen altında ovaryumun beyazımsı rengini veren damarlardan fakir, yoğun, düzensiz kollajenden oluşmuş bir bağ doku tabakası

olan *tunica albuginea* bulunmaktadır. Tunika albuginea germinal epitel ile korteksi birbirinden ayırır [82]. Genel olarak ovaryumlar, dişi gametin üretiminden, steroid hormonların salınmasından (östrojen ve progesteron), doğum sonrası çocuğun üreme organlarının büyüüp gelişmesinden ve sekonder cinsiyet karakterlerinin oluşmasından sorumludurlar [83].



Şekil 2.8. Ovaryum dokusunun hematoksilin eozin (h&e) ile boyanmış kesiti. A: Antrum, GEp: Germinal epitel, TA: Tunika albuginea, ZP: Zona pellucida, PF: Primordiyal foliküller, SF: Sekonder foliküller, GC: Granüloza hücreleri, TI: Teka İnterna [19].

2.4.1. Primordiyal folikül

En küçük folikül (25µm çapında) tipi olmakla birlikte doğumdan sonra en fazla sayıda bulunan foliküldür. Primordiyal folikülde bulunan primer oosit, tek katlı yassı foliküler hücreler ya da granüloza hücreleri ile çevrelenmiştir [84]. (Şekil 2.8).

2.4.2. Primer folikül

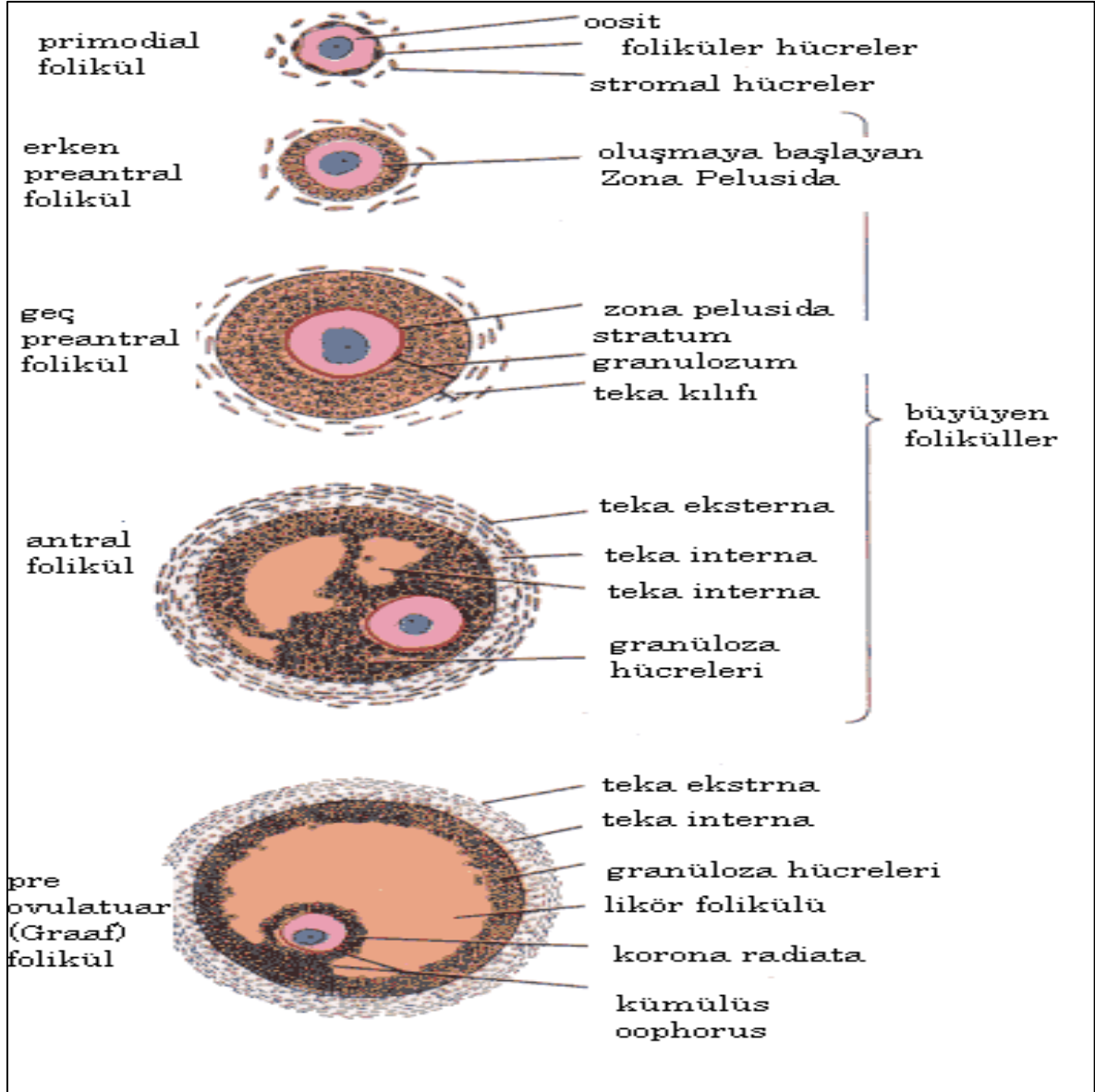
Primordial foliküllerin gelişmesiyle birlikte oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişimler meydana gelmektedir. İlk olarak oosit büyür ve onu çevreleyen folikül hücrelerinin sayısı artarak tek tabakalı kübik hale gelirler. Bu şekildeki foliküle *unilaminar primer folikül* denir. Folikül hücrelerinin

proliferasyonu ile oositin çevresi çok tabakalı folikül hücreleri ile çevrelediğinde *multilaminar primer folikül* oluşur. Bu aşamadan sonra folikül hücreleri *granüloza hücreleri* olarak isimlendirilir. Oosit büyürken içindeki organellerde de bir takım değişiklikler gerçekleşir. Oosit, folikül gelişimi sırasında kendi çevresinde, glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden zengin bir katman olan *zona pellusida* (ZP) oluşturur [85]. ZP, homojen, asidofilik, periyodik asit-schiff (PAS) ile pozitif reaksiyon gösteren ve oldukça iyi boyanan jel kıvamında bir yapıdır. Zona pellusida *ZP1*, *ZP2* ve *ZP3* denilen 3 farklı glikoproteinden oluşmaktadır. ZP granüloza hücreleri ve oositi birbirinden ayırır. Foliküler hücreler zona pellusidayı delip geçen sitoplazmik uzantılar aracılığıyla oositin mikrovilluslarıyla iletişim kurar. Primordiyal folikülün oluşumundan olgunlaşma aşamasına kadar ortalama 150 gün geçer ve olgunlaşan primer oosit 100-150 µm boyutuna ulaşır. Balbiani cisiminden çıkan golgi elemanlarının sitoplazmaya dağıldığı görülmektedir. *Balbani cisimciği* ultrastrüktürel düzeyde golgi mebranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulumun, çok sayıda mitokondriyonun ve lizozomların birlikte oluşturduğu bir yapıdır [86]. Foliküler gelişim sırasında granüloza hücrelerinin filopodları zona pellusida içine giriş yapar ve oolemma ile filopodlar arasında *gap junction* bağlantıları kurulur. Folikül hücrelerinin proliferasyonu ile oositin çevresi çok tabakalı folikül hücreleri ile çevrelediğinde multilaminar primer folikül oluşmuş olur [87,88] (Şekil 2.8).

2.4.3. Antral (Sekonder) folikül

Multilaminar primer foliküllerdeki granüloza hücreleri arasında içi folikül sıvısı ile dolu boşluklar görülmeye başlanır. Bu dönemde folikül *sekonder folikül* adını alır. Granüloza hücreleri çoğalır ve folikülün boyutu artarak 200 µm'den 10 mm'ye kadar ulaşır. Folikül duvarındaki küçük boşlukların giderek birleşmesiyle *antrum* adı verilen tek bir büyük boşluk oluşur. Granüloza hücreleri tarafından üretilen glikozaminoglikanlar, steroid bağlayıcı proteinler ve proteoglikanlar folikül sıvısının yapısında bulunur. Ayrıca folikül sıvısında progesteron, östrojen, inhibin, folikülostatin ve aktivin gibi hormonlar da bulunmaktadır. Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin proliferasyonu ön hipofizdeki gonadotrop hücrelerden salınan FSH'nin bazal düzeylerine duyarlıdır [89,90].

Yaklaşık 125 µm boyuta ulaşan, folikül içinde eksantrik yerleşim gösteren oosit, granüloza hücreleri tarafından folikül sıvısı içine salgılanan *oosit maturasyon inhibitörünün* (OMİ) etkisi ile büyümesini durdurur. Antrumu oluşturmak için granüloza hücrelerinin yeniden düzenlenmesi sırasında oositi de içeren *kumulus ooforus* adı verilen küçük bir çıkıntı oluşur. Zona pellusidaya komşu olan oositi çevreleyen granüloza hücreleri ise *korona radiatayı* oluşturur. Bu evrede teka tabakası gelişerek iç kısımda zengin damarlanmaya sahip *teka interna* ve dış kısımda stromaya benzer bir yapı gösteren *teka eksterna* tabakalarına ayrılır. Teka interna tabakasını oluşturan hücrelerin sitoplazmalarında, lüteinizan hormon (LH) reseptörleri, bol miktarda lipid damlacıkları, tübüler kristali, mitokondriyon ve düz endoplazmik retikulumdan zengin bir içerik bulunmaktadır. LH uyarısı ile teka interna hücreleri tarafından sentezlenen androjen öncülü androstenedion granüloza hücrelerine aktarılır ve FSH uyarımı altında bu hücreler tarafından üretilen aromataz enzimi aktivitesi ile androstenedion östrojene dönüştürülür. Dışta bulunan teka eksterna tabakası, içerdiği kollajen demetler ve düz kaslardan dolayı daha çok kapsül işlevine sahiptir. Teka eksterna katmanı ile ovaryumun stroması arasındaki sınır tam olarak belirgin olmamasına rağmen teka interna ile granüloza katmanı arasındaki sınır burada bulunan bazal lamina (membrana limitans eksterna) ile oldukça iyi belirlenmiştir [91,92].



Şekil 2.9. Ovaryum folikülleri [93]

2.4.4. Korpus luteum

Teka interna ve granüloza hücreleri ovulasyondan sonra bölünmeden büyüyerek, hormon salgılayan lutein hücrelerine dönüşürler. Böylelikle geçici bir endokrin bez olan *korpus luteum* (sarı cisim) oluşur. Korpus luteum, progesteron ve östrojen hormonlarını salgılar. Graaf folikülünde, ovulasyon sonrası iç basınç düşer ve teka katmanındaki kan damarlarından kan sızması ile kısa sürede folikül içine kan toplanmasıyla meydana gelen yapıya *korpus hemorajikum* (kırmızı cisim, korpus rubrum) adı verilmektedir. Döllenme gerçekleşmediğinde, ovulasyonu takip eden 9. günde korpus luteum maksimum boyuta ulaşarak ovaryum yüzeyinde sarımsı

renkte bir çıkıntı şeklinde gözlenir. Ardından luteal hücrelerin yıkıma uğramasıyla küçülerek fibrotik skar dokusu olan *korpus albicansı* oluşturur. Progesteron üretiminin azalmasıyla menstrual kanama başlar [97-99]. Öte yandan oositin döllenmesi gerçekleşirse, korionik gonodotropin (HCG) hormonu sinsityotrofoblastlardan salgılanarak korpus luteumun parçalanmasını engellemektedir. Bunun sonucunda büyümeye devam eden korpus luteum, *korpus luteum graviditatis* (gebelik korpus luteumu) dönüşmektedir. Luteal hücreler progesteron salgılamayı 4. ayın sonuna kadar sürdürür. 4. Ayın sonunda, progesteron miktarı gebeliğin sürdürülmesine yetecek düzeye ulaştığından plasentanın trofoblastik hücreleri dejenere olmaya başlar. Gebelik korpus luteumunun dejenerasyonu 4. aydan önce gerçekleşirse genellikle düşükle sonuçlanmaktadır [94-96,100].

2.5. Ovaryum Fizyolojisi

Kadın hormonal sistemi, bir diğerini yöneten üç ayrı hormon grubundan oluşmaktadır.

- Hipotalamik-serbestleştirici hormon (Gonadotropin- Releasing Hormon - GnRH)
- Hipofiz ön lobu hormonları olan FSH ve luteinleştirici Hormon (LH)'dur. Bu hormonların her ikisi de hipotalamusta sentezlenen GnRH etkisiyle salgılanırlar.
- Ovaryum hormonları olan östrojen ve progesteron hipofiz ön lobundan salınan FSH ve LH'ye yanıt olarak ovaryumlar tarafından salgılanırlar. Kadında aylık menstrual döngü sürecinde, bu hormonların salınımları değişkenlik gösterir. Döngünün farklı evrelerinde salgılanma hızları da farklıdır.

Hipotalamustan GnRH salgısı artma ve azalma şeklinde büyük değişiklikler gösterirken bu artma ve azalmalar aylık döngü sürecinde daha azdır. Hormonlar ortalama olarak her 90 dakikada bir salgılanmaktadır [101-104].

2.5.1. Hipotalamus-hipofiz-over aksı

Hipotalamus

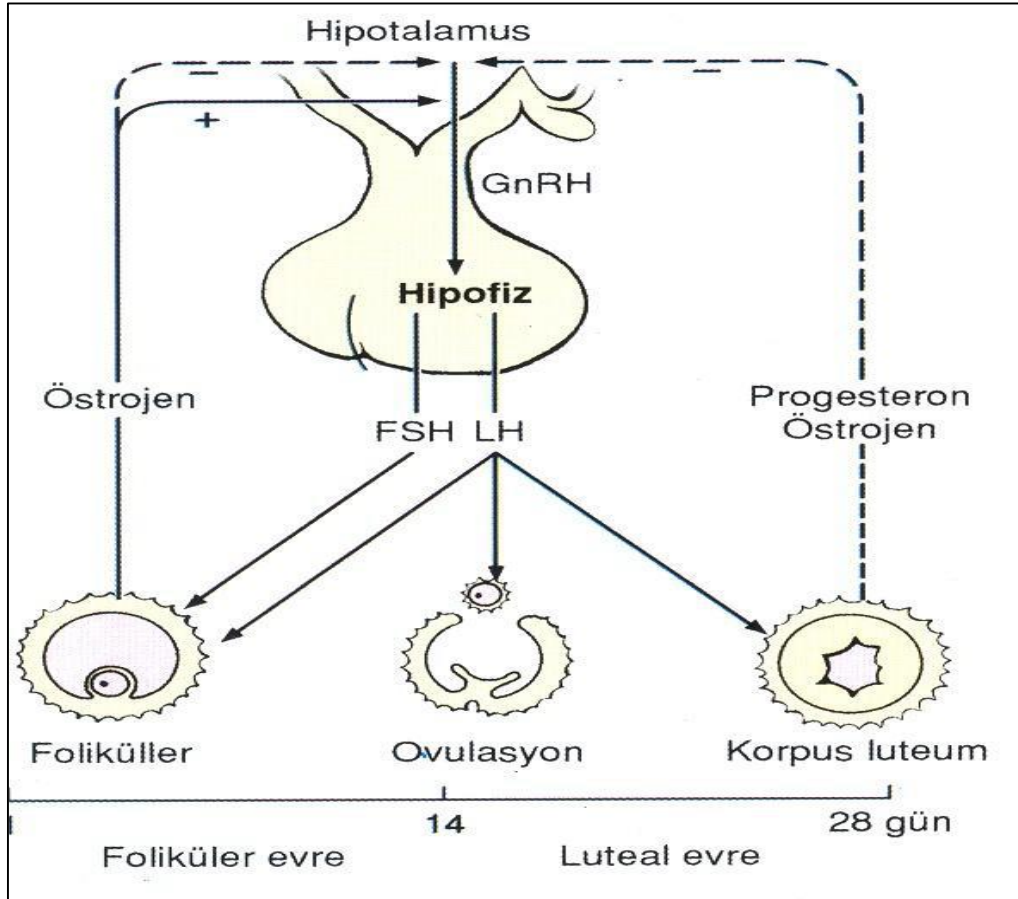
Nöronların salgıları olan gonadotropin serbestleştirici hormonlar (GnRH), hipotalamustan, portal sistem aracılığı ile hipofiz ön lobuna ulaşır. Santral sinir sisteminin üreme sistemini regüle eden en önemli araçlarından biri GnRH'tır. Hipofiz ön lobun pars distalisindeki bazofilik hücrelerin GnRH tarafından uyarılması ile FSH ve LH hormonları salgınır. GnRH üretimi, salgılanması ve depo edilmesi sırasında oluşabilecek anomaliler gonadlarda patofizyolojik bozukluğa yol açmaktadır. GnRH ön hipofiz hücre membranında yer alan özgün reseptörlerine bağlanarak uyarı oluşturmaktadır. Bu uyarının sürekli olması durumunda GnRH reseptörleri kapanarak gonadotropin sentezi azaltılmaktadır. FSH ve LH, memelilerde üreme hücrelerinin gelişerek olgunlaşmalarını, ovulasyonu, gebeliğin başlamasını ve devamını sağlarken ayrıca sekonder seks karakterlerinin ve meme bezlerinin gelişme ve büyümelerini de kontrol etmektedirler [104-106].

Foliküllerin gelişimini ve foliküler hücrelerden östrojen salgılanması FSH ile uyarılır. FSH, sekonder oositte, 1. mayoz bölünmenin tamamlanmasını uyararak ovulasyonu tetikler ve ovulasyondan sonra over içinde kalan folikülü korpus luteuma dönüştürür ve korpus luteumun progesteron salgınımı LH tarafından gerçekleştirilir. Östradiol, granüloza hücreleri tarafından üretilen ve doğurganlık dönemindeki kadınlarda en fazla bulunan hormondur [104,105].

Hipofiz

Over korteksinde yerleşik olan foliküllerin uyarılması için belli bir seviyede (eşik değerde) FSH salgınımına ihtiyaç vardır. FSH düzeyinin %10-30 kadar artışı foliküler gelişim için yeterlidir. Sağlıklı bir insanda meydana gelen siklusta FSH'nın eşik değeri kısa süreliğine aşmasıyla bir tane folikül oluşmaktadır. Öte yandan, FSH miktarının eşik değerin üzerinde bulunma süresindeki artış birden fazla folikülün meydana gelmesine de neden olabilmektedir. Dominant folikül seçimi de *erken foliküler dönem* olarak adlandırılan bu sürede gerçekleşmektedir. Dominant folikülden salgılanan östrojen ile sırasıyla FSH seviyesi düşerek foliküller atretik

forma dönüşürler. Dominant folikülün büyümesiyle granüloza ve teka hücrelerinden östradiol salınımı arttığı bu evre *midfoliküler* evre olarak tanımlanmaktadır. Östradiol miktarındaki artış, dişi genital sistemini ovulasyon, fertilizasyon ve implantasyona hazır hale getirir. Gelişmekte olan folikülden salgılanan östradiolün pozitif feed-back mekanizması ile hipofizi uyarması sonucu, ani LH yükselmesi gerçekleşir ve böylece ovulasyon olaylanır. LH'ın fazla miktarda salınmasıyla birinci mayoz bölünmesini tamamlayan oosit, metafaz II evresine gelerek olgunlaşmasını tamamlar ve böylelikle fertilizasyona uygun hale gelir. Bu sürece kadar östradiol salgılayan granüloza hücreleri, ovulasyonla birlikte progesteron salgılamaya başlarlar ve ardından lüteinize olurlar [104-108] (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Hipotalamus-Hipofiz-Over Aksı [109]

2.6.Tiroid Bezi Histofizyolojisi ve Hipotiroidi

2.6.1. Tiroid bezi fizyolojisi

Tiroid bezi, yuvarlak oval biçimli, içi kolloid dolu tiroid foliküllerinden oluşmuştur. *Folikül*, tiroid bezinin yapısal ve işlevsel birimidir. 100 – 300 µm çapındadır. Tiroid foliküllerinin duvarı, bezin işlevine göre tek sıralı yassı, kübik ya da prizmatik bir epitelle döşelidir [110,111]. Folikül epiteli, belirgin bir bazal lamina üzerinde oturmaktadır. Epitel hücrelerinin apikal yüzleri kolloid, bazal yüzleri ise bazal laminayla ilişki halindedir [112,113]. Tiroid bezinde iki tip hücre görülmektedir.

Foliküler hücreler, tiroid hormonlarını sentezlerler. Morfolojik olarak yassıdan prizmatikçe değişebilen tek sıralı hücrelerdir. Hücrelerin boyları tiroid bezinin salgı yapma durumuna göre değişmektedir. Aktif olarak hormon salgılayan hücreler prizmatik şekillidir. Folikül lümeninde salgıyı biriktiren hücreler başlangıçta kübik şekilli olup giderek yassılaşır. Bez dinlenme evresindeyken hücreler yassıdır. Folikül hücreleri kutuplaşmış hücrelerdir. Çekirdekleri oval ya da yuvarlak biçimli olup hücrede bazal ya da merkezi yerleşim göstermektedirler. Genelde iki çekirdekçik içermekte [114], sitoplazmaları granüllü yapıda ve bazofilik boyanmaktadır [115]. Hücreler bazal sitoplazmalarında çok sayıda granüllü endoplazmik retikulum içermektedirler. Apikal sitoplazmaları lizozom ve salgı granüllerinden zengindir. Mitokondriyonlar sitoplazmada dağılmıştır, fakat apikal sitoplazmada çok fazla sayıdadırlar. Foliküler hücreler ince yapı düzeyinde incelendiğinde apikal yüzde çok sayıda kısa mikrovilluslar ve yan yüzün üst bölümlerinde bağlantı birimleri içermektedirler [112,116]. Foliküler hücrelerde östrojen ve progesteron reseptörleri de bulunmaktadır [117]. Kolloidin ana bileşeni tiroid hormonlarının temel maddesi olan *tiroglobulin*dir. Tiroglobulin, tirozin aminoasidi rezidülerinden oluşur ve glikoprotein yapısındadır. Bu yapısından dolayı kolloid PAS ile pozitif tepkime göstermektedir [114,115].

Parafoliküler hücreler, folikül hücreleri arasında ve foliküller arası stromada tek tek ya da gruplar halinde bulunmaktadır. Bu hücrelerin foliküler hücrelerle ilişkileri olmasına rağmen, folikül lümenine ulaşamazlar. Foliküler hücrelere göre daha büyük yapıda, çok köşeli şekillere sahip ve sitoplazmaları daha açık boyanan

hücrelerdir. Sitoplazmalarında yuvarlak çekirdek, gelişmiş granüllü endoplazmik retikulum tubulusları, golgi kompleksleri, mitokondriyonları ve 60 – 550 nm çapında küçük salgı granülleri yer almaktadır [110, 112, 114]. Parafoliküler hücreler kurşunlu hematoksilen ile seçici olarak boyanmakta olup, immunohistokimyasal olarak ise kalsitonin monoklonal ve poliklonal antikorlar ile gösterilmektedirler [118]. Parafoliküler hücreler, DNES (Diffüz Neuroendokrin Sistem) hücrelerindendir. Bu hücreler kalsitonin hormonu salgılar ve sitoplazmalarında depolarlar.

Kalsitonin hormonu, kalsiyum düzeyi normalin üzerine çıkarsa, kan kalsiyum düzeyini düşürerek kalsiyum düzeyinin normale dönmesini sağlamaktadır [110,112, 119-121]. Parafoliküler hücreler kalsitoninden başka somatostatin de içermektedirler. Peptid yapısındaki bu hormonun yerel bir etkisinin olabileceği düşünülmektedir [122].

Tiroid hormonları, hipotalamustan salgılanan *Tiroid Releasing (salgılatıcı) Hormonun (TRH)* etkisiyle üretilirler. TRH, hipofiz ön lobundan salgılanarak TSH'nun kana bırakılmasını uyarmaktadır. TSH ise, tiroid bezinin hücreleri üzerindeki özgün reseptörlere bağlanarak folikül epitel hücrelerini tiroid hormonlarını üretmeleri için uyarıcı görev yapmaktadır.

Tiroid hormon salgısının tam olarak durduğu durumda, bazal metabolik hız normalin %40-50 kadar altına inerken, tiroid hormon salgısının aşırı olması durumunda, bu hız normale göre %60-100 kadar artmaktadır. Tiroid bezinden metabolik olarak aktif hormon salınımının %93'ü *T4* iken, %7'si *T3'dür*. Fakat *T4*'ün neredeyse tamamı dokularda *T3* haline dönüştürülmektedir. Bu iki hormonun fonksiyonları nitelik olarak benzerlik göstermekte birlikte etkilerinin hızı ve gücü bakımından farklıdır. *T3* hormonu, *T4*'e göre dört kat daha kuvvetlidir fakat *T3* hormonunun kandaki miktarı azdır ve dolaşımda bulunma süresi *T4*'e göre çok kısa sürelidir [123]. Tiroid hormon sentezinin ilk basamağı, tiroid bezi hücresi ve folikül içerisine kan dolaşımından iyodürün taşınmasıdır. İyodür, bazolateral membrandan tiroid folikül hücresi içine aktif taşımayla sodyum-iyodür taşıyıcısı ile alınmaktadır. Bu sodyum iyodür taşıyıcı sistemin işlevi, sodyum-potasyum taşıyıcısı ATPaz'ın sağladığı elektrokimyasal farklılığa bağlıdır. Aktif

iyodür taşınımı, sodyum-potasyum taşıyıcı sistem aracılığıyla olmakta ve iki sodyum iyonu ile bir iyodür iyonu hücre içine alınmaktadır. Bunun sonucunda folliküler hücre içindeki iyodür miktarı plazmaya göre 40 kat artırılmış hale gelmektedir [124]. Tiroid folikül hücresi bazal membranı, hücre içerisine iyodürü spesifik olarak pompalama yeteneğine sahiptir. Bu olaya *iyodür tuzağı* ismi verilir [123].

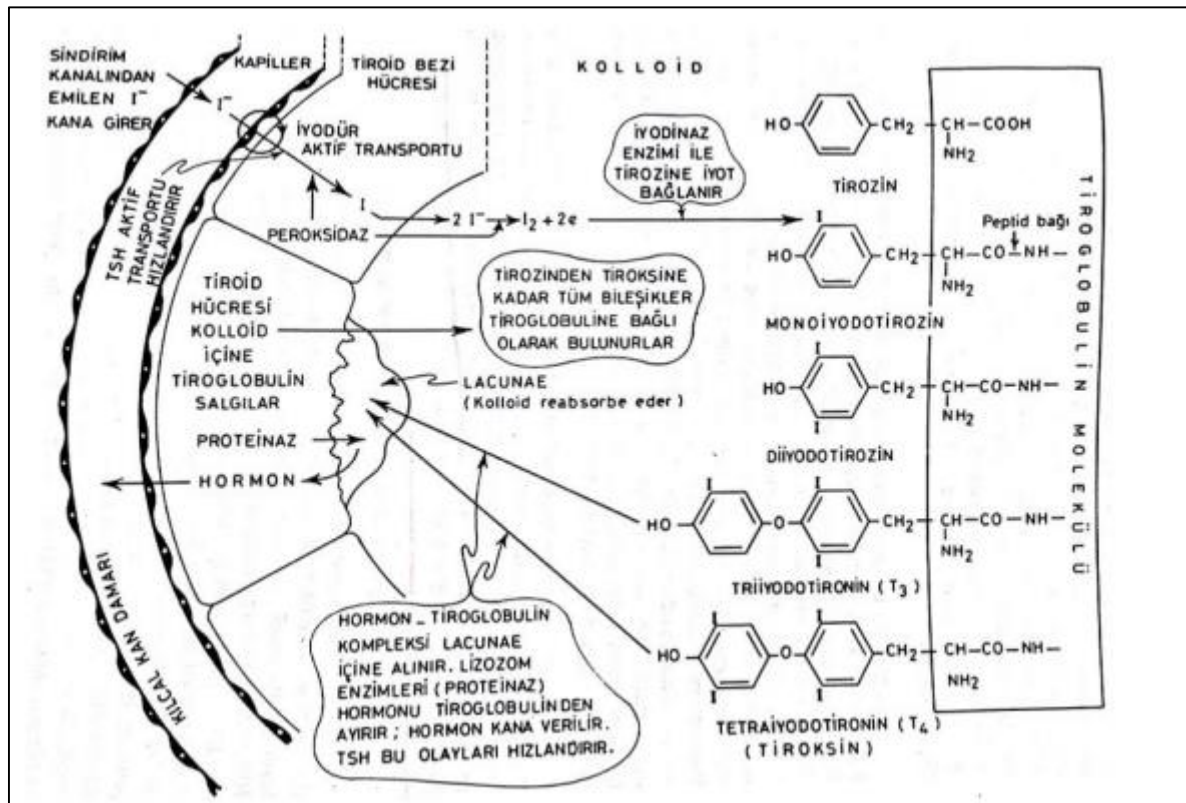
Tiroid hormonlarının oluşumundaki ilk temel basamak, iyodür iyonlarının okside formu olan *iyota* dönüşmeleridir. Herbir yeni oluşan iyot veya iyodür doğrudan tirozin aminoasitleriyle birleşebilme yeteneğine sahiptir. İyodürün oksidasyonu, peroksidaz enzimi ve hidrojen peroksit ile hızlandırılmaktadır. Peroksidaz sistemi engellendiğinde ya da kalıtsal olarak hücrede bulunmaması durumunda, tiroid hormonu üretim hızı sıfıra düşer. İyotun, tiroglobulin molekülüne bağlanmasına *organifikasyon* denir [123]. Tirozine ilk iyot eklenmesi ile *monoiyodotirozin* ve sonra *diyyodotirozin* oluşmaktadır. Tiroid hormonlarının sentezi sonrasında, her tiroglobulin molekülü 30'dan fazla tiroksin molekülü ve birkaç triiyodotironin molekülü içermektedir. Bu şekilde, vücudun normal gereksinimlerini yeterince karşılayacak miktarda tiroid hormonu, foliküller içinde 2 ila 3 ay depolanmaktadır. Tiroglobulinin kendisi, dolaşıma ölçülebilir miktarlarda salınmamaktadır.

Tiroid hormonunun salınım süreci basamakları;

- Tiroid follikül hücresinin apikal yüzeyinden çıkan psödopod uzantılar, küçük kolloid parçalarının etrafını sararak pinositik veziküller oluşturmakta ve bunlar hücrenin apeksinden içeri alınmaktadır.
- Lizozomlar hızlıca bu veziküllerle kaynaşarak dijestif enzimler içeren veziküllere dönüşmekte ve enzimler lizozomlardaki kolloidle karışmaktadır.
- Tiroglobulin molekülünün multiple proteazlarla parçalanmasıyla, tiroksin ve triiyodotironin serbest hale gelmektedir.
- Bu hormonlar tiroid hücre tabanından difüzyonla çevresel kapiller ağın içine girmektedir [123].

TSH, tiroid hormonlarının sentezi ve salınımı, hücre içi iyot alımı, hücrelerin hipertrofi ve hiperplazisi olmak üzere tiroid bezinin aktivitesini düzenlemektedir.

TSH, tiroid hücresi üzerindeki reseptörüne bağlandığında reseptörün hücre içine bakan kısmı birçok G-proteinini aktive etmektedir. Siklik AMP (cAMP) bağımlı protein kinazlar (PKA) aktive olmuş TSH reseptörünün birçok aktivitesine aracılık etmektedir. PKA sinyal yolağı da spesifik gen bölgelerindeki özel bölgeler ile iletişime geçecek olan cAMP cevap elementi modülatörü (CREM) ve cAMP cevap elementi bağlayıcı proteini (CREB) yolaklarını aktive etmektedir. Ayrıca TSH reseptörü, protein kinaz C (PKC) ve diasilgliserol (DAG) yolaklarını da aktive ederek IP3 bağımlı mekanizma aracılığıyla hücre içi serbest kalsiyum miktarını da geçici olarak arttırmaktadır. Aktive olmuş bu yolak sayesinde hücre içi iyot (I^-) alımının hızlanmasıyla, tiroid hormonlarının yapı taşı ve tiroid bezi fonksiyonlarının düzenleyicisi olan iyot, tiroid bezi fizyolojisinde ana rolü üstlenmektedir. Okside olmuş formda iyot (I_2) veya organik bileşikler halinde besinlerle vücuda alınan iyot sindirim ve emilim esnasında iyon halindeki iyodide indirgenerek dolaşımdan aktif taşıma yoluyla hormon sentezi için tiroid bezi hücrelerine alınmaktadır (Şekil 2.11) [125].



Şekil 2.11. Tiroid bezinde hormon sentezi ve salgılanması [126]

2.6.2. Hipotiroidizm

Tiroid bezinin periferik dokuların ihtiyacını karşılayacak düzeyde tiroid hormonu üretememesi durumuna *hipotiroidizm* denilmektedir. Tiroid bezinde en sık rastlanan fonksiyonel bozukluktur.

Üç temel sınıflaması vardır:

1. Ortaya çıkış dönemine göre; konjenital veya kazanılmış hipotiroidizm,
2. Endokrin bozukluğun seviyesine göre; birincil veya ikincil hipotiroidizm,
3. Şiddetine göre; klinik veya subklinik hipotiroidizmdir.

Birincil hipotiroidizm; tiroid bezinin kendisinden kaynaklanan tiroid yetmezliği durumu ile ortaya çıkmakta ve hipotiroidizm olgularının %99'unu oluşturmaktadır. Erişkinlerde görülen birincil hipotiroidizmin en sık sebepleri; kronik lenfositik tiroidit (Hashimoto hastalığı), radioiyodin tiroid ablasyonu, tiroidektomi, yüksek doz baş-boyun radyasyon terapisi, lityum, α -interferon ve amiodaron gibi ilaçların kullanımıdır. *İkincil (santral) hipotiroidizm* ise; tiroid yetmezliğinin hipofiz veya hipotalamusta meydana gelen bir bozukluk nedeniyle TSH üretiminin yetmezliğinden kaynaklan durumudur. Erişkinlerde görülen ikincil hipotiroidizmin en sık sebepleri arasında tümörler, inflamatuvar hastalıklar, infiltratif hastalıklar, enfeksiyonlar, hipofizer cerrahi, hipofizer radyasyon terapisi ve kafa travmaları yer almaktadır [117, 118, 121, 127].

Klinik hipotiroidizmde serum TSH düzeyi yüksek, serum FT4 düzeyi ise düşüktür. *Subklinik hipotiroidizm* ise hafif derecede tiroid yetmezliği olup, TSH değeri hafif-orta düzeyde artmış, FT4 değerleri normal değerler arasındadır. İkincil hipotiroidizmde her ikisinin de serum düzeyleri düşük değerlerdedir. Klinik hipotiroidizmin prevalansı yaklaşık olarak kadınlarda % 1-2, erkeklerde % 0.1'dir. Subklinik hipotiroidizmde ise bu değerler farklı popülasyonlarda % 4-10 arasında değişmekte ve kadınlarda görülme sıklığı daha fazladır. Subklinik hipotiroidizm yılda % 5-18 oranında klinik hipotiroidizme dönüşmektedir [117, 118, 121, 127].

2.6.3. Tiroid Hormonları ve Oksidatif Stres

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri/reaktif nitrojen türleri (ROS/RNS) ile antioksidan düzeyleri arasındaki dengenin, organizmada ROS/RNS lehine olması durumudur. Bu sebeple, lipid, protein ve DNA'da oluşan hasarlar da oksidatif hasar olarak tanımlanmaktadır [128]. Tiroid metabolizmasının çeşitli nedenlerle bozulmasına bağlı olarak oluşan hipotiroidizm ve hipertiroidizm, insan [129] ve evcil hayvanlar [130] için dünya çapında önemli metabolik hastalıklar arasında yer almaktadır. Tiroid hormonlarının enerji metabolizması üzerine etkileri 1895'te Magnus-Levy'nin hipotiroidili hastalarda bildirdikleri düşük, hipertiroidili hastalarda ise yüksek oksijen tüketimi ile yaklaşık yüz yıldan uzun bir zamandır bilinmekte ve yoğun bir şekilde bu konudaki araştırmalar devam etmektedir [131]. Tiroid hormonları aracılığı ile bazal metabolizmanın hızlanması sonucunda mitokondriyal solunum zincirinde ortaya çıkan reaktif oksijen türleri, vücutta oksidatif stresin oluşmasına neden olabilmektedir. Tiroid hormonlarının sıçan dokularındaki lipid metabolizmasını etkileyerek oksidatif strese neden oldukları bilinmektedir. Bozulan oksidan/antioksidan dengesi sonucu hücresel hasarlar ve çeşitli patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır. ROS lipid peroksidasyonuna [132], proteinlerin karbonilasyonuna veya glutatyonilasyonuna [133] ve DNA'da baz hasarlarına [134] sebep olmaktadır. Hipotiroidizm vakalarında bazal metabolik hızın düşmesiyle lipid peroksidasyon düzeylerinde ve serbest radikallerin oluşumunda azalma meydana gelmektedir. Benzer şekilde bu olgularda SOD aktivitesinde azalmaya bağlı olarak hücre membranı oksidatif dejenerasyon karşısında hassas duruma gelmektedir. Katalaz, glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi antioksidan enzimler H_2O_2 'nin su (H_2O) molekülüne parçalanmasına aracılık etmektedir [135]. Katalaz aktivitesindeki düşüş hücre içindeki endoplazmik retikulumun hasarına yol açmaktadır [136]. 6-propil-2-tiourasil (PTU) ile indüklenen hipotiroidizm oluşturulan sıçanların böbrek dokularında lipid peroksidasyonunun ve protein karboksilasyonunun arttığını ancak SOD-1 ve SOD-2'nin mRNA'da ekspresyonunun azaldığı, katalaz (CAT) aktivitesinin düştüğü ve GSH-Px aktivitesinde ise değişme olmadığı bildirilmiştir [137]. Deneysel hipertiroidizm ve hipotiroidizm oluşturulan sıçanların kalplerinde, hipertiroidizm grubunda SOD değerinin belirgin olarak arttığı, GSH-Px değerinin her iki grupta da kontrol grubuna göre arttığı ve CAT değerinin ise hipertiroidizm grubunda önemli düzeyde

arttığı bildirilmiştir [138]. Hipotiroidizmli hastalarda NO, SOD ve total antioksidan seviyelerinde bir değişim gözlenmediği ancak hipertiroidizmli hastalarda NO ve total antioksidan seviyelerinde belirgin bir düşüş gözlemlendiği, SOD aktivitesinde ise belirgin bir artış olduğu bildirilmiştir [139]. Deneysel hipotiroidizm oluşturulan sıçanların kontrol grubundakilere göre daha yüksek plazma ve doku MDA, plazma NO₂, NO₃ ve doku total antioksidan seviyelerine sahip olduğu bildirilmiştir [140]. Hipotiroidi oluşturulan sıçanların genomik DNA'larındaki 8-oxodG düzeylerinin düştüğü ancak hipertiroidi oluşturulan sıçanlarda kontrol grubundaki sıçanlara oranla belirgin bir farklılık görülmediği bildirilmiştir [141]. Fare kalbindeki mitokondriyal DNA 8-oxodG düzeyinin hipotiroidili farelerde belirgin olarak azaldığı ancak hipertiroidili farelerde ise düşük olduğu bildirilmiştir [142].

2.6.4. Tiroid bezi ve ovaryum ilişkisi

Ovaryumdaki granüloza hücrelerinde TSH reseptörlerinin varlığı ilk olarak 1993 yılında gösterilmiştir [143]. 1999 yılında Cecconi ve arkadaşları T3'ün granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir [144]. T3 gen ekspresyonu yüksek oranda nükleer tiroid hormon reseptörleri ailesi aracılığıyla düzenlenmektedir. İnsan TR α geni kromozom 17'de ve TR β geni kromozom 3'te bulunmaktadır. Memeliler 3 değişik reseptör izoformu eksprese etmektedir (TR α -1, TR β -1 ve TR β -2). Her biri hedef genlerin transkripsiyonunu düzenleyerek T3'e cevabı yönlendirebilmektedir. Ayrıca, c-erbA α -2, TR α geninin alternatifi olarak ayrılmış bir üründür ve TR olarak iş göremez. Fakat çok yüksek oranda eksprese edildiğinde tiroid hormon etkisinin liganddan bağımsız inhibitörü olarak davranmaktadır [145]. TR mRNA izoformu dokuya özel şekilde eksprese edilmekte ve ekspresyon düzeyi gelişme sırasında regüle edilmektedir [146]. İki TR izoformu, α -1 ve β -1, insan mural granüloza hücrelerinde saptanmıştır [143]. Oositler ve kumulus hücreleri TR mRNA eksprese eder ve foliküler sıvı değişken ama anlamlı miktarda serbest T3 içermektedir [147].

2.6.5. Tiroid hormonlarının ovaryum üzerine etkileri

Primer hipotiroidizm ile ilgili olarak en kapsamlı epidemiyolojik veriler, kuzeydoğu Birleşik Krallık'taki Whickham County'de yaşayan 18 yaş ve üstü bireylerin

popölasyona dayalı bir çalışmasından elde edilmiştir [148,149]. Veriler, İsveç, Japonya ve Amerika Birleřik Devletleri'de de benzer rakamlar bildirildiği için diğer ölkelerin temsilcilerini de temsil etmektedir [150]. Özellikle subklinik hipotiroidizm (SCH), belirgin yoğunlukta kadınlarda ve ilerleyen yaşla birlikte artan bir durumdur. Çoėu vaka kronik otoimmün tiroidite (yılda 1000 kadın başına 3.5 insidansı) neden olur, bunu tirotoksikoz için yıkıcı tedavi takip etmektedir (yılda 1000 kadın başına dűřen insidans). Belirli bir zamanda kadınlarda gelişen spontan hipotiroidizm olasılığı, yaşları 20 ile 25 ve 75 ile 80 arasında olmak üzere yılda 1000 ile 1.4 arasında artar.

Subklinikden (SK) aşırı hipotiroidiye (OH) doğru ilerlemek için spesifik risk faktörleri tiroid antikorlarının ve yüksek TSH'nin varlığıdır.

Hipotiroidili kadınlarda androstenedion ve estronun metabolik klerensi azalmış ve periferik aromatisasyonda artış gözlenmiştir [151,152]. Hipotiroidili kadınlarda 5 α / β oranında androjen metabolitleri de azalmıştır ve 2 oksijenli östrojenlerin atılımında bir artış görölmektedir. SHBG'nin plazma bağlama aktivitesi azalmakta bu da hem toplam testosteron hem de E2'nin plazma konsantrasyonlarında azalmaya neden olmaktadır. Ancak bu hormonların bağlanmayan kısımları artış göstermektedir. Ötiroid durum giderildiğinde steroid metabolizmasındaki değişiklikler ortadan kalkmaktadır. Gn seviyeleri genellikle normaldir [153]. Bununla birlikte, bazı hipotiroidili kadınlarda GnRH'ye gecikmiş LH cevabı bildirilmiştir. Gecikmiş bir LH cevabı olduğunda, serum prolaktin (PRL) konsantrasyonu artar, bu durum hem TSH hem de PRL salgılanmasını arttıran hipotalamik TRH'ye bağlı olabilmektedir. Galaktore de oluşabilmekte fakat bu rahatsızlıklar genellikle T4 uygulamasından sonra kaybolmaktadır [154].

Doğurganlık ağındaki kadınlarda, hipotiroidizm, döngü uzunluğunda ve kanama miktarında (oligomenore ve amenore, polmenore ve menoraji) değişikliklere yol açmaktadır. Kanama miktarındaki değişiklikler olasılıkla anovölasyona sekonder östrojen atılımına bağlı kanamadan kaynaklanmaktadır [155]. Hipotiroidizmde ortaya çıkan hemostaz faktörlerindeki (VII, VIII, IX ve XI faktörlerinin azalması gibi) defektler polmenore ve menorajiye katkıda bulunabilmektedir [156].

Primer miksödemli hastalarda, adet bozukluğu, amenore, klinik hemorajik metropati ve menoraji olguları görülmektedir [157]. Hipertiroidizmlili hastalardan tedavi sonrasında hipotiroidi geliştirmiş olanlarda yine benzer şekilde menoraji, polimenore veya her ikisi birlikte görülmektedir [158]. Hipotiroidik kadınlarda tek başına menoraji olmak üzere adet düzensizlikleri de görülmektedir [159]. Ayrıca, oligomenore, hipomenore ve hipermenore bulguları da görülmektedir [160].

Tüm bu bulgular birlikte ele alındığında, hipotiroidizmde menstrual bozuklukların sıklığının sağlıklı insanlara göre yaklaşık üç kat daha fazla olduğu görülmektedir. Hipotiroidili kadınlarda görülen ana adet düzensizliği, en sık görülen semptom olduğu düşünölen amenore ve yaygın göröldüğu düşünölen oligomenoredir [161,162]. Hipotiroidinin şiddetli olduğu kadınlarda daha ciddi menstrual rahatsızlıklara sahip olma eğilimi olmasına rağmen, farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamaktadır. Ayrıca, tiroid antikorlarının varlığının, hipotiroidizmde menströel anormalliklerin meydana gelmesinde önemli bir faktör olmadığı belirtilmektedir [163].

Subklinik hipotiroidi ve infertilite arasındaki ilişki retrospektif ve kontrolsüz değeriendirilse de, 25-34 yaş aralığındaki infertil kadınlarda yüksek TSH değeriilerine bağlı olarak subklinik hipotiroidi görölmektedir [163]. Subklinik hipotiroidi tanısı konulan infertil kadınlar T4 ile tedavi edildiğinde, progesteron salgılanması normalleşmekte ve gebe kalma durumları gerçekileşmektedir [164].

Erken foliköler fazda bazal TSH, LH ve testosteron konsantrasyonları arasında pozitif kolerasyon vardır. Ayrıca yüksek TRH ile uyarılan kadınlarda normal TSH cevabı olan kadınlara kıyasla daha düşük oranda gebe kalma durumları vardır [165].

İnfertil kadınlarda subklinik hipotiroidi prevalansı retrospektif olarak incelendiğinde TSH düzeylerinin artmadığı görölmektedir [162].

Miksödem tanısı konulan hastalarda, adet düzensizlikleri, proliferatif endometrium ve anovulasyon görölmektedir [157].

T3 seviyelerindeki değişimler östrus döngüsü regölasyonu, fertilité, fetal gelişim ve laktasyonu etkilemektedir. Benzer şekilde yumurtalıkları alınan ve çiftleşme davranışları T3 uygulaması ile engellenen kemirgenlerde östrojenin aracılık ettiği üreme davranışları olumsuz etkilenmektedir. Tiroid bezi ayrıca mevsimsel olarak üreyen hayvanlarda anöstrus durumuna geçiş için gereklidir. Örneğin, koyunlarda anesteziyi başlatmak için üreme mevsiminin sonunda normal serum T3 konsantrasyonlarının bulunması gerekmektedir. Ancak sonraki üreme mevsiminin anöstrus ve zamanlamasının korunmasında T3 etki göstermemektedir [166]. Gebelik, kemirgenlerde tiroid hormonlarının durumunu değiştirmektedir. Sıçanlarda gebelik, toplam T4 ve T3 konsantrasyonları ve genişlemiş tiroid bezi hacmi ile sonuçlanmaktadır. Bununla birlikte, insanlardan farklı olarak, gebe sıçanlarda iyot alımı azalmakta ve idrar iyodür atılımı gebeliğin son günlerinde değişmeden kalmaktadır [167].

Tüm bunlara ek olarak yüksek miktarda tiroid hormonu uygulamasının, serum LH'sinde bir azalma ile hipofizdeki LH'de bir artış (veya değişme) meydana getirdiğini göstermektedir. Son olarak, domuz granüloza hücrelerinin farklılaşmasını uyarmak için tiroid hormonlarının FSH ile sinerjistik bir etkisi de bildirilmektedir [168].

Sıçanlarda fetal hipotiroidizm, lipit ve kolesterol eksikliği olan küçük ovaryumlarla sonuçlanmaktadır [165]. Cinsel olarak olgunlaşmamış sıçanlarda PTU ile indüklenen hipotiroidizm ve tiroidektomi gecikmiş vajinal açıklık ve daha küçük ovaryumlar ve folliküllerle birlikte cinsel olgunlaşmanın yanı sıra kötü gelişmiş uterus ve vajina ile sonuçlanmaktadır [169]. Hipotiroidi yapılan yetişkin dişi sıçanlar, düzensiz östrus döngüsü ve ovaryum atrofisi geçirmektedir. Ayrıca, hipotiroid sıçanlarda büyük kistik ovaryumların gelişmesiyle birlikte hCG'ye daha fazla yanıt alınmakta ancak birkaç korpus luteum tanımlanmaktadır [170].

Olgun dişi hipotiroid fareler infertildir, ancak infertilite nedeni henüz tam olarak aydınlatılmamış olsa da, genç hipotiroid farelerde ise infertilitenin nedeni çiftleşmeden önce T4 uygulaması ile tersine çevrilebilen bozulmuş foliküler gelişmeye bağlı olduğu düşünülmektedir [171].

2.7. Arı Sütü

1623 yılında, sadece kraliçe arı için üretildiği ve arılardan elde edilen ürünler arasında (Resim 2.12), en zengin besin maddesi olarak keşfedilmiştir. İngilizce’de önce krallara özgü anlamına gelen “Gelatine Reale” adı kullanılmış, daha sonra da “Royal Jelly-Arı sütü” adı verilmiştir [172].



Resim 2.12. Bal peteği içine salgılanan arı sütü [173]

Genç (5-15 günlük) işçi arıların, hipofaringeal ve mandibular bezlerinden salgılanan bir maddedir. Kraliçe arı ve işçi arılar arasındaki farklılaşma, larva dönemi süresindeki beslenmeyle ilişkilidir. Döllenmiş arı yumurtalarının tamamı ilk dört gün boyunca, arı sütüyle beslenir ve tümünden kraliçe arı gelişebilmektedir. Ancak, sadece larva gelişim döneminin tamamında arı sütü ile beslenenlerden kraliçe arı oluşmaktadır [174]. Bu beslenmeden dolayı, kraliçe arı ile işçi arılar arasında birçok açıdan önemli farklılıklar gözlenmektedir. Morfolojik gelişimlerinde arı sütü ile beslenerek larva dönemlerini tamamlayan kraliçe arıların, üreme organları iyi gelişirken, işçi arıların kovanda yapılan işlerle ilgili olarak polen sepeti, mandibulaları, kuluçka salgı bezi ve balmumu salgı bezleri gibi organları iyi gelişmektedir. Yaşam süreleri kıyaslandığında, kraliçe arılar birkaç yıl yaşayabilirken, işçi arılar sadece birkaç ay yaşayabilmektedirler. Ayrıca larva dönemlerindeki yaşam süreleri de, birbirinden farklılık göstermektedir. Kraliçe arıların bu dönemi 15,5 gün iken, işçi arılar 21 günde bu dönemi tamamlamaktadır. Davranış

farklarında ise, kraliçe arılar günde birkaç bin adet yumurta bırakırlarken, işçi arılar ara sıra yumurta bırakmaktadırlar. Kraliçe arılar kovanla ilgi aktivitelere katılmazken, işçi arılar kovan ile ilgili ortak faaliyetlere katılmaktadırlar [175].

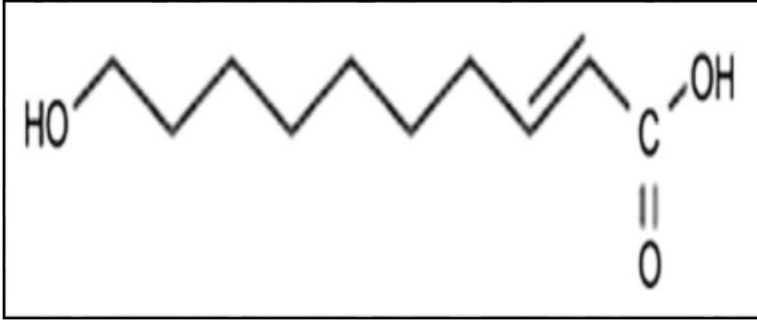
Arı sütü morfolojik olarak beyazımsı kemik renginde olup, zamanla sarımtırak renge dönüşen, homojen karaktere ve kremsi bir kıvama sahiptir. Kendine has kokuya, yakıcı-ekşimsi bir tada, yaklaşık 1,1 g / cm³ yoğunluğa sahiptir ve suda kolaylıkla çözünebilen karakterdedir [176,177]. Arı sütünün saklanma koşulları değiştiğinde, fiziksel özelliklerinde de değişim görülebilmektedir. Mesela 5 °C'de saklanan arı sütündeki renk ve viskozite, oda sıcaklığında saklanan arı sütünden farklıdır. Ancak -40 °C'de saklanan arı sütünde, değişim gözlenmemektedir [174].

Arı sütünün temel bileşenleri; su, proteinler, karbonhidratlar, yağlar, vitaminler ve minerallerden oluşmaktadır. Bu maddeler; %60-70 oranında su, %12-15 oranında protein, %10-12 oranında karbonhidrat, %3-7 oranında lipid, %0,5-2 oranında esansiyel aminoasitler, %0,8-4 oranında tanımlanamayan maddeler olarak arı sütünün içeriğini oluşturmaktadır [179] (Çizelge 2.1). İçinde barındırdığı biyolojik aktiviteye sahip vitaminlere; tiamin, niasin, riboflavin gibi pek çok örnek verilebilir. Ayrıca arı sütünün içinde; kalsiyum, potasyum, sodyum, demir gibi mineraller de bulunmaktadır [179].

Çizelge 2.1. Arı sütünün bileşimi

İçerik	Miktarı (%)
Su	57-70
Protein	11-17
Karbonhidrat	11-13
Yağ	4-5
Mineraller	2,34-3,34
Na, K, Ca, Fe, Cu, Mg, Mn	Eser miktarda
Bilinmeyen Maddeler	2-3

Arı sütünün temel bileşenlerinden olan 10-hidroksi-2-dekenoik asit (10 HDA), arı sütünün kalitesini belirleyen yağ asididir (Şekil 2.13) ve uygun şartlarda üretilmiş arı sütünde en az % 1,40 oranında 10-HDA bulunmalıdır [179].



Şekil 2.13. 10-HDA kimyasal yapısı

2.7.1. Arı sütü ve fertilité

Diyabetik sıçanlarda yapılan çalışmalarda, arı sütünün testis ağırlığı, sperm sayısı, canlılık, motilite, deformite, DNA bütünlüğü, kromatin kalitesi, serum testosteron ve testiküler doku MDA düzeyleri gibi üreme parametrelerini geliştirdiği bildirilmiştir [180].

Erkeklerde astenozoospermiye (ileri hızlı sperm oranının referans değerinin altında olması) bağlı infertilitede, bal ve arı sütünün tedavi edici yönde olumlu etkileri olduğu [90], ayrıca arı sütünün erkek bireylerde sperm sayısını arttırdığı bildirilmiştir [181]. Erkek sıçanlara 1 g/kg arı sütü uygulanmasıyla; testesteron düzeyi, sperm sayısı/canlı sperm oranının anlamlı derecede arttığı, anormal sperm yüzdesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirtilmiştir [182].

Erkek tavşanlarda sıcaklık stresine bağlı infertiliteyi önlemek amacıyla değişik dozlarda (200, 400, 800 mg/kg) arı sütü verilen tavşanlar ile oluşturulan gruplarda; kontrol grubuna göre, sperm motiliteleri, ejakulat hacmi, sperm konsantrasyonu, seminal plazmanın içerdiği fruktoz oranı ve testesteron düzeylerinin arttığı bildirilmiş ve 200, 400, 800 mg/kg arı sütü verilen gruplarda sırasıyla anormal spermilerin %24, %24, %15 ve ölü spermilerin %27, %25, %17 oranlarında olduğu, yani istatistiksel olarak anlamlı değerlerde arı sütünün azaltıcı yönde etkili olduğunu göstermiştir [183].

Düzenli dozlarda arı sütü verilen diyabetik sıçanlarda deneklerin vücut, testis ağırlıkları ve serum testosteron düzeylerinin anlamlı artış gösterdiği belirtilmiştir [184].

Arı sütü, östrojen reseptörleri ile etkileşim yoluyla östrojenik aktivitelere, ardından da gen ifadelerinde ve hücresel işlevlerdeki değişikliklerin olduğuna dair kanıt sağlamaktadır [185]. Fakat arı sütünün menopoz dönemindeki kadınlarda yaşam kalitesinin iyileştirilmesi için etkili bir besin takviyesi olduğu fikrini desteklemek için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Ayrıca folikülogenezi ve ovaryum hormonlarını arttırdığı bildirilmiştir. Arı sütü, olgunlaşmamış dişi hayvanlar için doğal bir büyüme uyarıcısı olarak düşünülebilmektedir [186].

Yüksek konsantrasyonda (10mg/ml) arı sütü takviyesi glikoliz ve kumulus hücrelerinde pentoz-fosfat yolunun aktivitesinin artmasına bağlı olarak, oosit matürasyon oranının, fertilizasyon oranının ve blastosit oluşumunun yüksek seviyede arttığını göstermişlerdir [187]. Arı sütünün içindeki biyolojik bileşikler göz önüne alındığında, daha yüksek konsantrasyonda arı sütü varlığında oositler daha yüksek bir hücre içi (glutatyon) GSH düzeyine ve blastosist aşamasına kadar gelişme kapasitesine sahiptir. Fakat kimyasal bileşimler ve arı sütünün biyoaktif bileşikleri tam olarak aydınlatılmadığından, biyoaktif bileşikler ve bunların klinik çalışmalardaki uygulamalarını tam olarak tanımlamak için daha ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır [187].

2.8. Oksidatif Stres ve Reaktif Oksijen Türleri

Serbest radikaller ve antioksidanlar arasındaki dengenin serbest radikaller tarafına bozulması *oksidatif stres* olarak tanımlanmaktadır. Serbest radikaller, dış orbitallerinde eşlenmemiş elektron içeren, kısa ömürlü, kararsız ve aktif moleküllerdir. Bu moleküller yaşlanma, dejeneratif hastalıklar, genlerin kararsız olması ve kanser gibi oluşumlarda rol oynamaktadır. Oksijenden oluşan radikaller metabolizmadaki en önemli serbest radikallerdir. Canlı hücrelerde hem endojen hem de ekzojen olaylarda devamlı reaktif oksijen türleri (ROT) oluşmaktadır [188]. Prooksidan/antioksidan dengenin antioksidanlar lehine bozulması sonucunda gelişen oksidatif stres, çeşitli mekanizmalar ile biyomoleküllerde dejenerasyon oluşturmaktadır. DNA da, diğer bütün moleküller gibi kimyasal oksidatif hasara maruz kalmaktadır. Gün içerisinde ortalama 10^3 kez DNA molekülünün oksidatif

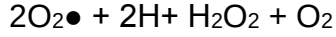
hasara maruz kaldığı öne sürülmektedir [189]. Süperoksit anyon radikali ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil radikali ($OH^{\cdot}$), nitrikoksit radikali ($NO^{\cdot}$) veya hidroperoksil ($HOO^{\cdot}$) gibi radikaller hücrelerde doğrudan veya dolaylı olarak DNA kırıklarının oluşmasına neden olmaktadır. Bu hasar sonucunda mutajenite, genotoksisite, karsinojenite ve yaşlanma gibi fizyopatolojik süreçler tetiklenmektedir [190].

2.8.1. Serbest radikallerin hücre ve hücre yapılarında meydana getirdiği hasarlar

- DNA'da hasar oluşturmaları,
- Zarın yapısında ve işlevinde değişim oluşturmaları,
- Zar proteinlerinde hasar meydana gelmesi,
- Hücre içi K^+ kaybını arttırması,
- Nükleotid yapılı koenzimleri yıkıma uğratması
- Platelet kümeleşmesini arttırması,
- Lipitlerin oksijenle yükseltgenerek bozuması,
- Proteinlerin kümeleşmesi ve çapraz bağlanmalar yapması,
- Hücre tiyol/disülfid oranını değiştirmesi,
- Proteinlerin tiyol gruplarında hasar oluşturmaları ve buna bağımlı enzimlerin yapı ve fonksiyonlarını bozması,
- Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksigenaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz gibi litik enzim aktivitelerini değişime uğratması [191-194].

2.9. Süperoksit Dismutaz (SOD)

İlk kez 1969 yılında McCord Fridovich tarafından antioksidan etkisi gösterilen süperoksit dismutaz (SOD), metalloenzim ailesinin bir üyesidir [195]. Oksijen kullanımının yüksek olduğu dokularda aktivitesi fazla olup, hücre dışı alanda ise oldukça düşük aktiviteye sahiptir. Süperoksit radikallerinin hidrojen peroksit (H_2O_2) ve oksijene dönüşüm reaksiyonu kendiliğinden olabildiği gibi, SOD enziminin kataliziyle de gerçekleşmektedir. SOD enziminin katalizi sonucu 4000 kat daha hızlı gerçekleşen reaksiyon sonucunda membrandan geçemeyen süperoksit radikali, membrandan geçebilen H_2O_2 'e dönüşmektedir.

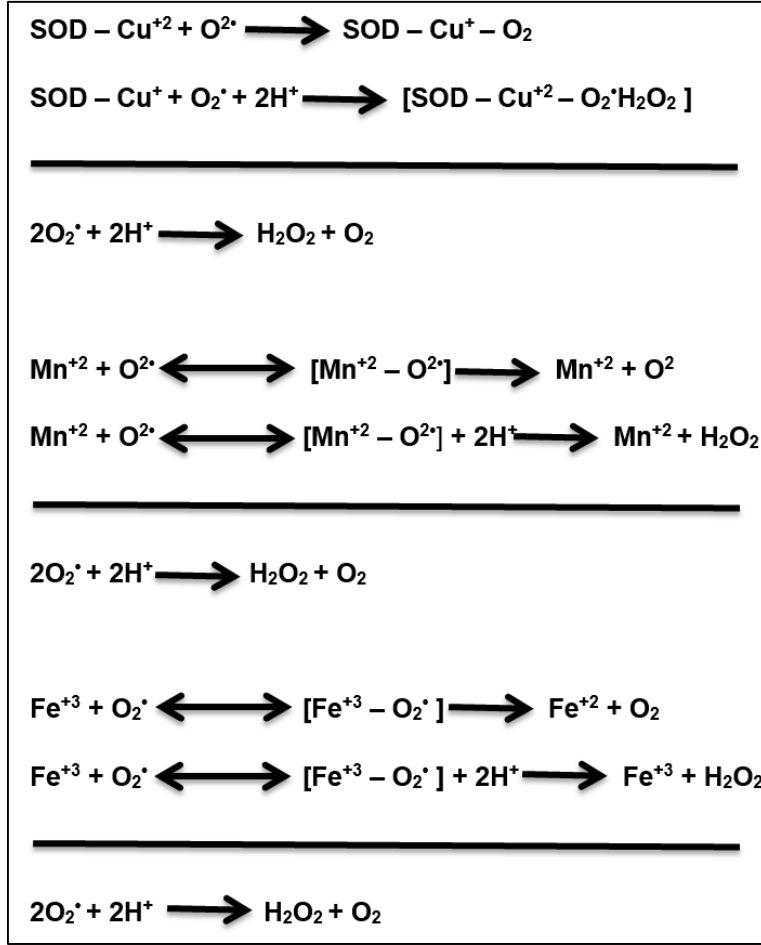


Oluşan H_2O_2 ise metal iyonlarının varlığında oldukça hızlı gerçekleşen Fenton ve Haber-Weiss reaksiyonları sonucu hücrede oksidatif hasar oluşturabilecek son derece zararlı hidroksil radikaline dönüşmektedir. SOD aktivitesi hücre içindeki süperoksit miktarı düşük tutulurken hücre dışında biriken H_2O_2 'in etkisinin diğer antioksidan enzimler olan katalaz ve glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri sayesinde dengede tutulabileceği düşünülmektedir [196-198].

SOD enzimi yapısında bulunan metal iyonlarına göre farklı şekilde isimlendirilmektedirler (Çizelge 2.2). Hücredeki dağılım yerlerine, aktif metal kısımlarına ve aminoasit dizilimlerine göre farklılık göstererek prokaryotlarda Mn-SOD ve Fe-SOD, ökaryotlarda ise Mn-SOD, CuZn-SOD ve ECSOD formlarında bulunmaktadır [199-201] (Şekil 2.13).

Çizelge 2.2. SOD enzim formlarına ait genel bilgiler

	SOD-1	SOD-2	SOD-3	Fe-SOD
Metal İyonu	Cu, Zn	Mn	Cu,Zn	Fe
Hücre Tipi	Ökaryot	Ökaryot Prokaryot	Ökaryot	Prokaryot
Hücredeki Yerleşim Yeri	Sitoplazma	Mitokondri	Hücre Dışı	-
Molekül Ağırlığı	32kDa	88kDa	135000kDa	41kDa
Kromozomdaki Yeri	21q22.1	6q25	4p-q21	-
Ekson Sayısı	5	5	3	-



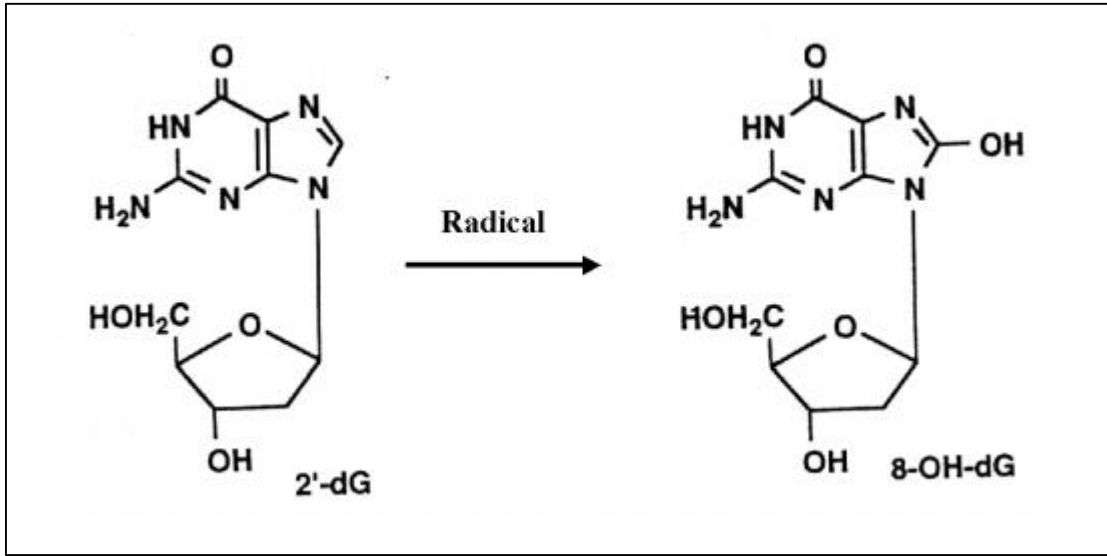
Şekil 2.12. SOD izoformlarının etki mekanizmaları

Yapısında bulunan metal iyonlarına göre farklı isimlendirilen SOD'un her formu temelde süperoksit radikalinin moleküler oksijene ve hidrojen perokside dönüşümünü kataliz etmekte ve hücresel kısımlarda süperoksit düzeyinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır.

2.10. 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin (8-OHdG)

Serbest radikallerin DNA'da oluşturduğu oksidatif hasar; baz ve şeker lezyonları, zincir kırıklarına ve DNA protein çapraz bağlanması gibi çoklu lezyonları içeren değişikliklere neden olmaktadır. Pürinden meydana gelen lezyon 8-hidroksiadenin (8-OH-Ade) olarak adlandırılır ve DNA'daki adeninin C-8 pozisyonuna hidroksil radikallerinin eklenmesiyle oluşmaktadır (Şekil 2.14). Bu lezyon, serbest radikallerin DNA'da meydana getirdiği hasarda deneysel koşullar altında in vitro ve in vivo olarak tanımlandığı başlıca üründür [202]. 8-Hidroksi-2'-Deoksiguanozin ayrıca şu isimlerle de eş anlamlı olarak kullanılmaktadır:

- 8-Hidroksi deoksiguanozin
- 8-Hidroksi-2'-deoksiguanozin
- 8-Hidroksi guanozin
- 8-Oxo-2' deoksiguanozin
- 7,8-Dihidro-8-oxo-2'-deoksiguanozin
- 7,8-Dihidro-8-oksodeoksiguanozin
- 8-Oxo-7,8-dihidro-2' deoksiguanozin
- 8-Oxo-dG



Şekil 2.13. 8-oHdG Formülasyonu [203]

8-OHdG, ROT'un DNA'da yaptığı oksidatif baz hasar ürünlerinden en sık karşılaşılan ve mutajenitesi en yüksek olanıdır. ROT üretiminin artmasıyla birlikte oksidatif DNA hasarı oluşumu da artabilmektedir. Oksijen kullanımının fazla olduğu hücrelerde de 8-OHdG düzeyinin korele biçimde arttığı bildirilmiştir [204]. Ayrıca 8-OHdG'nin, oksidatif DNA hasarı belirteci olarak kullanıldığı birçok çalışma bulunmaktadır [205].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları ve Gruplandırma

Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu tarafından onaylanan çalışmamızda Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezinde üretilmiş, 30 adet 6-8 haftalık (genç), Wistar Albino cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Her grupta 6'şar adet sıçan olacak şekilde toplam 5 grup oluşturuldu.

1. Grup: Kontrol grubu
2. Grup: Sham kontrol grubu
3. Grup: Hipotiroidi grubu
4. Grup: Arı sütü grubu
5. Grup: Arı sütü ve hipotiroidi grubu

Deney hayvanları standart kafeslerde 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ve ısı 22 - 24°C olan fizyolojik ortamlarda tutuldular. Deneklerin serbest diyet ve su ile beslenmeleri sağlandı.

3.2. Hipotiroidi Modeli Oluşturma

Hipotiroidi modeli oluşturulan gruptaki sıçanlara 30 gün boyunca, herbir sıçana 10mg/kg/gün 6-propil-2-tiyourasil (PTU) olacak şekilde 0.1 N sodyum hidroksit (NaOH) içeren %0.9 sodyum klorür (NaCl) çözeltisi içinde çözündürülerek intraperitoneal (i.p.) yolla verilmiştir.

Arı Sütü grubundaki sıçanlara 30 gün boyunca 100 mg/kg arı sütü distile su içerisinde çözülerek gavaj yolu ile verilmiştir.

Hipotiroidi-Arı Sütü Grubundaki sıçanlara ise 30 gün boyunca eş zamanlı olarak i.p. olarak 10 mg/kg 6-propyl-2-tiyourasil (PTU) , 0.9 M serum fizyolojik içinde eritilmiş ilaçtan 0.5 ml ile birlikte 100 mg/kg arı sütü distile su içerisinde çözülerek gavaj yolu ile verildi.

Hipotiroidi modelinin oluşup oluşmadığını saptamak için periyodik olarak kuyruk venlerinden alınan kan örneklerinde TSH, serbest T4 ve serbest T3 düzeylerine bakılmıştır. TSH düzeyleri 10 µIU/mL ve üzeri olan sıçanlarda hipotiroidi modelinin olduğu kabul edilmiştir.

Deney süresi sonunda denekler genel anestezi altındayken karın bölgeleri açılarak ovaryumları çıkarıldıktan sonra i.p. alfazin (Seri No: 1610302-04 Woerden, Almanya) ve alfamin (Seri No: 1705176-01 İzmir, Türkiye) enjeksiyonu ile uyutularak ötenazi gerçekleştirildi. Tüm deneklerden alınan ovaryum örnekleri %10'luk nötral formaldehit içerisinde konuldu.

3.3. Işık Mikroskopik Yöntem

İmmünohistokimyasal boyamalar için alınan doku örnekleri öncelikle alışlagelmiş ışık mikroskop izleme işlemlerinden geçirilerek parafin bloklar hazırlandı.

Bu amaçla %10 'luk nötral formaldehitte 72 saat süreyle tespit edilen doku örnekleri bir gece akarsu altında yıkanarak tespit maddesinden arındırıldılar ve takip işlemlerinden sonra parafin bloklara gömüldüler. Mikrotom (Leica SM 2000, Germany) ile 4 µm kalınlığında alınan kesitler histomorfolojik inceleme için normal lamlara yerleştirildi ve Hematoksilen Eozin ile boyandı.

Mallory Azan boyaması için, deparafinize edilen kesitler dereceli alkol serilerinden geçirilerek hidrate edildikten sonra %0.1 (w/v) Azokarmin G solüsyonu ile 1 saat 60°C'de boyandı. Örnekler suyla yıkandıktan sonra %95 etanol içindeki %0.1 (v/v) anilin yağı ile differansiye edildikten sonra %1 asetik alkol ile durulanıp 1 saat %5 fosfomolibdik asitle mordanlandılar. Tekrar sudan geçirilen kesitler 1 saat anilin mavisi-orange G solüsyonunda boyandı, suda yıkanıp dehidrate edildi, ksilol ile şeffaflandırılıp entellan ile kapatıldı.

3.4. İmmünohistokimyasal Yöntem

Doku örnekleri, oda ısısında, %10' luk nötral formalin solusyonu içerisinde 72 saat süreyle tespit edildi. Daha sonra alışlagelmiş ışık mikroskop izleme yönteminden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan bloklardan mikrotomla (Leica SM

2000, Germany) polizinli lamlara 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Deparafinize edilmesi amacıyla, kesitler bir gece 37 °C ve ertesi gün 1 saat 60 °C olacak şekilde etüvde bekletildi ve deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15' er dakika ksilol'e etkin bırakıldı. Dehidrate edilmesi amacıyla dokular 10'ar dakika olacak şekilde sırasıyla %100, %96, %80, %70 ve %50'lik alkol serilerinden geçirildiler.

Dehidrate edilen dokular alkolden arındırılmak için 5' X 2 kez distile sudan geçirildikten sonra, Pap - pen (Super PAP - pen, PN IM3580, Becman Coulter Company, France) ile kesit üzerindeki dokuların çevresi çizildi.

Daha sonra, SOD-1 (Lot: GR80256-42, Abcam, rabbit b, Cambridge, England) ve 8-OhdG (Lot: AG06295202, Bioss, rabbit Polyclonal, Woburn, USA) primer antikorları için 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit (Ref: TA- 125- HP, Lot: HP18180, hydrogen peroxide block, Thermo Scientific, Fremont, CA) etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında camlar PBS (Phosphate buffer saline, pH: 7.4) ile yıkandı.

Yıkanan camlara 5 dakika Ultra - V block (Ref: 859043, Lot: 1838146A, Ultra V Block, Life Techonologies, USA) uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemten sonra dokular yıkanmadan primer antikör aşamasına geçilerek; SOD-1 ve 8-OhdG primer antikörlerine etkin bırakıldı. Daha sonra PBS ile yıkanan camlara 20 dakika biyotinli sekonder antikör (Ref: 859043, Lot: 1838146A Broad Spectrum Second Antibody, USA) uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar 20 dakika süresince streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (Ref: 859043, Lot: 1838146A, HRP-Streptavidin, USA) etkin bırakıldı, böylece camlarda enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Son olarak ortama kromojen DAB (Ref: ACK125, Lot: 40870, Scytek, Utah, USA) eklenerek yaklaşık 10 dakika bekletildi ve gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı.

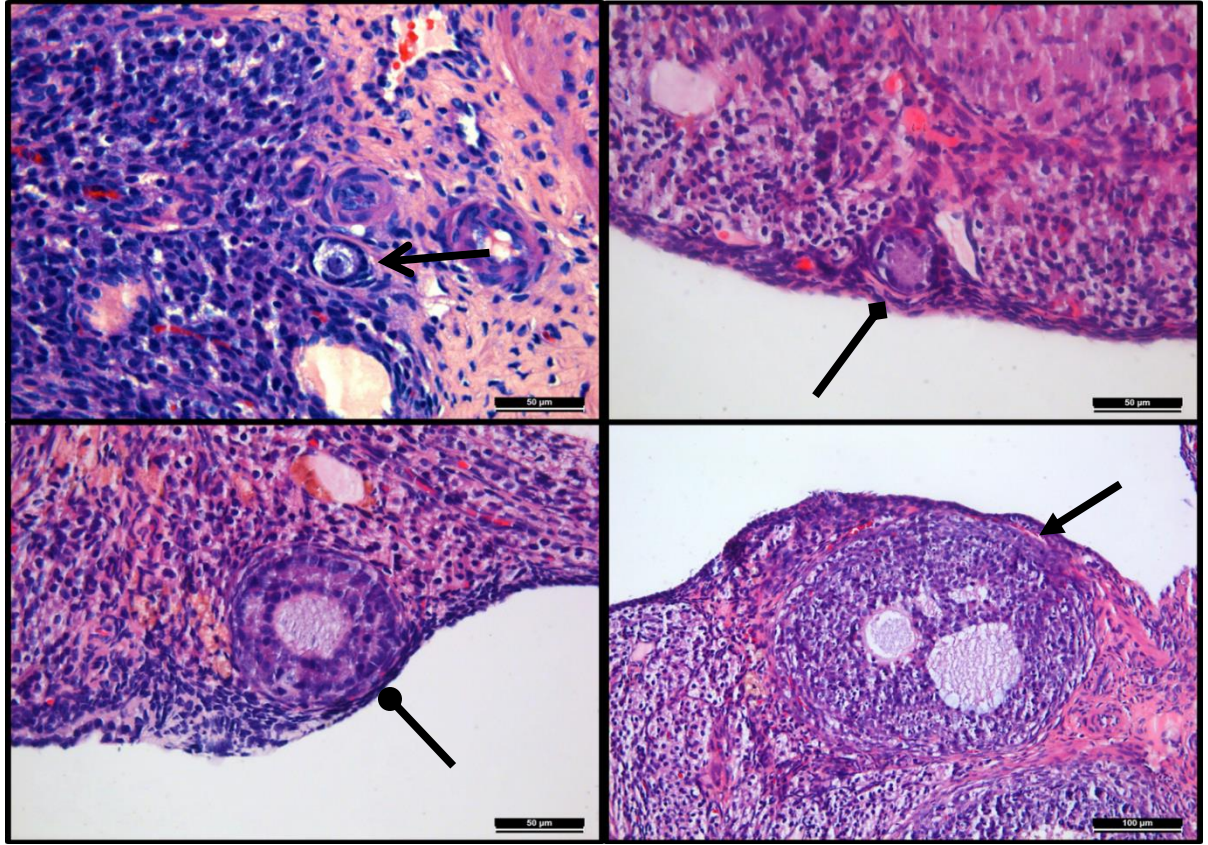
Zemin boyası olarak Mayer'in Hemotoksileni (0B52Y092, Merck) kullanıldı. Lamlar entellan (Lot: HX378130, Merck, Germany) ile kapatılıp, bilgisayar donanımlı, kamera ataçmanlı foto-ışık mikroskopta (DM 4000 B, Leica, Weetlar, Germany, DFC280 Plus Camera, Leica, Weetlar, Germany) fotoğraflanarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Histomorfolojik Bulgular

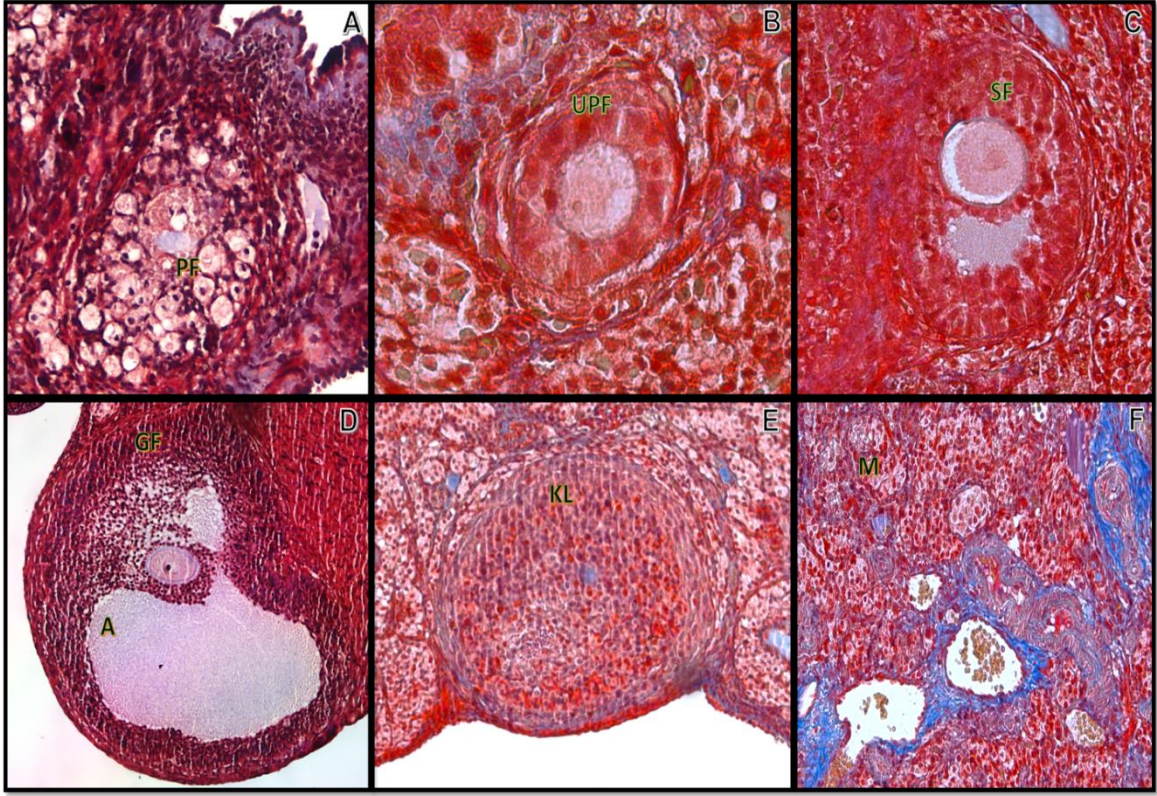
Çalışmada kullanılan ratlardan elde edilen ovaryum doku örneklerinden hazırlanan preparatlar H&E ve Mallory Azan ile boyanmış ve yapılan histomorfolojik değerlendirmelerde;

Kontrol, sham kontrol ve arı sütü uygulanan gruplarda ovaryumu çevreleyen germinal epitelin normal yapıda olduğu gözlemlendi. Kortekste yer alan ovaryum folikülleri normal histolojik yapıda olup, sekonder foliküllere ait teka interna ve eksterna yapılarının sınırlarının belirgin olduğu gözlemlendi. Folikülleri ve damarları çevreleyen bağ dokuya ait kollajen liflerin normal yapıda ve sayıda olduğu saptandı. Ayrıca medullada bulunan ven ve arter yapılarının da normal histolojik görünümde olduğu belirlendi (Resim 4.1– 4.6).

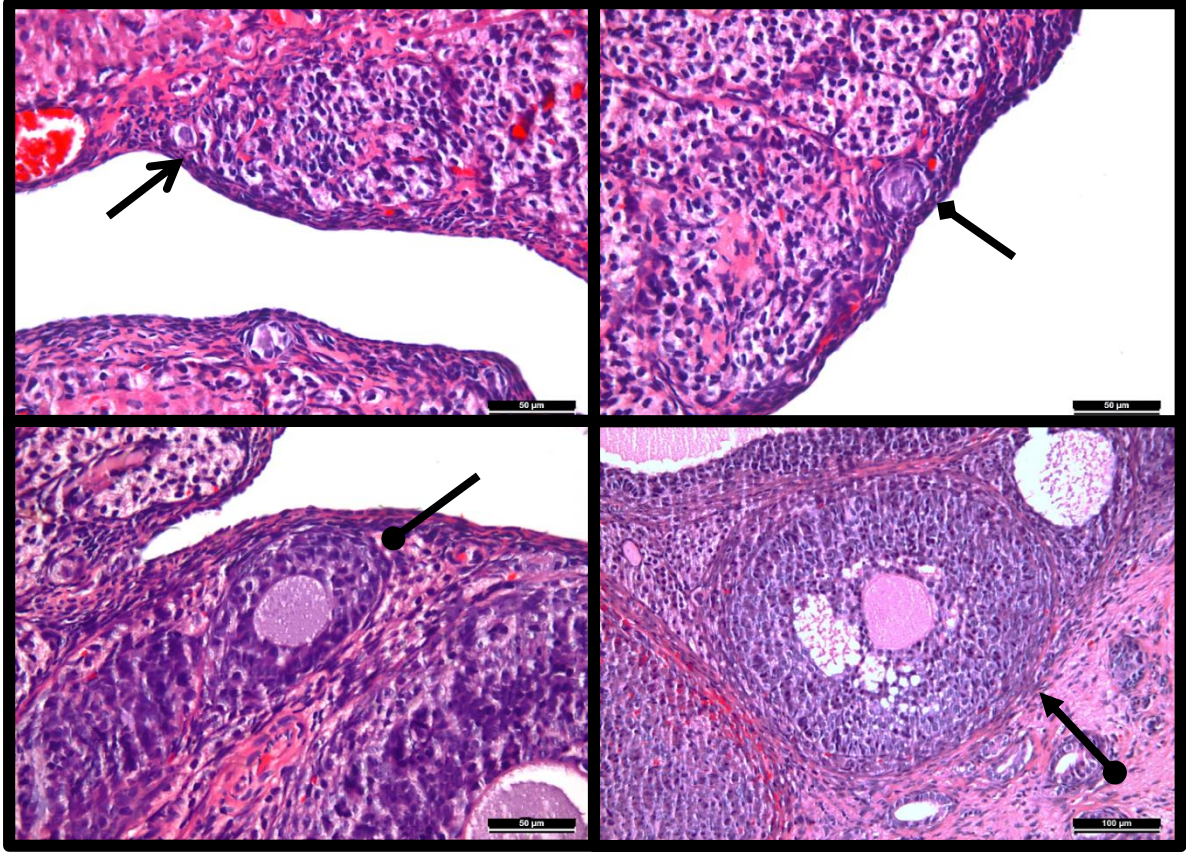


Resim 4.1. Kontrol grubuna ait hemotoksilen-eozin boyamaları

- : Primordial Folikül
- : Unilaminar Primer Folikül
- : Multilaminar Primer Folikül
- : Sekonder Folikül

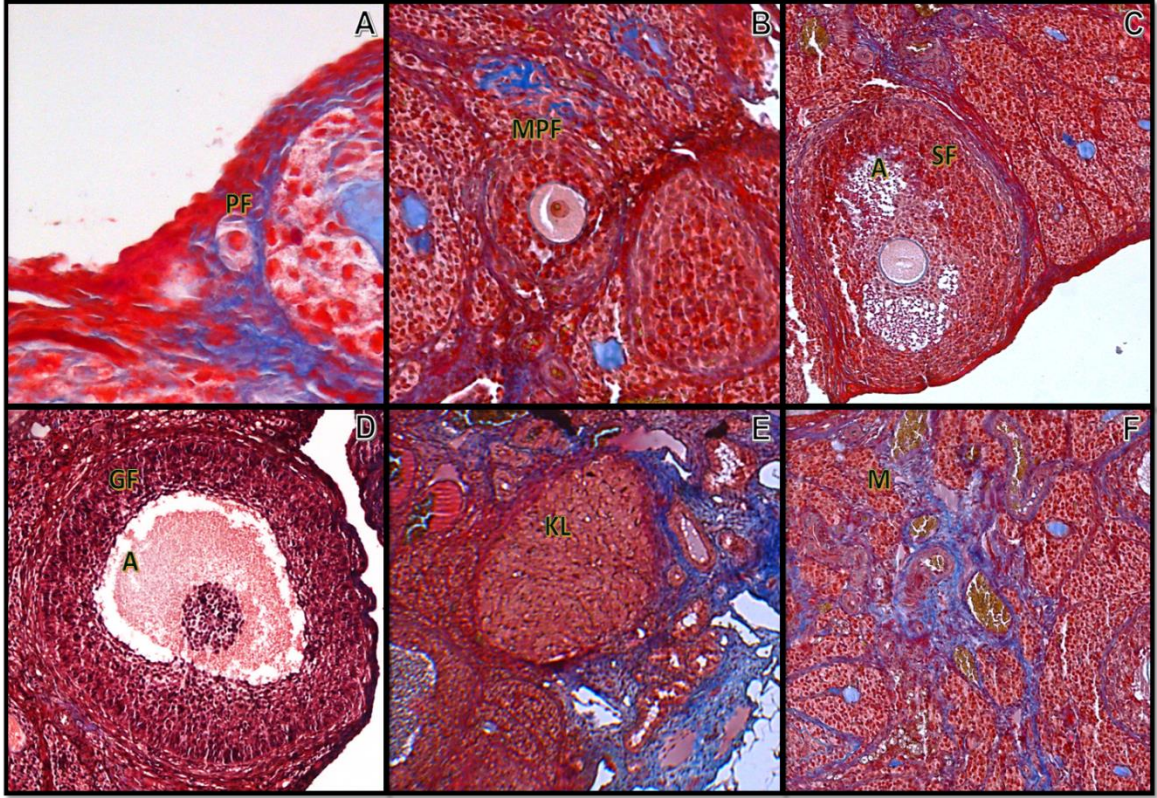


Resim 4.2. Kontrol grubuna ait Mallory Azan Boyamalarında; Primordial Folikül (PF), Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Graaf Folikülü (GF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)

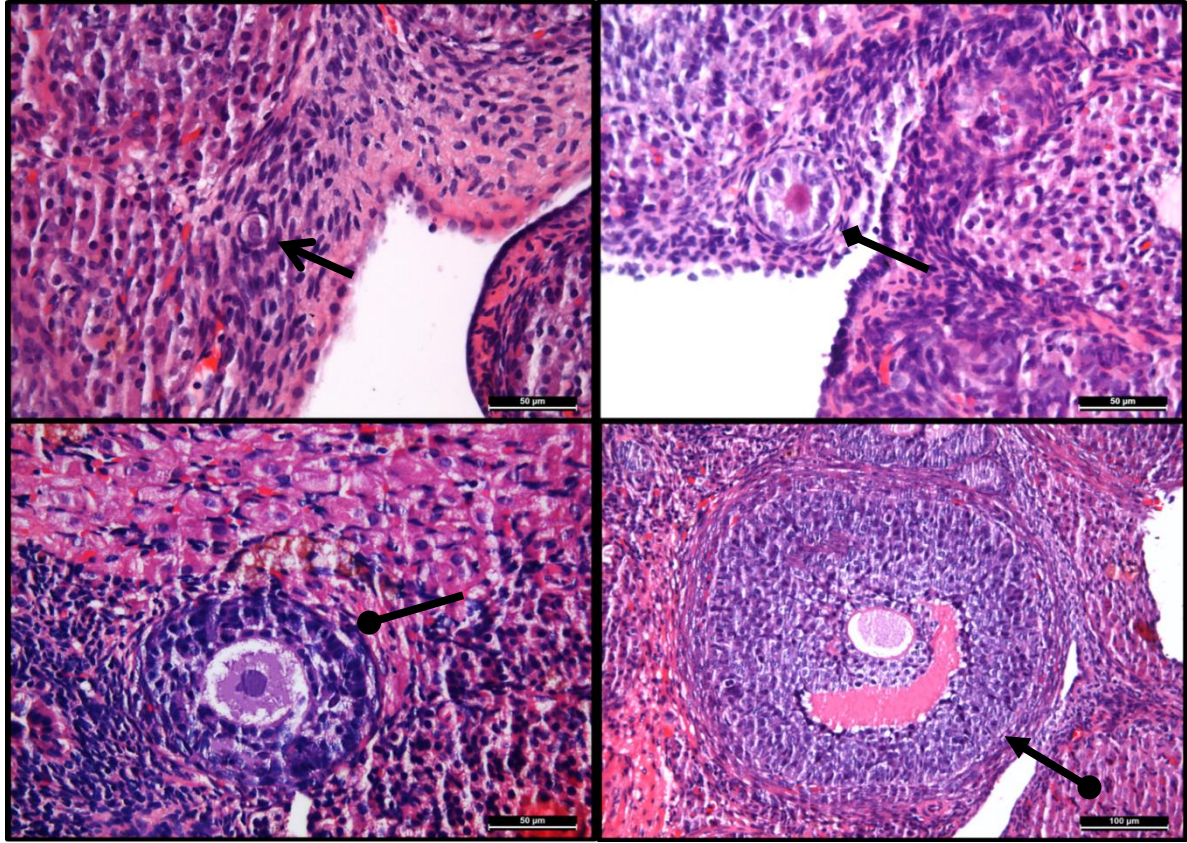


Resim 4.3. Sham kontrol grubuna ait hemotoksilen-eozin boyamaları

- : Primordial Folikül
- : Unilaminar Primer Folikül
- : Multilaminar Primer Folikül
- : Sekonder Folikül

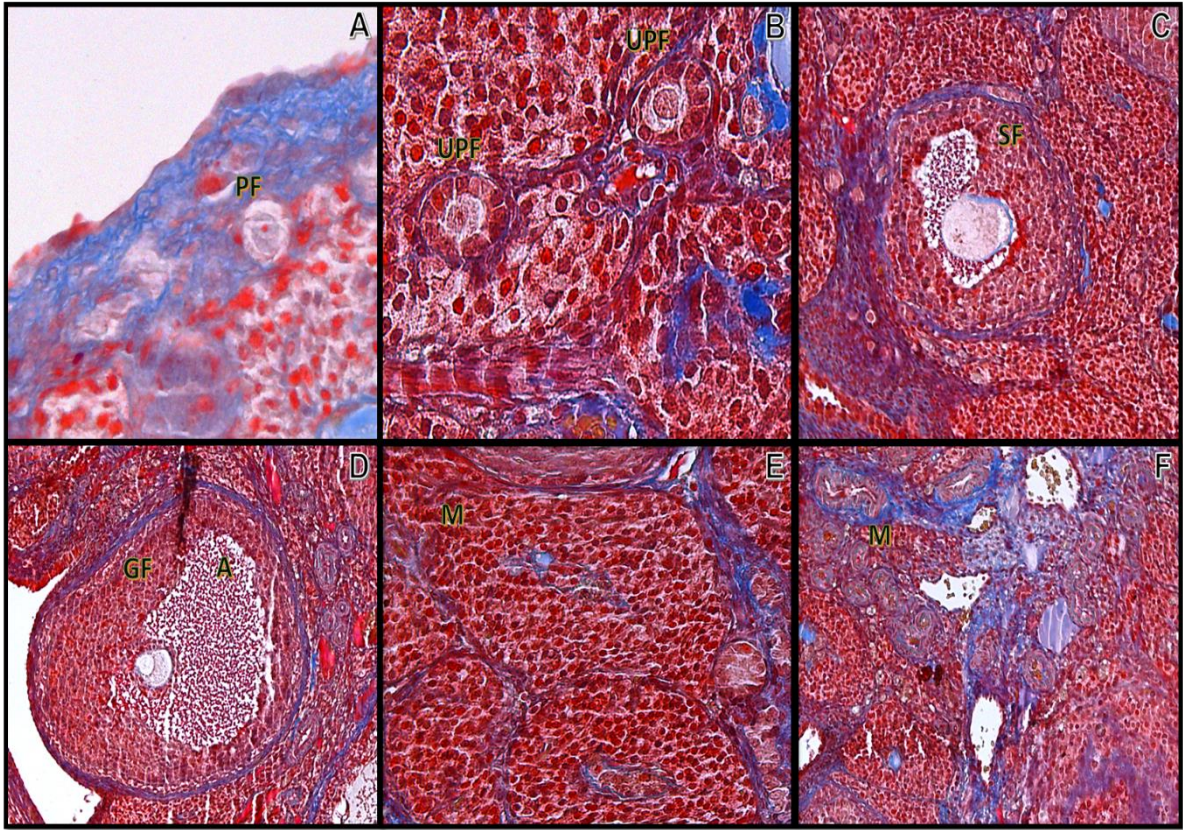


Resim 4.4. Kontrol Sham grubuna ait Mallory Azan boyamalarında, Primordial Folikül (PF), Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Graaf Folikülü (GF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)



Resim 4.5. Arı sütü grubuna ait hemotoksilen-eozin boyamaları

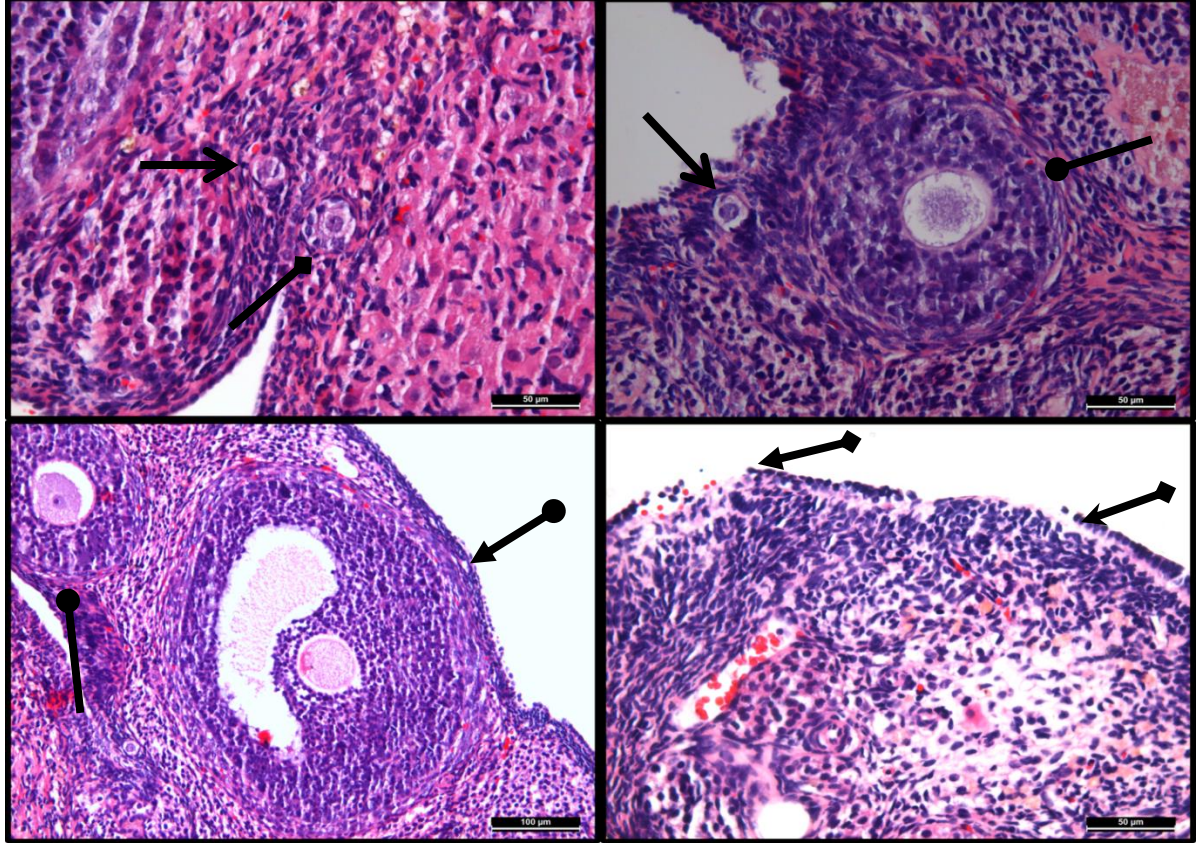
- : Primordial Folikül
- : Unilaminar Primer Folikül
- : Multilaminar Primer Folikül
- : Sekonder Folikül



Resim 4.6. Arı sütü grubuna Ait Mallory Azan boyamalarında; Primordial Folikül (PF), Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Graaf Folikülü (GF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)

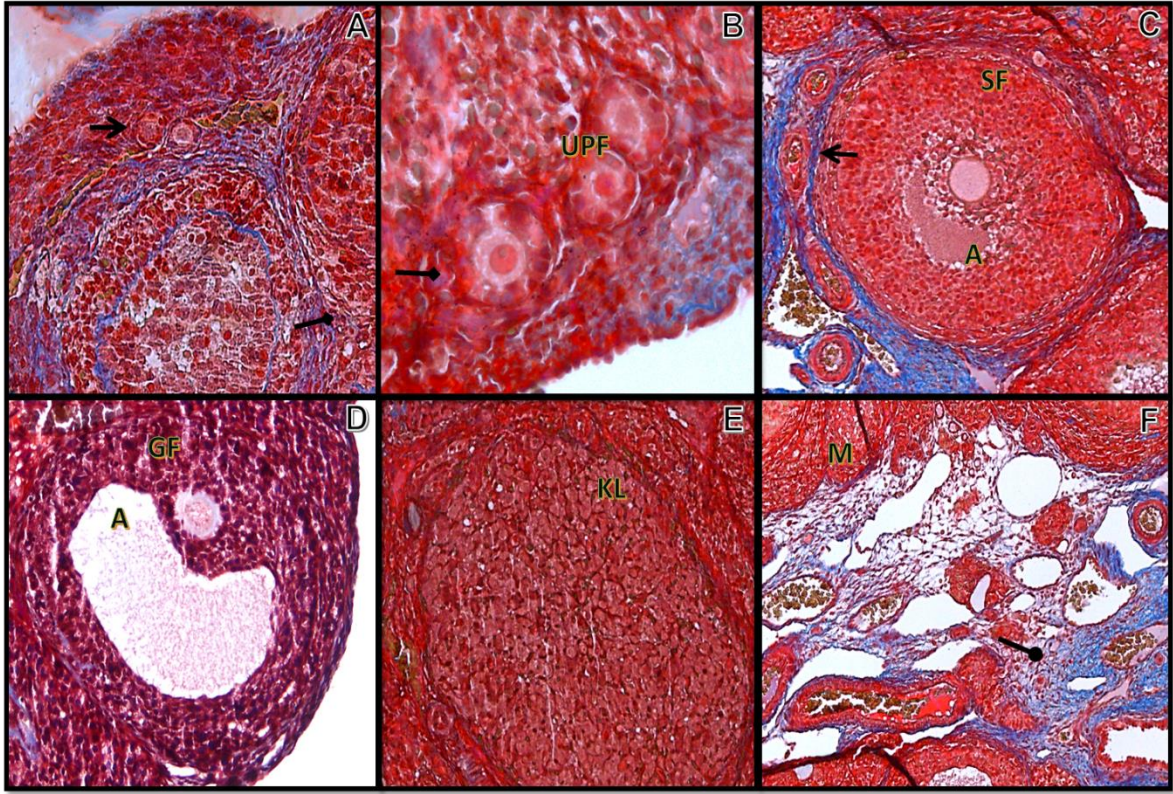
PTU indüklenen gruba ait ovaryum doku örneklerinden alınan kesitlerde germinal epitelin çoğunlukla yassı tipte ve birçok bölgede ovaryum yüzeyinden ayrılarak döküntüye uğradığı gözlemlendi. Kortekste yer alan folikül tiplerinin ayırt edilemeyecek şekilde birbiriyle kaynaşmış olduğu saptandı. Benzer şekilde granüloza hücreleri ile teka tabakalarının da normal düzenlenimleri dışına çıkarak birleştiği ve sınırlarının net olarak ayırt edilemediği gözlemlendi. Bazı sekonder foliküllere ait antrumlarda kanama ve granüloza hücrelerine ait döküntü olduğu izlendi. Primer oositlerin birçoğunda hipertrofi ve ödem belirlendi. Ayrıca atretik folikül sayısının artmış olduğu bununla birlikte folikülleri ve damarları çevreleyen bağ dokuya ait kollajen liflerin görece son derece azalmış olduğu tespit edildi. Tüm folikül tiplerine ait granüloza hücrelerinin hipertrofik olduğu, çekirdek yapılarında kayıpların meydana geldiği ve nekrotik bir yapı sergiledikleri gözlemlendi. Granüloza hücreleri ile teka interna arasında yerleşim gösteren bazal membranın devamlılık göstermediği saptandı. Medullada çok sayıda dilate ven ve arter yapısı belirlendi ancak bu damarlara ait endotelde ödeme rastlanmadı. Bu bölgede bağ dokunun

retiküler liflerden oluştuğu, yine kollajen liflerin görece son derece azaldığı tespit edildi (Resim 4.7, 4.8).

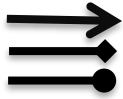


Resim 4.7. PTU indüklenen gruba ait hemotoksilen-eozin boyamaları

- : Primordial Folikül
- ↗ : Unilaminar Primer Folikül
- : Multilaminar Primer Folikül
- : Sekonder Folikül
- ↔ : Ovaryum yüzeyinden ayrılarak döküntüye uğrayan germinal epitel

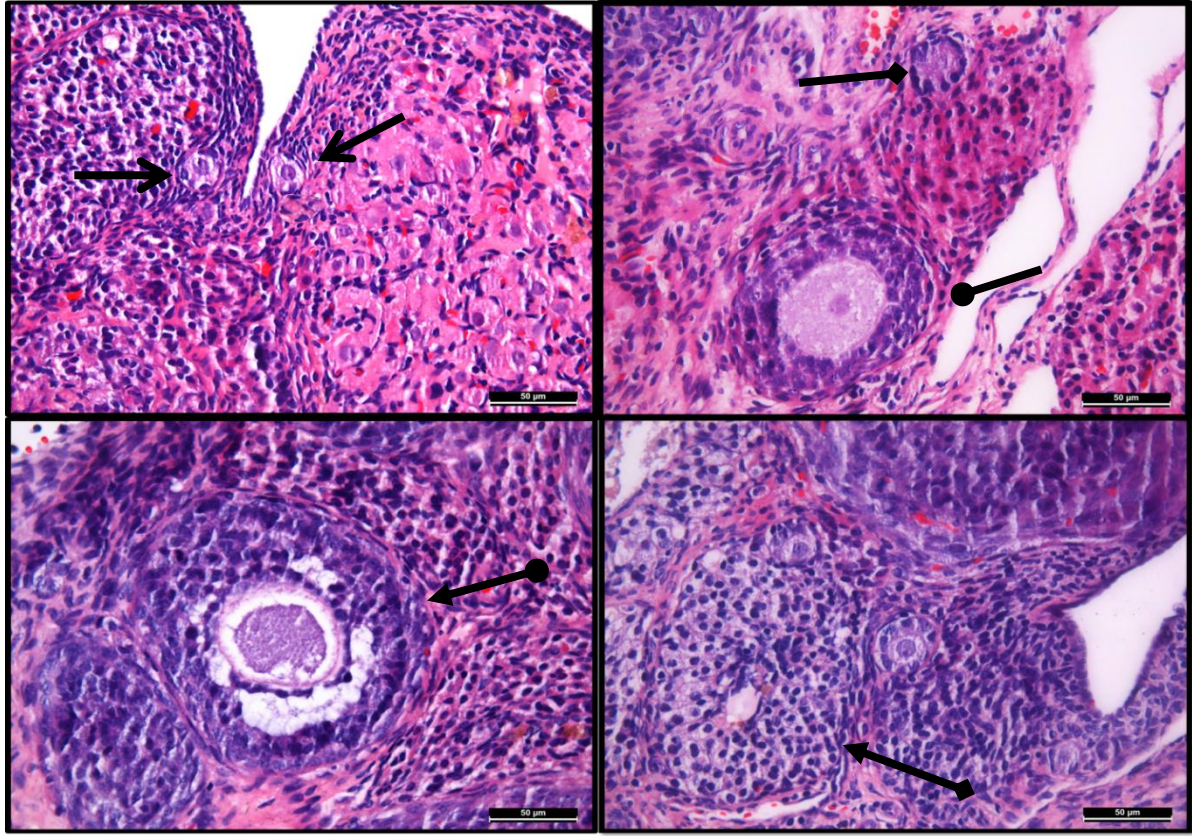


Resim 4.8. PTU indüklenen gruba ait Malory Azan Boyamalarında; Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Graaf Folikülü (GF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)



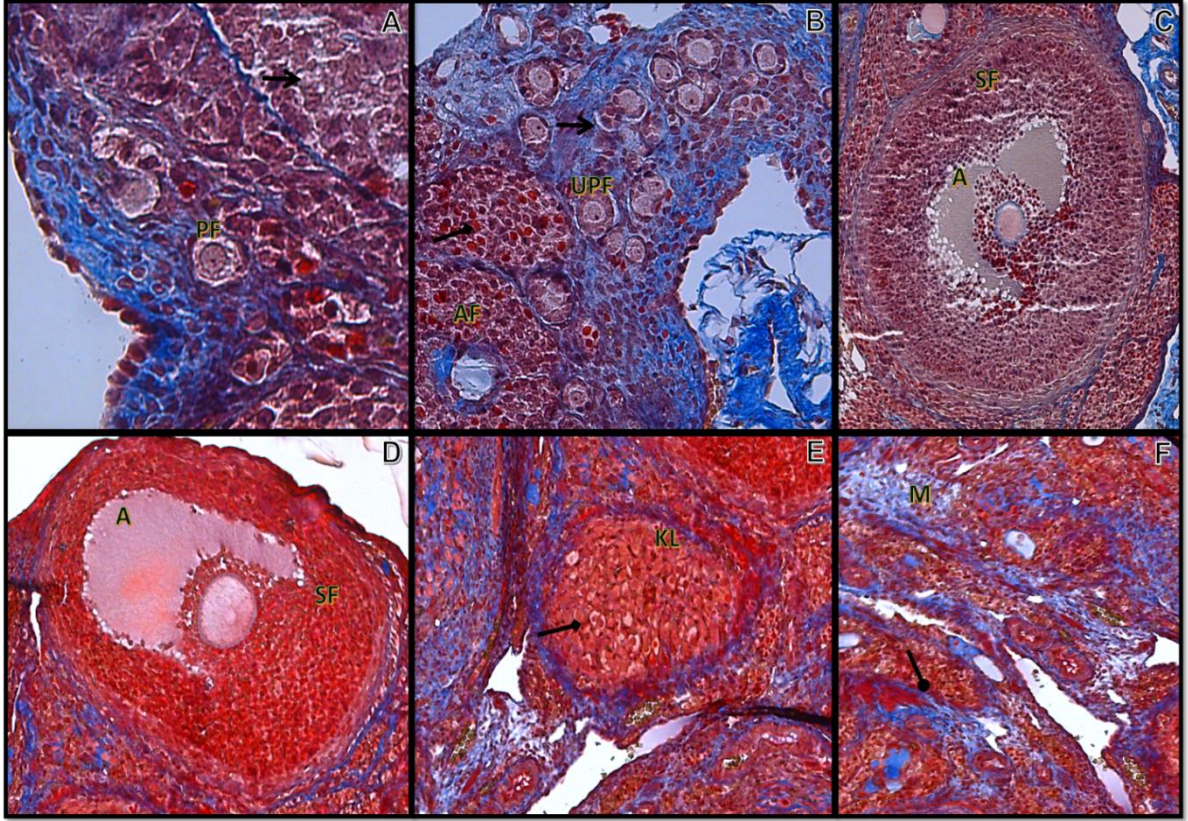
- : Ayırt edilemeyen folikül yapısı
- : Normal düzenlenimleri bozulan granüloza ve teka hücreleri
- : Medullada bulunan kollajen lifler

PTU ile birlikte arı sütü uygulanan gruba ait ovaryum dokusunun histomorfolojik incelemelerinde, PTU ile indüklenen gruptan farklı olarak folikül tiplerinin ayrımının yapılabildiği gözlemlendi. Bu gruba ait primordial ve unilaminar primer foliküller normal yapıları ile ayırt edilirken, multilaminar primer ve sekonder foliküllere ait granüloza hücrelerinde hipertrofi ve ödem, çekirdek ve sitoplazma kaybı en belirgin bulgu olarak belirlendi. Foliküllere ait primer oositlerin genellikle hipertrofik yapıda olduğu, zona pellusidadan ayrılma gösteren ödemli yapı sergilediği tespit edildi. Folikül ve damar duvarı çevresindeki bağ doku normal histolojik yapılarında gözlemlendi. Bazı foliküllere ait granüloza hücreleri ile teka interna arasındaki bölgede yer yer ayrılma ve düzensizlik tespit edildi (Resim 4.9, 4.10).



Resim 4.9. PTU ile birlikte Arı sütü verilen gruba ait hemotoksilen-eozin boyamaları

- : Primordial Folikül
- : Unilaminar Primer Folikül
- : Multilaminar Primer Folikül
- : Sekonder Folikül
- ↔ : Atretik Folikül



Resim 4.10. PTU ile birlikte arı sütü verilen gruba ait Mallory azan boyamalarında; Primordial Folikül (PF), Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Atretik Folikül (AF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)

- ➡ : Multilaminar primer ve sekonder foliküllere ait granüloza hücrelerinde hipertrofi ve ödem
- ➡ : Multilaminar primer ve sekonder foliküllere ait granüloza hücrelerinde çekirdek ve sitoplazma kaybı
- : Medullada bulunan kollajen lifler

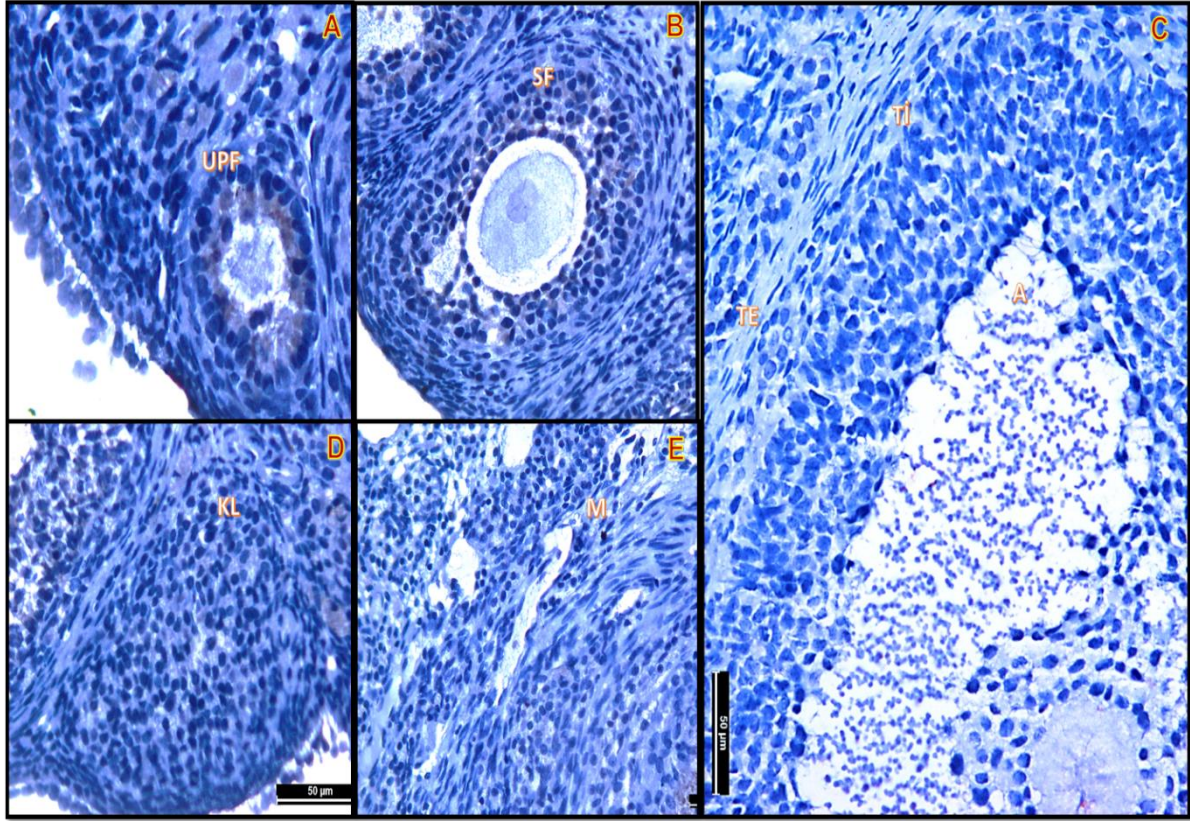
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.2.1. SOD-1 bulguları

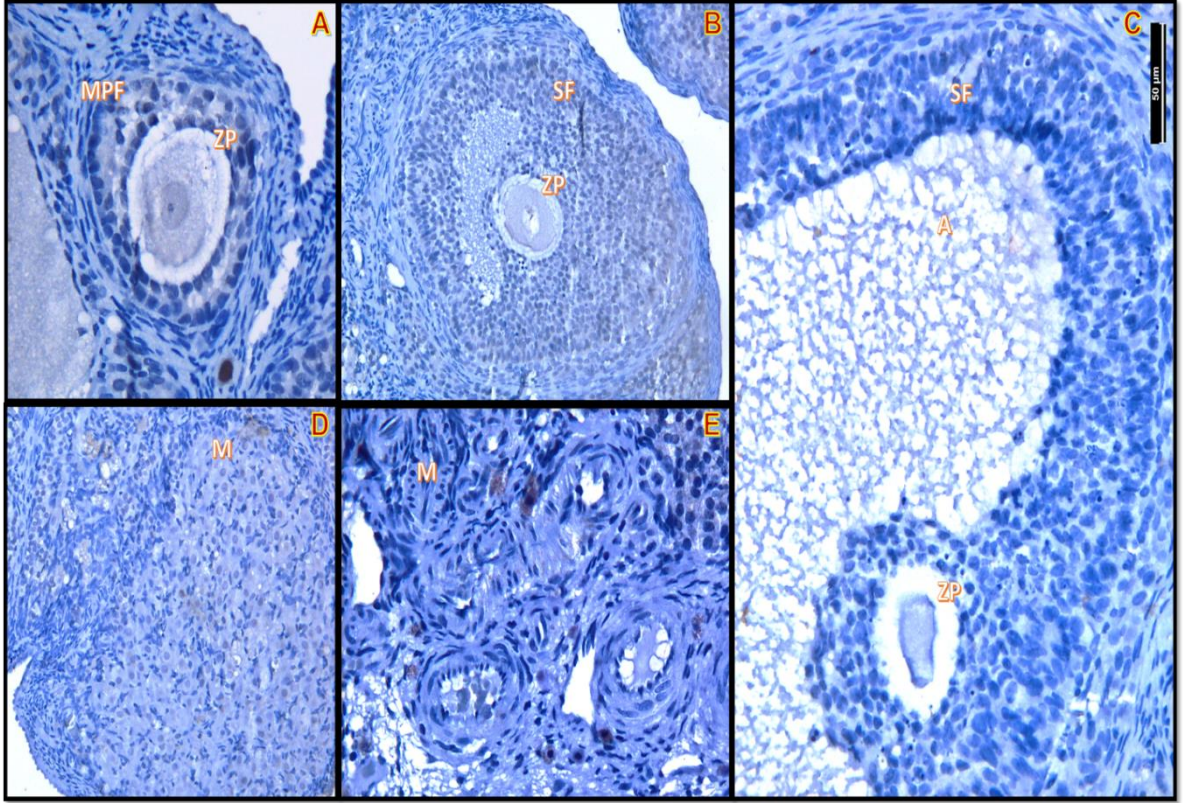
Kontrol, sham kontrol ve arı sütü uygulanan grupların ovaryum kesitleri immünohistokimyasal olarak SOD-1 immünreaktivitesi yapılan değerlendirmelerde;

unilaminar ve multilaminar primer foliküller ile sekonder foliküllere ait granüloza hücrelerinin bir kısmında zayıf sitoplazmik tutulum gözlenirken, teka interna ve eksterna, medulla stroması ve foliküller arası bağ dokuda ise immünreaktiviteye rastlanılmadı. Yine ovaryum yüzeyini çevreleyen germinal epitelin hemen hemen

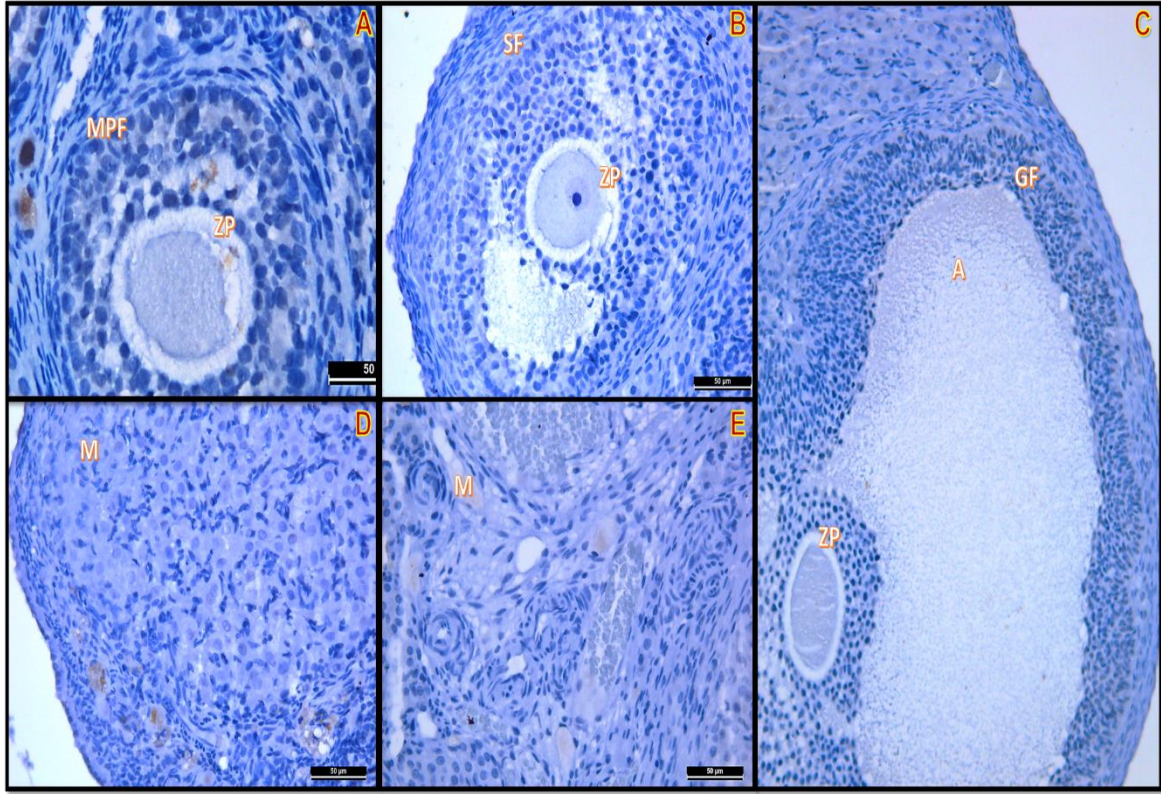
tamamında zayıf sitoplazmik SOD-1 tutulumu belirgin olarak izlendi (Resim 4.11.,4.12,4.13.).



Resim 4.11. Kontrol grubu SOD-1 açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A), Teka interna (Tİ), Teka Eksterna (TE)

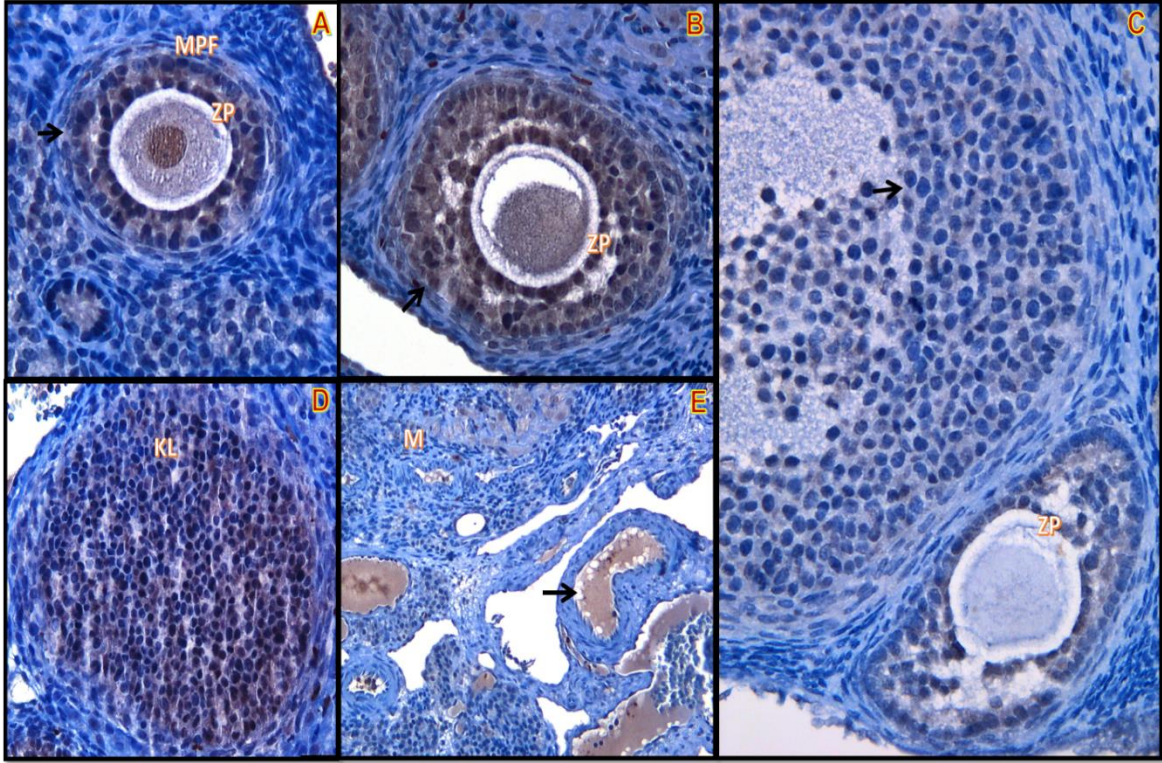


Resim 4.12. Sham kontrol grubu SOD-1 açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)



Resim 4.13. Arı Sütü grubu SOD-1 açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Medulla (M), Antrum (A)

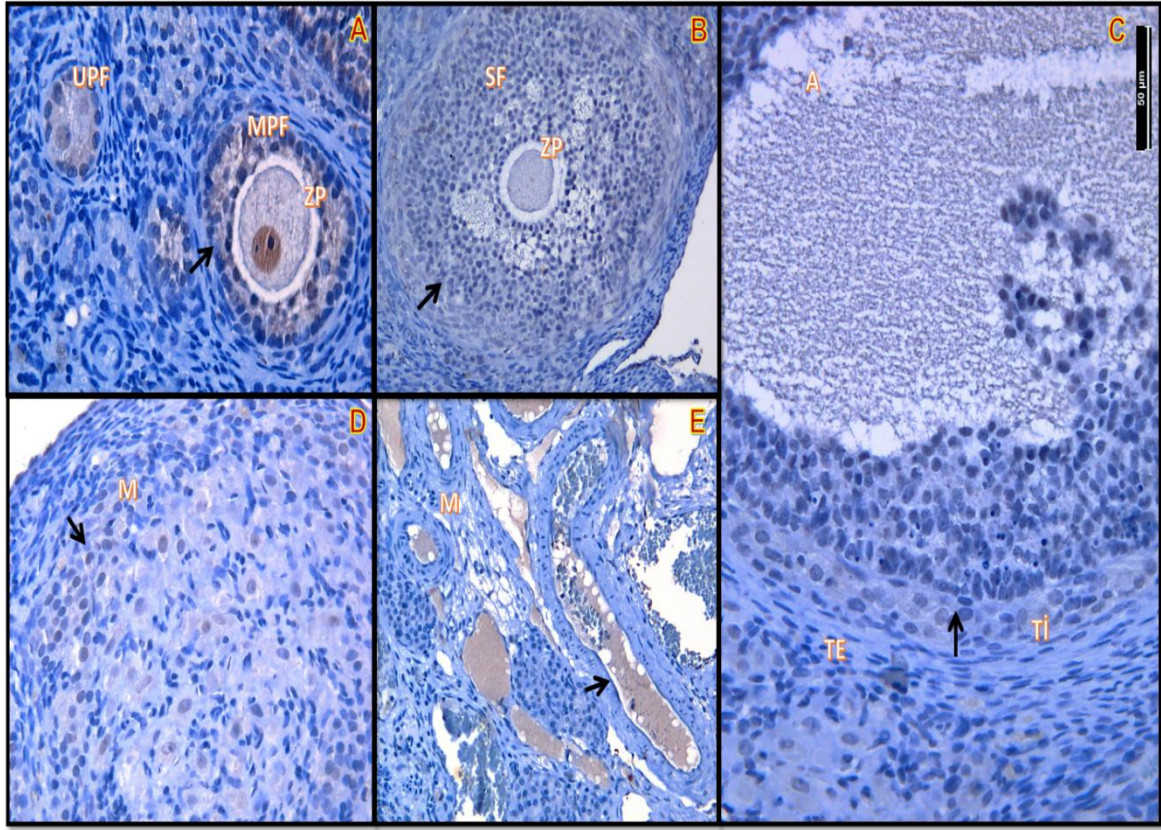
PTU indüklenen deney grubunda yapılan incelemelerde, germinal epitelde şiddetli SOD-1 immünreaktivitesi tespit edildi. Foliküllerin ayrımı çok net yapılamamakla birlikte, tüm folikül tiplerinin tamamına ait granüloza hücrelerinde ortadan şiddetliye değişen sitoplazmik ve nükleer SOD-1 immünreaktivitesi gözlemlendi. Benzer şekilde sekonder foliküllerin teka yapılarına ait bazı hücrelerde, ortadan şiddetliye değişen sitoplazmik immünreaktivite izlendi. Medulla stroması ve foliküller arası bağ dokuda immünreaktivite izlenmezken, korpus luteumda zayıftan ortaya değişen sitoplazmik SOD-1 tutulumu tespit edildi (Resim 4.14).



Resim 4.14. PTU indüklenen grubun SOD-1 açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Zona Pelusida (ZP), Korpus Luteum (KL), Medulla (M), Antrum (A)

→ : SOD-1'in germinal epitel, teka hücreleri ve medulla stromasında şiddetli immünreaktivitesi

Hipotiroidi ile birlikte arı sütü uygulanan gruba ait ovaryum dokularındaki foliküllerin granüloza hücrelerine ait SOD-1 tutulumunun sitoplazmik düzeyde ve çoğunlukla zayıf ve orta şiddette olduğu belirlendi. Sekonder foliküllere ait teka interna ve eksternada ise zayıf sitoplazmik tutulum izlendi. Yine korpus luteumda zayıf SOD-1 immünreaktivitesi ayırt edilirken, germinal epitelde orta şiddette tutulum tespit edildi (Resim 4.15).



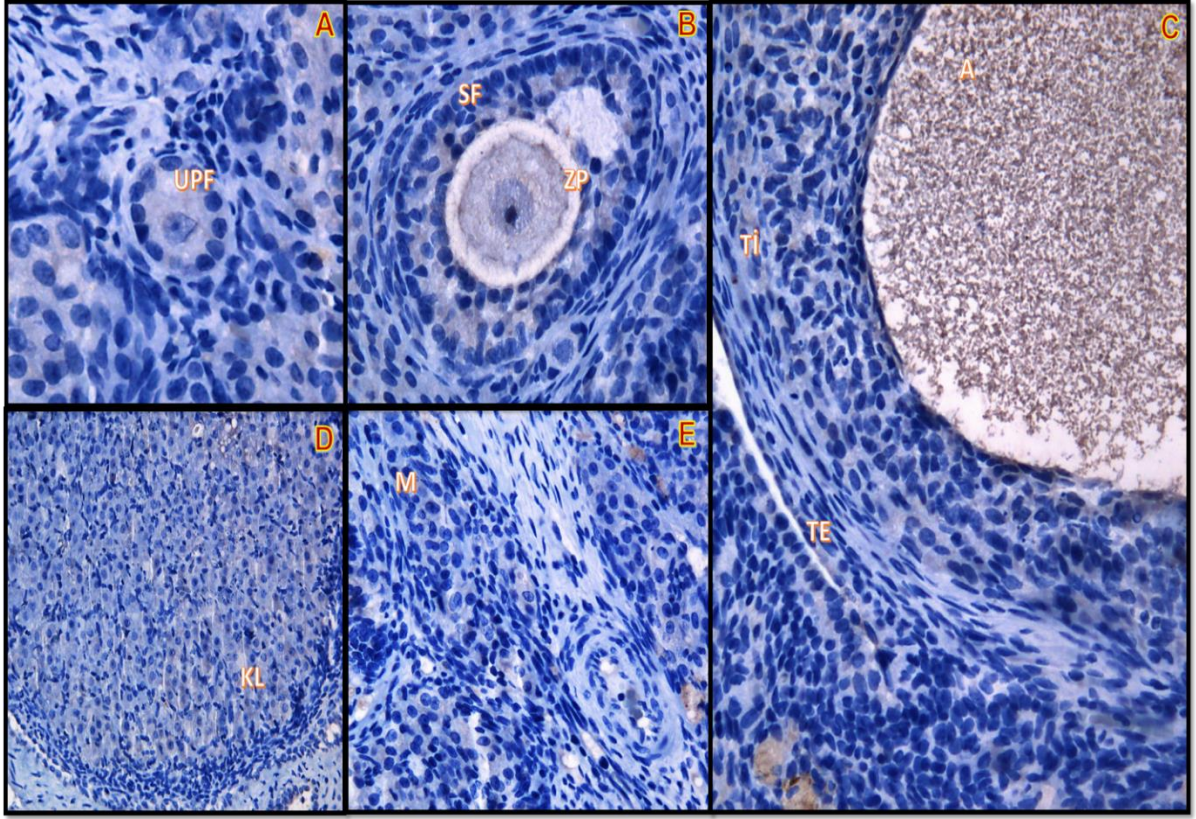
Resim 4.15. PTU ile birlikte arı sütü verilen grubun SOD-1 açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Unilaminar Primer Folikül (UPF), Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Teka interna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Medulla (M), Antrum (A)

→ : SOD-1'in germinal epitel, teka hücreleri ve medulla stromasında zayıf immünreaktivitesi

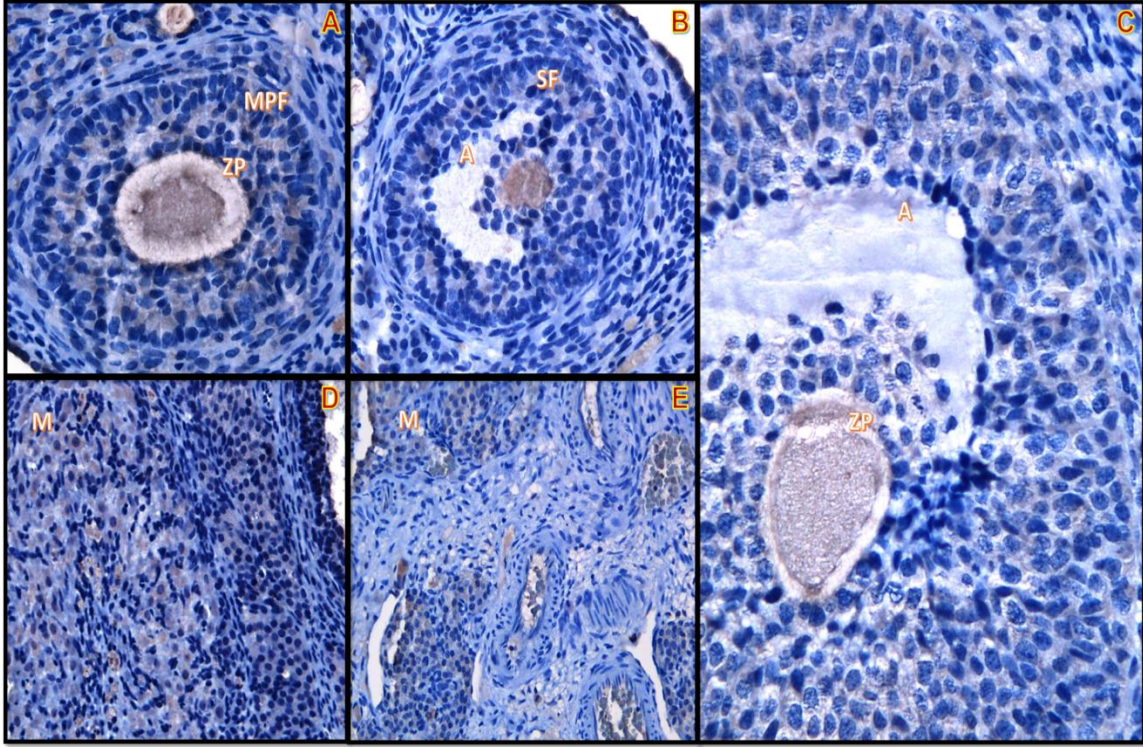
4.2.2. 8-OHdG bulguları

Kontrol, sham kontrol ve arı sütü uygulanan grupların ovaryum kesitleri immünohistokimyasal olarak 8-OHdG immünreaktivitesi yapılan değerlendirmelerde;

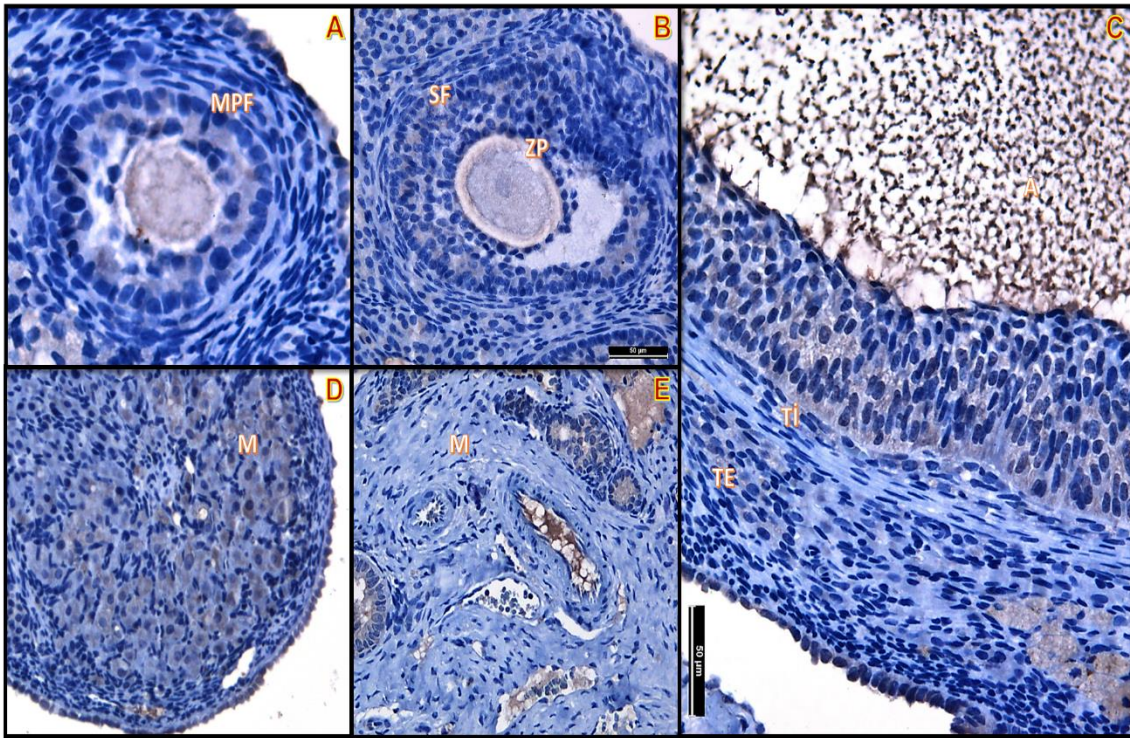
germinal epitelde yaygın olarak zayıftan ortaya değişen şiddette 8-OHdG immünreaktivitesi ayırt edilirken, tüm folikül tiplerine ait bazı granüloza hücrelerinde ve korpus luteumda oldukça zayıf tutulum gözlemlendi. Sekonder foliküllere ait teka interna ve eksterna ile medulla stroması ve foliküller arası bağ dokuda ise 8-OHdG immünreaktivitesi tespit edilmedi (Resim 4.16,4.17,4.18).



Resim 4.16. Kontrol grubunun 8-OHdG açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Unilaminar Primer Folikül (UPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Teka interna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Medulla (M), Antrum (A)

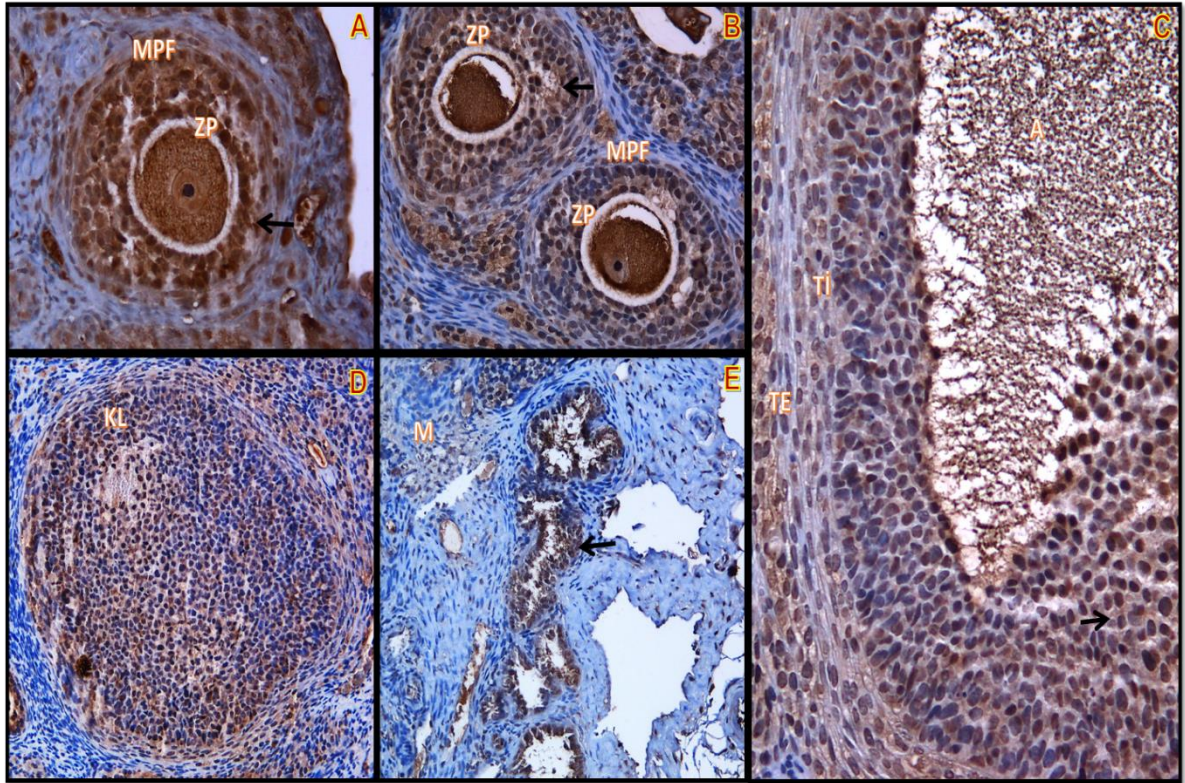


Resim 4.17. Sham kontrol grubunun 8-OHdG açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Medulla (M), Antrum (A)



Resim 4.18. Arı sütü grubunun 8-OHdG açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Sekonder Folikül (SF), Zona Pelusida (ZP), Teka İnterna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Medulla (M), Antrum (A)

PTU indüklenen deney grubuna ait ovaryum dokusundaki tüm folikül tiplerine ait granüloza hücrelerinin neredeyse tamamında ve ooplazmada nükleer ve sitoplazmik düzeyde ortadan şiddetliye değişen 8-OHdG tutulumu gözlemlendi. Sekonder foliküllere ait teka interna ve eksterna yapılarındaki hücrelerin birçoğunda ortadan şiddetliye değişen düzeyde nükleer ve perinükleer immünreaktivite görülürken, diğer hücrelerde ise zayıf 8-OHdG tutulumu izlendi. Bu grupta korpus luteumun yanı sıra diğer grup ve boyamadan farklı olarak medulla stromasında da çok sayıda hücrede ortadan şiddetliye değişen düzeyde immünreaktivite gözlemlendi. Yine germinal epitelde şiddetli 8-OHdG tutulumu tespit edildi (Resim 4.19).



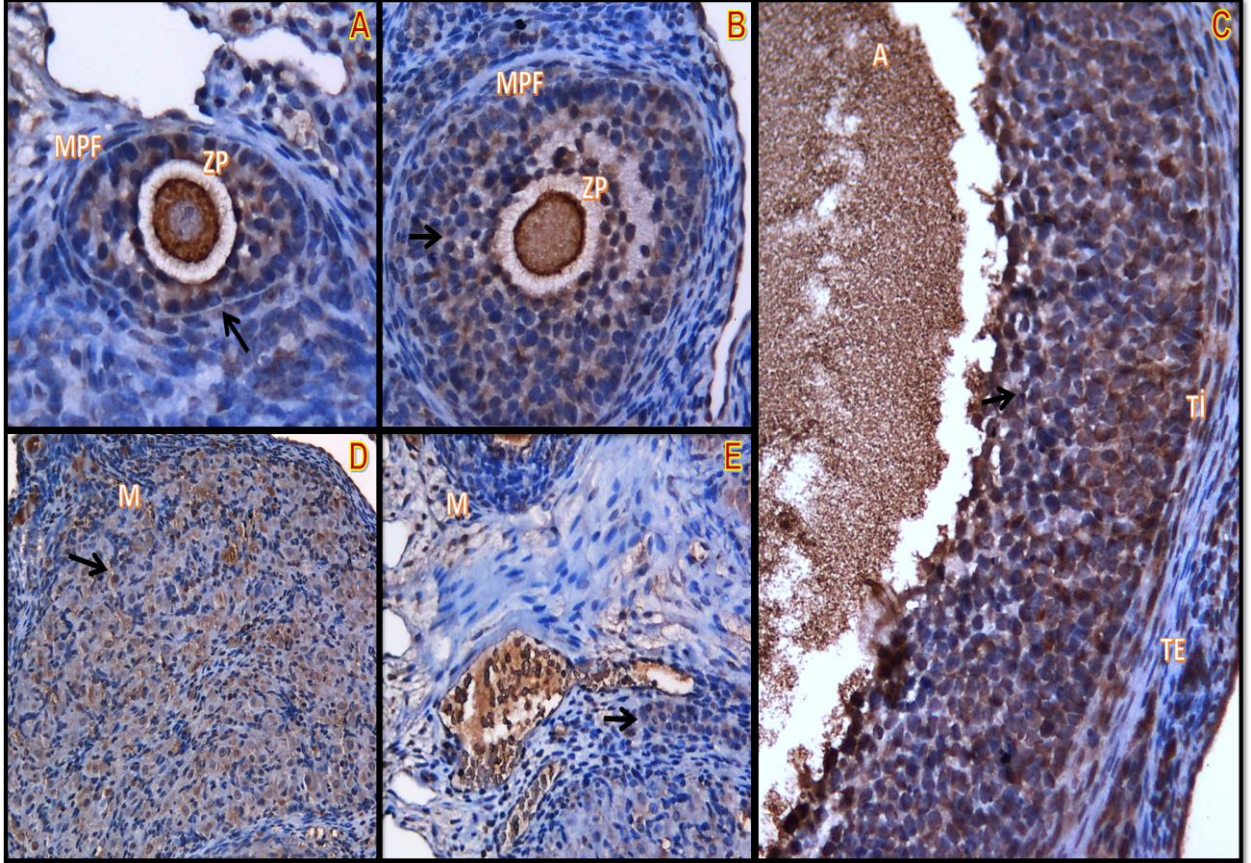
Resim 4.19. PTU indüklenen grubunun 8-OHdG açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Korpus Luteum (KL), Zona Pelusida (ZP), Teka İterna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Medulla (M), Antrum (A)



: 8-OHdG'nin germinal epitel, teka hücreleri ve medulla stromasında şiddetli immünreaktivitesi

Hipotiroidi oluşturulan ve arı sütü uygulanan grupta 8-OHdG immünreaktivitesinin özellikle medulla stromal hücrelerinde ve folikülleri çevreleyen bağ dokuda, PTU indüklenen gruba kıyasla daha az sayıda hücrede zayıf immünreaktivite gösterdiği

tespit edildi. Foliküllere ait granüloza hücrelerinde ve ooplazmada ise tutulumun ortadan şiddetliye değişen düzeyde olduğu gözlemlendi. Yine korpus luteumda da ortadan şiddetliye değişen immünreaktivite izlendi. Teka interna ve eksternadaki 8-OHdG tutulumunun ise oldukça zayıf olduğu belirlendi (Resim 4.20).



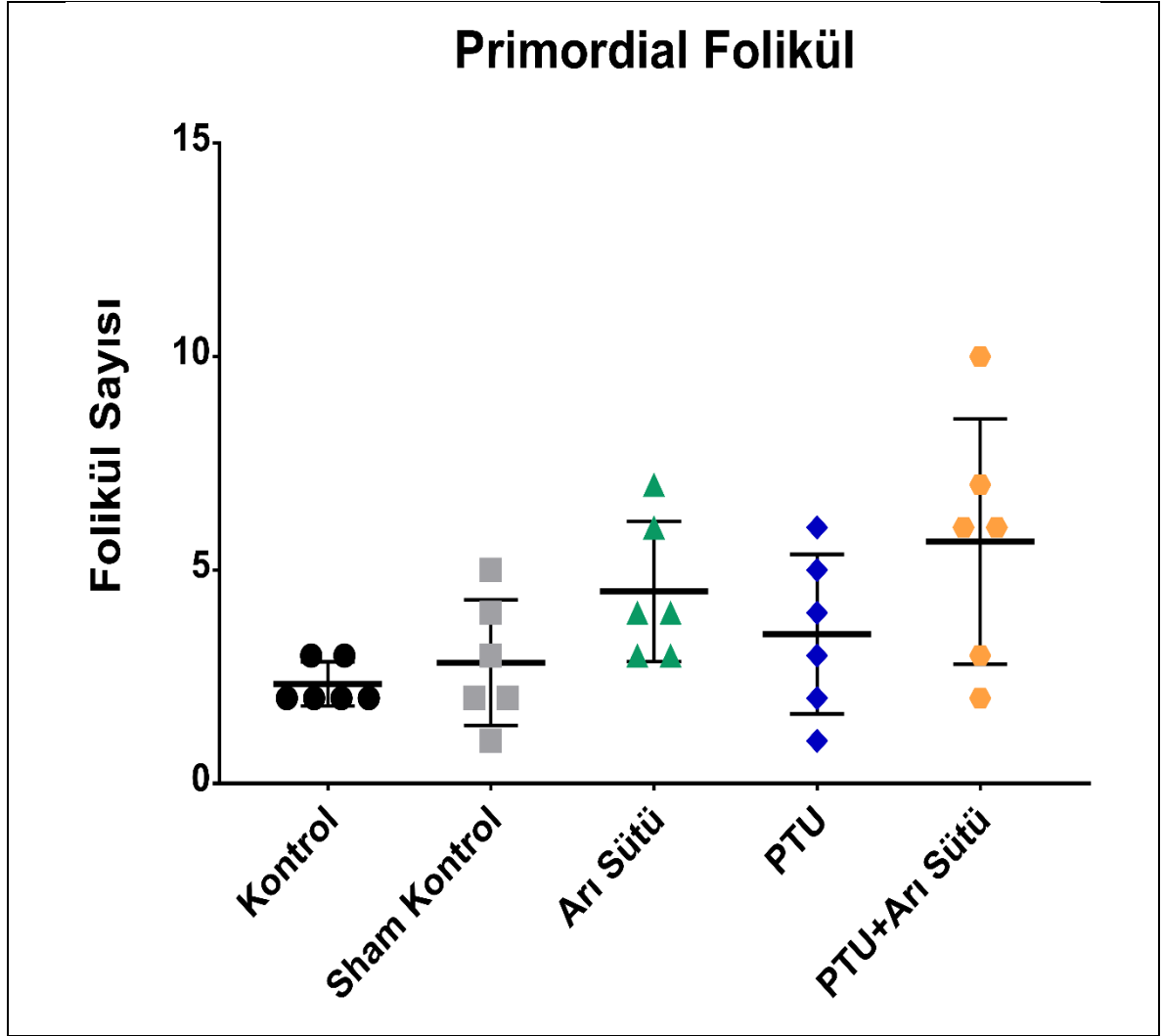
Resim 4.20. PTU ile birlikte arı sütü verilen grubun 8-OHdG açısından immünohistokimyasal boyamalarında; Multilaminar Primer Folikül (MPF), Zona Pelusida (ZP), Teka İnterna (Tİ), Teka Eksterna (TE), Medulla (M), Antrum (A)

→ : 8-OHdG'nin germinal epitel, teka hücreleri ve medulla stromasında zayıf immünreaktivitesi

4.3. Foliküllerin Dağılım Grafikleri

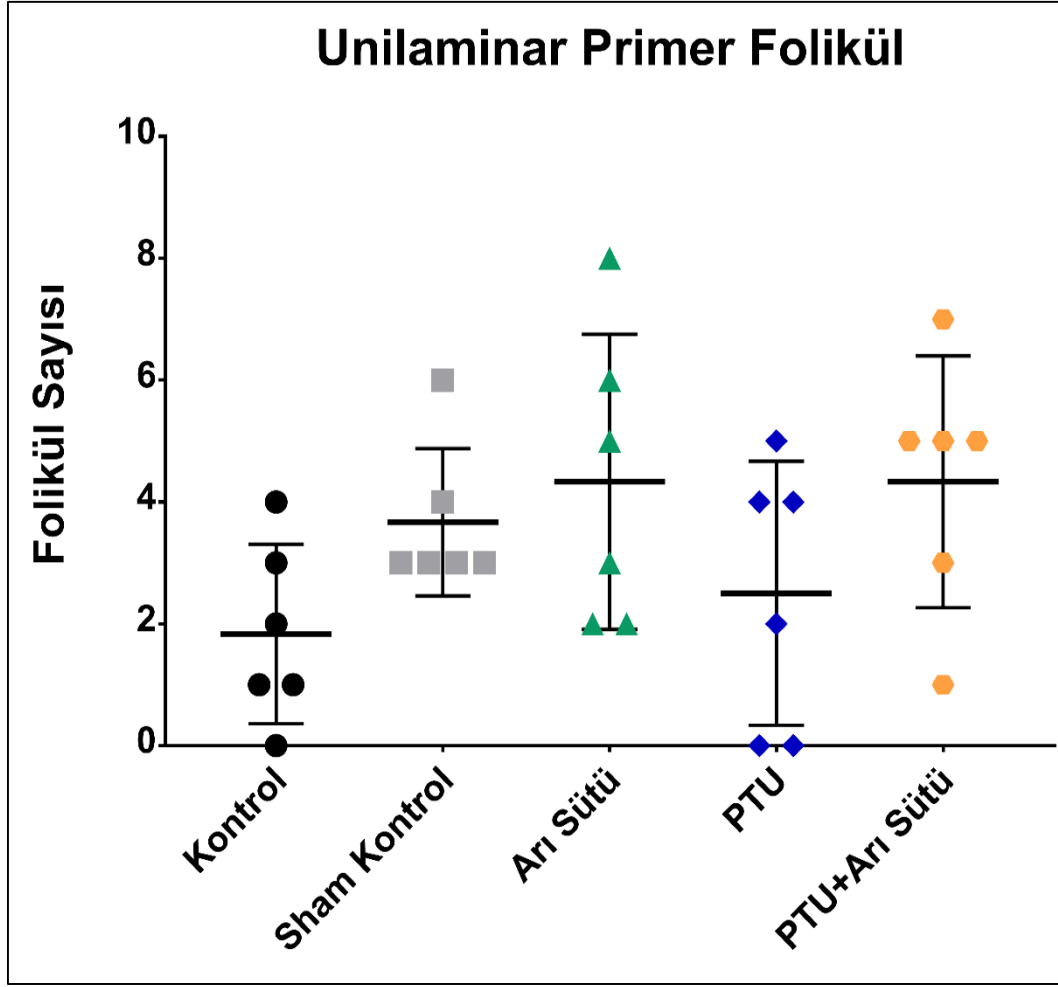
Çalışmada kullanılan deney hayvanlarından alınan ovaryum dokusu kesitlerindeki;

Primordial foliküllerin grup içi dağılımları incelendiğinde, kontrol ve sham kontrol gruplarının primordial folikül sayısı daha homojen bir dağılım gösterirken, PTU ve PTU ile birlikte arı sütü verilen gruplarda ise grup içi değişken dağılım gözlenmiştir (Şekil 4.1).



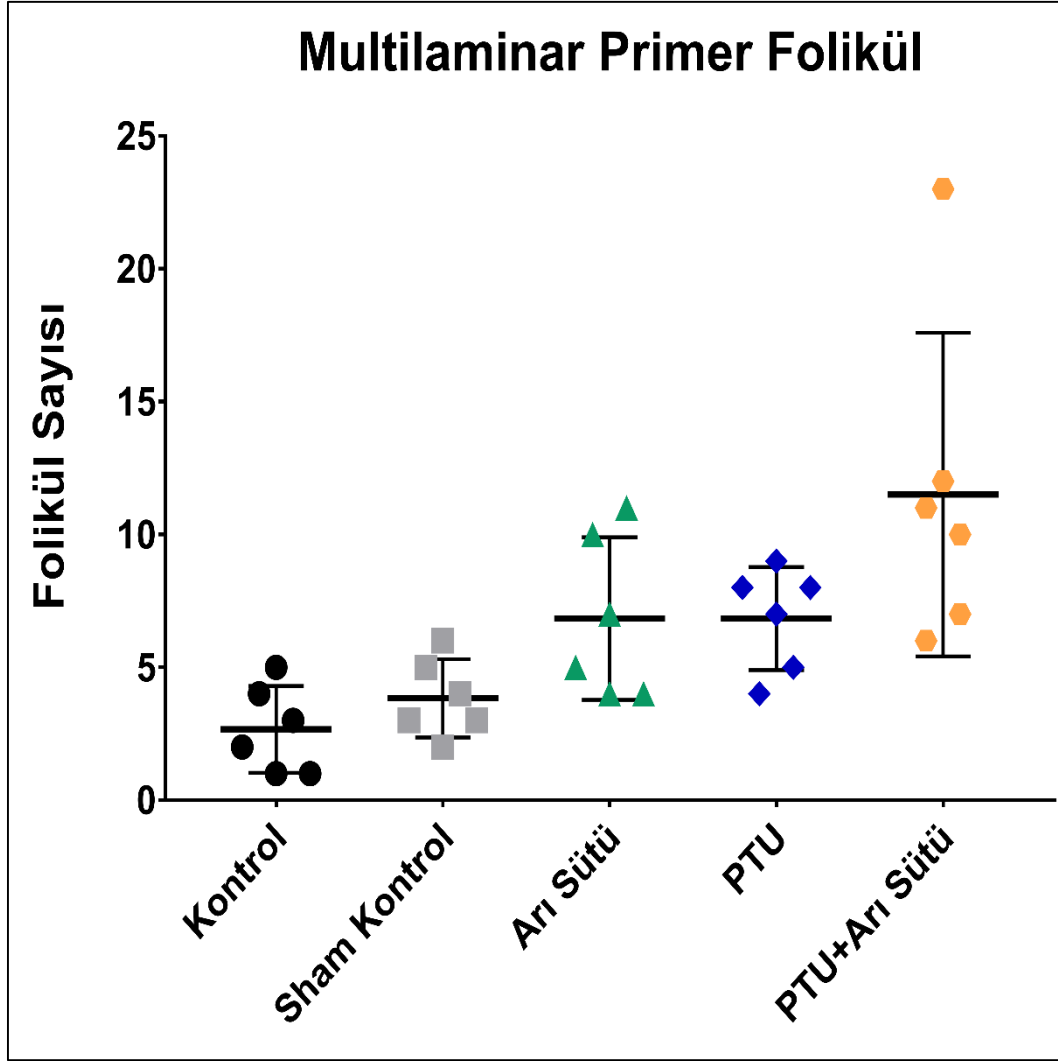
Şekil 4.1. Tüm gruplara ait Primordial Folikül dağılımları

Unilaminar primer foliküllerin gruplar arası dağılımları incelendiğinde; PTU indüklenen grubun sham kontrol grubuna kıyasla unilaminar primer folikül sayısında azalma olduğu, fakat PTU ile birlikte arı sütü verilen grubun unilaminar primer folikül sayılarında arı sütü grubuna kıyasla bir değişim göstermediği belirlenmiştir (Şekil 4.2).



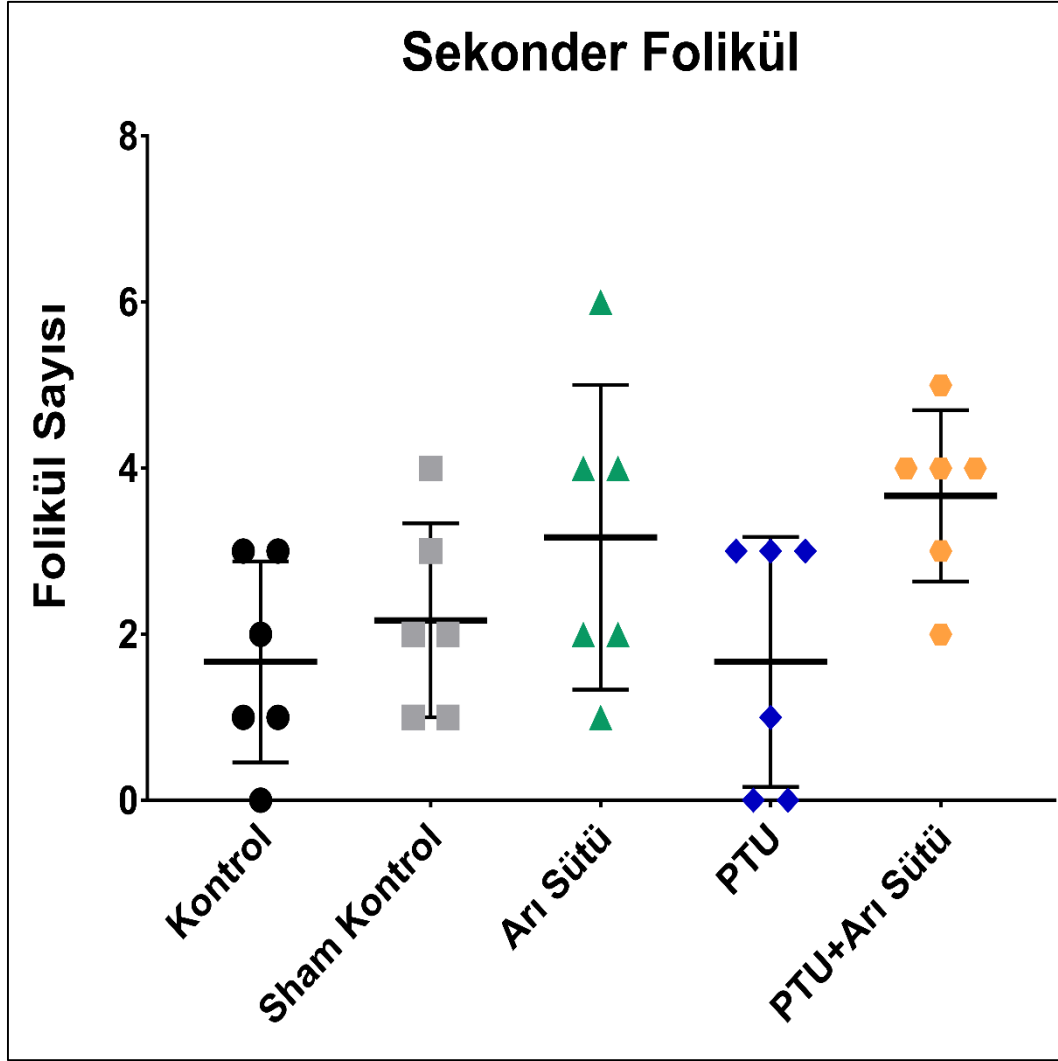
Şekil 4.2. Tüm gruplara ait Unilaminar Primer Folikül dağılımları

Multilaminar primer foliküllerin grup içi dağılımları incelendiğinde; tüm gruplara ait multilaminar primer folikül sayılarında grup içi değişken dağılım gözlenmiştir (Şekil 4.3).



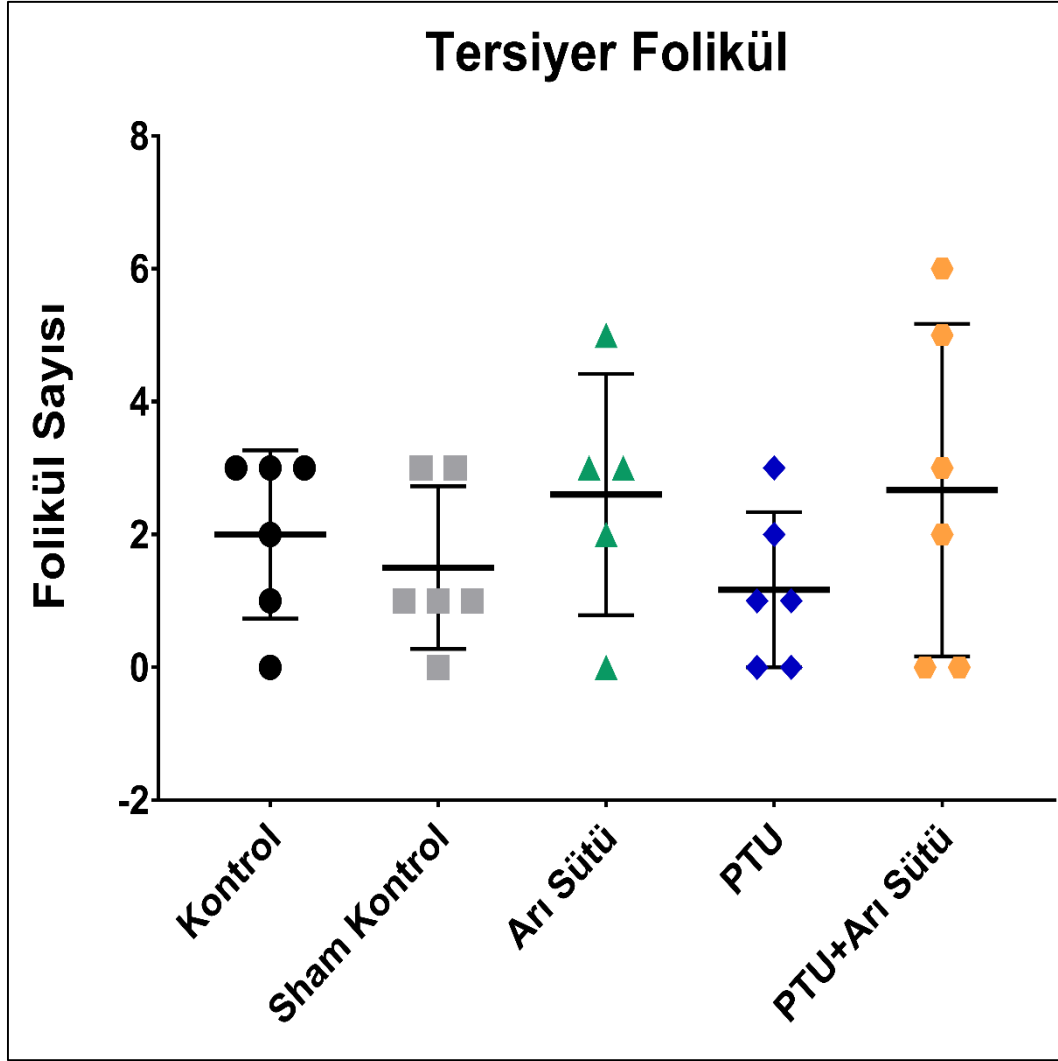
Şekil 4.3. Tüm gruplara ait Multilaminar Primer Folikül dağılımları

Sekonder foliküllerin grup içi dağılımları incelendiğinde; tüm gruplara ait sekonder folikül sayısının değişken dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Öte yandan, gruplar arası dağılımda ise PTU indüklenen gruba ait sekonder folikül sayısının diğer gruplara kıyasla azalma gösterdiği, arı sütü ve PTU ile birlikte sadece arı sütü verilen gruplardaki sekonder folikül sayısında ise artış olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.4.).



Şekil 4.4. Tüm gruplara ait Sekonder Folikül dağılımları

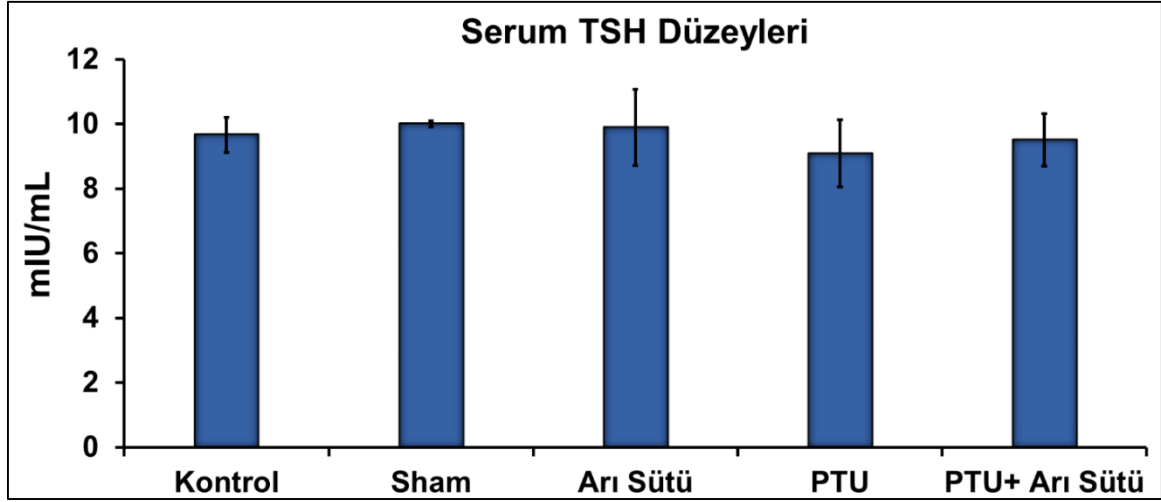
Tersiyer foliküllerin grup içi dağılımları incelendiğinde; tüm gruplara ait tersiyer foliküllerin değişken sayıda dağılım gösterdiği belirlenirken, PTU indüklenen gruba ait tersiyer folikül sayısının diğer gruplara kıyasla azalma gösterdiği belirlenmiştir (Şekil 4.5).



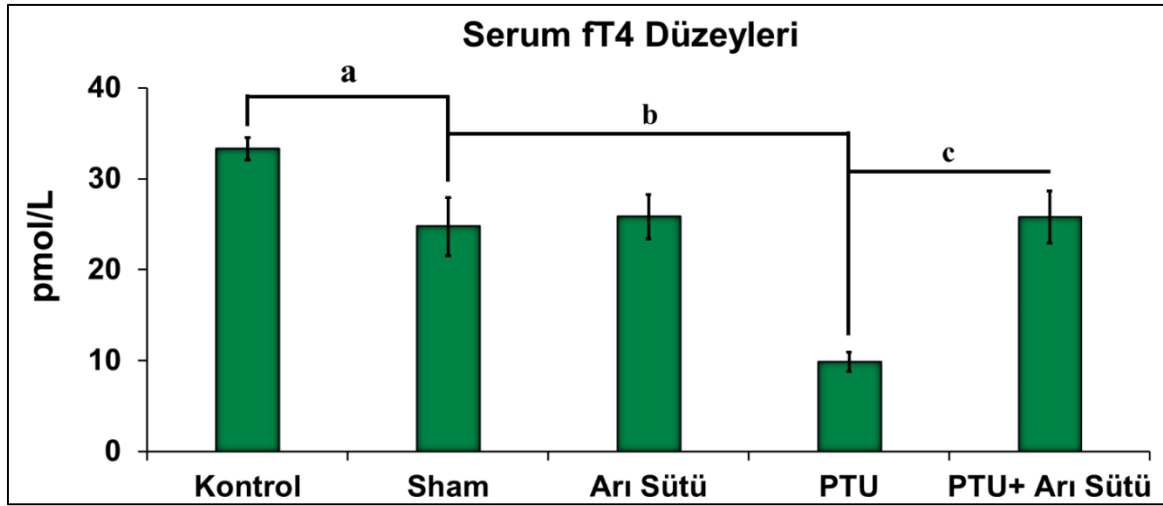
Şekil 4.5. Tüm gruplara ait Tersiyer Folikül dağılımları

4.4. İstatistiksel Bulgular

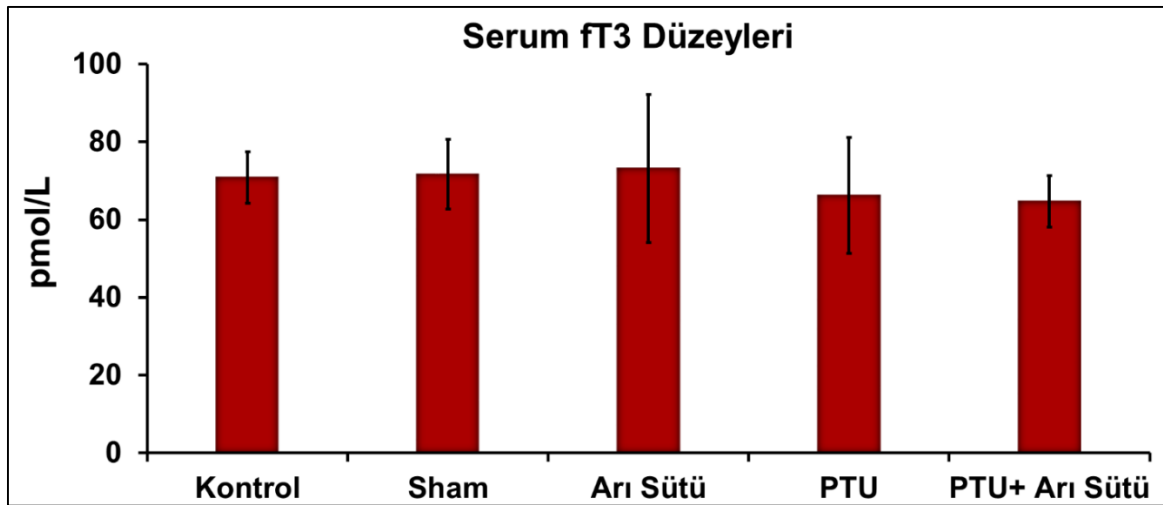
Deneklerden alınan kan örnekleri değerlendirilmesi sonucunda serum TSH, serbest T3 ve serbest T4 düzeyleri tespit edildi. Tek yönlü ANOVA (Bonferroni *post hoc test*) istatistiksel analizi sonucunda; gruplar arası serum TSH seviyelerinde bir farklılık gözlenmezken (Şekil 4.6), serbest T4 seviyelerinin PTU ve PTU ile birlikte arı sütü verilen gruplarda kontrole kıyasla anlamlı bir azalma olduğu belirlenmiştir (Şekil 4.7). Serum TSH seviyelerine benzer şekilde serbest T3 seviyeleri de gruplar arasında bir farklılık göstermemiştir (Şekil 4.8).



Şekil 4.6. Serum TSH düzeyleri



Şekil 4.7. Serum serbest T4 düzeyleri a: p<0.05; b: p<0.001; c: p<0.001



Şekil 4.8. Serum serbest T4 düzeyleri

5. TARTIŞMA

Tiroid hastalıkları kalp, beyin, bağırsaklar ve üreme sistemiyle ilgili organlar başta olmak üzere birçok organı etkilemektedir [206]. Hipotiroidi, kanda tiroid hormonlarının düşük seviyede görülmesine bağlı olarak oluşan ve birçok sistemde bozukluğa neden olan klinik bir tablo oluşturmaktadır [207]. Kadınlarda erkeklerden daha sık görülmektedir [208].

Tiroid hormonlarının yapımı ve salınımı hipotalamo-hipofizer-tiroid aksı ve periferik dokulardaki tiroid hormon seviyesi ile düzenlenmektedir [209]. Kanda T3 ve T4 seviyesinin azalması negatif feedback mekanizma ile TSH yapımını stimüle ederken, artması da TSH salınımını baskılamaktadır [210].

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri/reaktif nitrojen türleri (ROS/RNS) ile antioksidan düzeyleri arasındaki dengenin, organizmada ROS/RNS lehine olması durumudur. Bu sebeple, lipid, protein ve DNA'da oluşan hasarlar da oksidatif hasar olarak tanımlanmaktadır [128]. Tiroid metabolizmasının çeşitli nedenlerle bozulmasına bağlı olarak oluşan hipotiroidizm ve hipertiroidizm, insan [129] ve evcil hayvanlar [130] için dünya çapında önemli metabolik hastalıklar arasında yer almaktadır.

Tiroid hormonları aracılığı ile bazal metabolizmanın hızlanması sonucunda mitokondriyal solunum zincirinde ortaya çıkan reaktif oksijen türleri, vücutta oksidatif stresin oluşmasına neden olabilmektedir. Bozulan oksidan/antioksidan dengesi sonucu hücresel hasarlar ve çeşitli patolojik durumlar ortaya çıkmaktadır. ROS lipid peroksidasyonuna [132], proteinlerin karbonilasyonuna veya glutatyonilasyonuna [133] ve DNA'da baz hasarlarına [134] sebep olmaktadır. Hipotiroidizmde bazal metabolik hız düşmekte ve buna bağlı olarak lipid peroksidasyon seviyesinde ve serbest radikal üretiminde de azalma oluşmaktadır. Hipotiroidizm ayrıca, doku proteinlerinin miktarında da düşüşe yol açmaktadır. En önemlisi de, SOD aktivitesinde düşüşe neden olarak hücre membranını oksidatif hasara karşı hassas duruma getirmektedir [135].

1999 yılında Cecconi ve arkadaşları T3'ün granüloza hücrelerinde aromataz aktivitesini inhibe ettiğini göstermişlerdir [144]. T3 gen ekspresyonu yüksek oranda nükleer tiroid hormon reseptörleri ailesi aracılığıyla düzenlenmektedir. İnsan TR α geni kromozom 17'de ve TR β geni kromozom 3'te bulunmaktadır. Memeliler 3 değişik reseptör izoformu eksprese etmektedir (TR α -1, TR β -1 ve TR β -2) [47]. İki TR izoformu, α -1 ve β -1, insan mural granüloza hücrelerinde saptanmıştır [143]. Oositler ve kumulus hücreleri TR mRNA eksprese eder ve foliküler sıvı değişken ama anlamlı miktarda serbest T3 içermektedir [147].

Tiroid hormonlarının aşırı artışının dişi üreme yolunun fetal gelişimi üzerindeki etkilerine dair az sayıda veri bulunmaktadır. Bakke ve arkadaşlarının 1973 yılında yaptığı bir çalışmada genç dişi farelere verilen küçük tiroid hormon dozları, erken vajinal açılım ve östrus döngüsünün başlangıcı ile erken cinsel olgunluk kazanımına neden olduğunu göstermektedir. Aşırı tiroid hormonu alan farelerin yumurtalıkları, çok sayıda korpus luteum ve folikülü ortaya çıkardığı, erişkin dişi sıçanlarda, yüksek T4 dozlarının uygulanması, birkaç olgun folikül veya korpus luteum ile uzun süreli diöstrus ile sonuçlandığı bildirilmiştir [170]. Söz konusu çalışmamızda da PTU ile deneysel hipotiroidi indüklediğimiz dişi sıçanlarda hipotiroidi grubuna ait deneklerin ovaryum dokusunda atretik foliküllerin ve korpus luteum sayısının arttığı gözlemlenmiştir.

2001 yılında Jiang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, hipotiroidi oluşturulmuş genç farelerde infertilitenin nedeni çiftleşmeden önce T4 uygulaması ile tersine çevrilebilen bozulmuş foliküler gelişmeye bağlı olduğu gösterilmiştir [171]. Benzer şekilde yaptığımız çalışmada oluşturduğumuz hipotiroidi grubundaki en belirgin bulgu, kortekste yer alan ovaryum foliküllerinin birbirleri ile folikül tiplerini ayırt edemeyecek kadar birleşmiş olmasıydı. Yine granüloza hücreleri ile teka interna ve eksterna yapılarının da normal düzenlenimleri dışına çıkarak birleştiği ve sınırlarının net olarak ayırt edilemediği gözlemlenmiştir. Ayrımı yapılabilen bazı sekonder foliküllere ait antrumlarda kanama ve granüloza hücrelerine ait döküntü olduğu belirlenmiştir.

Dijkstra ve arkadaşlarının 1996 yılında yaptıkları çalışmada, PTU verilen sıçanların ovaryumlarında kontrol grubundaki sıçanların ovaryumlarına nispeten daha az

sayıda sekonder, antral, atretik antral ve atretik foliküller içerirken, korpus luteum içermediklerini öne sürmüşlerdir [165]. Öte yandan bizim yaptığımız çalışmada ise, hipotroidi oluşturulmuş deneklere ait ovaryum dokusunda atretik foliküllerin sayısının arttığı izlenmiştir. Ayrıca folikülleri ve damarları çevreleyen bağ dokuya ait kollajen liflerin azaldığı tespit edilmiştir.

Memeli ovaryumunun temel fonksiyonu olgun oosit üretimi ve steroid hormon biyosentezidir. Bu fonksiyonlar belli hormonal kontrol altında kompleks bir süreç olarak folikül gelişimi ile ilgilidir. Folikül gelişimi ve farklılaşmasının düzenlenmesinde hipofizden salgılanan gonadotropinler temel rol oynarken, çeşitli hormonların ve büyüme faktörlerinin ovaryum folikül gelişiminde etkili olduğu gösterilmiştir [134]. Ovaryum foliküllerinin gelişiminde ve kumulus-oosit kompleksinin (COC) olgunlaşmasında da T3 gereklidir. T3'ün COC olgunlaşmasının veya ovulasyonun etkilediği moleküler mekanizmaları tanımlamak hem tanı hem de in vitro fertilizasyon (IVF) ve embriyo transferi için uygun koşulların tanımlanmasında yararlı olacağı düşünülmektedir. Buna koşut PTU ile indüklenmiş denekler ile yaptığımız çalışmada da ovaryum foliküllerinin birbirleri ile folikül tiplerini ayırt edemeyecek şekilde kaynaşmış olduğunu, ayrımı yapılabilen bazı sekonder foliküllere ait antrumlarda ise kanama ve granüloza hücrelerine ait döküntüler olduğu izlenmiştir. Foliküllere ait primer oositlerin çoğunda da hipertrofi ve ödem tespit edilmiştir. Hipotiroidi grubundaki deneklerin ovaryumlarındaki tüm folikül tiplerinde granüloza hücrelerinin hipertrofik olduğu, çekirdek yapılarında kaybın meydana geldiği ve nekrotik bir yapı sergiledikleri belirlenmiştir. Granüloza hücreleri ile teka interna arasında yerleşim gösteren bazal membranın ise devamlılık sergilemediği izlenmiştir.

Metalloenzim ailesinin bir üyesi olan SOD [195] aktivitesi, oksijen kullanımının yüksek olduğu dokularda fazla, hücre dışında ise oldukça düşük aktiviteye sahiptir. Süperoksit radikallerinin H_2O_2 ve oksijene dönüşüm reaksiyonu kendiliğinden olabildiği gibi, SOD enziminin kataliziyle de gerçekleşmektedir. SOD enziminin kataliziyle çok hızlı gerçekleşen reaksiyon sonucunda membrandan geçemeyen süperoksit radikali, membrandan geçebilen H_2O_2 'e dönüşmektedir.

Meydana gelen H_2O_2 ise metal iyonlarının varlığında oldukça hızlı gerçekleşen bir takım reaksiyonlar sonucunda hücrede oksidatif hasar oluşturabilecek son derece zararlı olan hidroksil radikale dönüşmektedir. SOD aktivitesinin, hücre içindeki süperoksit miktarı düşük tutulurken hücre dışında biriken H_2O_2 'in etkisinin diğer antioksidan enzimler olan katalaz ve GSH-Px enzimleri sayesinde dengede tutulabileceği düşünülmektedir [196-198].

Yapısında bulunan metal iyonlarına göre farklı formları bulunan SOD'un, her formu temelde süperoksit radikalının moleküler oksijene ve hidrojen perokside dönüşümünü kataliz etmektedir. Hücresel alanlarda süperoksit düzeyinin kontrolünde önemli rol oynamaktadır [201].

İnsanlarda hipotiroidizm ve oksidatif stres ile ilgili birçok veri bulunmakla birlikte, bu veriler arasında kesin bir ilişki kurulamamıştır. Örneğin; Baskol ve arkadaşlarının 2007 yılında primer hipotiroidili 33 hastadan 18'i ötiroid durumundan, yani en az 6 aylık tiroksin replasmanından sonra tekrar değerlendirdikleri çalışmada, 26 sağlıklı bireyin serum SOD aktivitesi ile karşılaştırmışlardır. SOD aktivitesi, tedaviden önce ölçülen hastalarda kontrollere kıyasla farklı bulunmadığını bildirmişlerdir. Tedavi öncesi ve kontrol düzeyleriyle karşılaştırıldığında ise SOD aktivitesinin tedaviden sonra anlamlı olarak daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir [212].

Benzer şekilde, Gerenova ve Gadjeva 2007 yılında 71 haşimato hastası üzerinde yaptıkları bir çalışmada, plazmadaki lipid peroksidasyonu (malondialdehid, MDA) ve eritrositlerdeki SOD, katalaz (CAT) ve GSH-Px aktiviteleri gibi antioksidan değerlerini ölçmüşler ve haşimatolu bireyler ile sağlıklı bireylerin serum MDA ve SOD enzimlerinin reaktivitelerinde anlamlı bir fark bulunmadığını göstermişlerdir. Buna karşılık haşimatolu hastalarda CAT aktivitesi azalırken, GSH-Px aktivitesinin arttığını belirtmişlerdir. Haşimato hastalığının erken evresinde antioksidan destek tedavisi ile hormon replasman tedavisinin birlikte verilmesinin hastalığın ilerlemesini önleyebileceği sonucuna varmışlardır [213].

Öte yandan, 2017 yılında Oktay ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, deneysel hiper ve hioptiroidi oluşturulan ratlardan alınan çeşitli doku (böbrek, karaciğer, beyin) örneklerinde, hipertiroid grubundaki ratlara ait dokularda SOD aktivitesinin arttığını fakat hipotirid grubundaki ratlara ait dokulardaki SOD aktivitesinin ise belirgin şekilde azaldığını bildirmişlerdir [214].

2015 yılında Kong ve arkadaşları yaptıkları çalışmada deneysel hipotiroidi ve hipertiroidi oluşturdukları farelerin, kontrol grubu ile hipo-T ve hiper-T gruplarındaki deneklerin uterus dokularında SOD aktivitesini karşılaştırdıklarında, hipotirodizm oluşturulan farelerin uteruslarında SOD immünreaktivitesinin azalma gösterdiğini bildirmişlerdir. Buna karşılık hipo-T ve hiper-T grupları karşılaştırıldığında ise nerdeyse hiçbir fark olmadığını bildirmişlerdir [215].

Bu çalışmalardan farklı olarak, PTU ile deneysel hipotiroidi oluşturduğumuz çalışmamızda ratların ovaryumlarındaki foliküllerin tamamına ait granüloza hücrelerinde orta şiddetli olmak üzere sitoplazmik ve nükleer SOD immünreaktivitesi ayırt edildi. Ayrıca sekonder foliküllerin teka tabakalarına ait bazı hücrelerde, ortadan şiddetliye değişen sitoplazmik SOD immünreaktivitesi izlendi. Germinal epitelde de şiddetli immünreaktivite görüldü. Medulla stroması ve foliküller arası bağ dokuda ise immünreaktivite izlenmezken, korpus luteumda zayıf ile zayıftan ortaya değişen sitoplazmik tutulum tespit edilmiştir. Bu nedenle, verilerimiz, tiroid hormonunun sıçan yumurtalıklarında SOD aktivitesinin artmasına neden olabileceğini ortaya koymuştur.

Çalışmamıza benzer şekilde Wei ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı çalışmada hipertiroidizm oluşturdukları rat grubuna ait ovaryum dokusu hücrelerinde T-SOD aktivitesinin arttığını bildirmişlerdir [216].

2014 yılında Nazeri ve arkadaşları 85 hipotiroidli, 66 hipertiroidli ve 74 sağlıklı bireyin açlık halinde katalaz (CAT), SOD ve total antioksidan kapasitenin serum enzimatik aktivitesini ölçtükleri vaka çalışmasında, hipo ve hipertiroidizmlili hastalarda katalaz ve SOD aktivitesinin sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak arttığını bildirmişlerdir. Bu durumun nedenini, artmış serbest radikal oluşumuna bağlı olarak intrinsik antioksidan cevabın artmasını göstermişlerdir [217].

Serbest radikallerin DNA üzerinde oluşturduğu oksidatif hasar pürin ve pirimidin bazlarında değişiklikler meydana getirmektedir. Pürin bazları içerisinde en düşük iyonizasyon potansiyeline sahip bileşik guanindir. Reaktif oksijen türlerinin başlıca hedefi olmasının temel nedeni budur [218]. ROT'lar guaninin yapısında bulunan karbon (C) atomuna etki ederek birçok guanin türü oluşmasına sebep olmaktadır. Bunların içerisinde en sık meydana gelenler 7,8-dihidro-8-hidroksiguanin (8-OHG) ve FapyG'dir. 8-OHG'nin deoksiriboz şekerine bağlanarak oluşturduğu modifiye nükleozit ise 8-OHdG'dir. Okside olmuş DNA'nın ekzonükleazlar tarafından onarılmasıyla oluşan bir baz modifikasyonudur. Guanin, DNA'nın replikasyonunda adenin ile yanlış eşleşme yaparak Guanin-Sitozin → Adenin-Timin transversiyonuna neden olduğundan, oksidatif stresin bir biyogöstergesi olarak kabul edilmektedir [219].

Yaptığımız çalışmada, deneysel hipotiroidi oluşturulan rat grubuna ait ovaryum dokusundaki granüloza hücrelerinin hemen hemen tamamında ve ooplazmada nükleer ve sitoplazmik düzeyde orta şiddetliden çok şiddetliye değişen 8-OHdG tutulumuna rastlandı. Sekonder foliküllere ait teka hücrelerinin tamamına yakın bir çoğunlukta ortadan şiddetliye değişen düzeyde nükleer ve perinükleer immünreaktivite gözlemlenirken, diğer hücrelerde ise zayıf 8-OHdG tutulumu izlendi. Bu grupta korpus luteumun yanı sıra diğer gruplardan ve boyamalardan farklı olarak medulla stromasında da yaygın sayıda hücrede ortadan şiddetliye değişen düzeyde immünreaktivite görüldü. Ayrıca germinal epitelde de şiddetli tutulum tespit edildi.

2013 yılında Ece ve arkadaşlarının haşimatomlu hastalar üzerinde yaptığı çalışmada, hasta grubunun serum 8-OHdG düzeylerinin kontrol grubuna göre oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir [220]. Oksidatif stres, DNA hasarının indüksiyonunu etkiler ve DNA, serbest radikaller dahil olmak üzere reaktif türlerin oksidatif atağının biyolojik olarak en önemli hedefidir [189]. 8-OHdG oksidatif DNA hasarı için bir işaretleyicidir [205].

Hara ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise, oksidatif stresin otoimmün tiroid hastalıkları ile ilişkili olması sebebiyle, Graves hastalığı ve Hashimoto tiroiditi olan hastalardan mononükleer hücrelerin kültürü ile 8-OHdG ve sitokrom c üretimi

incelenmiş, bunun sonucunda tedavi edilmemiş Graves hastalığı olan hastalarda, mononükleer hücrelerin kültür süpernatantındaki 8-OHdG ve sitokrom c düzeyleri, sağlıklı (kontrol) deneklere göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir [221].

Bozulmuş oosit kalitesi ve oksidatif stresin, endometriozis ile ilişkili infertilitenin patogeneğinde rol oynayabileceğini araştıran Da Broi ve arkadaşları, 2016 senesinde yaptıkları çalışmada oksidatif stresin rolünü daha iyi anlamak için, endometriozis ve infertil kontroller ile infertil kadınlarda serum ve foliküler sıvıda lipidlerin, proteinlerin ve DNA hasarının eş zamanlı analizi dahil olmak üzere her aşamadaki sekiz oksidatif stres belirteçlerini karşılaştırmışlardır. Endometriozisli hasta grubunda daha yüksek serum konsantrasyonlarında GSH ve SOD, düşük serum total antioksidan düzeyleri (TAC) konsantrasyonları ve 8-OHdG ve vitamin E'nin infertil kontrollere göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir [222].

Ghanhari ve arkadaşlarının 2015 yılında diyabetik sıçanlarda yaptığı çalışmada, arı sütünün testis ağırlığı, sperm sayısı, canlılık, motilite, deformite, DNA bütünlüğü, kromatin kalitesi, serum testosteron ve testiküler doku MDA düzeyleri gibi üreme parametrelerini geliştirdiğini belirtmişlerdir [180].

Benzer şekilde 2009 yılında Hassan'ın yaptığı çalışmada, erkek ratlara 1 g/kg arı sütü uygulanmasıyla; testesteron düzeyi, sperm sayısı/canlı sperm oranının anlamlı derecede arttığı, anormal sperm yüzdesinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu bildirilmiştir [183].

2010 yılında erkek tavşanlarda sıcaklık stresine bağlı infertiliteyi önlemek amacıyla arı sütünü kullanan Elnagar, değişik dozlarda (200, 400, 800 mg/kg) arı sütü verilen tavşanlar ile oluşturulan gruplarda; kontrol grubuna göre, sperm motiliteleri, ejakulat hacmi, sperma konsantrasyonu, seminal plazmanın içerdiği fruktoz oranı ve testesteron düzeylerinin arttığını bildirmiştir. 200, 400, 800 mg/kg arı sütü verilen gruplarda sırasıyla, anormal spermlerin %24, %24, %15 ve ölü spermlerin %27, %25, %17 oranlarında olduğu, yani istatistiksel olarak anlamlı değerlerde arı sütünün sıcaklık stresinin etkilerini azaltıcı yönde etkili olduğunu göstermişlerdir [223].

Ghanhari ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı çalışmada arı sütünün folikülogenezi ve ovaryum hormonlarını arttırdığı bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda arı sütünün, olgunlaşmamış dişi hayvanlar için doğal bir büyüme uyarıcısı olarak düşünülebileceği görüşüne varılmıştır [186].

Biz de çalışmamızda PTU ile birlikte arı sütü uygulanan gruba ait ovaryum dokusu incelemelerinde, hipotiroidinin oluşturduğu oksidatif stresin bir sonucu olan folikül tiplerinin birbirleriyle kaynaşarak ayırtedilemesi durumunun, PTU ile eş zamanlı olarak arı sütü verdiğimiz grupta tamamen ortadan kalktığı dolayısıyla folikül ayrımının yapılabildiği tespit edildi. Bu gruba ait primordial ve unilaminar primer foliküller normal yapıları ile ayırt edilirken, multilaminar primer ve sekonder foliküllere ait granüloza hücrelerinde hipertrofi ve ödem, çekirdek ve sitoplazma kaybı oldukça belirgin olarak izlendi. Ayrıca foliküllere ait primer oositlerin genellikle hipertrofik yapıda olduğu, zona pellusidadan ayrılma gösteren ödematik yapı sergilediği tespit edildi. Bazı foliküllerde ise yer yer granüloza hücreleri ile teka interna arasındaki bölgede ayrılma ve düzensizlik tespit edildi. Fakat folikül ve damar duvarı çevresindeki bağ dokunun ise normal yapıda olduğu belirlendi.

Hipotiroidi ile birlikte arı sütü uygulanan gruba ait yapılan immünohistokimyasal incelemelerde, foliküllerin granüloza hücrelerine ait SOD tutulumunun sitoplazmik düzeyde ve çoğunlukla orta ve zayıftan ortaya değişen şiddette olduğu görüldü. Sekonder foliküllere ait teka tabakalarında ise zayıf sitoplazmik tutulumun varlığı izlendi. Yine korpus luteumda zayıf SOD immünreaktivitesi ayırt edilirken, germinal epitelde orta şiddetli tutulum tespit edildi.

PTU ile arı sütü verilen gruptaki deneklerin ovaryum dokusundaki 8-OHdG tutulumunun özellikle medulla stromal hücrelerinde ve folikülleri çevreleyen bağ dokuda PTU'nun tek başına uygulandığı gruba kıyasla daha az sayıda hücrede ve daha zayıf immünreaktivite gösterdiği, foliküllere ait granüloza hücrelerinde ve ooplazmada ise tutulumun değişen düzeyde devam ettiği tespit edildi. Yine korpus luteumda da ortadan şiddetliye değişen immünreaktivite izlendi. Teka tabakalarında ise tutulumun oldukça zayıfladığı görüldü.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, PTU ile oluşturulan hipotiroidi modelinin ovaryum dokusunda meydana getirdiği oksidatif stres sonucunda, germinal epitel de dahil olmak üzere tüm foliküllerde ve foliküller çevresi bağ doku ile medullada yoğun dejenerasyona yol açtığı, foliküler ayrımı ortadan kaldırdığı gözlenmiştir. Hipotiroidi sonucu dokuda olaylanan oksidatif stresten özellikle granüloza hücreleri ile germinal epitelin yoğun olarak etkilendiği, tüm bu dejeneratif değişimlerin arı sütü uygulaması ile büyük ölçüde normale döndüğü, arı sütü uygulaması ile birlikte oksidatif stresin SOD-1 düzeyinde immünreaktivitenin anlamlı seviyede azaldığı ancak 8-OHdG düzeyinde halen devam ettiği kanısına varılmıştır.

Düşük tiroid hormonlarının antioksidan savunmayı etkileyerek oksidatif stresi arttırabileceği ve ovaryum dokusunda oksidan etki oluşturabileceğini göstermektedir. Arı sütü uygulamasının ise hipotiroidinin yol açtığı oksidatif strese karşı antioksidan etki göstererek ovaryum dokusunu belirli ölçüde hipotiroidinin oluşturabileceği hasarlara karşı koruyabileceği gösterilmiştir.

Sonuç olarak, sözü edilen çalışmamızda gözlemlediğimiz histomorfolojik ve immünohistokimyasal bulgular doğrultusunda yapılacak olan ileri moleküler çalışmalar ile arı sütünün etkilediği sinyal yolları daha ayrıntılı şekilde aydınlatılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Sperof, L., Glass, R.H. and Kase, N.G. (1999). *Clinical gynecologic endocrinology and infertility*. 6th ed. Baltimore, Lippincott Williams & Wilkins.
2. Atasü, T. ve Şahmay, S. (2001). *Jinekoloji*. 2.Baskı. İstanbul:Nobel Tıp Kitapevleri.
3. Serdaroğlu, H., Berkman, S. ve Topuz, S. (2004). *Jinekoloji*.1.Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.
4. Jaslow, C. R., Patterson, K. S., Cholera, S., Jennings, L.K., Ke, R.W. and Kutteh, W.H. (2010). *CD9 Expression by human granulosa cells and platelets as a predictor of fertilization success during IVF*. Obstetrics and Gynecology International.
5. Madankumar, R., Cohen, M.A. and Brenner, S.H. (2003). Age and fertility. *Primary Care Update for Ob/Gyns*, 10(6), 270-273.
6. Gordon, D.J. and Speroff, L. (2003). *Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite el kitabı*. (Çeviri: Az, I., Vicdan, K.). Ankara:Nobel Tıp Kitapevleri.
7. Bankowski, B.J., Hearne, A.E., Lambrov, N.C., Fox, H.E. and Walach, E.E. (2005). *Johns hopkins jinekoloji ve obstetrik el kitabı*. 2.Baskı. (Çeviri: Vicdan, K., Az, I., Akarsu, C.). Ankara: Atlas Yayıncılık.
8. Speroff, L., Glass, R.H. and Kase, N.G. (1996). *Klinik jinekolojik endokrinoloji ve infertilite*. 5.Baskı. (Çeviri: Erk, A.) Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri.
9. Cramer, D.W., Liberman, R.F., Powers, D., Hornstein, M.D., Mcshane, P. and Barbieri, R.L. (2000). Recent trends in assisted reproductive techniques and associated outcomes. *Obstet Gynecology*, 95, 61-66.
10. Ferraretti, A. P., Gianaroli, L., Magli, M.C., Bafaro, G. and Colacurci, N. (2000). Female poor responders. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 161, 59-66.
11. Canipari, R. (2000). Oocyte- granulosa cell interactions. *Human Reproduction Update*, 6(3), 279-289.
12. Baltus, A. E., Menke, D. B., Hu, Y. C., Goodheart, M. L., Carpenter, A. E., de Rooij, D. G., Page, D. C. (2006). In germ cells of mouse embryonic ovaries, the decision to enter meiosis precedes premeiotic DNA replication. *Nature Genetics*, 38(12), 1430-4.
13. Oktay, K., Karlikaya, G., Akman, O., Ojakian, G. K. and Oktay, M. (2000). Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biology of Reproduction*, 63, 457- 61.
14. Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122, 829- 38.

15. Skinner, M. K. (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*, vol. 11, 461- 71.
16. Oktay, K., Briggs, D. and Gosden, R. G. (1997). Ontogeny of folliclestimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 82, 3748- 3751.
17. O'Brien, M. J., Pendola, J. K. and Eppig, J. J. (2003). A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biology of Reproduction*, 68, 1682- 1686.
18. Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H. A., Nachtigal, M. W., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., Themmen, A. P. (2002). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, 143(3), 1076-84.
19. Durlinger, A. L., Kramer, P., Karels, B., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., Themmen AP., (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 140, 5789- 96.
20. Van Rooij, I. A., Broekmans, F. J., te Velde, E. R., Fauser, B. C., Bancsi, L. F., de Jong, F. H., Themmen AP., (2002). Serum anti-Mullerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction Update*, 17, 3065-3071.
21. Ebner, T., Sommergruber, M., Moser, M., Shebl, O., Schreier-Lechner, E. and Tews, G. (2006). Basal level of anti-Mullerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles. *Human Reproduction Update*, 21, 2022- 2026.
22. Lee, W. S., Otsuka, F., Moore, R. K. and Shimasaki, S. (2001). Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction*, 65, 994- 9.
23. Nilsson, E. E. and Skinner, M. K. (2003). Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biology Of Reproduction*, 69, 1265-1272.
24. Dong, J., Albertini, D. F., Nishimori, K., Kumar, T .R., Lu, N. and Matzuk, M. M. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383, 531-535.
25. Carabatsos, M. J., Elvin, J., Matzuk, M. M. and Albertini, D. F. (1998). Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biology*, 204, 373- 384.
26. Vitt, U. A., McGee, E. A., Hayashi, M. and Hsueh, A. J. (2000). In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression

- and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, 141, 3814- 3820.
27. Nilsson, E. E. and Skinner, M. K. (2004). Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 214, 19- 25.
 28. Nilsson, E. E., Kezele, P. and Skinner, M. K. (2002). Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 188, 65- 73.
 29. Cheng, L., Gearing, D. P., White, L. S., Compton, D. L., Schooley, K. and Donovan, P. J. (1994). Role of leukemia inhibitory factor and its receptor in mouse primordial germ cell growth. *Development*, 120, 3145- 3153.
 30. Kezele, P., Nilsson, E. E. and Skinner, M. K. (2005). Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biology Of Reproduction*, 73, 967- 973.
 31. Kezele, P. R., Nilsson, E. E. and Skinner, M. K. (2002). Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 192, 37- 43.
 32. Rajkovic, A., Pangas, S. A., Ballow, D., Suzumori, N. and Matzuk, M. M. (2004). NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*, 305, 1157-1159.
 33. John, G. B., Gallardo, T. D., Shirley, L. J. and Castrillon, D. H. (2008). Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Developmental Biology*, 321, 197- 204.
 34. Hreinsson, J. G., Scott, J. E., Rasmussen, C., Swahn, M. L., Hsueh, A. J. and Hovatta, O. (2002). Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 87, 316- 321.
 35. Wang, J. and Roy, S. K. (2004). Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. *Biology of Reproduction*, 70, 577- 585.
 36. Hayashi, M., McGee, E. .A, Min, G., Klein, C., Rose, U. M., van Duin, M. Hsueh, A. J., (1999). Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, 140, 1236- 1244.
 37. Hanrahan, J. P., Gegan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R. Galloway, S. M. (2004). Mutations in the genes for oocytederived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70, 900-909.

38. Juengel, J. L., Hudson, N. L., Heath, D. A., Smith, P., Reader, K. L., Lawrence, S. B., O'Connell, A. R., Laitinen, M. P., Cranfield, M., Groome, N. P., Ritvos, O., McNatty, K. P. (2002). Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*, 67, 1777-1789.
39. Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T., Yamamoto, S., Erickson, G. F. and Shimasaki, S. (2000). Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 39523- 39528.
40. Otsuka, F., Moore, R. K., Iemura, S., Ueno, N. and Shimasaki, S. (2001). Follistatin inhibits the function of the oocyte-derived factor BMP-15. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289: 961-966.
41. Zhao, J., Taverne, M. A. van der Weijden, G. C., Bevers, M. M. and van den Hurk, R. (2001). Effect of activin a on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biology of Reproduction*, 65, 967-977.
42. Oktem, O. and Oktay, K. (2007). The role of extracellular matrix and activin-a in in vitro growth and survival of murine preantral follicles. *Reproductive Sciences*, 14, 358- 366.
43. Liu, X., Andoh, K., Abe, Y., Kobayashi, J., Yamada, K., Mizunuma, H., Ibuki, Y. (1999). A comparative study on transforming growth factor-beta and activin a for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology*, 140, 2480- 2485.
44. Smitz, J., Cortvrindt, R., Hu, Y. and Vanderstichele, H. (1998). Effects of recombinant activin a on in vitro culture of mouse preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 50, 294- 304.
45. Juengel, J. L. and McNatty, K. P. (2005). The role of proteins of the transforming growth factor-beta superfamily in the intraovarian regulation of follicular development. *Human Reproduction Update*, 11, 143- 160.
46. Roy, S. K. and Kole, A. R. (1998). Ovarian transforming growth factor- beta (TGF-beta) receptors: in-vitro effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF-beta on receptor expression in human preantral follicles. *Molecular Human Reproduction*, 4, 207-214.
47. Chegini, N. and Flanders, K. C. (1992). Presence of transforming growth factor-beta and their selective cellular localization in human ovarian tissue of various reproductive stages. *Endocrinology*, 130, 1707- 1715.
48. Saragueta, P. E., Lanuza, G. M. and Baranao, J. L. (2002). Autocrine role of transforming growth factor beta1 on rat granulosa cell proliferation. *Biology of Reproduction*, 66, 1862- 1868.
49. Dodson, W. C. and Schomberg, D. W. (1987). The effect of transforming growth factor-beta on follicle-stimulating hormone-induced differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, 120, 512- 516.

50. Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Hernandez, E. R., May, J. V., Purchio, A. F. and Twardzik, D. R. (1989). Ovarian transforming growth factorbeta (TGF beta): cellular site(s), and mechanism(s) of action. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 61, 247- 256.
51. Juneja, S. C., Barr, K. J., Enders, G. C., Kidder, G. M. (1999). Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biology of Reproduction*, 60, 1263- 70.
52. Simon, A. M., Goodenough, D. A., Li, E., Paul, D. L. (1997). Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, 385, 525- 529.
53. Baerwald, A. R., Adams, G. P., Pierson, R. A. (2003). Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. *Biology of Reproduction*, 69, 1023- 1031.
54. Fraser, H.M., Duncan, W.C. (2005). Vascular morphogenesis in the primate ovary. *Angiogenesis*, 8(2), 101-116.
55. Rodgers, R.J., Irving-Rodgers, H.F., Russell, D.L. (2003). Extracellular matrix of the Developing ovarian follicle. *Reproduction*, 126(4), 415-424.
56. Gartner, L.P. (2015). *Textbook of histology e-book*. Elsevier Health Sciences.
57. Kierszenbaum, L. (2006). *Histoloji ve hücre biyolojisi abraham*. (Çeviren: Demir, R.). Ankara: Palme Yayıncılık, 572-575.
58. Çelik, Ö. (2011). *Yardımcı üreme teknikleri temel klinik ve embriyolojik uygulamalar*. Adana: Nobel Kitabevleri.
59. Çolgan, U. (2006). *Reprodüktif endokrinoloji ve infertilite*. 1. Baskı, İstanbul: Medikal Yayıncılık.
60. Gartner, L.P.H. and Hiatt J.L. (2001). *Color textbook of histology*, 3rd Edition, Philadelphia: W.B. Saunders comp.
61. Frémont, L. (2000). Biological effects of resveratrol. *Life Sciences*. 66(8), 663-673.
62. Gövsa, G.F. (2003). *Sistematik anatomi*. İzmir: Güven Kitapevi.
63. Schünke, M., Schulte, E. and Schumacher, U. (2007). *promethus anatomi atlası*. Cilt: 2. (Çeviren: Yıldırım, M.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
64. Cumhuri, M., Yener, N. ve Tuncel, M. (2001). *Temel anatomi*. Ankara: Odtü Geliştirme Vakfı Yayıncık.
65. Dere, F. (1996). *Anatomi*. Cilt:1-2. 4. Baskı. Adana: Okullar Pazarı Kırtasiye.
66. Moore, L.K. and Dalley, A.F. (2007). *Kliniğe yönelik anatomi*. (Çeviren: Şahinoğlu, K.). 4. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.

67. Arıncı, K. ve Elhan, A. (2001). *Anatomi*. 1. Cilt. 2. Baskı. Ankara: Güneş Kitap Evi.
68. Snell, S.R. (1998). Tıp *fakültesi öğrencileri için klinik anatomi*. (Çeviren: Yıldırım, M.). 1. Baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
69. Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2003). *Temel histoloji*. (Çeviren: Aytekin, A., Solakoğlu, S.). Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri.
70. Gartner, L.P. and Hiatt, L.J. (2001). *Color text book of histology*. 2. Edition, London: WB Saunders Co.
71. Ovalle, W.K. and Nahirney, P.C. (2009). *Netter's essential histology*. (Çeviren: Müftüoğlu, S., Kaymaz, F., Atilla, P.). Ankara: Güneş Tıp Kitabevleri.
72. Eşrefoğlu, M. (2004). *Genel ve özel histoloji*. Ankara: Pelikan Tıp ve Teknik Kitapçılık.
73. Sternberg, S.S. (1997). *Histology for pathologist*. New York: Lippincott-Raven.
74. Guraya, S.S. (1977a). Recent advances in the morphology, histochemistry and biochemistry of the developing mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 51, 49–131.
75. Guraya, S.S. (1977b). Histochemical observations on the guinea pig ovary during pregnancy and lactation. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*, 82, 193–232.
76. Guraya, S.S. and Uppal, J. (1978). Morphological and histochemical studies on foetal and postnatal ovaries of the field rat (*Millardia meltda*). *Acta Morphologica Neerlandico-Scandinavica*, 16: 287–304.
77. Rennels, E.G. (1951). Influence of hormones on the histochemistry of ovarian interstitial tissue in the immature rat. *The American Journal of Anatomy*, 38, 63–108.
78. Duke, K. L. (1980). *Comparative aspects of the mammalian ovary*. (Eds. Motta, P.M., Hafez, E.S.E.), In: *Biology of the Ovary*. The Hague: Martinus Nijhoff.
79. Mossman, H. W. and Duke, K.L. (1973). *Comparative morphology of the mammalian ovary*. Madison, WI, University of Wisconsin Press
80. Christensen, A.K. (1975). *Leydig cells*. In: *Handbook of Physiology*, Section 7: Endocrinology. Male Reproductive System. Greep RO, Astwood (eds), Washington Dc: American Physiological Society.
81. Hall, P.F. (1988). *Testicular steroid synthesis: Organization and regulation*. In: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E, Neill JD, et al. (eds). New York: Raven Press.

82. Ross, M.H. (2003). *Histogy, A Text and Atlas*. 4th ed. Pennsylvania- VSA: Lippincott Williams and Wilkins.
83. Bukovsky, A., Caudle, M.R., Svetlikova, M. and Upadhyaya, N.B. (2004). Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2, 20.
84. Ross, M.H., Kaye, G.I. and Pawlina, W. (2003). *Histology a text and atlas*. 4th edition. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 833-834.
85. Lindeberg, M. (2008). *Molecular and morphological studies of folliculogenesis, oocyte maturation and embryogenesis in humans*. Karolinska Institutet. Department of Clinical Sciences Intervention and Technology, Division of Obstetric and Gynecology, Thesis for Doctoral Degree; Stockholm, Sweden.
86. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2006). *Histology a text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 5th edition, Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
87. Gardner, L.P. and Hiatt, J.L. (2000). *Color textbook of histology*. 3. Baskı. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 464-466.
88. Ross, M.H., Kaye, G.I., Pawlina, W. (2003). *Histology a text and atlas*. 4th edition. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 836-839.
89. Motta, P.M., Makabe, S., Nottola, S.A. (1997). The ultrastructure of human reproduction I. The natural history of the female germ cell :origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update*, 3, 281- 95.
90. Gartner, L.P. and Hiatt, J.L. (2001). *Histology*. 4. Baskı. Egypt, Williams & Wilkins.
91. Gartner, L.P. and Hiatt, J.L. (2007). *Color textbook of histology*. USA: Elsevier. 469-475.
92. Muftuoglu, S., Kaymaz, F. ve Atilla, P. (2009). *Netter temel histoloji*. Ankara: Günes Tıp Kitabevleri.
93. Junquera, L.C. and Carneiro, J. (2003). *Basic histology text and atlas*. 10th ed. USA: McGraw-Hill. 517-519.
94. Balasch, J., Fabregues, F., Tur, R., Creus, M., Casamitjana, R., Peñarrubia, J., Barri, P. N., Vanrell, J. A. (1995). Further characterization of the luteal phase inadequacy after gonadotrophin-releasing hormone agonist-induced ovulation in gonadotrophin-stimulated cycles. *Human Reproduction*, 10, 1377-1381.
95. Kayalı, H., Şatıroğlu, G. ve Taşyürekli, M. (1992). *İnsan embriyolojisi*. 7.Baskı. İstanbul: Alfa Basım Yayım.

96. Murathanoğlu, O. (2010). *Endokrinoloji ders notları*. İstanbul Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zooloji Anabilim Dalı, İstanbul.
97. Erdoğan, D., Hatipoğlu, M. T., Görgün, M. ve Ilgaz, C. (2007). *Özel histoloji*. Hatipoğlu.
98. Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2006). *Temel histoloji*. (Çeviren: Solakoğlu, S., Aytekin, Y.) Ankara: Güneş Tıp Kitabevi.
99. Kierszenbaum, A.L. (2006). *Histoloji ve hücre biyolojisi*. (Çeviren: Demir, R.) Ankara: Palme Yayıncılık. 565-572.
100. Gardner, L. P. and Hiatt, J.L. (2000). *Color textbook of histology*. 3. Baskı. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, USA. 468-471.
101. Ganong, W.F. (2001). *Review of medical physiology*, 20. Baskı. McGraw-Hill.
102. Hawkins, S. M. and Matzuk, M. M. (2008). The menstrual cycle: basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135, 10-8.
103. Uzumcu, M. and Zachow, R. (2007). Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: consequences within the ovary and on female reproductive function. *Reprod Toxicol*, 23, 337-352.
104. Laven, J. S. and Fauser, B.C. (2006). What role of estrogens in ovarian stimulation. *Maturitas*, 54, 356-362.
105. Kişnişçi H. A., Gökşin, E., Üstay, K., Durukan, T., (1996). *Temel kadın hastalıkları ve doğum bilgisi*. Ankara:Güneş Tıp Kitabevi.
106. Delibaşı, L., Balaban, B. ve Ayaş, B. (2000). *Gametler (sperm/oosit) fertilizasyon ve embriyoner gelişim*. İstanbul:Serono Yayınları.
107. Seeley, R.R., Stephens, T.D. and Tate, P. (1996). *Essentials of anatomy and physiology*. 2. Baskı. California-USA: WBC/McGraw-Hill.
108. Kesseş, B., Liu, Y.X. and Jia, X.C. (1985). Autocrine role of estrogens in the augmentation of luteinizing hormone receptor formation in cultured rat granulosa cells. *Biology of Reproduction*, 32, 1038-1050.
109. Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2003). *Basic histology text and atlas*. 10th ed. USA: McGraw-Hill. 520-523.
110. Erdoğan, D., Hatipoğlu, M. T., Görgün, M. ve Ilgaz, C. (1996). *Özel histoloji*. Ankara: SBAD Yayınları.
111. Hatipoğlu M. T. (2003). *Anatomi ve fizyoloji*. 14. Baskı. Ankara: Hatipoğlu.
112. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2006). *Histology – a text and atlas*. 50th Edition, 700 – 704, Lippincott Williams & Wilkins, USA. 755-757.

113. Tekelioğlu, M. (2002) *Özel histoloji (İnce Yapı ve Gelişme)*. İstanbul: Antıp Yayınları. 254.
114. Fawcett, D.W. (1986). *Bloom and fawcett – a text book of histology*. Eleventh Edition, Philadelphia: W.B. Saunders.
115. Leeson, T. S. and Leeson, C.R. (1988). *Text atlas of histology*. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
116. Tekelioğlu, M. (2002). *Özel histoloji (İnce Yapı ve Gelişme)*. İstanbul:Antıp Yayınları. 256-258.
117. Bur, M., Shiraki, W. and Masood, S. (1993). Estrogen and progesterone reseptor detection in neoplastic and non-neoplastic thyroid tissues. *Modern Pathology*, 6, 469–47,.
118. Mc Millian, P. J., Hooker, W. M. and Defots, L. J. (1974). Distribution of calcitonin – containing cells in the human thyroid. *The American Journal of Anatomy*, 140, 73 – 80.
119. Gartner L. P. and Hiatt J. L. (2007). *Color textbook of histology*. 30th Edition, Philadelphia: Saunders Elsevier. 311-316.
120. Junqueira, L.C. and Carneiro, J. (2006). *Temel histoloji*: 10 Baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri. 465.
121. Susan, S. (2005). *Gray's anatomy – The anatomical basis of clinical practice*. Thirty-Ninth Edition. Elsevier Churchill Livingstone.
122. Yamada, Y., Matsubara, Y. and Kobayashi, S. (1977). Immunohistochemical demonstration of somatostatin – containing cells in the human, dog and rat thyroid. *The Tohoku Journal Of Experimental Medicine*, 122, 87– 92.
123. Guyton, A.C. and Hall, J.E. (2006). *Thyroid Metabolic Hormones*. Textbook of Medical Physiology. 11. Baskı. Philadelphia: Elsevier Saunders.
124. De Felice, M. and Di Lauro, R. (2009). *Td, clinical management of thyroid disease*. Chapter II. Endocrinological Reviews.
125. Ren R., Jiang X., Zhang X., Guan Q., Yu C., Li Y., Gao L., Zhang H., Zhao J. Association between thyroid hormones and body fat in euthyroid subjects. *Clinical Endocrinology (Oxford)*. 2014 April;80(4):585-90.
126. Noyan, A. (2011). *Yaşamda ve hekimlikte fizyoloji*. Ankara: Palme Yayınları.
127. Miettinen, M. and Virtanen, I. (1984). Expression of laminin in thyroid gland and thyroid pathology. An Immunohstologic study. *International Journal of Cancer*, 34, 27–30.
128. Guerrero, A., Pamplona, R., Portero-Otin, M., Barja, G., Lopez-Torres, M. (1999). Effect of thyroid status on lipid composition and peroxidation in the mouse liver. *Free Radical Biology & Medicine*, 26(1-2), 73-80.

129. Pamplona, R., Portero-Otin, M., Ruiz, C., Bellmunt, M.J., Requena, J.R., Thorpe, S.R., Baynes, J.W., Romero, M., Lopez-Torres, M. and Barja, G. (1999). Thyroid status modulates glycoxidative and lipoxidative modification of tissue proteins. *Free Radical Biology & Medicine*, 27(7-8), 901-910.
130. Lopez-Torres, M., Romero, M. and Barja, G. (2000). Effect of thyroid hormones on mitochondrial oxygen free radical production and DNA oxidative damage in the rat heart. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 168(1-2), 140-44.
131. Petrulea, M., Muresan, A. and Duncea, I. (2012). *Oxidative stress and antioxidant status in hypo- and hyperthyroidism*. Antioxidant Enzyme. El-Missiry MA, InTech.
132. Bhandary, B., Marahatta, A., Kim, H.R. and Chae, H.J. (2012). An involvement of oxidative stress in endoplasmic reticulum stress and its associated diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(1), 434-456.
133. Wakim, A. N., Polizotto, S. L., Buffo, M. J., Marrero, M. A. and Burholt, D. R. (1993). Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 59, 1187– 1190.
134. Cecconi, S., Rucci, N., Scaldaferrri, M. L., Mascuilli, M. P., Rossi, G. Moretti, C., D'Armiento, M., Ulisse S. (1999). Thyroid hormone effects on mouse oocyte maturation and granulosa cell aromatase activity. *Endocrinology*, 140, 1783–1788.
135. Koenig, R.J., Lazar, M.A., Hodin, R.A., Brent, G.A., Larsen, P.R., Chin, W.W. and Moore, D.D. (1989). Inhibition of thyroid hormone action by a non-hormone binding c-erbA protein generated by alternative mRNA splicing. *Nature*, 337, 659–661.
136. Hodin, R.A., Lazar, M.A. and Chin, W.W. (1990). Differential and tissue specific regulation of the multiple rat c-erbA messenger RNA species by thyroid hormone. *The Journal of Clinical Investigation*, 85, 101–105.
137. Jena, S., Chainy, G.B. and Dandapat, J. (2012). Expression of antioxidant genes in renal cortex of PTU-induced hypothyroid rats: effect of vitamin E and curcumin. *Molecular Biology Reports*, 39(2), 1193-1203.
138. Messarah, M., Saoudi, M., Boumendjel, A., Boulakoud, M. S. and Feki, A. E. (2011). Oxidative stress induced by thyroid dysfunction in rat erythrocytes and heart. *Environ Toxicol Pharmacol*, 31(1), 33-41.
139. Kumari, N. S., Gowda, S. and Gowda, K. M. D. (2011). Oxidative Stress in Hypo and Hyperthyroidism. *Al Ameen Journal of Medical Sciences*, 4(1), 49-53.
140. Salama, A.F., Tousson, E., Ibrahim, W. and Hussein, W.M. (2013). Biochemical and histopathological studies of the PTU-induced hypothyroid

rat kidney with reference to the ameliorating role of folic acid. *Toxicology and Industrial Health*, 29(7), 600-8.

141. Lopez-Torres, M., Romero, M. and Barja, G. (2000). Effect of thyroid hormones on mitochondrial oxygen free radical production and DNA oxidative damage in the rat heart. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 168(1-2), 127-134.
142. Gredilla, R., Barja, G. and Lopez-Torres, M.. (2001b). Thyroid hormone-induced oxidative damage on lipids, glutathione and DNA in the mouse heart. *Free Radical Research*, 35(4), 417-425.
143. Zhang, S.S., Carrillo, A.J. and Darling, D.S. (1997). Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNA in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. *Molecular Human Reproduction*, 3, 555–562.
144. Tunbridge, W.M., Evered, D.C., Hall, R., Appleton, D., Brewis, M., Clark, F., Evans, J.G., Young, E., Bird, T. and Smith, P.A. (1977). Lipid profiles and cardiovascular disease in the Whickham area with particular reference to thyroid failure. *Clinical Endocrinology*, 7, 495–508.
145. Vanderpump, M. P., Tunbridge, W. M., French, J. M., Appleton, D., Bates, D., Clark, F., Grimley-Evans, J., Hasan, D. M., Rodgers, H., Tunbridge, F. and Young, E. T. (1995). The incidence of thyroid disorders in the community: a twenty-year follow-up of the Whickham Survey. *Clinical Endocrinology*, 43, 55–68.
146. Wang, C. and Crapo, L. M. (1997). The epidemiology of thyroid disease and implications for screening. *Endocrinology Metabolism Clinics of North America*, 26, 189–218.
147. Redmond, G. P. (2004). Thyroid dysfunction and women's reproductive health. *Thyroid*, 14(1), 5–15.
148. Longcope, C., Abend, S., Braverman, L. E. and Emerson, C. H. (1990). Androstenedione and estrone dynamics in hypothyroid women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 70, 903–907.
149. Larsen, P. R., Davies, T. F. and Hay, I. D. (1998) *The thyroid gland*. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR, eds. Williams textbook of endocrinology. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders.
150. Marino, M., Chiovato, L. and Pinchera, A. (2006). *Graves' disease*. In: DeGroot LJ, Jameson JL, eds. Endocrinology. 5. Baski. Philadelphia: Elsevier Saunders.
151. Krassas, G. E., Pontikides, N., Kaltsas, T., Papadopoulou, P., Paunkovic, J., Paunkovic, N. and Duntas, L. H. (1999). Disturbances of menstruation in hypothyroidism. *Clinical Endocrinology*, 50, 651–653.

152. Ansell, J.E. (1996). *The blood in the hypothyroidism*. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. *Werner and Ingbar's the thyroid—a fundamental and clinical text*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven.
153. Sturgis, R. E., Lerman, S. H. and Stanbury, J. B. (1952). The menstrual pattern in thyroid disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 12, 846–855.
154. Benson, R.C. and Dailey, M.E. (1955). The menstrual pattern in hyperthyroidism and subsequent posttherapy hypothyroidism. *Surgery, Gynecology & Obstetrics*, 100, 19–26.
155. Scott, J.J.C. and Mussey, E. (1964). Menstrual patterns in myxedema. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 90, 161–165.
156. Joshi, J.V., Bhandarkar, S.D., Chadha, M., Balaiah, D. and Shah, R. (1993). Menstrual irregularities and lactation failure may precede thyroid dysfunction or goitre. *Postgraduate Medical Journal*, 39, 137–141.
157. Krassas, G. E., Pontikides, N., Kaltsas, T., Papadopoulou, .P, Paunkovic. J., Paunkovic, N. and Duntas, L. H. (1999). Disturbances of menstruation in hypothyroidism. *Clinical Endocrinology*, 50, 655–659.
158. Bohnet, H. G., Fiedler, K. and Leidenberger, F. A. (1981). Subclinical hypothyroidism and infertility. *Lancet* , 2, 1278.
159. Bals-Pratsch, M., De Geyter, C., Müller, T., Frieling, U., Lerchl, A., Pirke, K. M., Hanker, J. P., Becker-Carus, C. and Nieschlag, E. (1997). Episodic variations of prolactin, thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, melatonin and cortisol in infertile women with subclinical hypothyroidism. *Human Reproduction*, 12, 896–904.
160. Shalev, E., Eliyahu, S., Ziv, M. and Ben-Ami, M. (1994). Routine thyroid function tests in infertile women: are they necessary? *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 171, 1191–1192.
161. Nezi, M., Christopoulos, P., Paltoglou, G., Gryparis, A., Bakoulas, V., Deligeoroglou, E., Creatsas, G. and Mastorakos, G. (2016). Focus on BMI and subclinical hypothyroidism in adolescent girls first examined for amenorrhea or oligomenorrhea. The emerging role of polycystic ovary syndrome. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 29(6), 693-702.
162. Gerhard, I., Becker, T., Eggert-Kruse, W., Klinga, K. and Runnebaum, B. (1991). Thyroid and ovarian function in infertile women. *Human Reproduction*, 6, 338–345.
163. Vasudevan, N., Ogawa, S. and Pfaff, D. (2002). Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: physiological flexibility by molecular specificity. *Physiological Reviews*, 82, 923–944.

164. Zhang, H. X., Qin, Y. Z., Liu, W. H. and Hao, R. (2014). Hypothyroidism and first-trimester spontaneous miscarriages. *Clinical and Experimental Obstetrics and Gynecology*, 41(2), 182-185.
165. Dijkstra, G., de Rooij, D. G., de Jong, F. H. and van den Hurk, R. (1996). Effect of hypothyroidism on ovarian follicular development, granulosa cell proliferation and peripheral hormone levels in the prepubertal rat. *European Journal of Endocrinology*, 134, 649–654.
166. Potter, B.J., Mano, M.T., Belling, G.B., Martin, D.M., Cragg, B.G., Chavadej, J. and Hetzel, B.S. (1984). Restoration of brain growth in fetal sheep after iodized oil administration to pregnant iodine-deficient ewes. *Journal of the Neurological Sciences*, 66(1), 15-26.
167. Versloot, P.M., Schröder-van, der Elst J.P., vander Heide, D. and Boogerd, L. (1997). Effects of marginal iodine deficiency during pregnancy: iodide uptake by the maternal and fetal thyroid. *American Journal of Physiology*, 273, 1121–1126.
168. Maruo, T., Hiramatsu, S., Otani, T., Hayashi, M. and Mochizuki, M. (1992). Increase in the expression of thyroid hormone receptors in porcine granulosa cells early in follicular maturation. *Acta Endocrinology (Copenh)* 127,152–160.
169. Tohei, A., Imai, A., Watanabe, G. and Taya, K. (1998). Influence of thiouracil-induced hypothyroidism on adrenal and gonadal functions in adult female rats. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 60, 439–446.
170. Bagavandoss, P., England, B., Asirvatham, A. and Bruot, B.C. (1998). Transient induction of polycystic ovary-like syndrome in immature hypothyroid rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 219, 77–84.
171. Jiang, J. Y., Imai, Y., Umezu, M. and Sato, E. (2001). Characteristics of infertility in female hypothyroid (hyt) mice. *Reproduction*, 122, 695–700.
172. Iannuzzi, J. (1990). Royal Jelly: Mystery food. 1st part. *The American Bee Journal*, 8, (610), 12-19.
173. İnternet: URL:
http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2FTr.Wikipedia.Org%2FWiki%2FDosya%3ABienenwabe_Mit_Eiern_Und_Brut_5.Jpg.+Son&date=2018-06-12 Erişim Tarihi: 02.04.2018.
174. Lercker, G., Capella, P., Conte, L. S. and Ruini, F. (1981). Components of royal jelly: I. Identification of the organic acids. *Lipids*, 16(12), 912-919.
175. Krell, R. (1996). *Value-added products from beekeeping*. Chapter 6: Royal Jelly.
176. Arslan, A. ve Bayraktar, A. (1988). Arı Sütü ve Kimyasal Bileşimi. *Teknik Arıcılık Dergisi*, 8, 27-30.

177. Lercker, G., Vecchi, M. A., Piana, L., Nanetti, A. and Sabatini, A. G. (1984). Composition de la fraction lipidique de la gelée royale de larves d'abeilles reines et ouvrières (*Apis mellifera ligustica*, Spinola) en fonction de l'âge des larves. *Apidologie*, 15(3), 303-314.
178. Benfenati, L., Sabatini, A. G. and Nanetti, A. (1986). Composizione in sali minerali della gelatina reale. *Apicoltura*, 2, 129-143.
179. Vecchi, M. A., Sabatini, A. G., Grazia, L., Tini, V. and Zambonelli, C. (1988). Il contenuto in vitamine come possibile elemento di caratterizzazione della gelatina reale. *Apicoltura*, 4, 139-146.
180. Ghanbari, E., Nejati, V., Najafi, G., Khazaei, M. and Babaei, M. (2015). Study on the effect of royal jelly on reproductive parameters in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Materials Research*, 9(1), 113-120.
181. Abdelhafiz, A.T. and Muhamad, J.A. (2008). Midcycle pericoital intravaginal bee honey and royal jelly for male factor infertility. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 101(2), 146-149.
182. Karacal-Tamamogullari, F., Aral, F. ve Demirkol, R. (2006). Erkek farelerde arı sütünün uzun süreli uygulanmasının bazı spermatolojik özellikler üzerine etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 20(5), 341-344.
183. Hassan, A.A. (2009). Effect of royal jelly on sexual efficiency in adult male rats. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 23, 155-160.
184. Elnagar, S. A. (2010). Royal jelly counteracts bucks' "summer infertility". *Animal Reproduction Sciences*, 121(1-2), 174-180.
185. Mishima, S., Suzuki, K. M., Isohama, Y., Kuratsu, N., Araki, Y., Inoue, M. and Miyata, T. (2005). Royal jelly has estrogenic effects in vitro and in vivo. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3), 215-220.
186. Ghanbari, E., Khazaei, M. R., Khazaei, M. and Nejati, V. (2018). Royal Jelly Promotes Ovarian Follicles Growth and Increases Steroid Hormones in Immature Rats. *International Journal of Fertility and Sterility*, 11(4), 263-269.
187. Eshtiyaghi, M., Deldar, H., Pirsaraei, Z. A., Shohreh, B. (2016). Royal jelly may improve the metabolism of glucose and redox state of ovine oocytes matured in vitro and embryonic development following in vitro fertilization *Theriogenology*, 86(9), 2210-2221.
188. Caporaso, N. (2003). The Molecular Epidemiology of Oxidative Damage to DNA and Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(17), 1263-1265.
189. Burçak, G. and Andican, G. (2004). Oksidatif DNA hasarı ve yaşlanma. *Cerrahpaşa Journal of Medicine*, 35, 159-169.

190. Boiteux, S. and Radicella, J. P. (1999). Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie*, 81(1-2), 59-67.
191. Halliwell, B. (1991). Reactive Oxygen Species In Living System:Source, Biochemistry And Role In Human Disease. *American Journal of Medicine*, 91, 14-21.
192. Shacter, E. (2000). Protein Oxidative Damage. *Methods Enzymol*, 319, 428-436.
193. Halliwell, B., and Gutteridge, J.M.C. (2007). *Free radicals in biology and medicine*. Newyork: Oxford University Press Inc.
194. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) .Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions*, 160, 1– 40.
195. Mccord, J.M. and Fridovich, I. (1969). Superoxide Dismutase. An Enzymic Function For Erythrocuprein (Hemocuprein). *The Journal of Biological Chemistry*, 244(22), 6049-6055.
196. Akkus, I. (1995). *Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri*. Konya: Mimoza Yayınları.
197. Rigo, A., Stevanato, R., Finazzi-Agro, A. and Rotilio, G. (1977). An attempt to evaluate the rate of the haber-weiss reaction by using oh radical scavengers. *Febs Letters*, 80, 130-132.
198. Deaton, C.M. and Marlin, D.J. (2003). Exercise-associated oxidative stress. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 2(3), 278-291.
199. Halliwell, B. (1999). *Gutteridge JMC. Free radical in biology and medicine*. Oxford:Oxford Sci Publ.
200. Buettner, G.R. (1998). *Antioxidant enzymes and functions*. Wahington D.C: Sunrise Free Radical School.
201. Fridovich, I. (2001). *Oxidative stress*. Encyclopedia Of Life Sciences, Nature Publishing Group, Wwww.Els.Com.
202. Jaruga, P., Rodriguez, H. and Dizdaroğlu, M. (2001). Measurement of 8-hydroxy-2"-deoxyadenosine in DNA by liquid chromatography/mass spectrometry. *Free Radical Biology & Medicine*, 31(3), 336-344.
203. Hattori, Y., Nishigori, C., Tanaka, T., Uchida, K., Nikaido, O., Osawa, T., Hiai, H., Imamura, S. and Toyokuni, S. (1996). 8-hydroxy-2"- deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *Journal of Investigative Dermatology*, 107(5), 733-737.
204. Calderon, G. L., Wen-wang, L., Zhang, Y. J., Rodriguez, Alcaraz, A., Osnaya, N., Villarreal-Calderón, A., Santella, R. M. (1999). 8-hydroxy-2'-

- deoxyguanosine, a major mutagenic oxidative DNA lesion, and DNA strand breaks in nasal respiratory epithelium of children exposed to urban pollution. *Environmental Health Perspectives*, 107, 469-474.
205. Helbock, H.J., Beckman, K.B. and Shigenaga, M.K. (1998). DNA oxidation matters; The HPLC electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 288-293.
 206. Dittrich, R., Beckmann, M. W., Oppelt, P. G., Hoffmann, I., Lotz, L., Kuwert, T. and Mueller, A. (2011). Thyroid hormone receptors and reproduction. *Journal of Reproductive Immunology*, 90(1), 58- 66.
 207. Laine, C., Williams, S. and Turner, B. (2009). Hypothyroidism. *Annals of Internal Medicine*, 140, 1-6.
 208. Aoki, Y., Belin, R.M., Clickner, R., Jeffries, R., Phillips, L. and Mahaffey, K.R. (2007). Serum TSH and total T4 in the United States population and their association with participant characteristics: National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES 1999-2002). *Thyroid*, 17(12), 1211-1223.
 209. Shupnik, M.A. and Ridgway, E.C. (1989). Chin WW. Molecular biology of thyrotropin. *Endocrine Reviews*, 10(4), 459-475.
 210. İşgör, A. ve İşgör, A. (edt.). (2000). *Tiroid hastalıkları ve cerrahisi*. 1. Baskı. İstanbul: Avrupa Tıp Kitapçılık.
 211. Elnakish, M. T., Ahmed, A. A., Mohler, P. J., Janssen, P. M. Role Of Oxidative Stress in Thyroid Hormone Induced Cardiomyocyte Hypertrophy and Associated Cardiac Dysfunction: An Undisclosed Story. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2015; 2015:854265.
 212. Baskol, G., Atmaca, H., Tanriverdi, F., Baskol, M., Kocer, D. ve Bayram, F. (2007). Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with hypothyroidism before and after treatment. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 115(8), 522-526.
 213. Gerenova, J. and Gadjeva, V. (2007). Oxidative stress and antioxidant enzyme activities in patients with Hashimoto's thyroiditis. *Comparative Clinical Pathology*, 16, 259.
 214. Oktay, S., Uslu, L. ve Emekli, N. (2017). Effects of altered thyroid states on oxidative stress parameters in rats. *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 28(2), 159-165.
 215. Kong, L., Wei, Q., Fedail, J. S., Shi, F., Nagaoka, K. and Watanabe, G. (2015). Effects of thyroid hormones on the antioxidative status in the uterus of young adult rats. *Journal of Reproduction and Development*, 61(3), 219-227.

216. Wei, Q., Fedail, J.S., Kong, L., Zheng, K., Meng, C., Fadlalla, M.B. and Shi, F. (2018). Thyroid hormones alter estrous cyclicity and antioxidative status in the ovaries of rats. *Animal Science Journal*, 89(3), 513-526.
217. Nazeri, S., Rostamian, M. and Hedayati, M. (2014). Impact of thyroid dysfunction on antioxidant capacity, superoxide dismutase and catalase activity. *Zahedan Journal Of Research In Medical Sciences*, 16(1), 51-54.
218. Hirano, T., Yamaguchi, R., Asami, S., Iwamoto, N. and Kasai, H. (1996). 8-Hydroxyguanine levels in nuclear DNA and its repair activity in rat organs associated with age. *The Journal of Gerontology*, 51, 303-308.
219. Klungland, A. and Bjelland, S. (2002). Oxidative damage to purines in DNA: Role of mammalian Ogg1. *DNA Repair*, 2007; 6: 481–488.
220. Ece, H., Mehmet, E., Cigir, B.A., Yavuz, D., Muammer, K., Cumhur, G., Mustafa, H., Sevki, C., Fusun, S. ve Gokhan, O.A. (2013). Serum 8-OHdG and HIF-1 α levels: do they affect the development of malignancy in patients with hypoactive thyroid nodules? *Contemporary Oncology*, 17(1), 51-57.
221. Hara, H., Sato, R. and Ban, Y. (2001). Production of 8-OHdG and cytochrome c by cultured human mononuclear cells in patients with autoimmune thyroid disease. *Endocrine Journal*, 48(6), 671-675.
222. Da Broi, M. G., de Albuquerque, F. O., de Andrade, A. Z., Cardoso, R. L., Jordão, J. A. A. and Navarro, P. A. (2016). Increased concentration of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in follicular fluid of infertile women with endometriosis. *Cell and Tissue Research*, 366(1), 231-242.
223. Elnagar, S.A. (2010). Royal jelly counteracts bucks' "summer infertility". *Animal Reproductive Sciences*, 121(1-2), 187-190.

EKLER

EK-1. Deney Hayvanları ve Etik Kurul Değerlendirme ve Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 23/07/2015-87845



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Doç. Dr. Çiğdem ELMAS
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Çiğdem ELMAS, Canan DEMİRTAŞ, Ayşe ÇAKIR GÜNDOĞDU, Burcu KARAMAN, Özüm ATILITÜRK ve Hazal KAYHAN'dan oluşan, G.Ü.ET-15.050 kod numaralı ve "*Hipotiroidi oluşturulan dişi sıçanlarda arı sütü takviyesinin üreme organları üzerinde koruyucu etkisi*" adlı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-15.050 and entitled "*The Protective Effect of Royal Jelly Supplements on Reproductive Organs, in Hypothyroidism Generated on Female Rats*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Kurul Başkanı

EK :
1 Liste

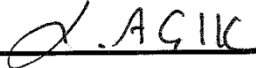
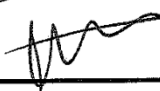
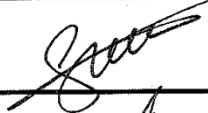
Ankara
Tel: 0 (312) 202 20 57 Faks: 0 (312) 202 20 63
e-Posta : hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi : http://dhek.gazi.edu.tr/

Bilgi için : Şenay Seloğlu
Genel Evrak Sorumlusu

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Deney Hayvanları ve Etik Kurul Değerlendirme ve Onay Belgesi

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM
LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ :16.06.2015		TOPLANTI SAYISI : 07	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Leyla AÇIK (Başkan)			
Uzman Dr.Şeyda DİKER (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Esra AKKOL		KATILAMADI	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Şule COŞKUN CEVHER			
Doç.Dr.Turgay TEKİNAY			
Doç.Dr.Süleyman YEŞİL			
Yrd.Doç.Dr.İhsan YIKILGAN			
Uzm.Dr.Burcu EKİM			
Dr.Kadir BAŞAR		KATILAMADI	
Osman İÇ		KATILAMADI	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ATLITÜRK, Özüm
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 22/ 02/ 1989, Kırklareli
 Medeni hali : Bekâr
 Telefon : 0 (554) 655 78 18
 e-posta : ozum.atliturk@gmail.com



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet yılı
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsüne bağlı Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2013
Lise	Babaeski Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2017/2018	Özel Bilim Temel Lisesi	Biyoloji Öğretmeni
2013/2014	Özel Final Dergisi Dershanesi	Biyoloji Öğretmeni

Yabancı Dili

İngilizce

Hobiler

Deneme yazmak, kamp kurmak, seyahat etmek, kitap okumak, yeni insanlarla tanışmak.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

