T.C.
Süleyman Demirel Üniversitesi
Tip Fakültesi
Kadin Hastaliklari ve Dogum
Anabilim Dali

RATLARDA OVULASYON INDÜKSIYONUNU TAKIBEN SPONTAN, SIKLOFOSFAMID VE RADYOTERAPI ETKISIYLE OLUSAN APOPTOZIS VE SFINGOZIN -1- FOSFAT'IN SIKLOFOSFAMID VE RADYOTERAPI ILE OLUSAN APOPTOZIS ÜZERINE ETKISI

DR.RAZIYE DESDICIOGLU

TIPTA UZMANLIK TEZI

DANISMAN

DOÇ.DR. HAKAN KAYA

ISPARTA - 2005

ÖNSÖZ VE TESEKKÜR

Kadin Hastaliklari ve Dogum uzmani olabilmem için dört yil boyunca her türlü yardim ve destegini esirgemeyen degerli hocalarima sonsuz tesekkürlerimi sunarim.

Tez çalismalarim boyunca çalismamin her asamasinda destegini gördügüm, Dr. Okan Özkaya, Dr.Hasan Sahiner ve Sayin Kerim Bagci'ya ve esim Dr.Kadir Desdicioglu'na tesekkür ederim.

Ayrica bu çalismada karsilik beklemeksizin bizlere yardimci olan Özel Denizli Onkomer Radyoterapi Merkezi çalisanlarindan basta sayin Doç. Dr.Lütfi Özkan ve Sayin Mustafa Çoban'a, 4 ay boyunca çok fazla mesaisini aldigimiz Uludag Üniversitesi Ögretim üyelerinden Doç. Dr. Engin Ulukaya, Doç.Dr.Ayberk Kurt, Doç.Dr.Berrin ZIK ve Uzm.Dr.Arzu Yilmaztepe'ye tesekkürlerimi sunuyorum.

IÇINDEKILER

ÖNSÖZ VE TESEKKÜR ..... **ii**
IÇINDEKILER ..... **iii**
SIMGE VE KISALTMALAR ..... **vi**
TABLOLAR, SEKILLER ve RESIMLER DIZINI ..... **vii**
1. GIRIS **1**
2. GENEL BILGILER **3**
2.1. Over Anatomi ve embriyolojisi 3
2.2. Oogenez 4
2.2.1. Dogum öncesi 4
2.2.2. Dogum sonrasi 4
2.3. Follikülogenez 5
2.3.1. Primordiyal follikül 5
2.3.2. Primer follikül 5
2.3.3. Antral follikül 6
2.3.4. Graff follikül 6
2.3.5. Follikül atrezisi 6
2.4. Gonadal disgenezi(Turner Sendromu) 7
2.5. Overde follikül gelisim asamalarinda apoptozis 7
2.6. Overyan apoptozis modelleri 8
2.7. Apoptozis mekanizmalari 9
2.7.1. Primordiyal follikül asamasi 10
2.7.2. Preantral follikül asamasi 10
2.7.3. Erken antral follikül asamasi 11
2.7.4. Preovulatuar follikül asamasi 11
2.7.5. Periovulatuar follikül asamasi 12
2.8. Kemoterapinin over fonksiyonlarina etkisi 13
2.9. Radyoterapinin over fonksiyonlarina etkisi 15
2.10. Infertilite ve erken menopozun psikososyal yönleri 16
2.11. Over fonksiyonlarini kanser tadavisinden korumak için yapilan çalismalar 18
2.11.1. Medikal yaklasimlar 18

2.11.1.1. GnRH analoglari 18
2.11.1.2. Antiapoptotik ajanlar 19
2.11.2. Cerrahi yaklasimlar 19
2.11.2.1. Kemoterapi öncesinde invitro fertilizasyon (IVF) ile elde edilen fertilize ovum krioprezervasyonu 19
2.11.2.2. Oosit dondurulmasi 20
2.11.2.3. Over dokusu krioprezervasyonu ve transplantasyonu 21
2.11.2.4. Antioksidan ajan kullanimi 22
2.12. Apoptozis 22
2.12.1. Genel apoptotik yollar 23
2.12.1.1. Kaspazlar 23
2.12.1.2. Ölüm reseptörleri yolu 23
2.12.1.3. Mitokondrial yol 23
2.12.1.4. Kaspaz bagimsiz apoptozis 24
2.12.1.5. Sfingolipid yolu 24
2.12.1.6. Seramid 24
2.12.1.7. Sfingozin 25
2.12.1.8. Sfingozin 1 fosfat 25
2.12.2. Terapötik olarak sfingolipidler 25
2.13. Sfingozin-1 fosfatin antiapoptotik etkileri 26
3. MATERYAL ve METOD 28
3.1. Deney Hayvanlari 28
3.2. Deney plani 28
3.3. Kullanilan ilaçlar ve kimyasallar 30
3.4. Kullanilan cihazlar 31
3.5. Sfingozin-1- Fosfatin hazirlanisi 31
3.6. Radyoterapi 31
3.7. Kemoterapi 32
3.8. Rat overinde Kaspaz 3 immün boyama prosedürü 32
3.9. Elektron mikroskopi metodu 33
3.10. TUNEL Metodu 34
4. BULGULAR 41

5. TARTISMA ve SONUÇ 58
ÖZET 66
SUMMARY 67
KAYNAKLAR 68

SİMGE VE KISALTMALAR

1-S1P- Sfingozin-1- Fosfat

2-POY- Prematüre Ovaryan Yetmezlik

3-OMI-Oosit Mayoz Inhibe Edici Faktör

4- ART-Assiste Reprodüktif Teknoloji

5- IVF-Invitro Fertilizasyon

6- BSO-Bütionin Sülfoksimin

7-TUNEL Metod: Terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT)-mediated biotinilated deoksiüridin trifosfataz (dUTP)-nick end labelling metod.

8-KGF - Keratinosit Growth Faktör

9- bFGF- Basic Fibroblast Growth Factor

10-FSH-Folikül Stimülan Hormon

11-LH-Lüteinizan Hormon

12-IGF-1-Insülin Like Growth Faktör-1

13-EGF-Epidermal Growth Faktör

14-GnRH-Gonadotropin Releasing Hormon

15-IL-1ß-Interlökin -1- ß

16-IL-6-Interlökin-6

17-TNFa-Tümör Nekroz Faktör a

18-NO-Nitrik Oksit

19-GH-Growth Hormon

20-TGF-a -Transforming Growth Faktör- a

21- ICSI-Intrastoplazmik Sperm Enjeksiyonu

22- TNF-R1-Tümör Nekrozis Faktör Reseptör-1

23-Fas L-Fas Ligand

24-eCG-Equine koryonik gonadotropin

TABLOLAR, SEKILLER ve RESIMLER DIZINI

Sekil 1. Follikül büyüme ve gelisiminin çesitli basamaklarinda follikül atrezisi

Sekil 2. Apoptozisi baslatan ve devam ettiren temel faktörlerin sematik gösterilmesi

Sekil 3. Overde follikül gelisim basamaklarina bagli olarak apoptoziste etkili olan faktörler

Tablo 1. Tüm gruplara yapilan islemler

Tablo 2. TUNEL metodu ile alinan sonuçlar

Tablo 3.Aktif kaspaz-3 immünohistkimyasal gösterilmesi ile alinan sonuçlar

Resim 1. Çalismada kullanilan sfingozin-1-fosfat

Resim 2. Çalismada kullanilan ratlar

Resim 3.Rata intraperitoneal enjeksiyon yapilmasi

Resim 4. Çalismada kullanilan cerrahi set

Resim 5.Diseksiyon öncesi anestezi verilmis rat ve cerrahi düzenek

Resim 6. Dorsal insizyon ile rat overinin açiga çikarilmasi

Resim 7. Overin bursa ovarikasina sfingozin-1-fosfat enjeksiyonu

Resim 8. Baska bir rat overinde bursa ovarikaya sfingozin-1-fosfat enjeksiyonu

Resim 9. Over agirliginin hassas terazi ile tartilmasi

Resim 10. Over dokusunun kan ve yag dokudan ayrilmasi için soguk izotonik ile yikanmasi

Resim 11. Over dokusunun farkli fiksatif solüsyonlara konulmak üzere ikiye ayrilmasi.

Resim 12.Tüm over dokulari bir arada

Resim 13. B grubuna ait bir overde kaspaz + boyanma

Resim 14. Resim 13'teki follikülün TUNEL + görüntüsü

Resim 15. B grubuna ait bir overde kaspaz + boyanma

Resim 16. B grubuna ait bir overde kaspaz + Korpus luteum hücreleri

Resim 17. B grubuna ait bir overde kaspaz (–) teka hücreleri

Resim 18. B grubuna ait bir overde kaspaz +folliküller

Resim 19. Resim 18'deki overde daha ileri evredeki follikülde daha fazla kaspaz + boyanma

Resim 20. B grubuna ait overde kaspaz – preantral follikül

Resim 21. B grubuna ait bir overde kaspaz – teka hücreleri

Resim 22. B grubu bir overde kaspaz + antral follikül ve kaspaz – primordiyal follikül

Resim 23. B grubuna ait bir overde kaspaz + ovum

Resim 24. Kaspaz – kontrol

Resim 25. Kaspaz + lümen sivisi ve zona pellucida

Resim 26. C grubuna ait bir overde kaspaz – boyanma

Resim 27. C grubuna ait bir overde TUNEL pozitifligi ve halo etkisi

Resim 28. D grubuna ait bir overde kaspaz + korpus luteum hücreleri ve kaspaz – teka hücreleri

Resim 29. F grubuna ait bir overde kaspaz – primordiyal follikül

Resim 30. F grubuna ait bir overde TUNEL + antral follikül

Resim 31. F grubuna ait bir overdeki folliküllerin kaspaz – görüntüsü

Resim 32. Resim 30'daki follikülün kaspaz – görüntüsü

Resim 33. F grubuna ait bir overde kaspaz – antral follikül

Resim 34. F grubuna ait bir overde morfolojik olarak apoptotik hücreler, fakat kaspaz – boyama

Resim 35. F grubuna ait overde daha büyük folliküllerde kaspaz + boyanma

Resim 36. F grubuna ait bir overde %60-70 TUNEL + primordiyal folliküller

Resim 37. F grubuna ait bir overde TUNEL – kontrol

Resim 38. F grubuna ait bir overde TUNEL + follikül

Resim 39. Elektron mikroskopisinde normal ve apoptotik hücre görüntüsü

Resim 40. Elektron mikroskopisinde apoptotik hücre halo görüntüsü

Resim 41. Elektron mikroskopisinde apoptotik hücrde yarimay görüntüsü

1. GIRIS

Genç hastalarda malign hastaliklarin tedavisinin artmasi ile yasam beklentisi hayli artmistir. Eriskin nüfusun yaklasik 1/1000'ini çocukluk çaginda malign hastaliklar nedeniyle tedavi alanlar olusturmaktadir. Gelisen tedavi yöntemleri hastalarin yasam kalitelerini de artirarak hastaliktan kurtulmalarini saglamaktadir. Çocukluk yada reprodüktif dönemdeki kanser tedavisi infertilite ile sonuçlanabilmektedir. Kanser tedavisi ile olusan gonadotoksik etkinin sonucu olarak kadin da zarar gören germ hücreleri yerine konamamaktadir. Bu degerli reserv ileride azalmak üzere puberteye kadar dogal seleksiyonla getirilir. Oositler gebelik, fertilizasyon dönemlerinde ve menstrual sikluslarda tüketilirler. Insan ve diger memeli overlerinde anne karninda baslayan oosit kaybi yasam boyu da devam ederek ortalama 50'li yaslarda menopoz ile sonuçlanir. Dogumda insan overinde mevcut olan yaklasik 2 milyon primordiyal follikül zamanla atreziye ugrayarak bir çogu fonksiyonel olamamaktadir. Kemoterapi, radyoterapi, sigara, çevresel kimyasallar bu atrezi sürecini hizlandirarak follikül reservlerinin çok daha çabuk tükenmesine neden olurlar (1). Genç yastaki hastalarda reprodüktif yasamin sekteye ugramasi, erken menopoz ve infertilite yasam kalitesini bozmaktadir. Bu soruna karsi yapilabilecek seyler kisitli ve cevap orani beklenenden azdir (2).

Normal gametogenezde kadin germ hücrelerinde gelisimsel ölümler görülür. Normal ve patolojik durumlarda gelisen bu ölümlerde etki mekanizmasi apoptozis olabilir (1). Programlanmis hücre ölümü olarak bilinen apoptozis embriyolojik gelismeden, büyüme, farklilasma ve normal hücre turnoverine kadar pekçok durumda istenmeyen hücrelerin ölümünü saglayan bir mekanizmadir (3). Prenatal ve postnatal dönemdeki normal germ hücre atrezisinde apoptozisin rolünü tarifleyen çalismalar vardir (4, 5). Pek çok çalismada kemoterapi ajanlarinin hücrelerde apoptozis araciligi ile ölüme yol açtigi gösterilmistir. Bazi genetik ve moleküler faktörler bu durumlarda olusan apoptoziste indükleyici rol oynarken, bazilari inhibisyona yol açarlar (6). Geçen birkaç yilda overde normal ve patolojik durumlarda olusan apoptozisin baslatilmasi ve uygulanmasinda sorumlu olan pekçok

intraselüler mekanizma ortaya konulmustur (7). Apoptozisin inhibisyonu ile kemoterapötiklerin neden oldugu prematür overyan yetmezlikten hastalarin korunabilecegi düsünülerek bu konuda çalismalar yapilmistir (6). Apoptozis alaninda yapilan çalismalarla oosit ve follikül hasarinin apoptotik mekanizmalar ile oynanilarak degistirilebilecegi kanaatine varilmistir. Apoptozisin inhibisyonu ile kemoterapötiklerin neden oldugu prematüre ovaryan yetmezlikten (POY) hastalarin korunabilecegi düsünülerek bu konuda çalismalar yapilmistir. Bu konuda devam etmekte olan ve daha da yapilmasi gereken çalismalar vardir(6).Sfingozin 1 fosfat apoptozis inhibitörlerine bir örnektir (6). Spiegel ve ark.(8) fibroblast hücre kültürlerine S1P eklendiginde hücre çogalmasi ve DNA sentezinin arttigini göstermislerdir. Seramid strese cevap olarak apoptozis sinyali ve erken mesajcisidir. Morita ve ark. (9) 2000'de yaptiklari çalismada Sfingozin 1-fosfat invivo kullaniminin radyoterapinin oositte olusturdugu apoptozisi önledigi görülmüstür. Ayrica ayni çalismada seramid olusumunu saglayan enzimin (asit sfingomyelinaz) genetik olarak defektli fare oositlerinin bulundugu ortama sfingozin 1-fosfat eklenmesinin oositleri doxurobisinin neden oldugu apoptozisten korudugu gösterilmistir.

Bu experimental arastirmada ratlarda radyoterapi ve kemoterapinin over dokusunda olusturdugu apoptotik hasar TUNEL, aktif kaspaz 3 ve elektron mikroskobu ile arastirildi. Ayrica bu hasarin önlenmesinde sfingozin-1-fosfatin yeri arastirildi.

2. GENEL BILGILER

2.1. Over Anatomi ve embriyolojisi

Overler gametogenez ve steroidogenezi saglayan disi üreme sistemi organidirlar. Hipotalamus, hipofiz ve over birbirleri ile iliskili olarak üreme hayatinin devamini saglarlar.

Overler pelvis minor dis yaninda, fossa ovarica'da yer alirlar. Hareket ettirilebilir ve eriskin kadinda 30x15x10 mm. boyutlarindadirlar. Fasies medialis ve lateralis olmak üzere iki yüzü, extremitas superior ve inferior olmak üzere iki ucu ve margo anterior ve posterior olmak üzere iki kenari vardir.

Kanlanmalari L2 seviyesinde aort'tan çikan a. ovarica'lar tarafindan saglanir. Damarlari overe mezoovarium içinde hilustan girerler. Venleri sagda v. cava inferiora, solda ise v.renalis sinistra'ya, lenf nodlari ise preaortik ve aortikolateral lenf nodlarina dökülürler. Innervasyonu plexus aortikus, plexus renalis, plexus hipogastricus inferior ve superiordan gelen dallarin olusturdugu plexus ovaricus ile saglanir.

Embriyolojik olarak over ve testisler üç alandan köken alirlar; mezotelium, mezenkimal doku, ilkel germ hücreleri. Embriyolojik hayatin 5. haftasinda mezonefrozun medialinde ilk önce olusurlar. Daha sonra primordiyal hücreler, ameboid hareketler ve kemotaksis ile bu kabarintiya göç ederler. Embriyolojik hayatin 7. haftasindan önce her iki cinste gonadlar farklilanmamistir (indiferansiye evre).

Kromozomal yapinin XX olmasi ovaryum gelisimi için önemlidir. Tek X kromozumunun oldugu Turner Sendromunda ovaryumlar gelisir. Ancak dejenere olurlar ve over bag dokusuna gömülü gonad çizgisi (gonadal streak) olarak kalirlar. Gebeligin 10-11. haftalarinda over dokusu kalin tunika albuginea tabakasinin olmamasi ve mayoz safhasina girmekte olan cinsiyet hücrelerinin varligi ile anlasilir (10).

2.2. Oogenez

Ilkel cinsiyet hücrelerinin olgunlasmasidir. Dogum öncesi dönemde baslayip dogum sonrasinda da devam eder.

2.2.1. Dogum öncesi

Ilkel cinsiyet hücreleri gonadlara tasindiktan sonra oogoniumlara farklanirlar. Mitozla çogalmaya baslarlar. Bir kismi da primer oositlere farklanirlar. Birinci mayoz bölünmenin profaz safhasina gelen oositlerin DNA'lari replike olur. Oogoniumlarin çogalmasi da devam ederek yaklasik 7 milyona ulasir. Bu asamadan sonra hücre dejenerasyonu da baslar. Oositler ve oogoniumlarin pek çogu dejenere olurlar. Canli kalan oositler 1. mayoz bölünmeye girerler. 1. mayoz bölünmenin profaz safhasinda beklerler. Primer oositler etraflarindaki tek katli yassi epitel ile birlikte primordiyal follikül olarak adlandirilir.

2.2.2. Dogum sonrasi

Dogumda tüm primer oositler 1. mayoz bölünmenin profaz asmasini bitirirler ve dinlenmeye geçerler. Birinci mayoz bölünme pubertede tamamlanir. Oositleri bu ana kadar engelleyen faktörün oosit mayoz inhibe edici faktör (OMI) oldugu kabul edilmektedir. Dogumda $7x10^5$-$2x10^6$ arasinda oosit **v**ardir. Bunlarin da çogu puberteye kadar atreziye ugrar. Puberte baslangicinda yaklasik $4x10^5$ kadari mevcuttur. Fertil çag boyunca yaklasik 400-500 kadari ovulasyon asamasina gelir. Primer oositler 2n (46) kromozoma sahiptir. Birinci mayoz bölünmenin zigoten, pakiten, diploten safhalarini geçirip, ovulasyona kadar bu safhada kalirlar. Ovulasyona hazir dönemde sekonder oosit olusumunu saglamak için metafaz safhasi baslar. Yirmiüç kromozom içeren 1.sekonder oosit ve 1.polar cisim meydana gelir. Kromozom sayilari esit fakat stoplazma hacimleri farklidir. Daha sonra sekonder oosit II. mayoz bölünme safhasina geçer. Bu safha sperm ile döllenme sonrasinda tamamlanir. Polar cisim ise kaybolur. Ikinci mayoz bölünmede DNA replikasyonu

olmaz. Yirmiüç adet kromozom içeren 2 hücre olusur. Birisi ovum, digeri 2. polar cisim adini alir (10).

2.3. Follikülogenez

Pubertede GnRH salinimini baslamasi hipofizden FSH ve LH salinimi stimüle eder. Bu hipofiz hormonlarinin etkisi ile overde 28-30 gün süren ovaryan siklus sekillenir. Her siklusta FSH etkisiyle 5-15 adet primer follikül gelisip büyür ve genelde bir tanesi olgun hale gelir. Ovulasyon ile içindeki olgun oositi atar. Geri kalan antral folliküller atreziye ugrarlar. Bu atreziden apoptozisin sorumlu oldugu düsünülmektedir. Hangi follikülün o ay büyüme fazina girecegi ve hangisinin dominant follikül olarak seçilecegini belirleyen faktörler bilinmemektedir (11).

2.3.1. Primordiyal follikül

Dogumdan sonra bulunan tek follikül tipidir. Primordiyal follikülde primer oosit ve tek katli hücre tabakasi (pregranüloza hücreleri) vardir (11).

2.3.2. Primer follikül

Oosit büyür, tek katli yassi epitel hücreleri önce tek katli kübük, daha sonra 2-3 katli granüloza hücrelerine farklanirlar. Oosit büyürken içindeki organellerde de degisiklikler olur. Oosit ve granüloza hücrelerinin salgiladigi birtakim maddelerle zona pellucida olusur. Oosit ile granüloza hücrelerini ayirir .

Primordiyal follikülün follikül havuzuna girisinden follikül matürasyonu tamamlanana kadar yaklasik 150 gün geçer (11).

2.3.3. Antral follikül

Granüloza hücreleri 6-10 kat sira olusturduklari dönemde salgiladiklari hyalüronik asitten zengin bir madde hücreler arasi boslukta birikir. Çesitli büyüme faktörleri, steroid içerir. Bosluklarin artmasi ve birlesmeleri ile yarim ay seklinde antrum olusur ve follikül antral follikül adini alir (Sekonder follikül). Antral follikül döneminde oositi kumulus ooforus denen granüloza hücre tabakasi sarar. Zona pellucidayi saran granüloza hücre tabakasina ise korona radiata denir. Granüloza hücre tabakasi disindaki stromal hücrelerin siklasmasiyla da teka folliküli olusur. Teka interna ve Teka externa tabakalari ise antral follikül döneminde iki farkli zar olarak ayirt edilir. Teka interna kapillerlerinden difüzyon ile granüloza hücrelerinin beslenmesi saglanir (11).

2.3.4. Graff follikül

Follikül gelisimi safhalarinda folliküllerin yarisindan çogu antral follikül döneminden önce dejenere olurlar. Bir tanesi dominant hale geçer ve büyümeye devam eder. Oosit 100µm'den sonra büyümezken follikül büyümeye devam eder (11).

2.3.5. Follikül atrezisi

Oosit dejenerasyonu dogumdan önce baslar, puberteye kadar artarak devam eder, üretken çagda da devam eder. Follikül gelisiminin herhangi bir asamasinda atrezi baslayabilir. (Sekil.1) Granüloza hücreleri kapillerler tarafindan isgal edilip, antral bosluga dökülürler. Teka hücreleri hipertrofiye olup, karakteristik parlak membran görünümü olustururlar. Oosit kisa zamanda dejenere olur. Granüloza hücre dökülmesi ile follikül duvari kollabe olur, bos ve kollabe zona pellucida bir süre daha bag dokusu içinde kalabilir. Hipertrofiye olan teka hücrelerinde lipid depolanmasi olur. Daha sonra parlak membran parçalanir, hücre parçalari over dokusuna yayilir ve fibröz skar olusur(11).

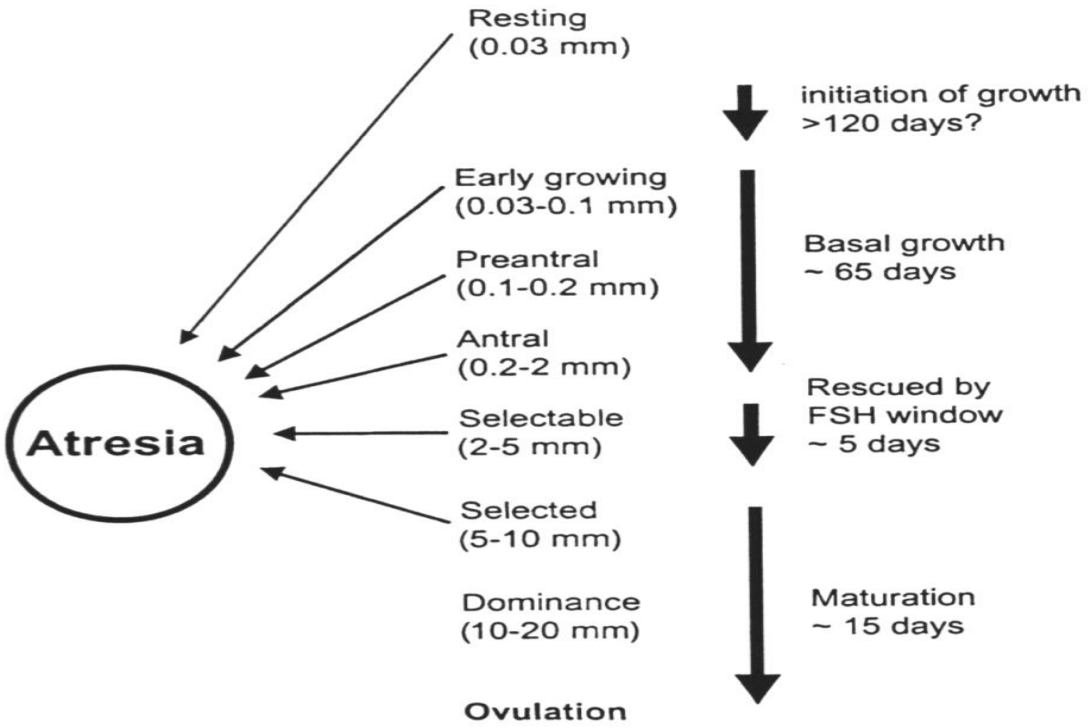


Figure . The various phases of follicle growth and development with the corresponding follicle diameters in parentheses. Adapted from Gougeon (Gougeon 1996).

Sekil 1: Follikül büyüme ve gelisiminin çesitli basamaklarinda follikül atrezisi (Kaynak: 12)

2.4. Gonadal disgenezi(Turner Sendromu)

Tüm canli dogumlarin 1/5000, yenidogan kizlarda 1/2500 sikliktadir. %95'i spontan abortus ile sonlanir. Çesitli fenotipik özellikleri vardir, çesitli anomalilerin sikligi artmistir. 45 XO kromozom yapisi olan disi fetusta intrauterin 12. haftaya kadar overler histolojik olarak normaldir. Bu dönemden sonra primordiyal folliküllerdeki oositler dejenere olurlar, dogumda çok az kalirlar veya hiç kalmazlar. Gonadlarin olmasi gereken yerde fibrotik bir bant vardir. Nadiren folliküler gelisim eriskin çaga kadar devam edebilir. %5-15'i kendiliginden puberteye girebilir (11).

2.5. Overde follikül gelisim asamalarinda apoptozis

Gebeligin 5. ayinda insan fetal overinde en fazla sayida (yaklasik $7x10^6$) germ hücresi vardir. Overlerde mevcut folliküller primordiyal folliküler formasyona

girmeden önce dejenerasyon olusmaya baslar. Doguma kadar germ hücre sayisi belirgin azalir. Dogumda maksimum rakamin %20'sinden daha az follikül vardir. Mevcut bu folliküllerin de %99.9'dan daha fazlasi hiçbir zaman ovulasyona ugramaz. Apoptozis, atreziye ugrayan follikülün ölümünden sorumlu yüksek organizasyonlu bir mekanizmadir. Gelisen folliküllerin büyük kisminin azalmasi ovulasyona tek follikülün ulasmasini saglar. Memeli follikülünde santral yerlesimli oosit, etrafinda granüloza hücresi ve bunlarin disinda da teka tabakasi yer alir. Havuzdan gelisecek primordiyal folliküllerin seçilmesi, bunlarin gelismesi, dominant follikül seçimi, ovulasyon ve lüteinizasyon basamaklarindan sonra ovaryan follikül matürasyonu saglanir. Primordiyal folliküllerde gelismenin baslamasi, gelisme, farklilasma ve atreziyi izler. Antral kavite olustuktan sonra follikül FSH'a bagimli hale gelir. Gelisme ve farklilasmanin her basamaginda atrezi görülebilir. LH pikine cevap veren folliküllerin sayisi korpus luteum sayisi ile aynidir. LH pikine cevap veren folliküller ovulasyona kadar apoptozise ugramazlar. Folliküler atrezi, FSH-LH gibi endokrin faktörler, IGF-1, EGF, bFGF, aktivin, IL-1 ß gibi parakrin faktörler tarafinda regüle edilirler. TNFa, GnRH, androjenler, IL-6 ve serbest radikaller de önemlidir. Granüloza hücre apoptozisi protein sentez ve transkripsiyonuna bagimli aktif hücresel olaydir (13).

2.6. Overyan apoptozis modelleri

Omurgali overinde apoptozis süreci dogumdan önce baslayip reprodüktif yasam boyunca devam eden germ hücrelerden yasamla bagdasmayanlari seçen programli hücre ölümüdür. Tüm omurgali overinde follikül atrezisinin apoptozis araciligi ile oldugu gösterilmistir. Germ hücreleri veya granüloza hücrelerinde fizyolojik veya patolojik sinyallerle apoptozis baslatilir. Bu sürecin merkezinde intraselüler sistein proteazlardan olusan kaspaz ailesi vardir. Sürecin baslangicindan sonuna kadar farkli kaspazlar rol almaktadir. Ayni zamanda pekçok yolak ve intraselüler protein de rol oynar. Fare overinde overe spesifik kaspazlar arastirilmaya çalisilmistir (14).

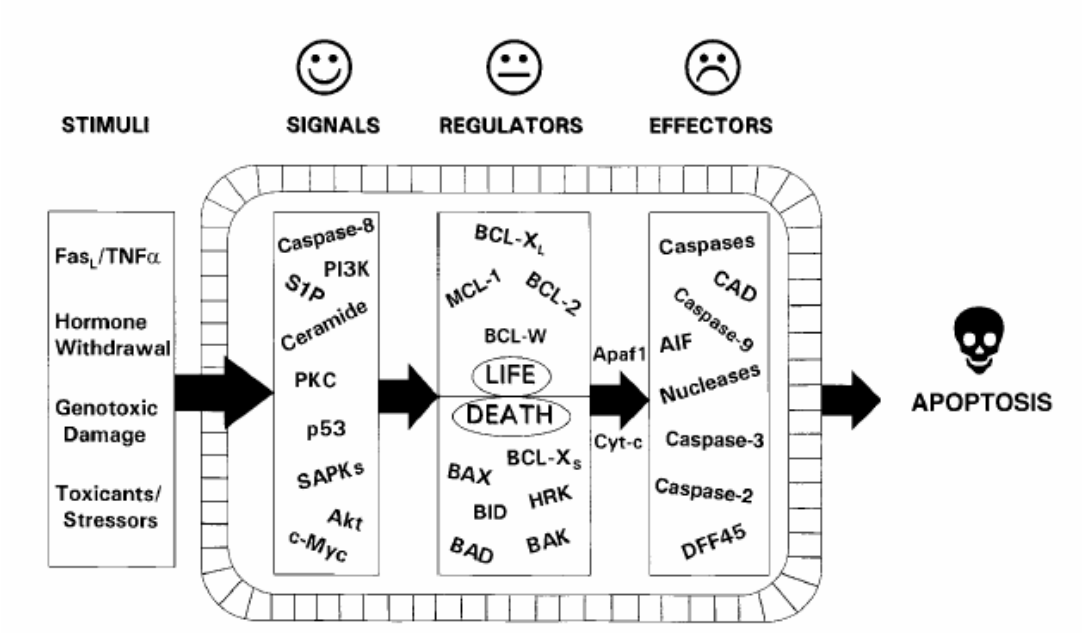
Farkli gelisme asamalarinda farkli faktörler apoptozisi regüle ederler. Folliküler atrezi ile pek çok çalisma modeli olusturulmustur. Granüloza hücre

kültürlerinde serum yoklugunda spontan apoptozis izlenmistir. Hayatta kalim veya proapoptotik faktörlerin ortama eklenmesi spontan apoptozis oranini etkilemektedir (sekil 2). Folliküler gelisimin tüm asamalarinda apoptozis gösterilmistir (13)

2.7. Apoptozis mekanizmalari

Hücrede ölüm karari verildigi zaman apoptotik ölüm aracilarinin koordinasyonuyla çok sayida alt program aktive edilir. Kaspaz ailesi ve Bcl-2 ailesi en önemli apoptotik regülatör faktörlerdir. Apoptotik sürecin en önemli yöneticisinin kaspaz ailesi oldugu düsünülmektedir (Sekil 3). Kaspazlar aspartik asit yolunda proteazlar olarak görev yaparlar. Kaspaz araciligi ile apoptozise yol açan 100 den fazla madde tanimlanmistir (Laminin, fodrin…). Bcl-2 ailesi antiapoptotik ve proapoptotik üyeleri olan bir ailedir. Proapoptotik faktörlerin salinimini düzenleyerek etki yaparlar. Mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salinimini saglarlar. Mitokondri apoptotik süreçte önemli bir organeldir. Proapoptotik pek çok maddenin stoplazmaya salinimini saglar. Sitokrom-c kaspaz 9 aktivasyonu için gereklidir. Pek çok apoptotik regülatör mitokondride depolanarak uyari geldigi zaman salinirlar. Apoptotik ölümden sonra hücresel artiklar ortamdan uzaklastirilirlar (13). Farelerde yapilan çalismalarda kaspaz- 2 gen inaktivasyonu olan mutant farelerde dogumda kendi vahsi tiplerine göre çok fazla sayida germ hücresi oldugu gösterilmistir (14). Kaspaz 11 eksikligi olan farelerde dogumda germ hücre sayisi oldukça azdir (14). Saglikli folliküllerde kaspaz 3 inaktif formda bulunurken atretik folliküllerde aktif kaspaz 3 konsantrasyonunun arttigi gösterilmistir (14).

Primordiyal follikül asamasindan preantral asamaya kadar olan folliküllerde postnatal hayatta apoptozis özellikle oositin ölümüyle baslar (14). Preantral folliküllerden preovulatuar folliküle kadar olan atrezide ise apoptozis granüloza hücrelerinde baslar (14). Infertil ovulatuar sikluslarda korpus luteum regresyonunda da apoptozisin önemli oldugu gösterilmistir. Kaspaz 1,3,9 korpus luteum regresyonunda önemli kaspazlardir (14).



Sekil 2: Apoptozisi baslatan ve devam ettiren temel faktörlerin sematik gösterilmesi.Fas L: Fas ligand;TNFa:Tümör nekrozis faktör a;PI3K:Fosfotidil inozitol 3 kinaz;S1P: Sfingozin-1-fosfat;PKC:Protein kinaz C;SAPKs:Stres activated protein kinases;Cyt-c: Sitokrom-c;AIF: Apoptozis indükleyici faktör;DFF45:DNA Fragmentasyon faktör 45;CAD: Kaspaz aktivated DNAase (15).

2.7.1. Primordiyal follikül asamasi

Primordiyal folliküllerde de apoptozis olmaktadir. Bu asamada özellikle oosit apoptozisi önemlidir (14). Kit-Kit ligand, EGF, bFGF kemirgenlerde gösterilmistir. Kit-Kit ligand etkilesimi özellikle fetal veya postnatal primordiyal folliküller için önemlidir (13).

2.7.2. Preantral follikül asamasi

Preantral follikül asamasi yavas gelisim ile karakterizedir. Insanlarda ve ratlarda farkli zamanlarda olaylanir. Insanlarda bu asama aylar sürerken ratlarda 1-2 gün sürer. Bu nedenle ratlarda yapilan çalismalari insana uyarlamak güçtür. Granüloza hücre kültürlerinde serum yoklugunda spontan apoptozis preantral folliküllerde de görülür. FSH ve cAMP bu gelisimi etkilememistir. In vivo ortamda

ise FSH ve LH reseptör stimülasyonu preantral rat folliküllerinin gelisimi için önemlidir. Direk etkili olmasa da gonadotropinler preantral foliküller üzerine gelismenin farkli asamalarindaki hücrelerin gonadotropin duyarli olmasi nedeniyle etkili olabilir. Keratinosit Growth Faktör (KGF), teka hücrelerinde üretilir ve granüloza hücrelerinde de reseptörleri vardir. Kültürlerde granüloza hücrelerinde apoptozisi baskilar. cGMP ve analoglari kültürlerde preantral folliküllerde apoptozisi yaklasik %75 azaltir. Askorbik asit de bu asamadaki folliküllerdeki apoptozise etkilidir. Muhtemelen FSH ve bFGF bazi istisna durumlar disinda apoptozisi inhibe ederler (13).

2.7.3. Erken antral follikül asamasi

Normal reprodüktif siklusta (insanda ve kemirgenlerde) erken antral follikül asamasi en kritik asamadir. FSH reseptörleri olusup FSH'ya bagimli hale gelirler. FSH destegi olmayan folliküller asla bu noktadan sonraki asamalari yasayamazlar. Ratlardan izole edilen erken antral folliküller için en önemli hayatta kalim faktörü FSH'dir. Apoptozisi %60 oraninda baskilar. IGF-1, EGF, bFGF, aktivin, IL-1B erken antral folliküllerin hayatta kalmasi için önemli lokal faktörlerdir. GH apoptozisi baskilar. Fakat pek çogu daha sonraki preovulatuar follikül asamasina daha etkilidirler. Östrojenin de preantral folliküllerde oldugu gibi erken antral folliküllerin de hayatta kalmasi için önemli oldugu düsünülmektedir. Fakat kültürlerdeki etkisi ile ilgili çalisma yoktur (13).

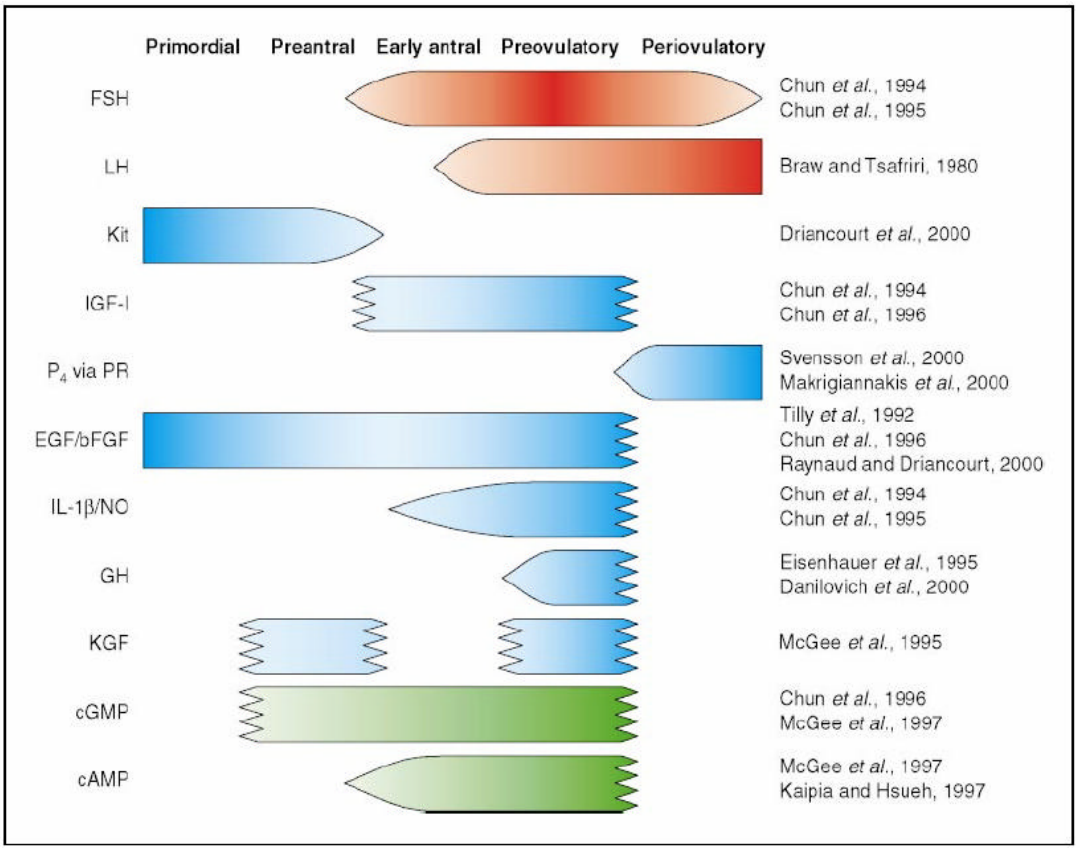
2.7.4. Preovulatuar follikül asamasi

Preovulatuar döneme gelen folliküllerin hepsi LH pikine cevap verebilmek için LH reseptörü üretirler. FSH ve LH, preovulatuar rat folliküllerinde apoptozisi baskilar. Bu apoptozisin baskilanmasi özellikle IGF-1 araciligi ile olmaktadir. IL-1 bu dönemdeki folliküllerde apoptozisi inhibe ederler. IL-1 reseptör antagonistlerinin ortama ilave edilmesi gonadotropinlerin etkisini baskilar. NO ve cGMP üzerinden etki yaptigi düsünülmektedir. Preovulatuar rat folliküllerı ve izole edilen granüloza

hücreleri EGF ve bFGF üreterek gonadotropinler kadar apoptozisin baskilanmasini saglarlar. Bu etkileri tirozin kinaz araciligi ile olmaktadir. EGF reseptörleri gonadotropinler tarafindan artirilir bu da preantral ve erken antral dönemde neden etkilerinin hiç olmadigini veya çok az oldugunu açiklar. TGFa, EGF'nin yapisal ve fonksiyonel homologudur. Preovulatuar folliküllerde EGF'nin etkilerini taklit eder. KGF de FGF ailesinin üyesi olup preovulatuar rat folliküllerinde apoptozisi inhibe eder (13).

2.7.5. Periovulatuar follikül asamasi

Follikül hayatiyetinin devami LH pikine verdigi cevaba baglidir. Invitro ortamlarda LH pikinden sonra folliküllerin daha az atreziye ugradiklari ve apoptozis duyarliliginda azalma oldugu gösterilmistir. Bunun mekanizmasini ayrintilari net açiklanmamistir. Fakat progestereon üzerinden oldugu düsünülmektedir. Sonuçta folliküler gelisim yüksek oranli proliferasyon ve apoptozis ile karakterizedir. Bu mekanizmalar lokal faktörlere ve endokrin faktörlere baglidir. Farkli gelisim asamalarinda folliküllerin duyarli oldugu faktörler farklidir (13).



Sekil 3. Overde follikül gelisim basamaklarina bagli olarak apoptoziste etkili olan faktörler. Kirmizi: Gonadotropinler; mavi: lokal faktörler; yesil: intraselüler mediatörler. bFGF:Basic fbroblast growth faktör;EGF:Epidermal growth faktör;KGF: Keratinosit growth faktör;GH: Growth hormon;IGF-1: Insülin like growth faktör-1;IL-1ß: Interlökin-1- ß;NO: Nitrik oksit;P4:Progesteron;PR: Progesteron reseptör (13).

2.8. Kemoterapinin over fonksiyonlarina etkisi

Sitotoksik kemoterapi nonjinekolojik maligniteler ve bazi malign olmayan hastaliklarin tedavisinde kullanilmaktadir. Yaygin olarak menstrüel düzensizlik, ovaryan yetmezlik ve infertilite ile iliskilidirler. Kemoterapinin indükledigi gonadal disfonksiyon ve infertilite ilacin dozu, hangi ajanin kullanildigi, hastanin yasi ile ilgilidir (21).

Kemoterapötik ajanlar baslica bes gruba ayrilirlar. Alkilleyici ajanlar, topoizomeraz II inhibitörleri, anöploidi uyaricilar, antimetabolitler ve radyomimetikler. Genelde kombinasyon tedavileri kullanilmakta ve ilaç sayisi

arttikça yan etki olasiligi da artmaktadir. Sekonder kanserler ve gonadal toksisite en önemli uzun dönem yan etkileridir (2). Çalismalarda kemoterapinin akut dönemde maturasyonu çok az etkiledigi fakat primordiyal follikül reservine zarar verdigi görülmüstür. Hücre düzeyinde bu etki mekanizmasi tam olarak anlasilamamis olmakla birlikte apoptozisin indüklenmesi sonucu olustugu ile ilgili yayinlarin sayisi giderek artmaktadir (20).

Prematüre ovaryan yetmezlik (POY), kemoterapötik ajanlara maruz kalan kadinlarda iyi bilinen bir durumdur (6). Sistemik lupus eritematozis, Romatoid artrit, çocukluk çagi lösemi ve lenfomalari, solid doku tümörleri, erken yastaki meme Ca'da kemoterapi alinmasi POY'e sebep olabilir. Kemik iligi, gasrointestinal sistem hücrelerinde kemoterapinin etkileri geri dönebilirken overde geri dönüsümsüzdür. Over kesitlerinde folliküllerin sayica hizla azalmasi ve yerine fibrozis olusumu görülmektedir (16). Histolojik çalismalarda belirgin primordiyal follikül kaybi ile birlikte over doku atrofisi gösterilmistir (1).

Kemoterapiye bagli POY insidansini tam olarak tespit etmek zordur. Çünkü bu duruma pekçok neden katkida bulunabilir (6). Kemoterapi rejimine göre %0-100 oraninda amenore olabilmektedir. Genç hastalarda %21-71, yasli hastalarda ise %49-100 arasindadir. Yasli hastalarda etkileri daha fazladir. Rejimin kombinasyonu, dozu, süresi de etkilidir. Alkilleyici ajanlar; siklofosfamid, klorambusil, N.mustard DNA'yi etkileyerek kalici gonadal hasara neden olurlar. DNA,RNA, protein sentezini inhibe ederler. Metotreksat, 5- FU, etoposid ve doxurobisin kalici hasara yol açmazlar. Osteosarkom nedeniyle uzun süre metotreksat kullanlarda ve koryokarsinom nedeniyle metotreksat kullananlarda POY görülmemektedir(6). Siklofosfamid çok sik kullanilan, DNA'da guanin içeren kisimlari alkilleyerek etki eden bir kemoterapötik ajandir. Siklofosfamidin doz arttikça artan ovaryan toksisite etkisi vardir (20). Granüloza hücreleri ile oositler arasindaki fonksiyonel ve yapisal iliskiler nedeniyle kemoterapötiklerin tam olarak etki mekanizmalarini açiklamak zordur. Bu yapilardan birinin zarar görmesi digerine de zarar verir (6). Sitotoksik ilaçlar follikül matürasyonuna veya primordiyal folliküllere zarar verebilir. Geçici amenore matür folliküllerin zarar görmesi sonucu olsurken, primordiyal follikül hasari sonucu kalici amenore veya POY gelisebilir. Alkilleyici ajanlar hücre siklusuna spesifik degildir, oosit ve pregranüloza hücrelerinden olusan primordiyal folliküller etkilenebilir (6).

Kümülatif doz kalici ovaryan yetmezlik için anahtar faktördür. Bir çalismanin sonuçlarina göre siklofosfamitin neden oldugu amenore doza bagimli olarak %10-61 arasinda degismektedir (17). Genç kadinlarda amenoreye neden olan kümülatif doz, yasli kadinlardakinden daha yüksektir. 40 yas-5200mg, 30 yas-9300mg ve 20 yas-20,400 mg. Siklofosfamid amenoreye neden olmustur (18). Yasli kadinlarda kemoterapi sonrasi amenore baslama süresi belirgin olarak daha kisadir. Bines ve ark. çalismalarinda 40 yas alti kadinlarda amenorenin kemoterapi baslangicinda 6-16 ay sonra amenore baslarken, 40 yas üstü kadinlarda 2-4 ay içinde baslamaktadir (19). Yasli kadinlarda etkinin daha fazla olmasi tedavi baslangicindaki over reservinin az olmasi ile açiklanabilir (1). Alkilleyici ajanlara karsi gonadal korunma gereken kadinlar oldukça fazla sayidadir. Meme kanserli kadinlarin %25'inde tani konuldugunda 50 yasin altindadir. CMF(siklofosfamid, metotreksat,5 fluorourasil) protokolü uygulanan kadinlarin 2/3'ü amenoreik olur. AC(doxurobisin, siklofosfamit) kullananlarin %34'ünde bu amenore 3 yil kadar devam eder. Tedaviye taxanlar eklendigi zaman bu süre uzamaktadir. Prepubertal kizlarda sitotoksik ilaçlara duyarlilik daha azdir (6). 50.000 mg. Siklofosfamid dozunda ancak POY gelismektedir (6). Bu hastalarda tedavi sonrasi 15 yila kadar izlem yapilmistir. Kombine kemoterapi rejimleri uygulananlarda gelismekte olan follikül sayilarinda azalma olurken primordiyal follikül sayisinda belirgin degisiklik olmamaktadir. Bu populasyonda uzun zaman izlemin devam ettigi çalisma sayisi az oldugu için POY sikligini açik söylemek zordur.

Radyoterapi ve kemoterapinin hücre üremesini durdurmak ve ölümü baslatmakla görev yapmasinin yaninda apoptozis baslatici etkileri oldugu da artik bilinmektedir. Bu özelligin bulunmasi hücre döngüsünün anlasilmasi ve daha etkili tedaviler gelistirilmesi konusunda yeni ufuklar saglamistir. Muhtemelen kemoterapi ve radyoterapi 1.mayoz bölünme safhasinda bekleyen ve mitoz bölünme özelligi olmayan oositlere zarar vermesinde de apoptozisin etkili oldugu düsünülmektedir (7).

2.9. Radyoterapinin over fonksiyonlarina etkisi

Iyonize radyasyon tüm yaslarda gonadlar üzerine toksiktir. Fakat radyoterapi dozu, alani, hastanin yasi etki derecesini ve süresini degistirebilir. Yasli hastalar daha

duyarlidirlar (2). Pelvik ve abdominal maligniteler nedeniyle, kraniospinal tümörler nedeniyle, Hodgkin hastaliginda pelvik lenf nodlarina radyoterapi uygulanmasi nedeniyle veya kemik iligi transplantasyonu öncesi tüm vücut irradiasyonu yapilmasi sirasinda overler radyoterapi ile karsilasabilirler. Bunlarin çogu fertil çagda veya öncesindedir. Bu hastalarin çogunda overleri koruma imkani olmamaktadir. Overlerin radyasyona maruz kalmasi sonucunda öncelikle oositler etkilenir. Primordiyal folliküllerde yer alan oosit matur folliküllerdeki ovumdan daha radyosensitiftir. Genç hstalarda primordiyal follikül daha fazla oldugu için korunmasi daha önemldir (22). Çalismalarda çikan sonulara göre folliküllerin yarisinin kaybina yol açan doz 4 Gy'dir.(2). Baska bir çalismada ise genç hastalarda kalici overyan yetmezlik için 20 Gy, yasli hastalarda 6 Gy gerekmektedir (2). Baska bir çalismada ise total vücut radyoterapisi sonrasi (14.4 Gy) 8 kizdan 6'sinda kalici ovaryan yetmezlik olustugu bildirilmistir (2). Farelerde farkli radyoterapi dozlarinda follikül hasarini inceleyen bir çalismada radyoterapinin doza bagimli olarak primordiyal follikül reservini azalttigi gösterilmistir. Genç hastalarin kanser tedavisi sonrasi erken menopoz ve infertilite sorunlarini incelemek amaciyla pekçok çalisma yapilmistir. Abdominopelvik radyoterapi ve alkilleyici ajanlarin kullanildigi çocukluk çagi kanser hastalarini inceleyen bir çalismada doza bagimli olarak abdominopelvik radyoterapi alan hastalarda prematür overyan yetmezlik riskinin daha yüksek oldugu gösterilmistir (2). Primordiyal folliküllere radyoterapinin artan dozunun neden oldugu hasar fare çalismasinda gösterilmistir(2). Doza bagmli olarak follikül reservinin azaldigi gösterilmistir.

2.10. Infertilite ve erken menopozun psikososyal yönleri

Genç kanser hastalarinin yasamlarinin devaminda çocuk sahibi olmak istemeleri genelde sorun olmaktadir. Birçok kanser tedavisi infertiliteye neden olmaktadir ve bu hastalar Assiste Reprodüktif Teknoloji (ART) yada benzeri yöntemlere ihtiyaç duymaktadirlar.

Evlat edinme, gamet donasyonu, tasiyici annelik gibi bazi çözümler olsa da çogu sikinti verici ve pahali yöntemlerdir. Ayrica dini ve toplumsal bazi özellikler bu yöntemlerin kullanilabilirligini kisitlar. Gebe kalan kadinlarda hastaliklarinin

tekrarlayip survi kisalmasi veya tedavilerinin gebeligi olumsuz etkilemesi korkusu vardir. Baska bir sorun bu hastalarin çocuklarinda genetik hasar olusacagi korkusu duymalaridir. Gerçekten bazi genetik malignite sendromlari olup ailenin sonraki üyelerinde tekrarlayabilir. Bu hastalarin hastalik nedeniyle yasam sürelerinin kisa olmasi ve çocuklarini ebeveynsiz birakma korkulari da ayri bir sorundur. Pekçok hasta bu konularda yeterli bilimsel bilgiye sahip degildir ve korkularinin çogu yersizdir.

Infertilite sikligi: Çocukluk çagi, adölesan ve genç eriskinlikte kanser tanisi konulmasi ve tedavisi gelecekteki fertiliteyi ve çocuk dogurganligini etkileyen bir durumdur. Kanser tedavileri kadinda ve erkekte farkli birçok yolla fertiliteye zarar vermektedir. Alkilleyici ajanlar over ve testise toksiktir. Pelvisin radyoterapi almasi kalici testis ve over hasarina yol açabilir. Kizlarda over sahasina denk gelebilen radyoterapi ve kemoterapi erkeklerden daha az gonadal hasara yol açabilirken, total vücut isinlamasi overi daha fazla etkilemektedir.

Puberte öncesi kemoterapi genç kadinlarda daha az zararli olup normal menstrüel sikluslari siklikla devam eder. Fakat bu kadinlarin ne kadarinda overyan rezerv azalmasi oldugu ve genç yaslarda menopoza girdikleri net bilinmemektedir. Abdominal radyoterapi alan kadinlar gebe kalmalari sonrasinda düsük dogum kilolu ve prematür dogum yapma sikliklari fazla olmaktadir. Kemoterapi alan hastalarda kardiak ve pulmoner komplikasyonlar gebelikte daha sik olmaktadir. Çalismalarda kanser tedavisi sonrasi infertil olanlar ile normal toplumdaki infertil çiftlerin psikososyal durumlari karsilastirilmamistir. Kanser hastalarinda mevcut olan kötü psikolojik duruma bir de infertilite eklenmesi daha da kötü olmaktadir.

Hastalarin pekçogunda infertilite bir sürpriz olarak karsilarina çikmaktadir. Genellikle hastalar tani konulup tedavi baslanacagi zaman ilerideki tedaviye bagli riskler ve infertilite hakkinda bilgi verilmemektedir. Çalismalarda genç yaslarda kanser tedavisi almis hastalarin çogunun uzun zaman yan etkileri bilmedigi gösterilmistir. Çocukluk çagindaki hastalara ise bu konuda anlatilanlari anlayacak kapasiteleri tam gelismedigi için bilgi verilmemektedir.

Hastalarin kendi genetik çocuklarina sahip olma hayalinin kaybolmasi büyük bir sorundur. Akil sagligi uzmanlari bu hastalar ile ilgili pekçok çalisma yapsa da bu çiftlerde tedavi edebilme imkani sinirlidir. Infertilite tedavileri genelde pahali ve

pekçok formalite içermektedir. Evlat edinme bu hastalar için zordur. Çünkü çogu maddi sikinti içinde olup islerini yapamayan insanlardir. Ayrica kullanilan tedaviler bazi hastalarda bilissel fonksiyonlari ve fizik kapasiteleri olumsuz etkilemistir.

Kadinlara bu tedavinin bitiminde sonra 2 yil korunmalari önerilir. Çünkü bu dönem reküürrenslerin en sik oldugu dönemdir. Kadinlari çogu gebe kalmalarinin hastaligin seyrini olumsuz etkileyecegini düsünürler (23).

2.11. Over fonksiyonlarini kanser tadavisinden korumak için yapilan çalismalar

2.11.1. Medikal yaklasimlar

Kemoterapi ve radyoterapinin indükledigi over hasarini çözmek ve önlemek ilgi çekici bir alan olmaya devam etmektedir (1).

2.11.1.1. GnRH analoglari

GnRH analoglarinin ratlarda kullanildigi deneysel çalismalarda overleri kemoterapinin toksik etkisinden korudugu izlenmistir. GnRHa ile tedavi baslandiktan 13 gün sonra overde mitotik aktivite belirgin olarak azalmaktadir (24). Eriskin ratlarin GnRHa ile tedavisi küçük folliküllerin büyük folliküllere dönüsümünü inhibe ederek gelismenin devamini önler. Muhtemelen folliküllerin kemoterapiye duyarli safhaya ulasmasini engellemektedir. Folliküllerin çogunlugu GnRH bagimsiz primordiyal safhadadir ve bunlarin kemoterapiye duyarliligi büyük folliküllerden daha azdir. Yapilan hayvan çalismalarinda siklofosfamit ile tedavi edilen ratlarda GnRHa ile kombine tedavi yapilanlarda follikül hasari daha az olmaktadir (25,26). Baska çalismalarda GnRH analoglarinin radyoterapinin yaptigi hasara karsi koruyucu olmadiklari, progesteronlarin bu durumda daha etkili olduklari gösterilmistir (21,27). Ayrica rat oositleri ve insan oositlerinin GnRHa'a olan duyarliliklari da farklidir. Overdeki GnRHa reseptörleri insan ile benzer olan Rhesus

maymunlari ile yapilan çalismada da GnRH analoglarinin kemoterapiden koruyucu olduklari gösterilmistir. GnRH analoglari preovulatuar asamadaki folliküllere baglanmamaktadir ayrica uzamis kemoterapi rejimlerinde etkisiz kalmaktadir (1).

Klinik çalismalarda birkaçinda da kemoterapi ile es zamanli olarak GnRHa kullaniminin over üzerine olan koruyucu etkileri gösterilmisse de uzun zaman kemoterapi alan hastalarda ve uzun dönem izlem sonrasi etkinligi gösterecek çalismalar ihtiyaç vardir (28,29).

2.11.1.2. Antiapoptotik ajanlar

Normal gametogenezde kadin germ hücrelerinde gelisimsel ölümler görülür. Normal ve patolojik durumlarda gelisen etki mekanizmasi apoptozis olabilir. Pek çok çalismada kemoterapi ajanlarinin hücrelerde apoptozis araciligi ile ölüme yol açtigi gösterilmistir. Bazi genetik ve moleküler faktörler bu durumlar da olusan apoptoziste indükleyici rol oynarken, bazilari inhibisyona yol açarlar. Apoptozis alaninda yapilan çalismalarla oosit ve follikül hasarinin apoptotik mekanizmalar ile oynanilarak degistirilebilecegi kanaatine varilmistir. Bu konuda devam etmekte olan ve daha da yapilmasi gereken çalismalar vardir (5).

2.11.2. Cerrahi yaklasimlar

2.11.2.1. Kemoterapi öncesinde invitro fertilizasyon (IVF) ile elde edilen fertilize ovum krioprezervasyonu

Günümüzde kadin kanser hastalarinin fertilitelerini korumak için birkaç yöntem ortaya konulmustur. IVF merkezlerinde 1983'ten bu yana embriyo krioprezervasyonu yapilarak reprodüktif potansiyel korunmaktadir. Ancak bu yöntem evli veya tek partneri olanlara yapilabilir. Hematolog ve onkologlarin kontrendikasyon belirtmedigi kadinlarda ilaçlarla ovulayon indüksiyonu yapilip, IVF planlanabilir. Fakat embriyonun canli kalabilirligi düsük olup bazen siklusu

tamamlayacak veya tekrarlayacak zaman olmayabilir. Tedavi sirasinda östrojen seviyelerinin artmasi meme ca veya baska östrojen duyarli malignitelerin alevlenmesine yol açabilir. Ayrica bazi yayinlarda ovulasyon indüksiyonuna sekonder over ca riskinin arttigi seklinde sonuçlar vardir (30,31). Hemen kemoretapi planlanmayan hastalara ovulasyon indüksiyonu ve embriyo kriopreservasyonu önerilebilir. Hastaliklarina ovulasyon indüksiyonun uzun dönemde etkileri net bilinmemektedir. Yapilan bir çalismada 13 kanser hastasinda kemoterapi ve radyoterapi öncesi IVF ve embriyo krioprezervasyonu planlanmis ve toplam 11 embriyo elde edilmistir (32). Beklenildigi gibi kronik hastaligi olanlarin ovulasyon indüksiyonuna olan cevaplari düsüktür. Ayrica embriyosu saklanan hastalarin ölümü halinde nasil muhafaza edilecekleri de tartisma konusudur. Hastalara kemoterapi sonrasi IVF yapilmasi da düsünülebilir. Kemoterapötik ajanlarin genetik sorunlara yol açmadigi gösterilmistir. Bir çalismada domuz oositlerinin invitro matürasyonunda 100mikrogr/ml siklofosfamid varliginda normal maturasyon ve IVF sonrasi normal PN(Pronükleus) gelisimi görülmüstür (33).

2.11.2.2. Oosit dondurulmasi

Radyoterapi ve kemoterapi alanlarda ideal ve gerçekçi bir yöntem oldugu düsünülmüstür. Bu konuda ana problem oositlerin ömrü ve fertilite oranlarinin korunabilmesidir (34). Dondurulan insan oositlerinin ömrünü artirmak için pekçok farkli yaklasimlar denenmistir fakat hepsinin sonuçlari birbirinden farklidir. Ovulasyona ugramis oosit 2.mayoz bölünmenin metafaz safhasinda beklemektedir, isiya ve toksik ajanlara asiri duyarlidir (35). Trounson 1986'da oositin $O^{o}C$ altinda gelistirebilecegi problemleri ortaya koymustur. Hücre iskeletinin bozulmasi, kromozom ve DNA anomalileri,zona ve plazma membran geçirgenliginin bozulmasi bunlarda bazilaridir (36). Tüm bunlara ragmen farkli krioprotektif ajanlarin kullanimi ve zonanin by-pass edildigi ICSI ile giderek artan gebelik oranlari elde edilmektedir. Çok kullanisli olmamasi ve pekçok çalismada farkli sonuçlar elde edilmis olmasi nedeniyle rutin kullanilan bir yöntem degildir. Yayinlarda term gebelige ulasmis çok az vaka vardir. Basari orani <%2 olarak verilmektedir (33,34,37). Germinal vezikül dondurulmasi ile ilgili çalismalar da yapilarak nükleer matürasyon olmadan ve

metafaz II asamasina gelmeden oositler dondurulmustur. Bu asamada sitogenetik hata riski daha az fakat membran daha duyarlidir. Oosit kültüründe uzun süre beklemesine bagli olarak zona hasari riski artabilir (38). Vitrifikasyon teknolojilerinin gelistirilmesi ile germinal vezikül krioprezervasyonu ve invitro matütrasyon tekniklerinin birlestirilmesi ile basari sansi artirilabilir (39).

2.11.2.3. Over dokusu krioprezervasyonu ve transplantasyonu

Primordiyal ve primer follikülden zengin over korteks dokusunun dondurulmasi alternatif ve ilginç bir yöntem olarak karsimizda durmaktadir. Bu teori ile metafaz II asamasina gelmeden oosit over dokusunda germinal vezikül asamasinda dondurulmaktadir. Dondurulmus-çözülmüs insan over dokusunda yüksek oranda canli follikül elde edilmesi prematür overyan yetmezlik riski altinda olan hastalarda fertilite korunmasi açisindan umut vericidir (40, 41,42).

Hayvan çalismalarinda fare over dokusun krioprezervasyonu ve transplantasyonu ile basarili sonuçlar alinmistir (43,44,45). Over doku yapisinin insana benzedigi koyunlarda yapilan çalismalar da olumlu sonuçlar vermektedir. Histolojik incelemede follikül kaybi belirgin olmakla beraber siklik over fonksiyonlari büyük oranda devam etmektedir.

Insan over doku krioprezervasyonu yakinlarda gelistirilmis bir yöntem olup birkaç merkezde yapilmaktadir. Genç kizlik veya eriskinlik döneminde kanser tanisi almis hastalarda over fonksiyonlarini ve dogal fertiliteyi korumak amaçli uygulanabilir. Prematür over yetmezlik riski olan tüm kadinlarda uygulanabilir. Menstrüel siklusun herhangi bir döneminde tek tarafli ooforektomi veya over korteks biyopsisi yapilabilir. Over korteksi stromadan ayrilir,çesitli solüsyonlara tabii tutulduktan sonra krioprezervasyon yapilabilir.

Over doku transplantasyonu da sinirli birkaç yöntemden biridir. Bu yöntemlerden birisi dondurulmus over dokusu daha sonraki bir tarihte ayni yere transplantasyonudur (46). Baska bir yöntem ise baska bir yere transplantasyonudur (47). Ototranplantasyon over dokusunun malign potansiyel tasiyor olma riskinden dolayi tehlikelidir. Baska bir yöntemde dondurulmus over dokusundan elde edilen küçük folliküllerin invitro matürasyona yönlendirilmesidir (48).

Over dokusunun xenogreft yapilmasi da denenmistir. Immün süprese farelere insan over dokusu transplante edilmistir. Reperfüzyon sürecinde olusan hipoksisin belirgin follikül hasarina yol açtigi gösterilmistir (49). Ayni sekilde farede rFSH ile ovulasyon indüksiyonu ve invitromatürasyon ile matür oosit elde edilen çalismalar da vardir (50).

Tüm gelisme ve çalismalara ragmen over korteks tranplantasyonunda optimal sartlar saglanamamistir. Uzun dönem basarisi follikül sayisina, sürvisine, gelisme ve ovulasyon yetenegine baglidir.

2.11.2.4. Antioksidan ajan kullanimi

Kemoterapötik ajanlar ve radyoterapi hücrede DNA, protein yapilar üzerinde toksik etkiler gösteririler. Kemoterapötiklerin vücutta olusan molekülleri karacigerde antioksidan sistemlere zarar verir (51). Radyasyon da dokulardki su molekülleri ile etlileserek serbest oksijen radikallerini olusturur (52). Bu bilgilerin isiginda radyoterapi ve kemoterapi verilen ratlara antioksidan bir hormon olan melatonin verilmesinin over dokusunda olusan serbest radikal konsantrasyonunu belirgin azalttigi ve over dokusuna olan zararinda bu nedenle azaltildigi gösterilmistir.

2.12. Apoptozis

Programlanmis hücre ölümü olarak bilinen apoptozis embriyolojik gelismeden, büyüme, farklilasma ve normal hücre turnoverine kadar pekçok durumda istenmeyen hücrelerin ölümünü saglayan bir mekanizmadir. Morfolojik olarak nükleer kromatin kondensasyonu, hücre membrani sismesi, hücrenin balonlasmasi, nükleus içeren hücrelerde küçük apoptotik cisimlerin olusmasi ile karakterizedir. Bu hücreler makrofajlar veya mononükleer fagositer sistem hücreleri tarafindan yok edilirler. Apoptozisin normal derecede devam etmesi organizmanin gelisimi ve hemostazi açisindan önemlidir. Fakat az veya çok olarak devam etmesi çesitli patolojik durumlarla karakterizedir. Apoptotik hücre ölümü esitli yollar tarafindan kontrol edilen kompleks bir ag ile saglanir. Apoptotik sinyal hücreye

geldigi zaman ölüm uyarici stimuluslar baslar ve bunlar hücre tipine göre farklilik gösterir (3).

2.12.1. Genel apoptotik yollar

2.12.1.1. Kaspazlar

Kaspazlar sistein proteaz ailesindendir ve onlarin substratlarini parçalarlar. Prokaspazlar aktif kaspazlara dönüsürler (3). Baslatici ve efektör kaspazlar olarak ikiye ayrilirlar. Baslatici olanlar (kaspaz 2,8,9,10) çesitli kaspaz aktive edici proteinlerle etkilesirler. Bunlarin aktivasyonundan sonra efektör kaspazlar devreye girer (kaspaz 3,6,7). Bunlar apoptotik sinyali güçlendirirler ve apoptotik hücre ölümündeki spesifik morfolojik degisiklikler meydana gelir. Kaspazlar mitokondrial veya ölüm reseptörleri araciligi ile aktive olurlar. Farkli organizma ve dokularda spesifik ve uniform morfolojik degisiklikler meydana gelir.

2.12.1.2. Ölüm reseptörleri yolu

Apoptozis hücre membranina TNF-R ailesi üyelerinden birinin baglanip ölüm reseptörlerini aktive etmesi ile indüklenebilir. Spesifik ölüm ligandlari reseptörlere baglandiktan sonra saniyeler içinde kaspazlar aktive olup saatler içinde de apoptotik hücre ölümü gerçeklesir. Fas (CD95) (Apo-1) ve TNF-R1 en iyi karakterize edilmis ölüm reseptörleridir. Bunlara FasL ve TNFα baglandiktan sonra prokaspaz 8 aktif kaspaz 8'e döner ve diger mesajcilar aktive olurlar.

2.12.1.3. Mitokondrial yol

Mitokondri oksidatif olaylarin en önemli regülatörüdür ve reaktif oksijen radikalllerinin ana kaynagidir. Apoptoziste de önemli rolü vardir. Bcl-2 gen ailesi

üyeleri mitokondri aracili apoptoziste önemli rol oynarlar. Apoptotik stimulus stoplazmadaki ve mitokondrideki pro ve antiapoptotik moleküller arasinda esitsizlige neden olur. Proapoptotik üyelerin mitokondri dis zarina dogru translokasyonu ile sitokrom-c salinimi olur.

2.12.1.4. Kaspaz bagimsiz apoptozis

Kaspaz 3 apoptoziste efektör kaspaz olmasina ragmen hiçbir kaspaza bagimli olmadan da apoptozis olusabildigi gösterilmistir (3).

2.12.1.5. Sfingolipid yolu

Sfingolipidler ökaryötik hücre membraninin bir üyesidirler ve apoptozisi regüle ederler. Sfingomyelin hücre zarinin dis kisminda yer alir ve hücre zarinin yarisindan fazlasi fosfolipidlerden olusur. Pekçok uyari sfingomyelinin enzimatik parçalanmasini uyarir**.**

2.12.1.6. Seramid

Seramid apoptoziste, hücre siklusunda ve hücre farlilasmasinda rol oynayan 2. mesajcilardandir. Sfingomyelinden sfingomyelinaz araciligi ile veya seramid sentaz enzimi ile de novo olarak sentezlenir. Asit ve nötral sfingomyelinaz olmak üzere iki enzim vardir. Asit sfingomyelinaz (ASMase) ph 4.5 oldugunda aktive olan lizozomal bir enzimdir. Eksikliginde insanda Nieman-Pick hastaligi görülür.(3). ASMase seramid sentezine asil önemli enzim oldugu ve hücre farklilasmasi ve apoptoziste rol aldigini gösteren pekçok çalisma vardir. Nötral sfingomyelinaz hücre membraninda bulunup nötr ph da aktive olur. Apoptoziste bu enziminde rolü oldugunu gösteren çalismalar vardir. Ayrica seramid palmitoil co.A ve serinden seramid sentaz enzimi ile de novo olarak da sentezlenir. Bu yol ilaçlar veya radyasyon uyarisi ile aktive olur. Antikanser tedavi sirasinda tümör hücrelerinde

seramid artisi büyük oranda bu yolla olur. Artmis seramid sentezi veya disarida hücre zarini geçebilecek seramid analoglarinin eklenmesi pekçok hücrede apoptozis indüksiyonu saglar.

2.12.1.7. Sfingozin

Sfingozin seramidden seramidaz enzimi ile sentezlenir. Fonksiyonlari tartismali olmakla beraber hücre çogalmasinin negatif regülatörü ve apoptozis indüktörü olarak görev yaptigi düsünülmektedir. Hücre içinde oldukça düsük düzeyde bulunur. Sfingozin kinaz sfingozini fosforilleyerek sfingozin-1-fosfat olusumunu saglar. Sfingozin 1- fosfataz ile tekar sfingozine dönüsümü saglanabilir. Seramid, sfingozin ve sfingozin 1 fosfattan hangisi hücrede hakim ise hücre cevabi ona göre belirlenir. Sfingozin kinaz enzimi stoplazmik bir enzim olup büyüme ve yasama faktörleri tarafindan aktivasyonu etkilenir.

2.12.1.8. Sfingozin 1 fosfat

Hücrenin hayatta kalimini artirir ve pekçok hücrede apoptozisi inhibe eder (3). Baslangiçta direkt olarak intraselüler ikincil haberci olarak etki yapar. Seramid ile aralarindaki denge hücrenin hayatta kalimini veya apoptozise ugramasini etkiler.

2.12.2. Terapötik olarak sfingolipidler

Sfingolipid dengesinin regülasyonu kanser tedavisinde önemlidir. Kemoterapötikler ve radyasyon tedavisi seramid akümülasyonuna neden olur (3). Seramid dengesinin bozulmasi hücrelerde multipl ilaç ve radyoterapi rezistansina yol açabilir. Sfingozin-1-fosfat biyosentezinin engellenmesi seramid araciligi ile olan apoptozisi artirir. Pekçok çalismada radyasyonun hücrede asit singomyelinaz enziminin aktivitesini artirarak seramid sentezini artirdigi gösterilmistir.

2.13. Sfingozin-1 fosfatin antiapoptotik etkileri

Apoptozis uyaricilari ve isaretçileri karmasik olmasina ragmen bugüne kadar elde edilen bilgilerle apoptozise müdahale edilebilmektedir. Örnegin kaspazlarin farmakolojik inhibisyonu apoptozisi önlemektedir. Apoptotik yolaklara erken asamalarda müdahale edilebilmesi tedavide yeni gelismeler saglayabilir. Bugüne kadar apoptozis ile ilgili yapilan çalismalarda sfingomyelinden sentezlenen seramidin somatik hücre ölümüyle iliskili oldugu gösterilmistir (9).

Ekaryot hücrelerde sfingomyelin hücre membraninin yapisal elemanidir. Parçalanmasi ile sfingozin meydana gelir. Sfingozinin fazlasinin hücre için toksik olmasi nedeniyle hücre içinde fosforile edilerek sfingozin-1-fosfat olarak bulunur. Gerektiginde sfingozin-1- fosfat, fosfataz ile tekrar sfingozine döner. Fibroblast hücre kültürlerine sfingozin-1- fosfat eklendiginde hücre çogalmasi ve DNA sentezinin arttigini göstermislerdir (8). Daha sonra damar düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde gösterilmistir. Pekçok sistemde ortama pertusis toksini gibi Gi protein inhibitörü eklenmesi sfingozin-1- fosfat etkilerini inhibe eder (8). Seramid ve sfingozin apoptozisin iyi bilinen indükleyicisidirler. sfingozin-1- fosfat seramid, TNFa, Fas ligand ve diger toksikler tarafindan indüklenen apoptozisi inhibe eder (8). Mitokondriden sitokrom c salinimi ile ölüme yol açan çesitli ölüm sinyalleri sfingozin-1- fosfat ile etkilesmektedir (8). Seramid seramidaz ile sfingozine yikilir ve sfingozin kinaz enzimi sfingozini fosforlayarak sfingozin-1- fosfat sentezlenmesini saglar. Sfingozin-1- fosfat hücre zarini geçebilen seramid analoglari ve dis stres faktörlerinin neden oldugu apoptozisi önlemektedir. Otonom germ hücre ölümünü önlemede asit sfingomyelinaz enzim defektinin önemli oldugu gösterildikten sonra seramid antagonisti olan sfingozin-1-fosfatin seramidin indükledigi apoptozisi önleyecegi düsünülmüstür. Çalismalarda elde edilen bilgiler toplandiginda seramidin kemoterapi ve rdayoterapinin araciligi ile olan oosit zararlanmasinda apoptozis sürecinde hücre ölüm ajani olarak görev yaptigi sonucuna ulasilmaktadir. Bazi çalismalarda oosit kültürlerinde seramid üretimi yapilabilmistir. Seramid ayrica hücre içinde metabolize olarak sfingozin-1-fosfat sentez yolunda araci olan ve bazi durumlarda apoptotik etkileri gösterilmis olan sfingozine dönüsmektedir. Prostat kanseri ve meme kanseri tedavisinde doksurobisin tedavisinin sfingozin seviyelerini

ve apoptozisi artirdigini gösteren çalismalar da vardir (7). Radyoterapi ve kemoterapinin oositleri öldürmesinde seramidin araci oldugunun tespit edilmesi bu kadinlarda fertilitenin korunabilmesi için birseyler yapilabilecegini düsündürmüstür. Bu düsüncelerle yakin zamanda invivo S1P kullaniminin oositleri kanser tedavisinin neden oldugu hasardan korumasina yönelik çalismalar yapilmistir (7).

Farelere radyoterapi vermeden 2 saat önce invivo olarak overin bursal kavitesine sfingozin-1-fosfat verilip 2 hafta sonra incelenen over dokusunda doza bagimli olarak overde follikül hasarini önledigi gösterilmistir. Tüm follikül populasyonunda anlamli fark ve over hacminde de olumlu etkiler izlenmistir. Oosit viabilitesi folliküllerin ilkel asamalarda matur hale gelene kadar gelisimini devam ettirebilmesi ile olmaktadir. Tüm asamalardaki folliküllerin sfingozin-1-fosfat tedavisi verilen grupta canli ve fonksiyonel oldugu gösterilmistir. Ayrica bu hayvanlara ovulasyon indüksiyonunu takiben IVF yapilmistir. Oosit ve embriyo kaliteleri degerlendirilmistir. Fertilizasyon oranlari ve iki hücreli embriyo sayisi her iki grupta benzer iken embriyolojik gelisimin devami sfingozin-1-fosfat ile korunmayan grupta izlenmemistir.

Overler kompleks organlardir. Overlerin primer özelligi kadin organizmasinda somatik ve germ hücrelerini birlikte içermesidir. Memeli disilerinde dogumda herbir germ hücresi spesifik somatik hücrelerle çevrilidir. Folliküllerin çogunun neonatal yasamda gelisimleri duraklamaktadir ve primordiyal follikül döneminde beklemektedirler. Dogumda diside mevcut olan follikül reservi yenilenemez, zamanla overyan yaslanma sürecinde bu reservin tamamen tükenmesi ile menopoz olur. Overden salinan östrojenin azalmasi kadinda menopozla birlikte pekçok saglik sorununu getirmektedir. Adjuvan kanser tedavileri oosit kaybini hizlandirmaktadir. Overyan yetmezlik, reprodüktif potensiyal kaybi, menopoz ile iliskili saglik sorunlarinin daha erken ortaya çikmasina neden olmaktadir (9).

Tüm çalisilanlarin sonunda oositlerin apoptozise yüksek hassasiyetleri oldugu ortaya çikmaktadir. Geçen birkaç yilda overde normal ve patolojik durumlarda olusan apoptozisin baslatilmasi ve uygulanmasindan sorumlu olan pekçok intraselüler mekanizma ortaya konulmustur (7).

3. MATERYAL ve METOD

Bu çalisma; Süleyman Demirel Üniversitesi Tip Fakültesi Kadin Hastaliklari ve Dogum A.D, Uludag Üniversitesi Tip Fakültesi Biyokimya A.D, Uludag Üniversitesi Tip Fakültesi Anatomi A.D. ve Uludag Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji A.D'nin katilimi ile tamamlanmistir.

3.1. Deney Hayvanlari

Çalismamizda agirliklari 100-160 gr. arasinda degisen, Wistar albino cinsi immatür 6-9 haftalik toplam 39 adet disi rat kullanildi. Deney hayvanlari çalisma boyunca 20±2°C'de, 12 saat aydinlik ve 12 saat karanlik ortamda tutuldu. Özel kemirgen yemi ve su (ad libitum) ile beslendi.

3.2. Deney plani

Çalismada toplam 40 rat 5 ayri gruba bölündü. Her grupta 8 adet rat mevcut olacak sekilde ayarlandi. Radyoterapi grubundaki ratlardan bir tanesi takipler sirasinda öldügü için grup 7 rat olarak kaldi.

Gruplardan birisi kontrol grubu olarak belirlendi.

Grup A (Kontrol grubu): Bu grupta bulunan 8 adet rata 3 gün ardarda ayni saatlerde 10 IÜ,10 IÜ ve 15 IÜ eCG verildi.

Grup B (Kemoterapi Grubu): Bu grupta bulunan 8 adet rata 3 gün ayni sekilde 10 IÜ,10 IÜ ve 15 IÜ eCG verildi. Son eCG'den 24 saat sonra 100mg/kg dozda intraperitoneal olarak siklofosfamid verildi.

Grup C (Kemoterapi ve Sfingozin-1- fosfat grubu): Bu grupta bulunan 8 adet rata ayni sekilde eCG verildi, son dozdan 24 saat sonra ratlar ketamin ve diazem ile anestezi altina alinip solda dorsal insizyonla overe ulasilip sol over bursal kavitesine 200µM sfingozin-1- fosfat içeren solüsyondan 50µl verildi. Cilt 3/0 vicryl ile

kapatildi. Bu ratlara 2 saat sonra 100mg/kg dozda intraperitoneal olarak siklofosfamid verildi.

Grup D (Radyoterapi grubu): Bu grupta bulunan 7 adet rata 3 gün ayni sekilde 10IÜ,10IÜ ve 15IÜ eCG verildi. Son dozdan 24 saat sonra asagida tariflenen sekilde radyoterapi verildi.

Grup E (Radyoterapi ve Sfingozin-1-fosfat grubu): Bu gruptaki 8 adet rata ayni sekilde eCG verildi. Son dozdan 24 saat sonra ratlar anestezi altina alinip sol dorsal insizyonla sol overe ulasildi. Sol over bursasina 200µM sfingozin-1- fosfat içeren solüsyondan 50µl verildi. Cilt 3/0 vicryl ile kapatildi. Bu ratlara 2 saat sonra anlatilan sekilde radyoterapi verildi.

Ayrica diseksiyon sirasinda C ve E gruplarinin karsi overleri de alinarak kullanilan S1P'in peritoneal yayilimla karsi overde yaptigi etkiler incelendi.

Grup F : Kemoterapi ve S1P verilen grubun karsi overi

Grup G: Radyoterapi ve S1P verilen grubun karsi overi

Kontrol grubu son doz eCG'den 24 saat sonra, kemoterapi gruplari kemoterapiden 24 saat sonra ve radyoterapi gruplarindaki ratlar radyoterapiden 16 saat sonra yüksek doz anestezik ajan ile öldürüldükten sonra dorsal insziyonla açilip sol overe ulasildi. Over dokulari zedelenmeden ve travmatize etmemeye özen gösterilerek çikarildiktan sonra, tartilip soguk izotonik ile 20-30 saniye kadar yikanarak kan ve yag dokulari uzaklastirildi. Daha sonra over ikiye kesilerek yarisi % 10 formalin içine, diger yarisi %4 glutaraldehit içeren solüsyona alindi. Bu solüsyonlar daha önceden buzdolabinda + 4ºC'de tutuldu. 5-6 saat + 4ºC' de bekleyen dokular daha sonra çalisilmak üzere soguk ortamda Uludag Üniversitesi'ne gönderildi.

Gruplar	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	4.gün+2saat	16.saat	24.saat
A		10IÜeCG	10IÜeCG	15IÜeCG			Diseksiyon
B	10IÜeCG	10IÜeCG	15IÜeCG		100mg/kg siklofosfamid ip		Diseksiyon
C	10IÜeCG	10IÜeCG	15IÜeCG	S1P	100mg/kg siklofosfamid ip		Diseksiyon
D	10IÜeCG	10IÜeCG	15IÜeCG		720cGy radyoterapi	Diseksiyon	
E	10IÜeCG	10IÜeCG	15IÜeCG	S1P	720cGy radyoterapi	Diseksiyon	

Tablo 1. Tüm gruplara yapilan islemler. Kontrol grubunun ovulasyon indüksiyonuna 24 saat sonra baslandi. Tüm ratlarin diseksiyonu ayni gün belirlenen saatlerde yapildi. C grubunun sag overleri F grubunu ve E grubunun sag overleri G grubunu olusturdu.

3.3. Kullanilan ilaçlar ve kimyasallar

1-Equine koryonik gonadotropin (eCG) (Folligon Intervet -Türkiye): 5ml'de 1000IÜ eCG içeren folligon ampül.

2-Sfingozin-1-fosfat(Sigma-Aldrich Germany) : 1 mg. toz halde sfingozin 1 fosfat içeren ürün.

3-Polietilen glikol (Merck)

4-Ethanol %96 (Merck)

5-Tween 80 (Acros Organics)

6-Methanol (Merck)

7-Ketamin hidroklorür (Ketalar-Pfizer): 10 ml'de 50 mg. ketamin içeren ürün hayvanlarda anestezi saglamak üzere kullanildi.

8-Diazem (Diapam – Biosel): 1ml'de 10mg diazepam içeren ürün kullanildi.

9-Tunel kit (Roche Diagnostics 1684817, Mannheim,Germany)

10-Harris's Hematoxylin

11-DAB substrate (Diamino benzidin- Boehringer Mannheim, 1718096, Mannheim, Germany)

12-%30 H_2O_2(Stock)

13-Triton- X 100

14-Proteinase K(Roche Diagnostics,161 519)

15-DNAse I (Roche Diagnostics 104159,100mg/ pack. Mannheim, Germany)

16-PBS

17-Mounting medium

18-Fresh xylene

19-Abs Etoh

20-Distile su

21-Deiyonize su

22-Nail Varnish

23-Metilen green boyasi (DAKO ,S 1962) 1 adet

24-Spur's resin (Agar Scientific Ltd,Stansted,Essex,UK)

3.4. Kullanilan cihazlar

1-37° C inkübatör
2-Poly-L-Lysine coated slides(SIGMA, P 0425,72/ paket) 1 paket
3-Normal lamel(20x22mm)(SIGMA, C 9802, 10 paket/kutu) 1 paket
4-Lamel
5-Humidity Chambers
6-100㎖lve 1000㎖l mikropipet
7- Isik mikroskobu
8-Buzdolabi ve derin dondurucu
9-Jeol 100 elektron mikroskopi

3.5. Sfingozin-1- Fosfatin hazirlanisi

Sfingozin-1-fosfat toz halde 1mg ürün içeren flakon kullanildi. 1 mg S1P için 2 ml methanolde 65°C'de, benmaride çözülmesi saglandi. Daha sonra vortekste bir miktar çevrilen solüsyonun, sonikasyon cihazinda 10 sn. çözülmesi saglandi. Azot akimi altinda solüsyondan metanol uçuruldu. Daha sonra hazirlamis oldugumuz PET-PBS (%5 polietilen glikol, %2.5etanol, %0.8 tween 80) tasiyici solüsyonunda çözüldü. Tekrar vortekslenip tekrar sonikasyon cihazinda 10 sn. tutuldu. Sfingozin 1-fosfat tamamen çözülmüs oldu (51). Elde edilen sfingozin 1 fosfat konsantarsyonu 200μM olacak sekilde ayarlandi (9).

3.6. Radyoterapi

15 adet rata Denizli Onkomer Radyoterapi merkezinde radyoterapi verildi. Co 60 γ kullanan Theratron 780-Kanada cihazi ile, 81.39cGy/min hizda toplam doz 720cGy olacak sekilde tek doz radyoterapi verildi. Ratlar kendileri için özel olarak hazirlanmis bölmeli kutuda tutuldu, radyoterapi 90 cm. uzakliktan verildi.

3.7. Kemoterapi

Kemoterapi grubundaki ratlara 100mg/kg dozda siklofosfamid intraperitoneal olarak verildi.

3.8. Rat overinde Kaspaz 3 immün boyama prosedürü

1- 5 µm kalinliginda kesitler alinir. Oda sicakliginda 5-10 dk. sulari akitildiktan sonra kesitle çalisilincaya kadar buzdolabinda saklanir.

2- Kesitler 60°C'de 60.dk deparafinize edilir.

a) Xylol'de 3 x8 dk

b) %100 alkolde 2x3 dk

c) %96 alkolde 2x3 dk

d) distile suda 2x1dk bekletilir.

3- Mikrodalgada her 700W'da her 5 dakika tuttuktan sonra 5 dk. sogutacak sekilde 3 kez bekletilir. Sitrat tamponla dolu saleye kesitler geçirilir. Islem bitince en az yarim saat oda sicakliginda kendiliginden sogumasina izin verilir.

a) Distile su ile yikanir.

b) PBS 1x5 dk

c) H2O2 10 dk (64 ml. distile suya %35lik H2O2'den 6 ml.eklenir).

d) PBS 3x5 dk

e) 100 µl serum ile 1 saat oda sicakliginda inkübasyon ardindan yikama yapilmaz sadece fazlalik kurutma kagidi ile silinir.

f) Primer antikor + 4 derecede 18 saat Kaspaz 3 antikoru ile önerilen konsantrasyonda inkübe edilir. Nemli bir ortam saglanarak kuruma olmamasina dikkat edilmelidir.

g) PBS 3x5 dk.

h) Link antikor 15 dk. oda sicakliginda

i) PBS 3x5 dk

j) Streptavidin peroksidaz 15 dk. oda sicakliginda

k) PBS 3x5 dk

l) DAB substrat (Uygulamadan hemen önce isiktan korumaya dikkat edilerek hazirlanir.1 ml kendi sustratina 1 damla olacak sekilde hazirlanir).

m) Distile su ile DAB dikkatle atik kabina yikanir. Preparat distile su ile dolu salede bekletilir.

n) Distile su ile yikanir.

o) Çesme suyu ile yikanir.

p) Harris hematoksilen 30sn

q) Çesme suyu ile yikanir.

r) Distile su

s) % 70 alkol 30sn

t) %96 alkol 30 sn

u) %100 alkol 3 dk

v) Xylene 2x3 dk

y) Mounting medium ile kapatilir.

3.9. Elektron mikroskopi metodu

Over dokularindan PH: 7.4, oda sicakliginda, 0.1 M fosfat tamponu içinde glutaraldehit uzaklastirilir. Yaklasik 1mm. kalinliginda bloklar alinip Tunica albuginea ve stromanin santral zonunuda içerecek sekilde kesitler alinip yaklasik 1 saat fixatif içinde bekletilir. Bu dokular fosfat tamponunda alkalanip fiksasyon sonrasi 0.1M fosfat tamponu içindeki % 2 osmium tetroksitte 2 saat bekletilir. Fosfat tamponu yikandiktan ve alkol ile dehidrate edildikten sonra Spur’s resin ile muamale edilir. Sonuçta hazirlanan dokular kodlanip incelenmek üzere bekletilir. Ultra ince kesitler alinip (yaklasik 80nm), resine batirilmis dokular bakir izgaralara toplanir ve uranil asetat ve sitrat ile boyanir. Jeol 100 elektron mikroskopu inceleme için kullanildi.

3.10. TUNEL Metodu

Preparatlar deparafinizasyon için 60°'de 45-60 dk. bekletilir. Sonraki basamaga hizlica geçmek gerekmektedir. Preparatlar hemen içi xylol dolu saleye alinir. Bu asamada + ve – kontroller için karar vermek gerekir. Preparatlar boyali cam kavanoza alinir. Her bir solüsyon bosaltildiktan sonra digeri preperatlar üzerine eklenir.

a) Xylen 2x5dk
b) %100 alkol 2x5dk
c) %95 alkol 3dk
d) %80 alkol 3dk
e) %70 alkol 3dk
f) %40 alkol 3dk
g) Distile su 2x3dk
h) PBS 5dk

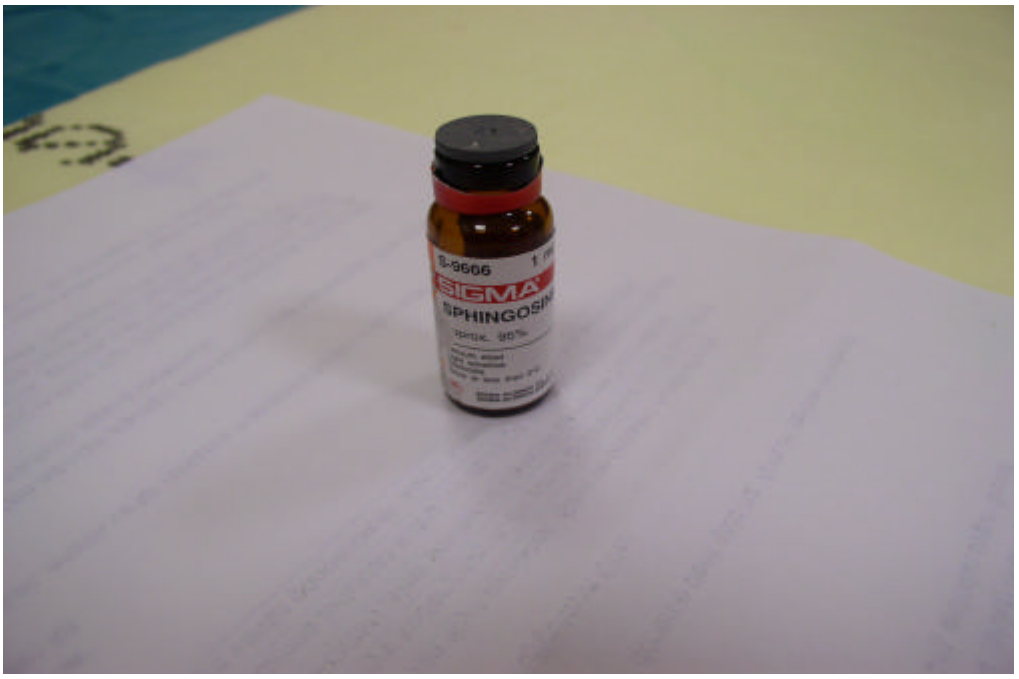
Daha sonra PBS bosaltilip Proteinaz K eklenir, 37°C'de 15.dk bekletilir.

Endojen peroksidaz blokaji için dokular PBS ile 2x5 dk yikanir. PBS bosaltilip H2O2 ile oda sicakliginda 10.dk bekletilir.

PBS ile 2x2 dk. çalkalanir.

Triton-X 100 ile 5dk. buz içinde bekletilir.

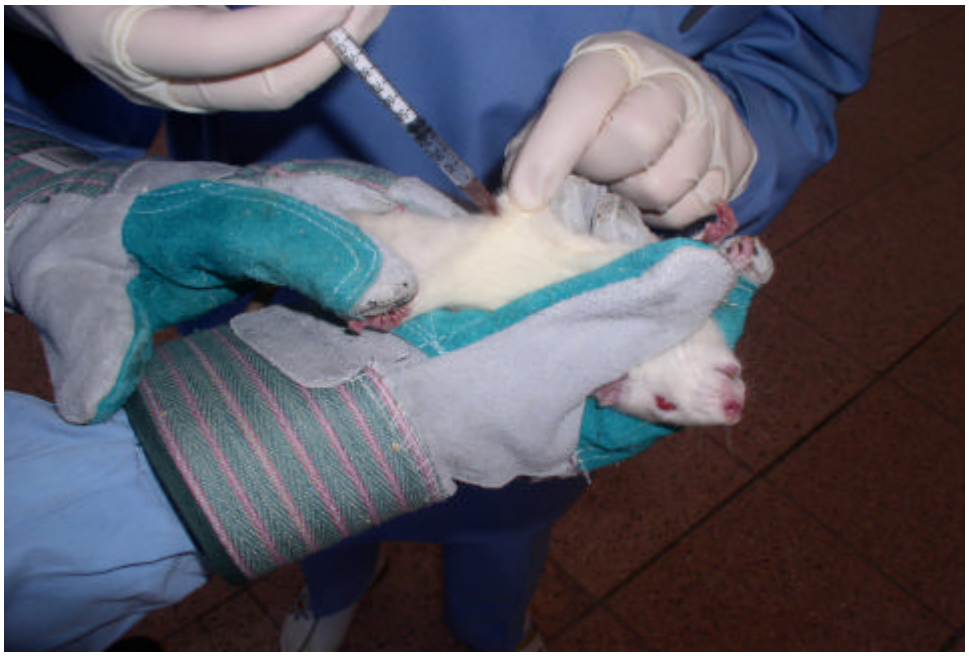
Pozitif ve negatif kontroller için bu asamaya kadar ayni islemler yapilir. Her iki gruptaki preparatlar isaretlenir. Negatif kontrol olmasi düsünülen preparatlar kavanozdan alinip nemli kamaraya alinir. DNA'yi uzaklastirmak için 50µl DNAase eklenir, 37°C'de 10.dk bekletilir. Diger preparatlar da nemli kamaraya alinip üzerine 25µl TUNEL karisimi eklenir, 37°C'de, 60dk bekletilir. Negatif kontrollere ise TdT enzim içermeyen solüsyondan 35µl eklenir. Preparatlar PBS ile 2 kez 5dk çalkalanir. Tüm preparatlar nemli kamaraya alinir, 50µl converter-POD solüsyonu eklenir, 37°C'de 30.bekletilir. PBS ile 2x3 dk çalkalanir. Daha sonra tekrar nemli kamaraya alinir, 50µl DAB konulur, oda sicakliginda 4 dk. bekletilir. PBS ile 3x3 dk. çalkalanir. Distile suda durulanan preparatlar çesme suyuna tutulur. Hematoksilenli saleye alinir, 15 sn boyanir, sonra tekrar çesme suyu ile durulanir. Mounting medium ile kapatilir, isik mikroskobunda incelenir.



Resim 1. Çalismada kullanilan sfingozin-1-fosfat. 1mg



Resim 2. Çalismada kullanilan ratlar



Resim 3.Rata intraperitoneal enjeksiyon yapilmasi.



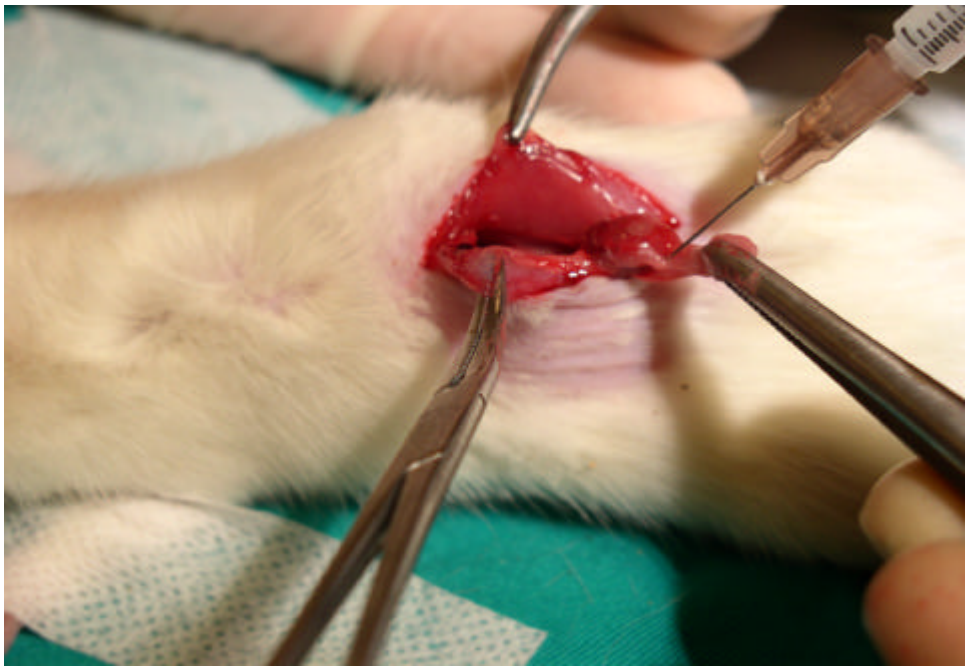
Resim 4. Çalismada kullanilan cerrahi set



Resim 5.Diseksiyon öncesi anestezi verilmis rat ve cerrahi düzenek.



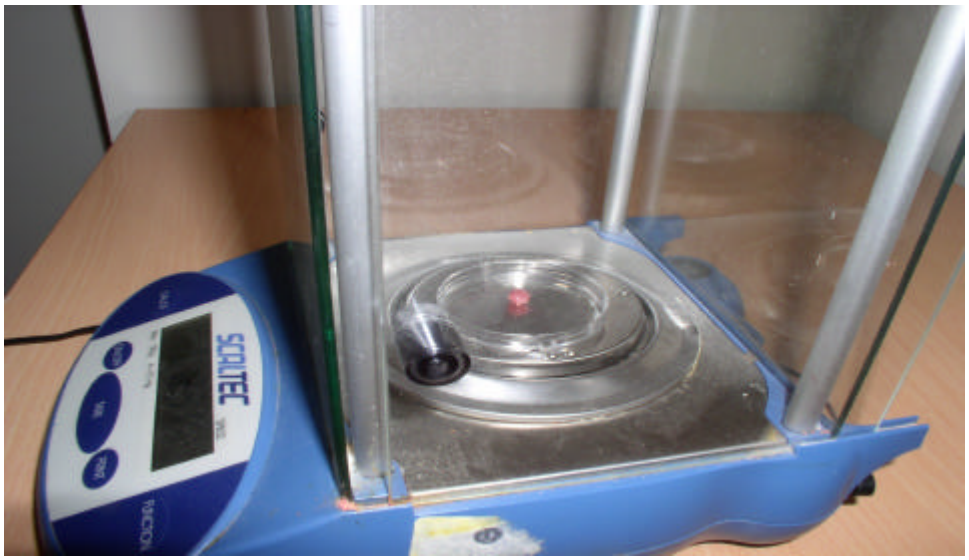
Resim 6. Dorsal insizyon ile rat overinin açiga çikarilmasi



Resim 7. Overin bursa ovarikasina sfingozin-1-fosfat enjeksiyonu



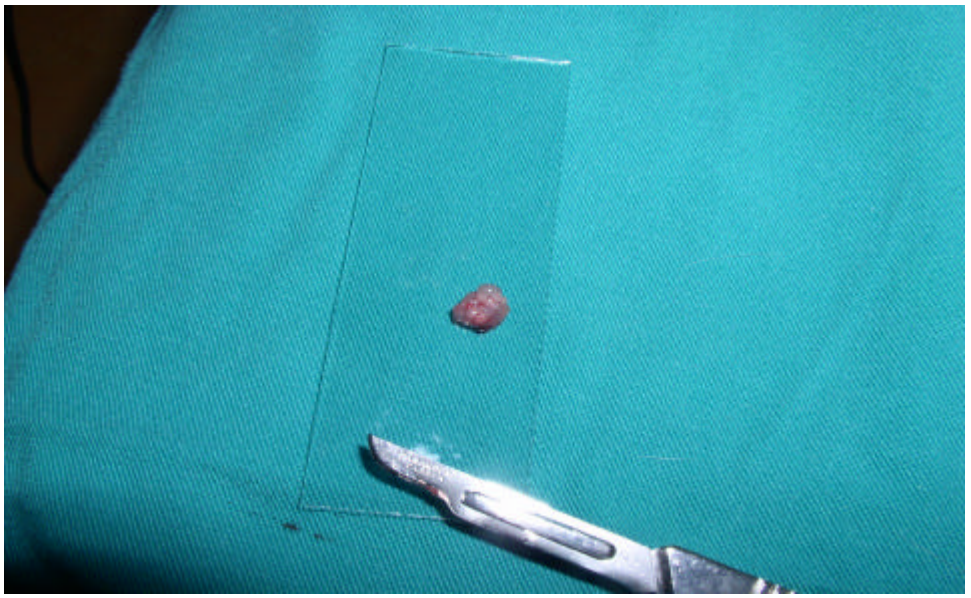
Resim 8. Baska bir rat overinde bursa ovarikaya sfingozin-1-fosfat enjeksiyonu



Resim 9. Over agirliginin hassas terazi ile tartilmasi



Resim 10. Over dokusunun kan ve yag dokudan ayrilmasi için soguk izotonik ile yikanmasi



Resim 11. Over dokusunun farkli fiksatif solüsyonlara konulmak üzere ikiye ayrilmasi.



Resim 12.Tüm over dokulari bir arada (Ayni gruba ait overler ayni siseye alindi).

4. BULGULAR

Overler diseksiyon sonrasinda hassas terazi ile tartilarak agirliklari karsilastirildi. A grubunda ortalama over agirligi:76.5mg; B grubunda: 89mg ;C grubunda :68.1mg ;D grubunda 72.8mg;E grubunda 97mg; F grubunda 70.8mg;G grubunda 87mg olarak ölçüldü.

Tüm gruplardaki over dokularindan hazirlanan preparatlardaki folliküller incelendi. Folliküllerdeki TUNEL ya da aktif kaspaz-3 + hücre sayilari belirtilen folliküllerdeki toplam hücre sayisina orani (yüzdesi) saptandi.

Hücre ölümü apoptozise özgü DNA kiriklarinin taninmasini saglayan bir yöntem olan TUNEL ve ayrica yine apoptozise özgü bir marker olan aktif kaspaz 3'ün immünhistokimyasal olarak belirlenmesiyle tespit edildi.

Radyoterapi ve Kemoterapiye bagli olarak apoptotik hücre ölümleri gözlendi. Radyoterapinin antral dönemdeki folliküllerde kaspaz 3+ hücre sayisinda yaklasik % 100 artisa yol açtigi gözlendi. Fakat primordiyal folliküllerde radyoterapinin bu etkisi ayni derecede olmayip yaklasik % 25 oraninda oldugu tespit edildi. TUNEL metoduna göre ne preantral folliküllerde ne de antral folliküllerde TUNEL + hücre sayisinda anlamli artis olmadigi tespit edildi. Fakat primordiyal folliküllerde TUNEL + hücre sayisinda artis oldugu gözlendi.

Preantral ve antral folliküllerde radyoterapi ve kemoterapinin TUNEL + hücre sayisinda anlamli artisa yol açmazken antrumda asiri pozitiflige yol açtigi gözlendi.

Uyguladigimiz sfingozin-1-fosfatin özellikle radyoterapi grubunda apoptozisi belirgin olarak engelledigi gözlendi. Kemoterapi grubunda ise anlamli degisiklik izlenmedi. TUNEL sonuçlarina göre kortekste TUNEL + hücre sayisinda üçte bir oraninda azalma tespit edildi. Kaspaz sonuçlarina göre , antral folliküllerdeki ve primordiyal folliküllerde kaspaz + hücre sayilarinda yari yariya azalma görüldü.

Kaspaz + hücre oranlarinin TUNEL + hücre oranlarina göre daha fazla oldugu görüldü. Tüm gruplar göz önüne alindiginda Kaspaz + hücre sayilarinin, TUNEL + hücre sayilarina oranla yaklasik 2-3 kat fazla oldugu görüldü.

Teka hücrelerinin radyoterapi ve kemoterapiden etkilenmedigi görüldü.

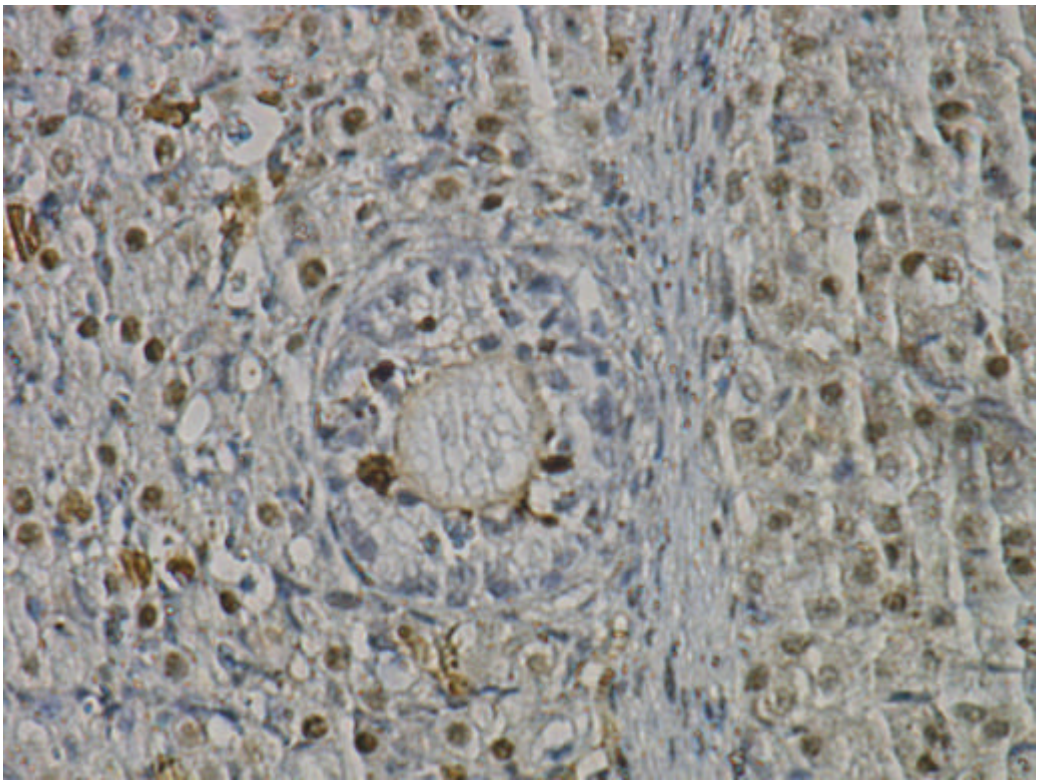
Elektron mikroskopi çalismalarinda , “tipik halo effect’’ gösteren hücrelerin nükleuslarinda apoptozise özgü olarak tipik hücre küçülmesi, kromatin kondensasyonu ve çevresindeki komsu hücrelerden küçülerek uzaklasma belirtisi gösterdigi gözlenmistir. Normal hücrelerle yapilan karsilastirmada hücrelerin genel olarak küçüldügü, plazma ve nükleus zarlarinin intakt kalirken, kromatinlerinin nükleer zarin periferisinde kondanse oldugu gözlenmistir. Bunlar tipik apoptozis bulgularidir.

TUNEL			
	Preantral	Antral	Primordiyal
A	<%5	<%10	<%20
B	<%5	<%10	%40
C	<%5	<%10	%40
D	<%5	%10-20	%60
E	%5	%15	%30-40
F	%20-30	%35	%40
G	%10	%20	%25

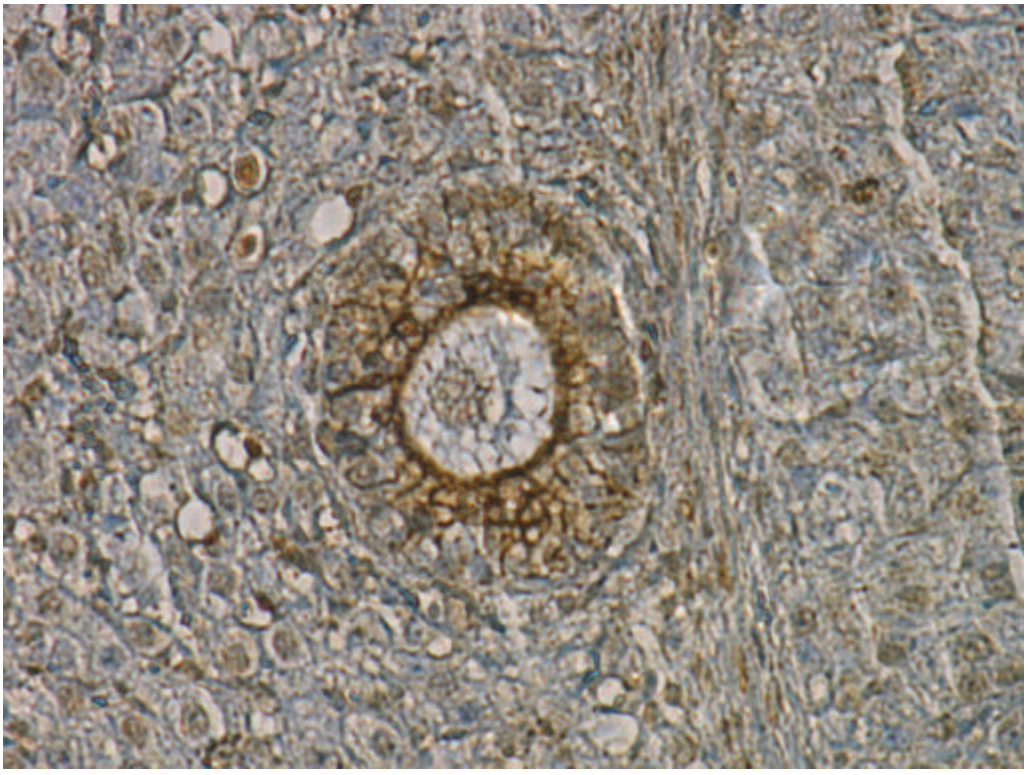
Tablo 2. TUNEL metodu ile alinan sonuçlar.

Kaspaz- 3			
	Preantral	Antral	Primordiyal
A	<%5	<%20	<%70
B	<%5	<%30	%90
C	<%5	<%30	%90
D	<%5	%40-50	%90
E	%2	%5	%50
F	%1	%1-5	%75-80
G	%1	%2	%75

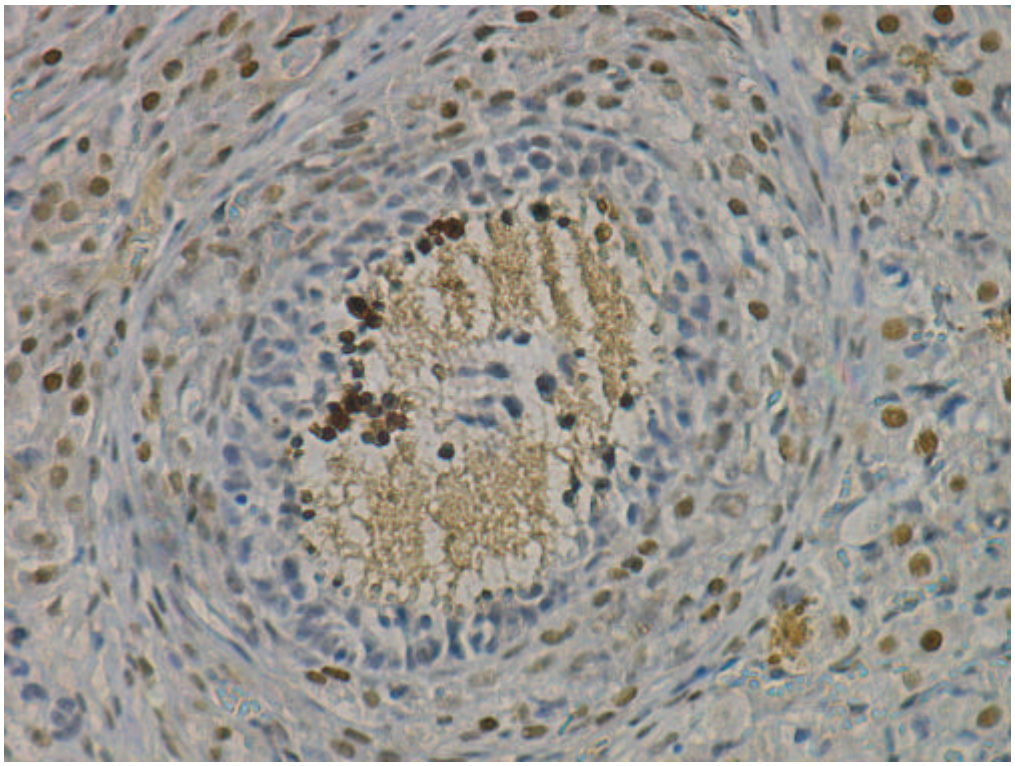
Tablo 3.Aktif kaspaz-3 immünohistkimyasal gösterilmesi ile alinan sonuçlar



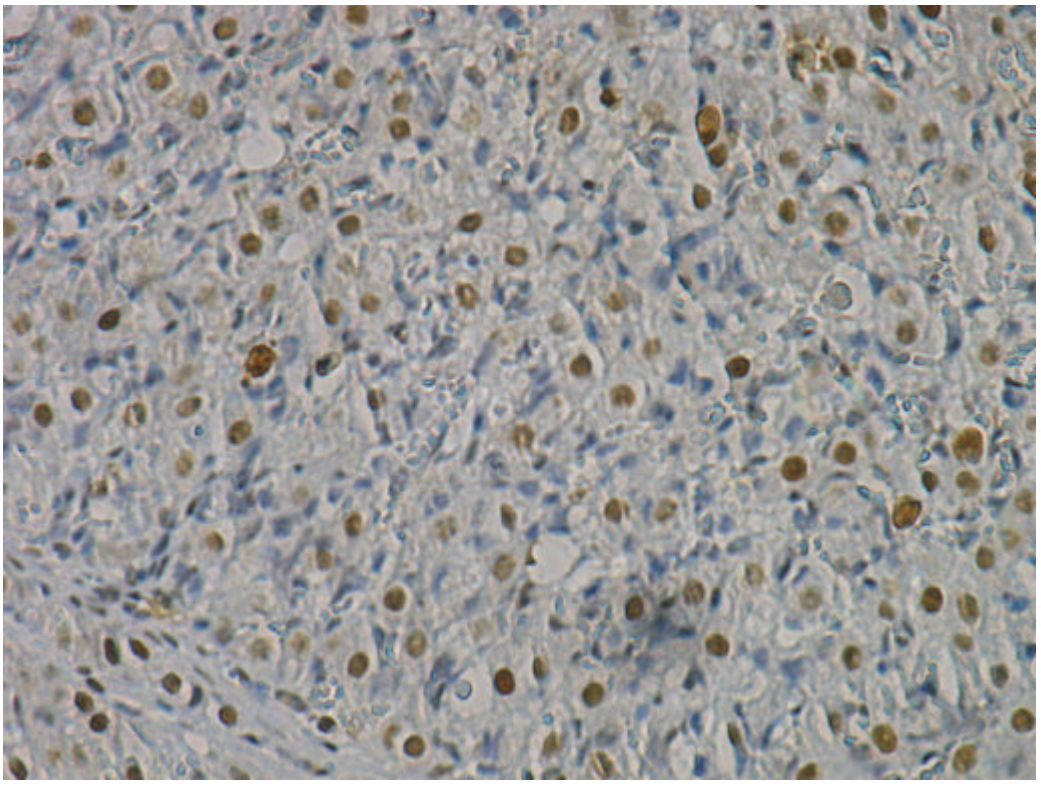
Resim 13. B grubuna ait bir overde kaspaz + boyanma. (x 40)



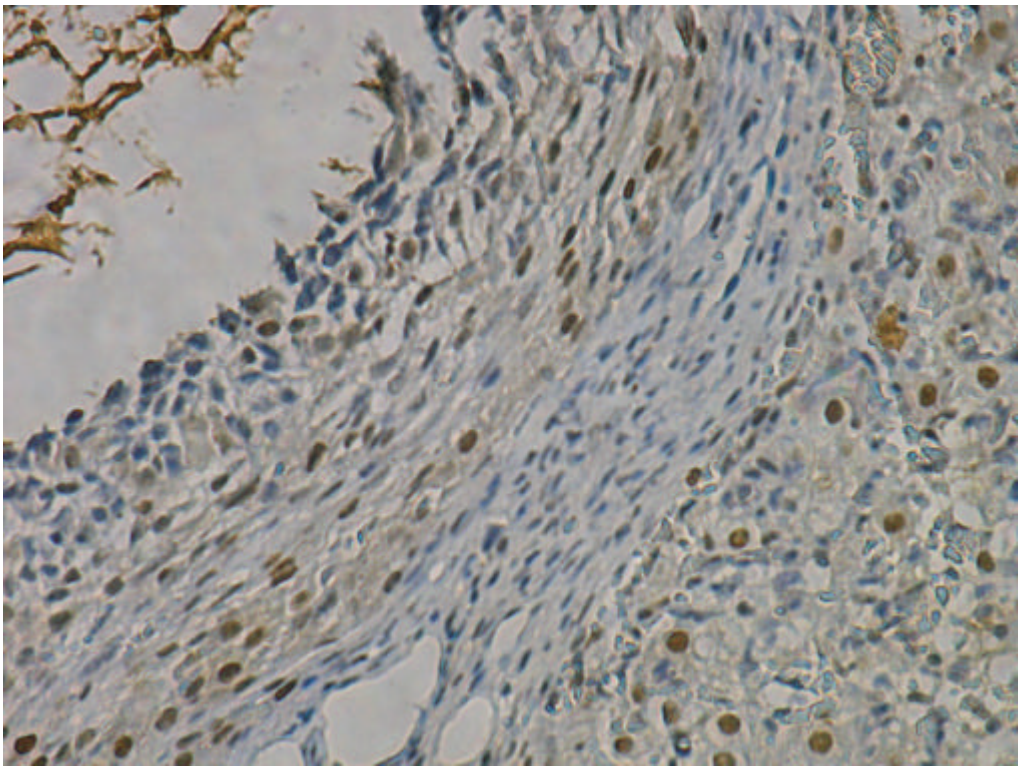
Resim 14. Resim 13’teki follikülün TUNEL + görüntüsü x 40



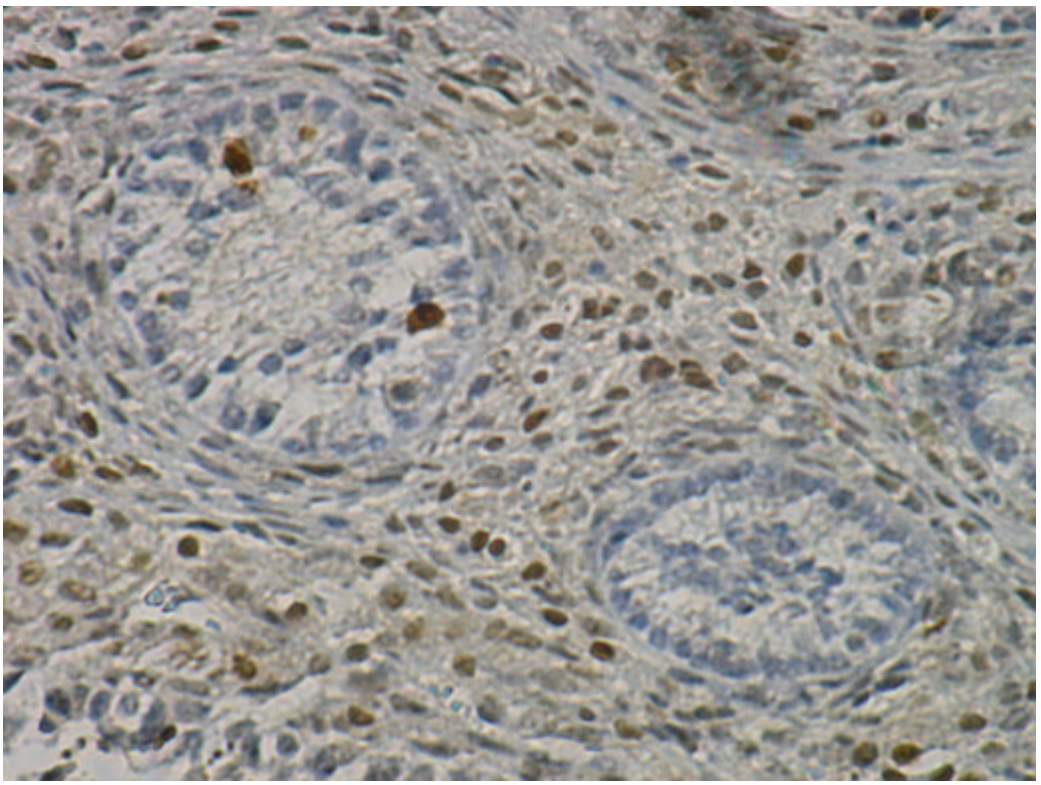
Resim 15. B grubuna ait bir overde kaspaz + boyanma x 40.



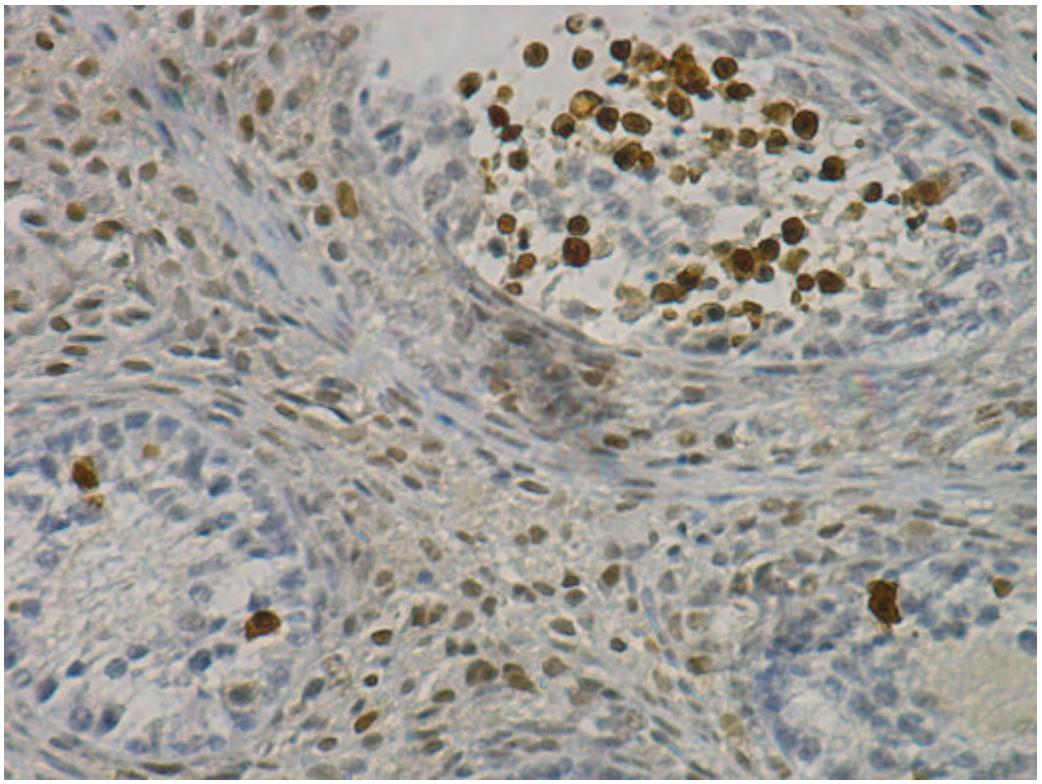
Resim 16. B grubuna ait bir overde kaspaz + Korpus luteum hücreleri x 40.



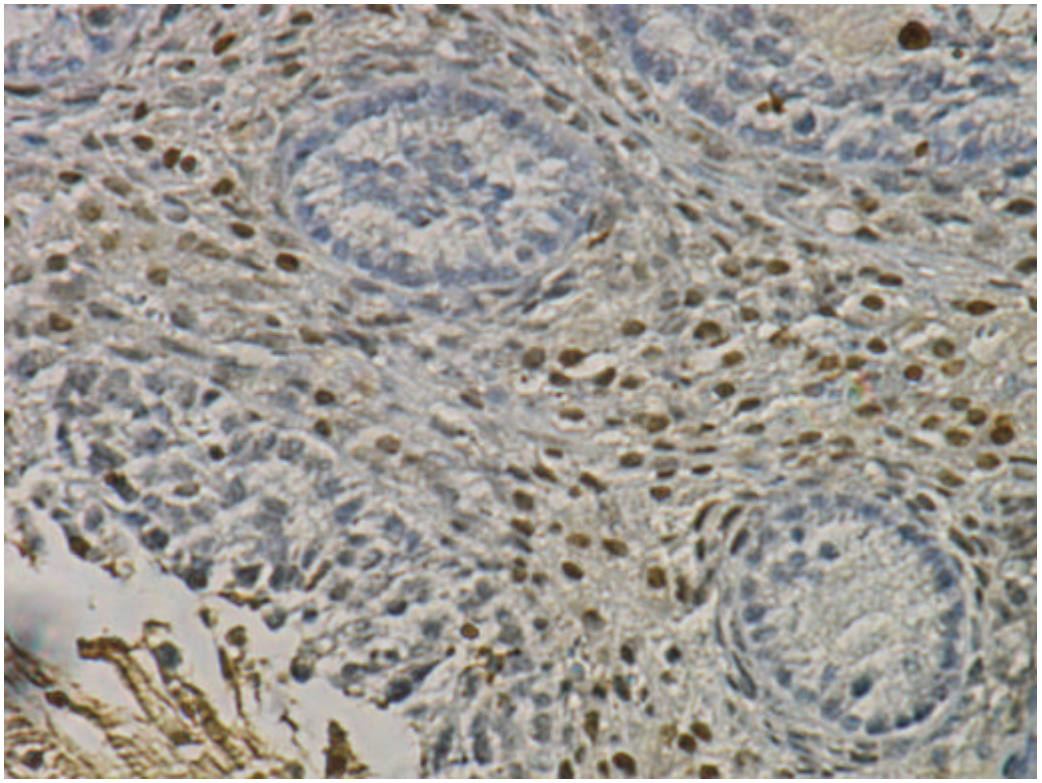
Resim 17. B grubuna ait bir overde kaspaz (–) teka hücreleri x 40.



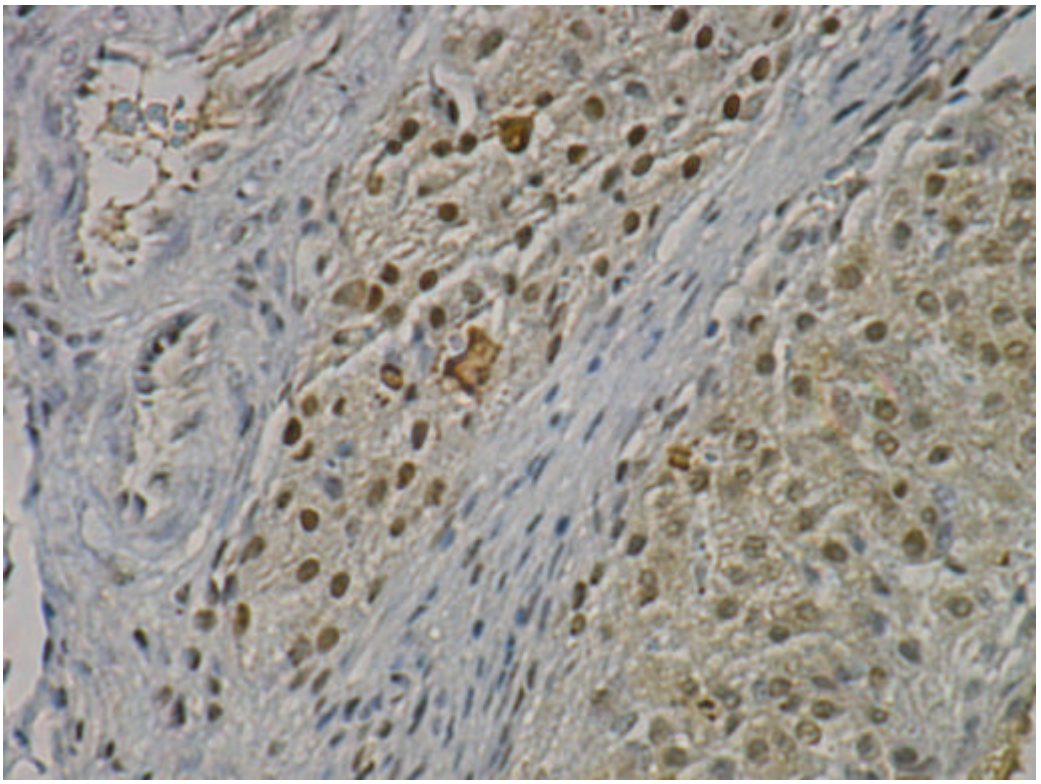
Resim 18. B grubuna ait bir overde kaspaz +folliküller x 40.



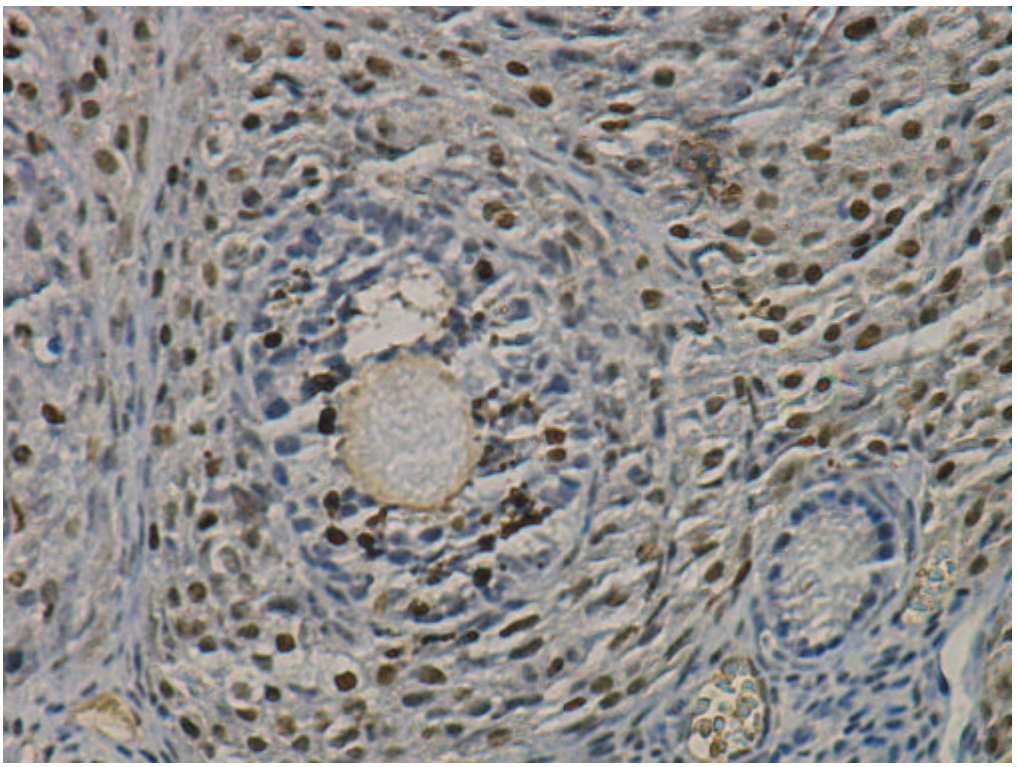
Resim 19. Resim 18'deki overde daha ileri evredeki follikülde daha fazla kaspaz + boyanma x40.



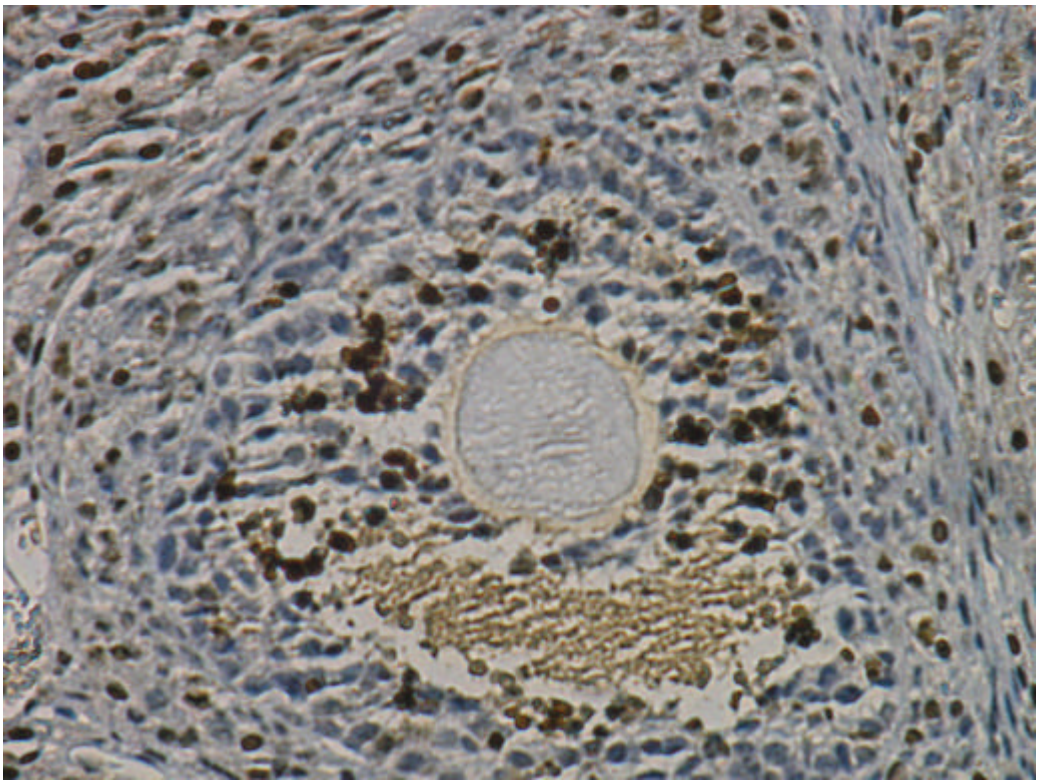
Resim 20. B grubuna ait overde kaspaz – preantral follikül x 40.



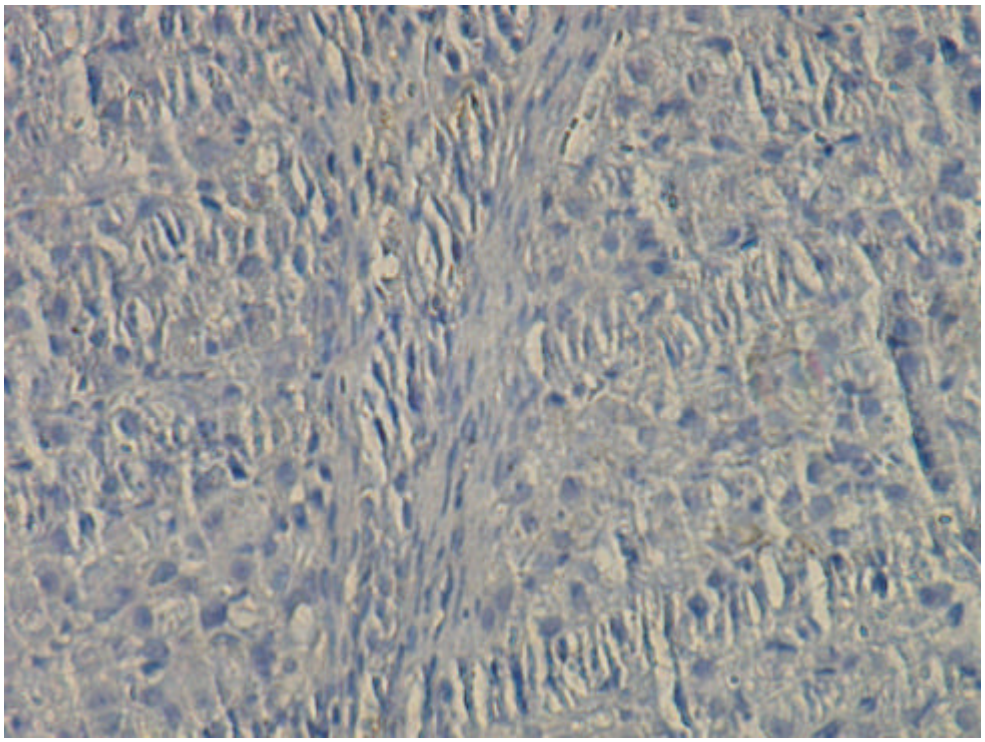
Resim 21. B grubuna ait bir overde kaspaz – teka hücreleri x40



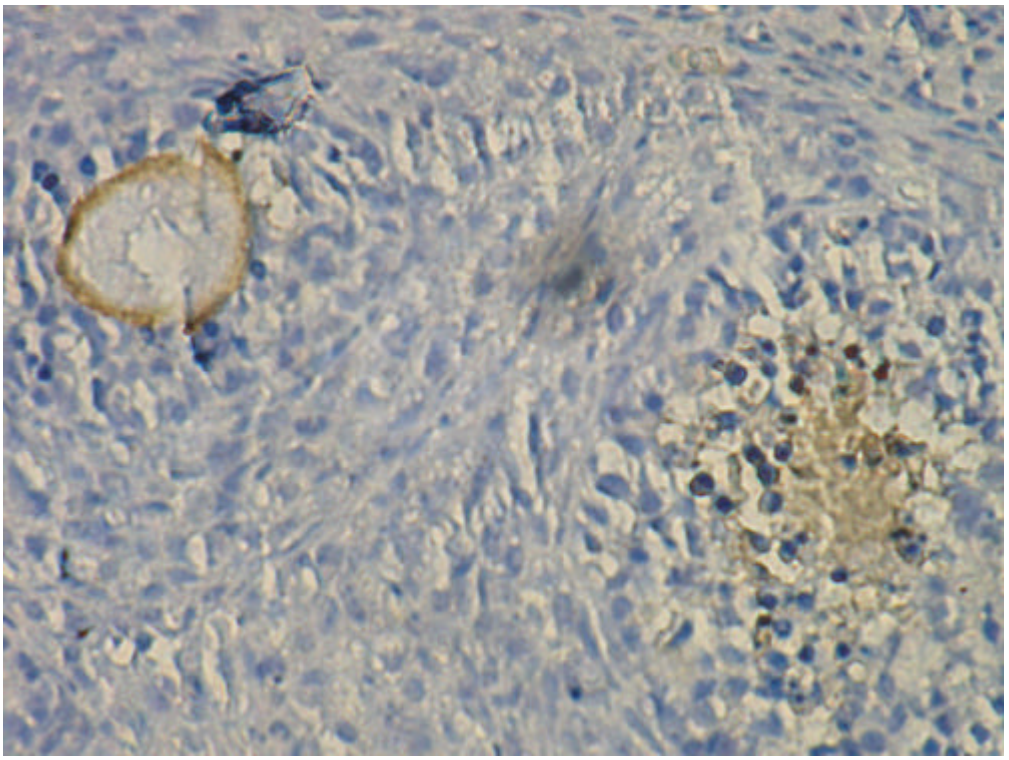
Resim 22. B grubu bir overde kaspaz + antral follikül ve kaspaz – primordiyal follikül x40



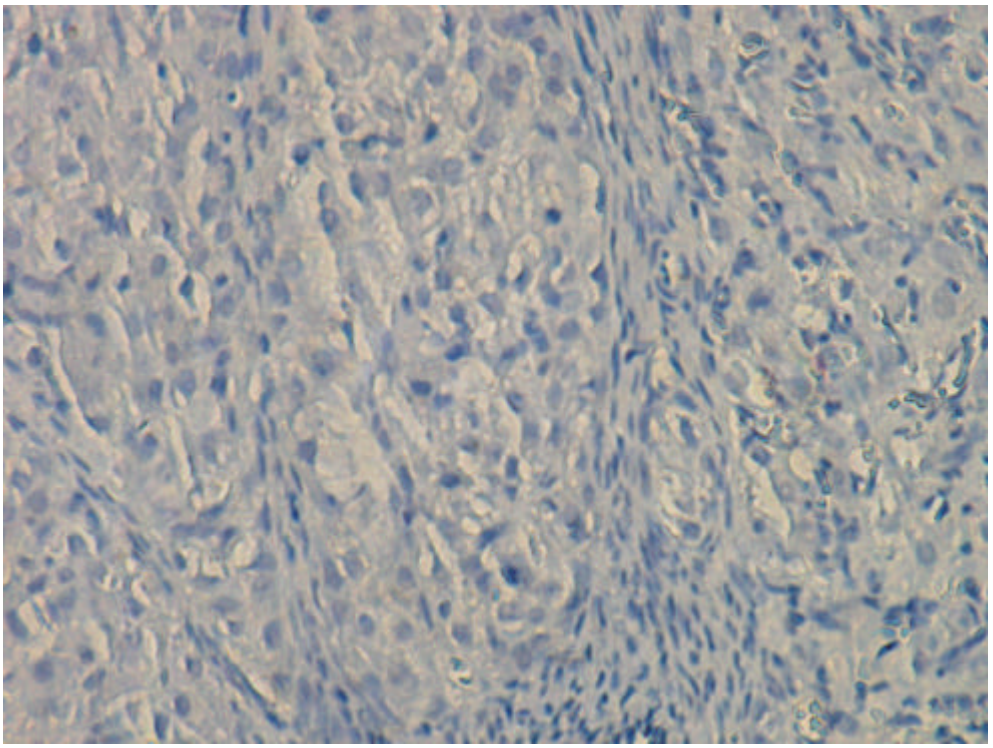
Resim 23. B grubuna ait bir overde kaspaz + ovum x40



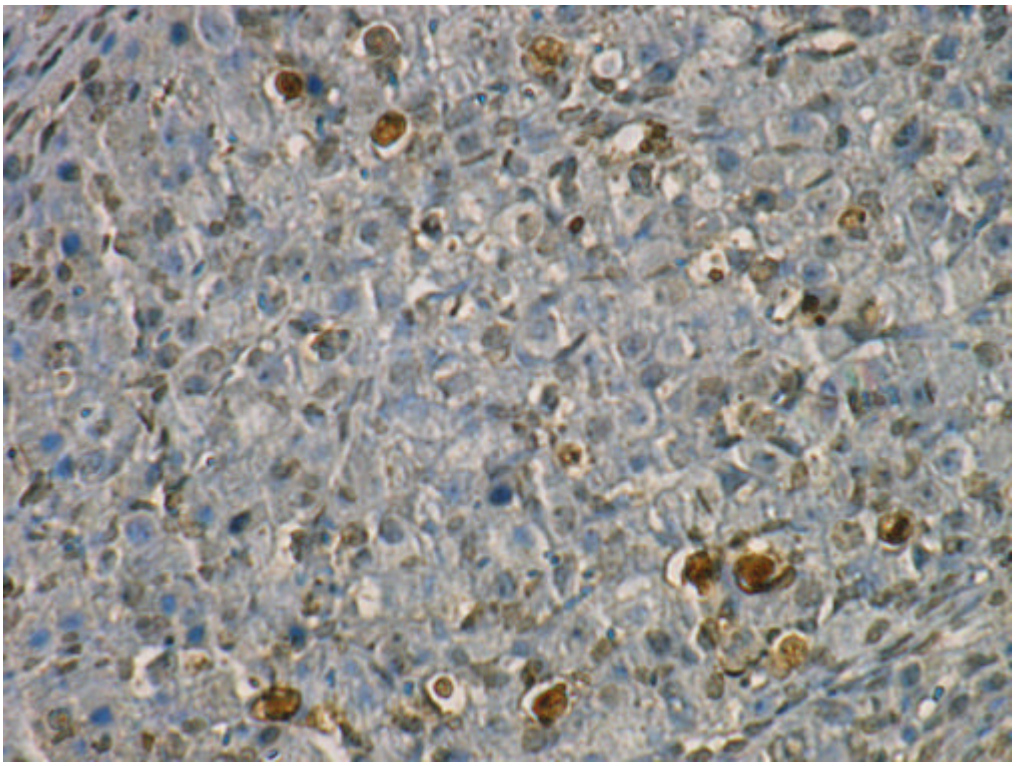
Resim 24. Kaspaz – kontrol x40



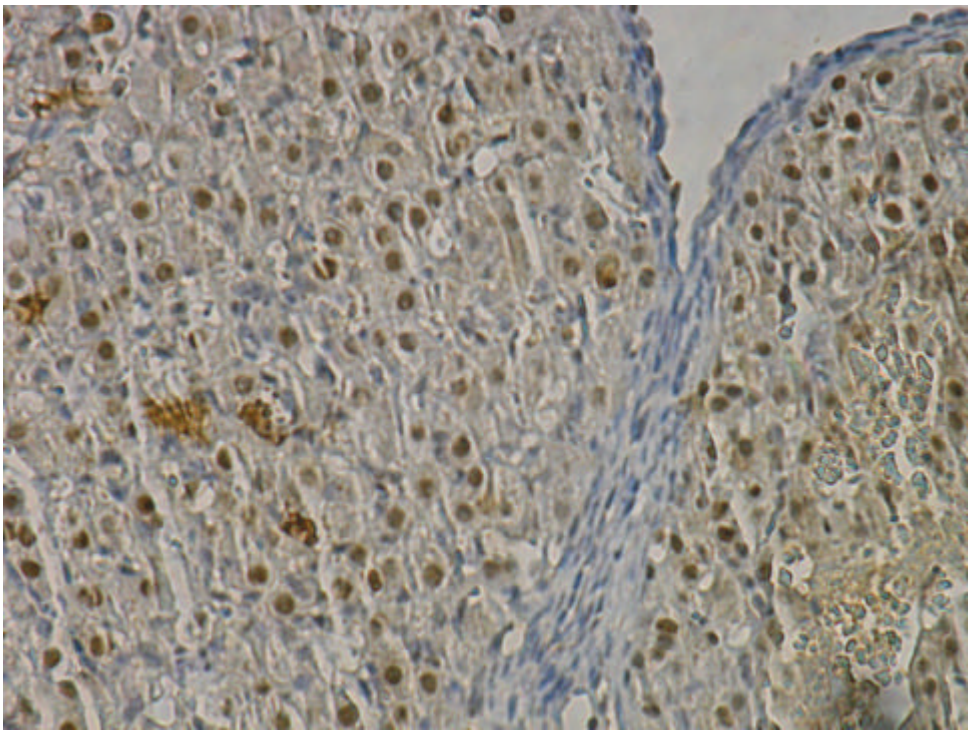
Resim 25. Kaspaz + lümen sivisi ve zona pellucida x40



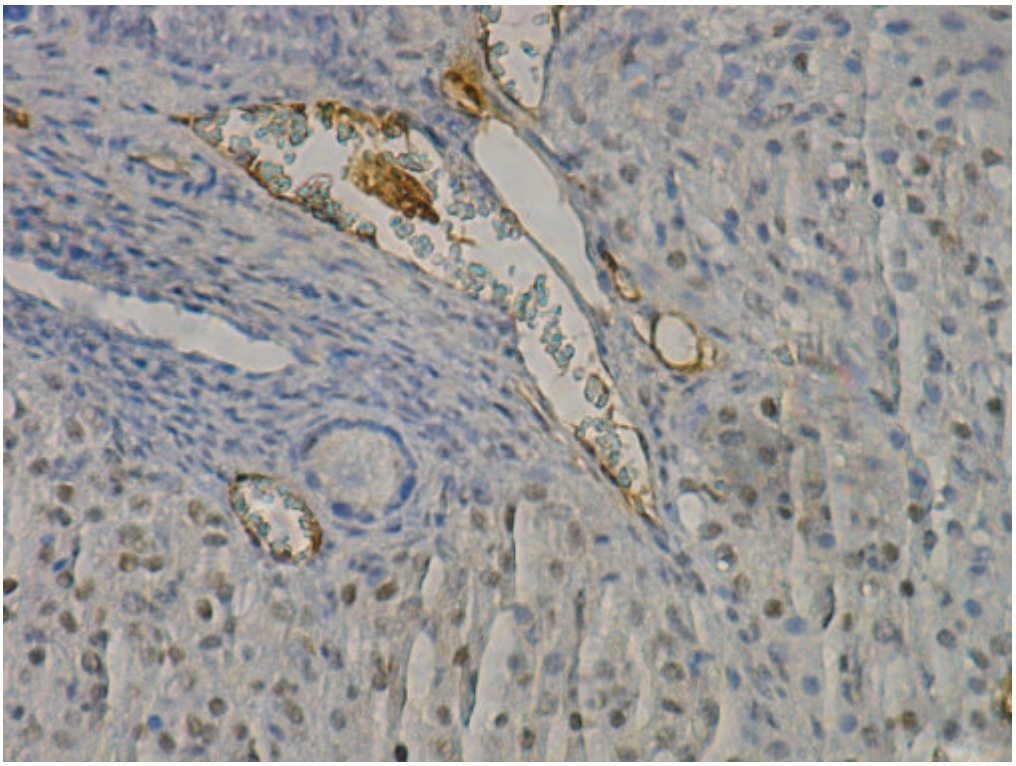
Resim 26. C grubuna ait bir overde kapsaz – boyanma x40.



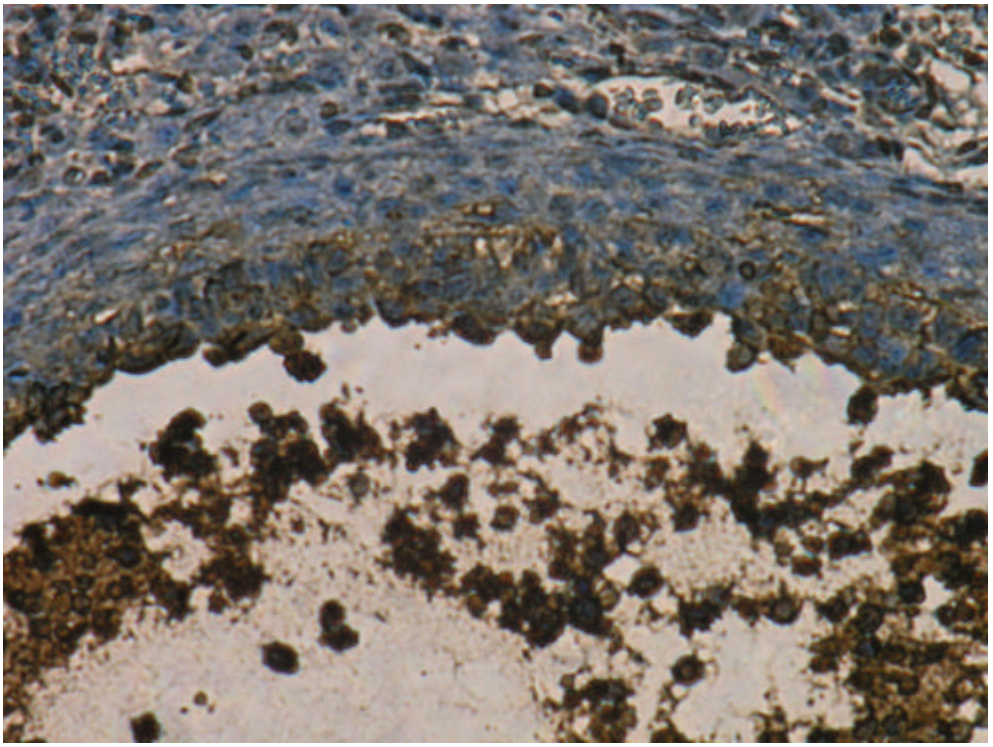
Resim 27. C grubuna ait bir overde TUNEL pozitifligi ve halo etkisi x40.



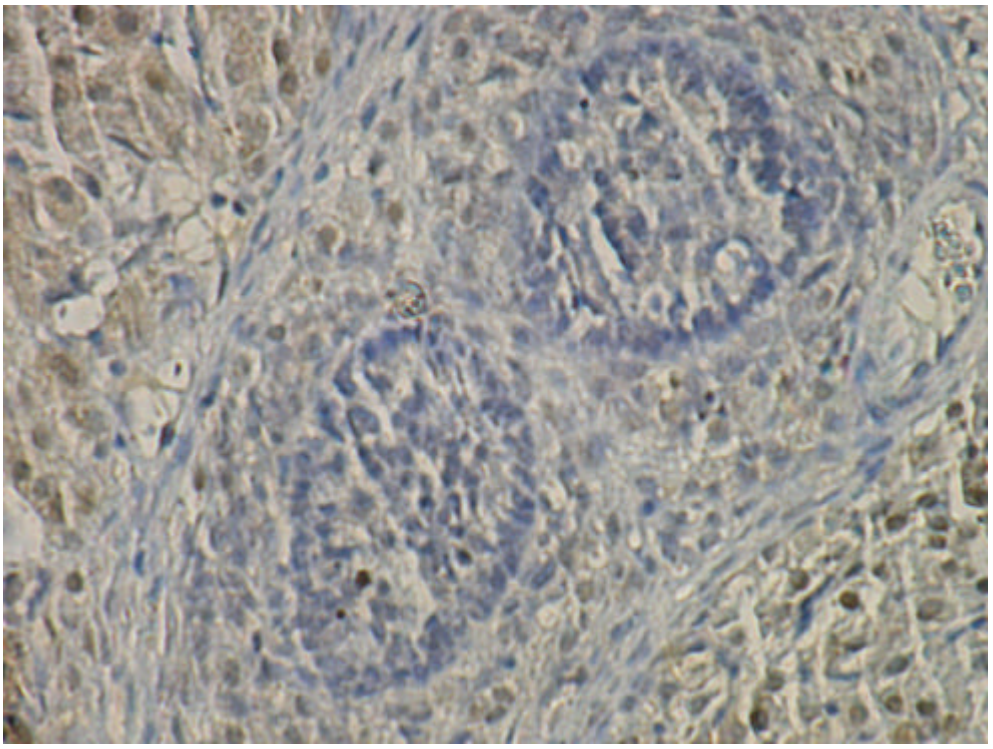
Resim 28. D grubuna ait bir overde kaspaz + korpus luteum hücreleri ve kaspaz – teka hücreleri x40.



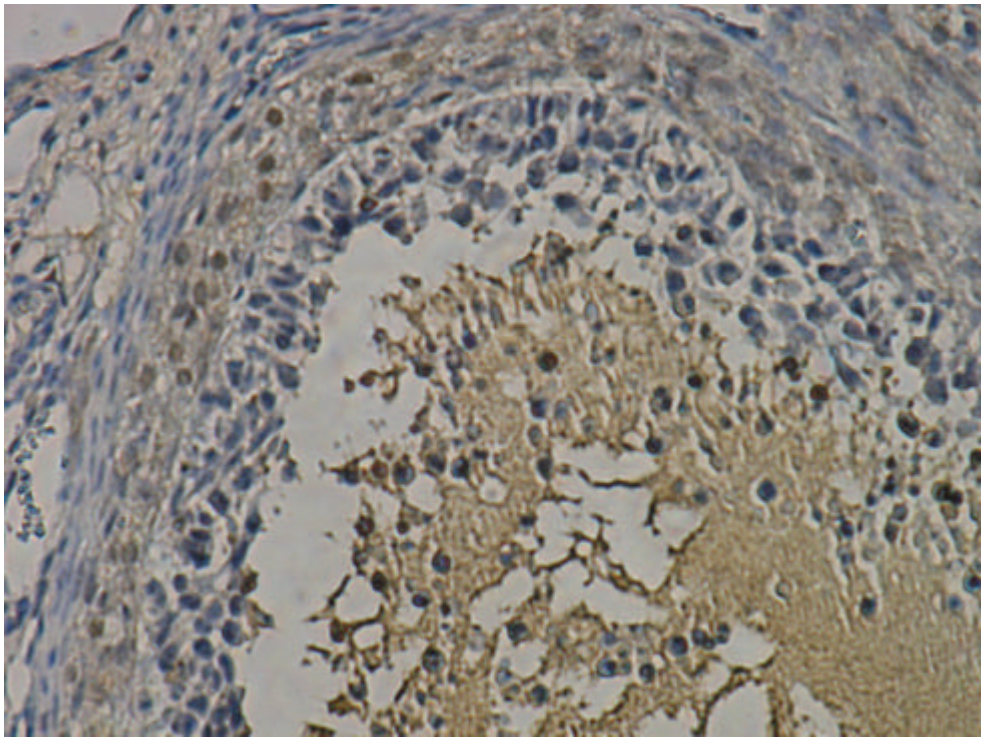
Resim 29. F grubuna ait bir overde kaspaz – primordiyal follikül x40.



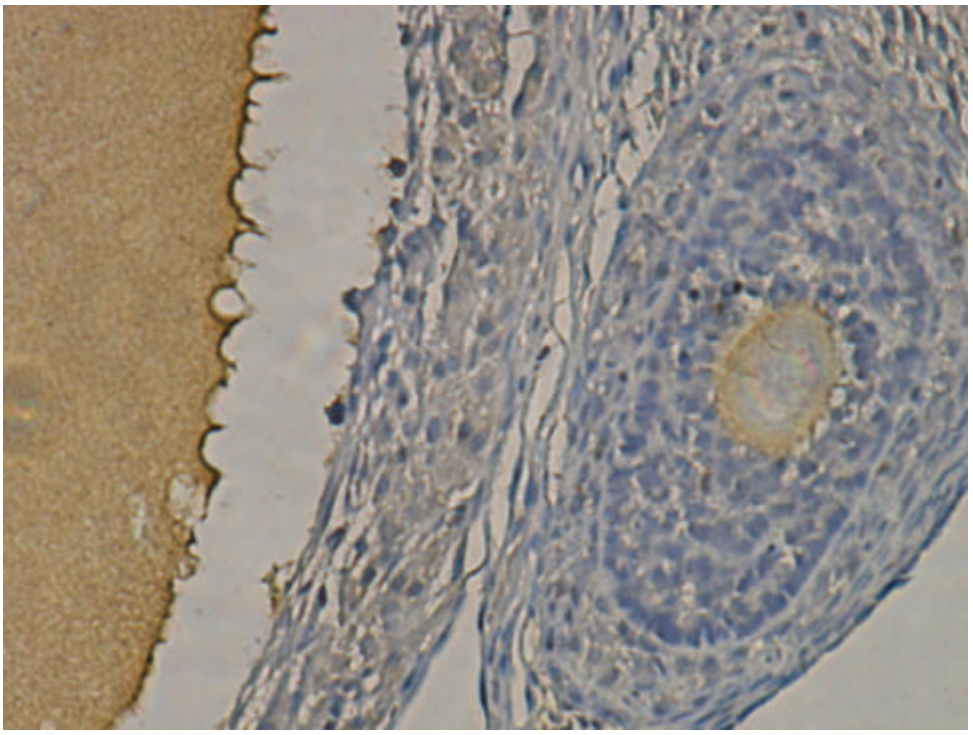
Resim 30. F grubuna ait bir overde TUNEL + antral follikül x40.



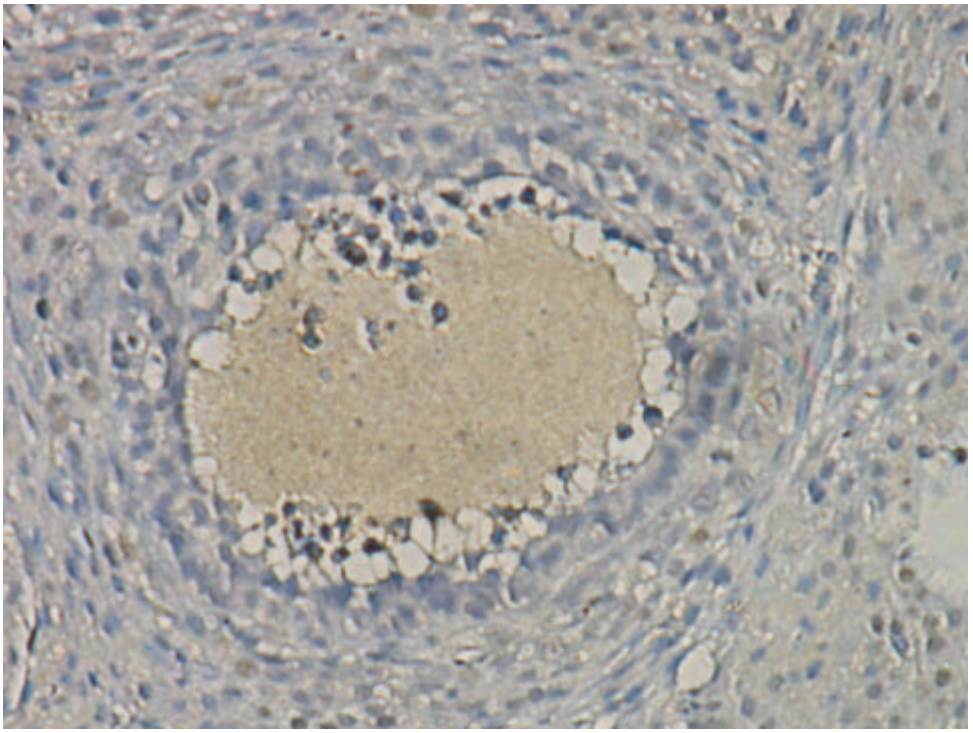
Resim 31. F grubuna ait bir overdeki folliküllerin kaspaz – görüntüsü x 40.



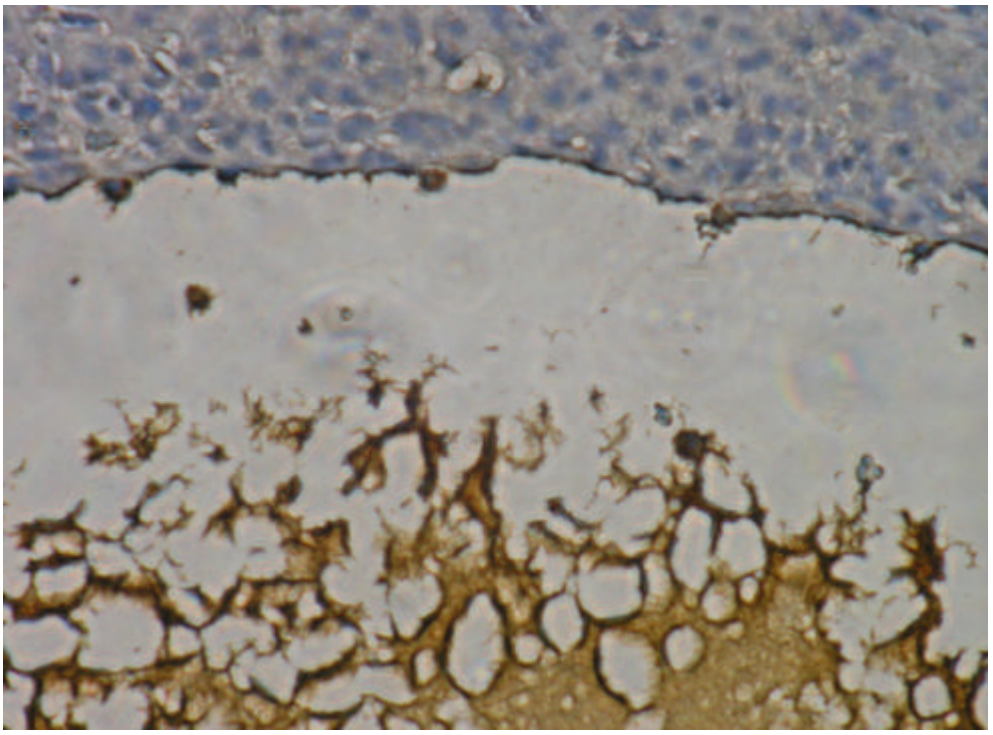
Resim 32**.** Resim 30’daki follikülün kaspaz – görüntüsü x40.



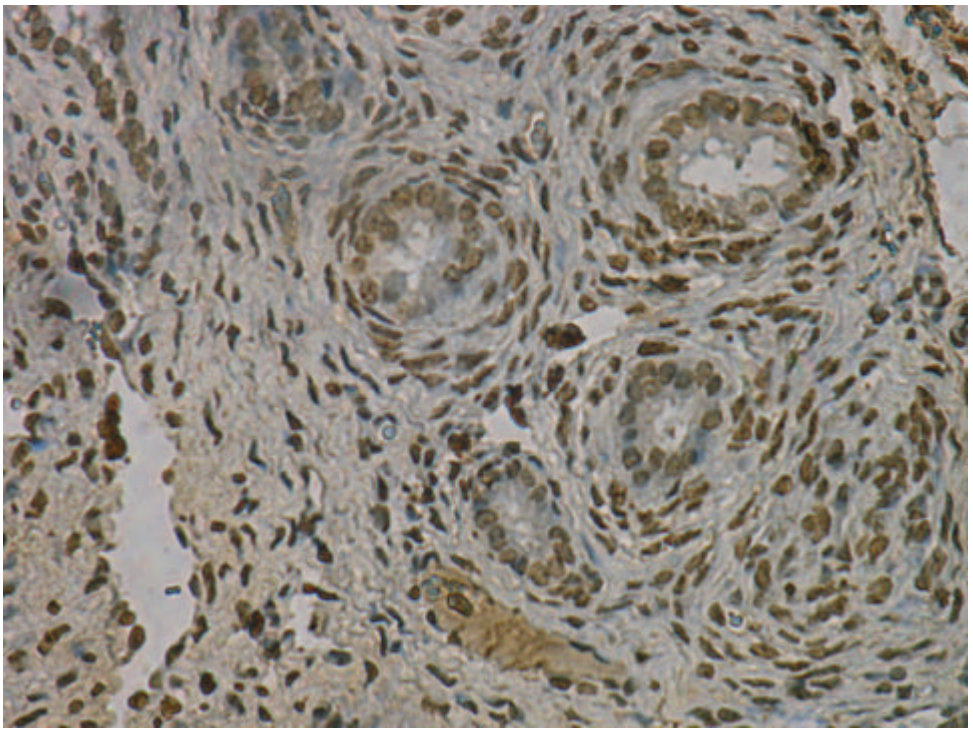
Resim 33. F grubuna ait bir overde kaspaz – antral follikül x40.



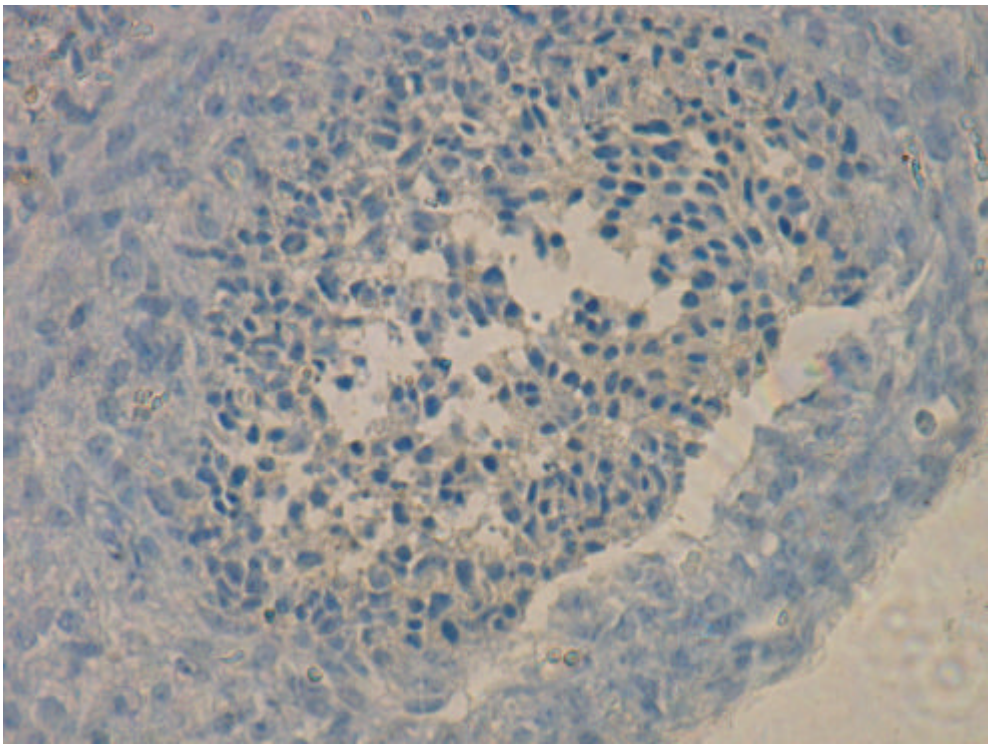
Resim 34. F grubuna ait bir overde morfolojik olarak apoptotik hücreler, fakat kaspaz – boyama x40.



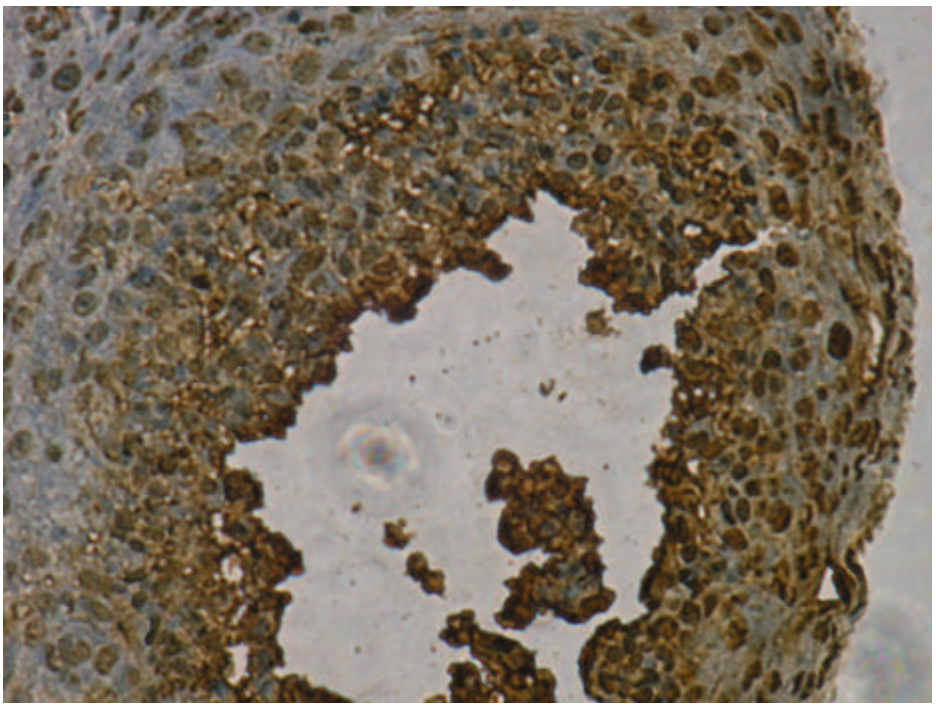
Resim 35. F grubuna ait overde daha büyük folliküllerde kaspaz + boyanma x40.



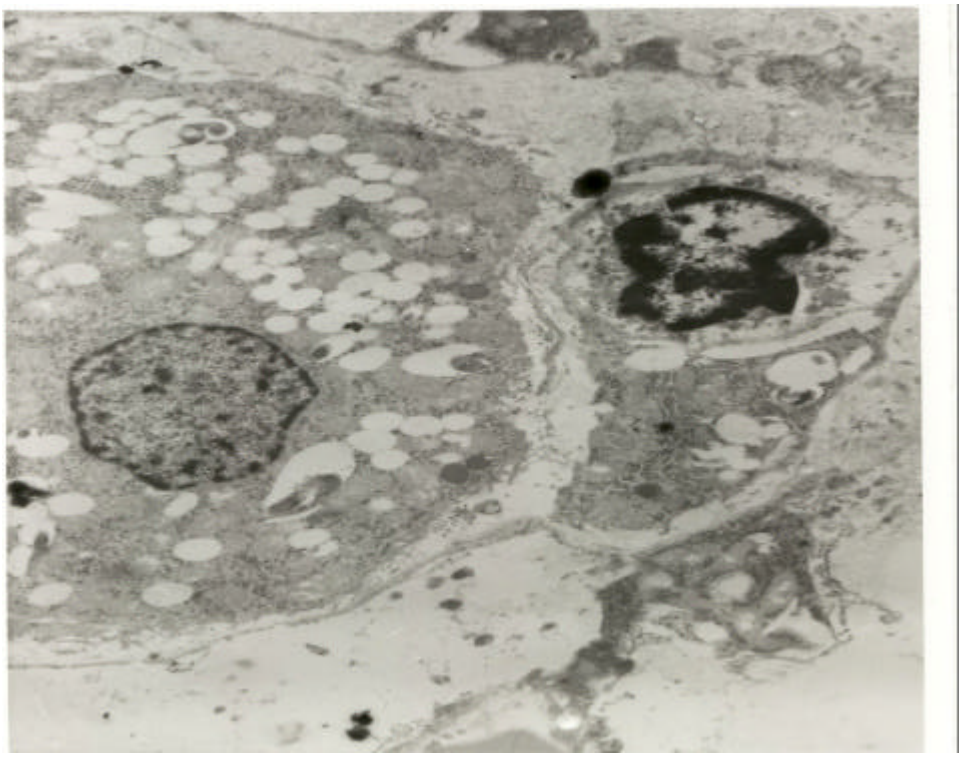
Resim 36. F grubuna ait bir overde %60-70 TUNEL + primordiyal folliküller x40.



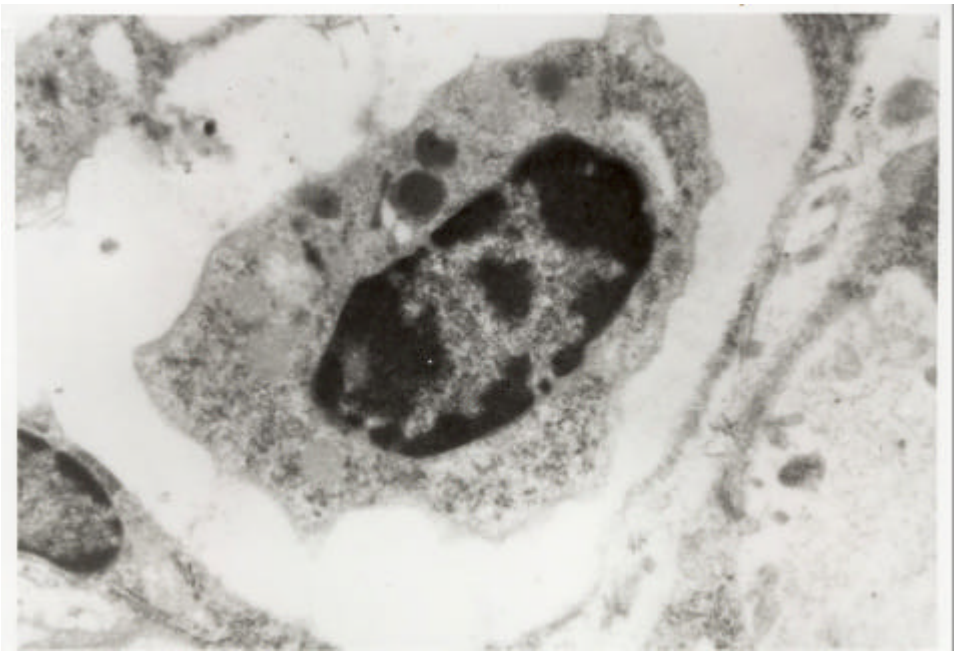
Resim 37. F grubuna ait bir overde TUNEL – kontrol x40.



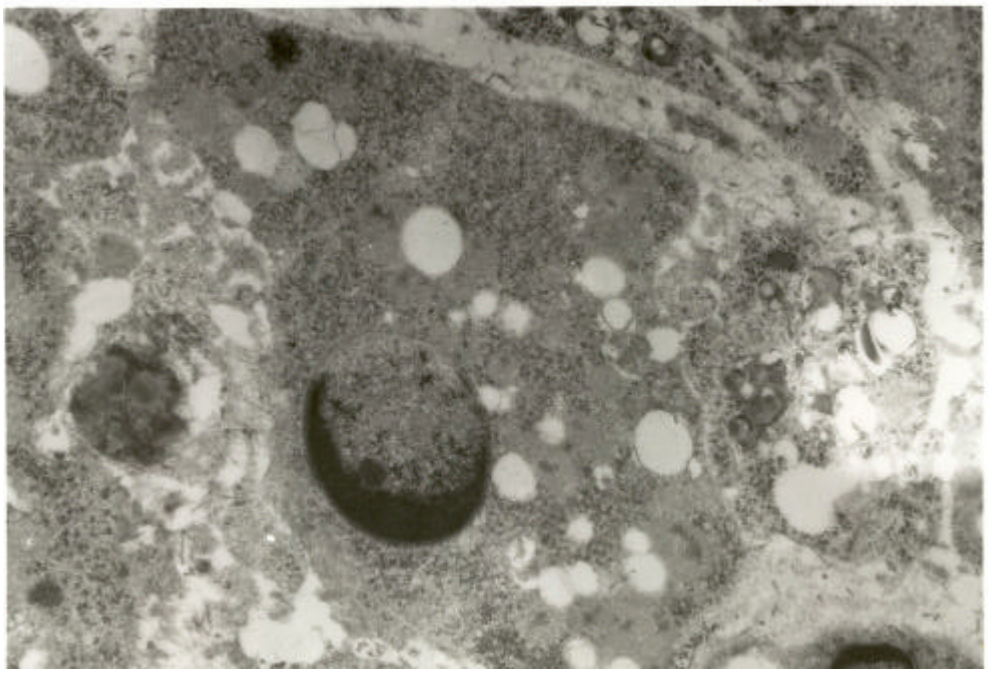
Resim 38. F grubuna ait bir overde TUNEL + follikül x40.



Resim 39. Elektron mikroskopisinde normal ve apoptotik hücre görüntüsü



Resim 40. Elektron mikroskopisinde apoptotik hücre halo görüntüsü.



Resim 41. Elektron mikroskopisinde apoptotik hücrde yarimay görüntüsü.

5. TARTISMA ve SONUÇ

Genç hastalarda malign hastaliklarin tedavisinin artmasi ile yasam beklentisi hayli artmistir. Eriskin nüfusun yaklasik 1/1000'ini çocukluk çaginda malign hastaliklar nedeniyle tedavi alanlar olusturmaktadir. Gelisen tedavi yöntemleri hastalarin yasam kalitelerini de artirarak hastaliktan kurtulmalarini saglamaktadir. Kanser tedavisi sonrasi sagkalim oranlarinin artip hastalarin eriskin yasa gelmeleri infertilite sorununu karsimiza çikarmaktadir (1) .

Kadin üreme sistemini kanser tedavilerinden korumak veya tedavi sonrasi reprodüktif yasamin devam edebilmesi için deneysel veya klinik pekçok çalisma yapilmistir (9,21,24,27,33-52).

GnRH analoglarinin ratlarda kullanildigi deneysel çalismalarda overleri kemoterapinin toksik etkisinden korudugu izlenmistir. GnRHa ile tedavi baslandiktan 13 gün sonra overde mitotik aktivite belirgin olarak azalmaktadir (24). Baska çalismalarda GnRH analoglarinin radyoterapinin yaptigi hasara karsi koruyucu olmadiklari, progesteronlarin bu durumda daha etkili olduklari gösterilmistir (21,27). Ayrica rat oositleri ve insan oositlerinin GnRHa'ya olan duyarliliklari da farklidir. Overdeki GnRHa reseptörleri insan ile benzer olan Rhesus maymunlari ile yapilan çalismada da GnRH analoglarinin kemoterapiden koruyucu olduklari gösterilmistir. GnRH analoglari preovulatuar asamadaki folliküllere baglanmamaktadir ayrica uzamis kemoterapi rejimlerinde etkisiz kalmaktadir (1).

Kemoterapötik ajanlar ve radyoterapi hücrede DNA, protein yapilar üzerinde toksik etkiler gösteririler. Kemoterapötiklerin vücutta olusan molekülleri karacigerde antioksidan sistemlere zarar verir (51). Radyasyon da dokulardaki su molekülleri ile etkileserek serbest oksijen radikallerini olusturur (52). Antioksidanlarin kullanildigi çalismalarda antioksidan ajan kullaniminin overlerdeki serbest oksijen radikali olusumunu azalttigi bunun da kemoterapi ve radyoterapi hasarindan koruyucu oldugu gösterilmistir.

IVF merkezlerinde 1983'ten bu yana embriyo krioprezervasyonu yapilarak reprodüktif potansiyel korunmaya çalisilmaktadir. Ancak bu yöntem evli veya tek partneri olanlara yapilabilir. Ayrica embriyonun canli kalabilirligi düsük olup bazen

siklusu tamamlayacak veya tekrarlayacak zaman olmayabilir. Tedavi sirasinda östrojen seviyelerinin artmasi meme ca veya baska östrojen duyarli malignitelerin alevlenmesine yol açabilir. Ayrica bazi yayinlarda ovulasyon indüksiyonuna sekonder over ca riskinin arttigi seklinde sonuçlar vardir (30,31). Hemen kemoretapi planlanmayan hastalara ovulasyon indüksiyonu ve embriyo kriopreservasyonu önerilebilir. Hastaliklarina ovulasyon indüksiyonun uzun dönemde etkileri net bilinmemektedir. Kronik hastaliklarda ovulasyon indüksiyonuna alinan cevap düsüktür. Ayrica hastanin transfer olmadan ölmesi veya durumunun kötülesmesi halinde embriyolara ne olacagi tartisma konusudur.

Oosit krioprezervasyonunun radyoterapi ve kemoterapi alanlarda ideal ve gerçekçi bir yöntem oldugu düsünülmüstür. Bu konuda ana problem oositlerin ömrü ve fertilite oranlarinin korunabilmesidir (34). Dondurulan insan oositlerinin ömrünü artirmak için pekçok farkli yaklasimlar denenmistir fakat hepsinin sonuçlari birbirinden farklidir. Ovulasyona ugramis oosit 2.mayoz bölünmenin metafaz safhasinda beklemektedir, isiya ve toksik ajanlara asiri duyarlidir (35). Trounson 1986'da oositin dondurulmasi ile ortaya çikabilecek problemleri ortaya koymustur. Hücre iskeletinin bozulmasi, kromozom ve DNA anomalileri, zona ve plazma membran geçirgenliginin bozulmasi bunlarda bazilaridir (36). Tüm bunlara ragmen farkli krioprotektif ajanlarin kullanimi ve zonanin by-pass edildigi ICSI ile giderek artan gebelik oranlari elde edilmektedir. Çok kullanisli olmamasi ve pekçok çalismada farkli sonuçlar elde edilmis olmasi nedeniyle rutin kullanilan bir yöntem degildir. Yayinlarda term gebelige ulasmis çok az vaka vardir. Basari orani <%2 olarak verilmektedir (33,34,37). Germinal vezikül dondurulmasi ile ilgili çalismalar da yapilarak nükleer matürasyon olmadan ve metafaz II asamasina gelmeden oositler dondurulmustur. Bu asamada sitogenetik hata riski daha az fakat membran daha duyarlidir. Oosit kültüründe uzun süre beklemesine bagli olarak zona hasari riski artabilir (38). Vitrifikasyon teknolojilerinin gelistirilmesi ile germinal vezikül krioprezervasyonu ve invitro matütrasyon tekniklerinin birlestirilmesi ile basari sansi artirilabilir (39).

Primordiyal ve primer follikülden zengin over korteks dokusunun dondurulmasi alternatif ve ilginç bir yöntem olarak karsimizda durmaktadir. Bu teori ile metafaz II asamasina gelmeden oosit over dokusunda germinal vezikül

asamasinda dondurulmaktadir. Dondurulmus-çözülmüs insan over dokusunda yüksek oranda canli follikül elde edilmesi prematür overyan yetmezlik riski altinda olan hastalarda fertilite korunmasi açisindan umut vericidir (40, 41,42).

Hayvan çalismalarinda fare over dokusun krioprezervasyonu ve transplantasyonu ile basarili sonuçlar alinmistir (43,44,45). Over doku yapisinin insana benzedigi koyunlarda yapilan çalismalar da olumlu sonuçlar vermektedir. Histolojik incelemede follikül kaybi belirgin olmakla beraber siklik over fonksiyonlari büyük oranda devam etmektedir.

Insan over doku krioprezervasyonu yakinlarda gelistirilmis bir yöntem olup birkaç merkezde yapilmaktadir. Genç kizlik veya eriskinlik döneminde kanser tanisi almis hastalarda over fonksiyonlarini ve dogal fertiliteyi korumak amaçli uygulanabilir. Prematür over yetmezlik riski olan tüm kadinlarda uygulanabilir. Menstrüel siklusun herhangi bir döneminde tek tarafli ooforektomi veya over korteks biyopsisi yapilabilir. Over korteksi stromadan ayrilir,çesitli solüsyonlara tabii tutulduktan sonra krioprezervasyon yapilabilir.

Over doku transplantasyonu da sinirli birkaç yöntemden biridir. Bu yöntemlerden birisi dondurulmus over dokusu daha sonraki bir tarihte ayni yere transplantasyonudur (46). Baska bir yöntem ise baska bir yere transplantasyonudur (47). Ototranplantasyon over dokusunun malign potansiyel tasiyor olma riskinden dolayi tehlikelidir. Baska bir yöntemde dondurulmus over dokusundan elde edilen küçük folliküllerin invitro matürasyona yönlendirilmesidir (48).

Over dokusunun xenogreft yapilmasi da denenmistir. Immün süprese farelere insan over dokusu transplante edilmistir. Reperfüzyon sürecinde olusan hipoksisin belirgin follikül hasarina yol açtigi gösterilmistir (49). Ayni sekilde farede rFSH ile ovulasyon indüksiyonu ve invitromatürasyon ile matür oosit elde edilen çalismalar da vardir (50).

Tüm gelisme ve çalismalara ragmen over korteks tranplantasyonunda optimal sartlar saglanamamistir. Uzun dönem basarisi follikül sayisina, sürvisine, gelisme ve ovulasyon yetenegine baglidir.

Bugüne kadar kanser tedavilerinin kadin üreme sistemi üzerine olan etkilerinin önlenmesi ile ilgili pekçok çalisma yapilmistir. Son yillarda radyoterapi ve kemoterapinin over üzerine olan etkisinde apoptotik mekanizmalarin gösterilmesi ile

dikkatler apoptozis önleyici yöntemlere çevrilmistir. Bu konuda yapilan bir çalismada farelerde sfingozin-1- fosfatin invivo kullaniminin overde radyoterapinin neden oldugu hasara karsi korudugu gösterilmistir. Bu çalismada over doku morfolojisi ve atretik olmayan oosit içeren folliküller sayilarak koruyuculuk gösterilmistir. Çalismada radyoterapiden 2 saat önce over etrafina S1P verilen ve sadece radyoterapi verilen fare overleri ile kontrol grubu farelerin overleri karsilastirilmistir. Radyoterapi alan gruba göre radyoterapi ve S1P grubunda daha fazla primordiyal, primer ve preantral follikül sayilarina rastlanmistir. Ayni çalismanin devami olarak radyoterapi alan ve radyoterapi ile S1P verilen farelerin oositleri alinarak invitrofertilizasyon yapilarak embriyo gelisimi incelenmistir. Iki hücreli embriyo gelisiminde kontrol grubu ile radyoterapi öncesi S1P ile tedavi edilen farelerin embriyolari arasinda fark izlenmezken, blastokist asamasinda S1P grubunda kaliteli blastokist orani daha fazla izlenmistir (9).

Ayni çalismanin diger bir ayaginda asit sfingomyelinazin inhibe edildigi farelerin oositlerinin invitro ortamda doxurobisinin neden oldugu hasardan korundugu gösterilmistir (9). Bizim çalismamizda farkli olarak over dokusunda üç farkli yöntem ile apoptozis bakildi. Ayni çalismada üç farkli üç farkli yöntem ile apoptozisin arastirildigi baska çalismaya rastlanmadi.

Apoptoziste pekçok genetik faktörün rol oynadiginin gösterilmesi genetik düzenlemelerin apoptozisi önleyebilecegini düsündürmüstür. Genetik faktörlerin degistirilerek dogal menopozun geciktirilebilmesi ve radyoterapi ve kemoterapinin neden oldugu prematür menopozun önlenebilecegi deneysel çalismalarla gösterilmeye çalisilmistir (54). Bcl-2 geninin apoptozise karsi koruyucu oldugu (55,56), bax geninin ise apoptozis indükleyici oldugu gösterilmistir. Bax geninin artmis expresyonunun insan, rat, sigir ve tavsan overinde granüloza hücrelerinde apoptozisi artirdigi gösterilmistir (57,58,59,60). Farelerde bax geni hasarlanmis mutantlarda spontan primordiyal ve primer folliküllerde hasarin önlendigi, Bcl-2 eksik mutant farelerde ise follikül havuzunda daha az sayida follikül oldugu gösterilmistir (61,62,63).

Bax geni hasarli farelerde doxurobisinin invivo ve invitro ortamda neden oldugu apoptozisin önlendigi gösterilmistir (64).

Genetik degisikliklerle apoptozise karsi koruma saglandigi invivo ve invitro hayvan çalismalarinda gösterilmis olsa da insanda genetik tedaviyi saglayacak teknoloji henüz yeterli degildir.

Over dokusunu kanser kemoterapisinin neden oldugu hasardan koruyan antioksidanlardan olan glutatyon ile yapilan çalismada siklofosfamid ile tedavi edilen farelere glutatyon sentezini inhibe eden bütionin sülfoksimin (BSO) verildiginde, siklofosfamidin neden oldugu apoptozisin daha fazla oldugu görülmüstür. Özellikle antral folliküllerde BSO verilmesinin apoptozisi histolojik olarak artiridigi fakat TUNEL yöntemi ile bu artisin olmadigi gösterilmistir. Primer folliküllerde ise bu degisiklik izlenmemektedir. Siklofosfamid ile birlikte BSO kullanilan farelerde over dokusunda glutatyon düzeyleri sadece siklofosfamid verilen gruba göre daha fazla azalmaktadir. Glutatyon seviyesinin azalmasi apoptozis oranini artiriyor gibi görünmektedir (65).

Baska bir çalismada kaspaz-2 eksikligi olan mutant farelerin ayni cins vahsi disi farelere göre over dokularinda daha fazla sayida primordiyal follikül oldugu gösterilmistir (66).

Perez ve arkadaslarinin çalismalarinda ise invitro ortamda bir kemoterapötik ajan olan doxurobisinin neden oldugu oosit apoptozisinin genel bir apoptozis inhibitörü olan ZVAD-FMK (Benzyloxycarbonyl-VAl-Ala-Asp-fluoromethylketone) ile inhibe edildigi gösterilmistir (65).

Bizim çalismamizda over dokusunda radyoterapi ve kemoterapinin neden oldugu apoptozisi önlemede bir antiapoptotik ajan olan S1P'in etkinligi arastirildi. Bu amaçla hücre ölümü apoptozise özgü DNA kiriklarinin taninmasini saglayan bir yöntem olan TUNEL ve ayrica yine apoptozise özgü bir markir olan aktif kaspaz 3'ün immünhistokimyasal olarak ortaya konulmasi kullanildi. Ayrica elektron mikroksopi incelemeleri ile apoptotik hücre ölümüne özgü bulgular degerlendirildi.

Kontrol grubuna sadece equine koryonik gonadotropin (eCG) verilerek folliküller stimüle edildi. Bu gruptaki overlerin incelenmesi sonucunda preantral folliküllerde aktif kaspaz 3 ve TUNEL yöntemi ile % 5 oraninda apoptozis izlendi. Antral folliküllerde TUNEL ile %10, aktif kaspaz 3 ile %20 apoptotik follikül izlendi. Primordiyal folliküllerde ise TUNEL ile %20, aktif kaspaz 3 ile %70 apoptozis görüldü. Bu bulgu insanda ovulasyon indüksiyonu sirasinda ovaryan

hiperstimülasyon riskinin fazla oldugu vakalarda hCG yapiminin bir gün veya iki gün geciktirilmesiyle yapilan oosit aspirasyonuyla elde edilen oositlerdeki dejenerasyon orani artisi ve fekundasyon orani düsüsü bulgulariyla da örtüsmektedir. Bu sonuçlar ile over dokusunda follikül gelisiminin her asamasinda apoptozisin rolü oldugu düsünüldü.

Kemoterapi verdigimiz grupta preantral folliküllerde TUNEL ve aktif kaspaz 3 ile %5 oraninda apoptozis oldugu izlenirken,antral folliküllerde TUNEL ile %10, aktif kaspaz 3 ile %30 oraninda apoptozis izlendi. Primordiyal folliküllerde ise TUNEL ile %40, aktif kaspaz 3 ile %90 oraninda apoptozis izlendi.

Kemoterapi öncesi S1P verdigimiz over dokularinda apoptozis orani preantral follikül asamasinda TUNEL yöntemi ile %5 , aktif kaspaz-3 ile %5, antral follikül asamasinda TUNEL ile %10 ,aktif kaspaz-3 ile %30 , primordiyal folliküllerde TUNEL ile %40 ve aktif kaspaz-3 ile %90 oraninda apoptozis izlendi. Bu sonuçlara bakilarak S1P'in siklofosfamidin neden oldugu apoptozise karsi korumadigi düsünüldü. Buradan hareketle hücre içinde apoptozise yol açan farkli yollardan kemoterapinin neden oldugu apoptotik yol ile S1P'in engelledigi apoptotik yolun farkli mekanizma ve yollar oldugu kuvvetle muhtemeldir. Bu bulgu ve düsünce yapilan literatür arastirmasina göre ilk kez bu çalisma ile ortaya konmustur.

Kemoterapi ve bir overin bursasina S1P verdigimiz grubun karsi over dokusunun incelenmesi ile preantral folliküllerde TUNEL yöntemi ile %30, aktif kaspaz 3 ile %1, antral folliküllerde TUNEL yöntemi ile %35, aktif kaspaz 3 ile %1-5, primordiyal folliküllerde TUNEL yöntemi ile %40, aktif kaspaz 3 ile %75-80 oraninda apoptozis izlendi. Burada S1P verilen over tarafi ile verilmeyen overde apoptotik oranda farklilik bulunmadi.

Radyoterapi grubunda preantral folliküllerde TUNEL ile %5 ve Kaspaz-3 ile %5, antral folliküllerde ise TUNEL ile %10-20 ve Kaspaz-3 ile %40-50, primordiyal folliküllerde TUNEL ile %60 ve Kaspaz-3 ile %90 oraninda + hücre gösterilmistir. Morita ve ark. çalismasinda apoptozise bakilmayip sadece primordiyal, preantral ve antral follikül sayisi, over agirliklari ve oosit fekundasyon oranlarina bakilmistir.

Radyoterapi öncesinde S1P verdgimiz grupta preantral folliküllerde TUNEL ile %5 ve Kaspaz-3 ile %2, antral folliküllerde ise TUNEL ile %15 ve Kaspaz-3 ile %5, primordiyal folliküllerde TUNEL ile %30-40 ve Kaspaz-3 ile %50 oraninda +

hücre gösterilmistir. Bu sonuçlar S1P'in radyoterapinin neden oldugu apoptozise karsi özellikle primordiyal folliküllerde olmak üzere önledigi söylenebilir.

Radyoterapi ve S1P verdigimiz grubun karsi overlerinde ise preantral folliküllerde TUNEL ile %10 ve Kaspaz-3 ile %1, antral folliküllerde ise TUNEL ile %20 ve Kaspaz-3 ile %2, primordial folliküllerde TUNEL ile %25 ve Kaspaz-3 ile %75 oraninda + hücre gösterilmistir. Bu sonuçlar ise karsi overde özellikle antral folliküllerde S1P'in koruma sagladigi görülmektedir. Bunun da peritoneal yayilimla veya kan yoluyla olabilecegi düsünülmüstür.

Bu çalismada:

1) Kemoterapi ve radyoterapi ile rat overinde primordiyal, preantral ve antral folliküllerde olusan apoptozis üç farkli yöntem ile (TUNEL, aktif kaspaz-3 ve elektron mikroskopisi bulgulari) arastirilmistir.

2) Ortaya çikan apoptozisin S1P lokal uygulamasi ile etkilenmesi arastirildi. Bu etki hem uygulanan overde hem de karsi overde arastirildi.

Ortaya çikan bulgular :

1) Apoptotik sürecin kemoterapi ve radyoterapi olmaksizin da primordiyal, preantral ve antral folliküllerde varligi,

2) Kemoterapinin preantral ve antral folliküllerde apoptoziste artis saglamadigi ama primordiyal folliküllerde belirgin apoptotik artis yaptigi,

3) S1P uygulamasinin kemoterapi ile olusan apoptoziste etkili olmadigi ve apoptozisi engellemedigi ,

4) Radyoterapi uygulamasinin hem spontan apoptozisten hem de kemoterapinin neden oldugu apoptozisten daha fazla oranda apoptozise neden oldugu,

5) Radyoterapiden önce S1P uygulamasinin belirgin olarak apoptozisi engelledigi ve bu etkinin kismen de olsa karsi overde de oldugu gösterildi.

Bu çalismada; rat overinde spontan, kemoterapi ve radyoterapi ile olusan apoptozis TUNEL, aktif kaspaz 3 ve elektron mikroskopisi ile ilk kez çalisilmis ve S1P'in etkinligi ilk kez arastirilmistir. S1P'in siklofosfamid ile olusan apoptozisi engellemedigi ve S1P'in apoptozisi engelleme yolu ile siklofosfamidin olusturdugu apoptotik sürecin farkli mekanizmalarla olustugu ilk kez öne sürülmüstür. S1P'in

radyoterapinin overde primordiyal, preantral ve antral folliküllerde olusturdugu apoptozisi belirgin oranda engelledigi ilk kez ortaya konmus ve radyoterapi ile olusan apoptotik mekanizma ile S1P'in antiapoptotik etkisinin ayni yol ile olabilecegi vurgulanmistir.

Sfingozin -1- fosfatin antiapoptotik etkisinin arastirildigi yeni experimental ve insan çalismalarina gereksinim vardir

ÖZET

Ratlarda 0vulasyon indüksiyonunu takiben spontan, siklofosfamid ve radyoterapi etkisiyle olusan apoptozis ve sfingozin-1-fosfatin siklofosfamid ve radyoterapi ile olusan apoptozis üzerine etkisi.

Genç hastalarda malign hastaliklarin tedavisinin artmasi ile yasam beklentisi hayli artmistir. Kadin üreme sistemini kanser tedavilerinden korumak veya tedavi sonrasi reprodüktif yasamin devam edebilmesi için deneysel veya klinik pekçok çalisma yapilmistir.

Bu çalismada kemoterapi ve radyoterapi ile rat overinde primordiyal, preantral ve antral folliküllerde olusan apoptozis üç farkli yöntem ile (TUNEL, aktif kaspaz-3 ve elektron mikroskopisi bulgulari) arastirilmistir. Ortaya çikan apoptozisin S1P lokal uygulamasi ile etkilenmesi arastirildi.

S1P'in siklofosfamid ile olusan apoptozisi engellemedigi görülmüstür. S1P'in radyoterapinin overde primordiyal, preantral ve antral folliküllerde olusturdugu apoptozisi belirgin oranda engelledigi görülmüstür.

Sfingozin -1- fosfatin antiapoptotik etkisinin arastirildigi yeni experimental ve insan çalismalarina gereksinim vardir.

Anahtar kelimeler: Kemoterapi, ovaryan apoptozis, radyoterapi, sfingozin-1-fosfat.

SUMMARY

Spontaneous, cyclophosphamide and radiotherapy induced apoptosis following ovulation induction and the effects of sphingosine-1-phosphate on cyclophosphamide and radiotherapy induced apoptosis, in rats.

With the increasing of treatment of malign diseases among the young patients, life expectation has increased. To prevent woman reproductive system from cancer teratment or to continue the reproductive life after the treatment, many experimental and clinical studies were carried out.

In this study with chemotherapy and radiotherapy induced apoptosis in primordial, preantal and antral follicules in rat ovary was searched in three different methods.

It was seen that S1P cannot hinder the apoptosis which induced cyclophosphamide. It was seen that S1P hinders radiotherapy induced apoptosis in primordial, preantral and antral follicules.

There is a need for new experimental and human studies in which S1P's antiapoptotic effects are searched.

Key words: chemotherapy, ovarian apoptosis, radiotherapy, sphingosine-1-phosphate.

KAYNAKLAR

1. Revel A,Laufer N. Protecting female fertility from cancer therapy. Mol. and Cell. Endocr.187:83-91,2002
2. Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Hum. Reprod. Update. 7(6):535-543,2004
3. Suomalainen L.Regulation of male germ cell apoptosis by sphingosine-1-phosphate. Program for developmental and reproductive biology Biomedicum. Helsinki. November, 2004
4. Tilly JL. The molecular basis of ovarian cell death during germ cell attrition,follicular atresia and luteolysis. Front Biosci. 1: d1-d11, 1996
5. Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. Rev. Reprod.1:162-172,1996
6. Falcone T,Attaran M,Bedaiwy MA, Goldberg MJ. Fertil. Steril.81(2):243-257,2004
7. Tilly JL, Kolesnick RN. Sphingolipids, apoptosis, cancer treatments and the ovary: investigating a crime against female fertility. Biochim. Biophsica Acta. 1585:135-138,2002
8. Timothy H.Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. Farm. Res. 47:401-407,2003
9. Morita Y,Perez GI, Paris F,Miranda SR,Ehleiter D,Haimovitz-Friedman A, Fuks Z,Xie Z,Reed JC,Schuchman EH,Kolesnick RN,Tilly JL.Oocyte apoptosis is supressed by disruption of the acid sphingomyelinase gene or by sphingosine-1-phosphate therapy. Nat.Med.6:1109-1114,2000.
10. Seftalioglu A. Kadin üreme organlari embriyoloji ve histolojisi. Kisnisçi HA.Temel Kadin Hastaliklari ve Dogum Bilgisi. Ankara: Günes Kitabevi 24-70,1996.
11. Bükülmez O,Arici A. Over fizyolojisi. Kisnisçi HA.Temel Kadin Hastaliklari ve Dogum Bilgisi. Ankara: Günes Kitabevi.1129-1145,1996.
12. Gougeon A.Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. Endocr. Rev.17:121-155, 1996

13. Markstrom E,Svensson EC,Shao R,Svanberg B,Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis - dependence on follicle differentiation. Reprod.123:23-30,2002
14. Johnson AL. Caspase mediated apoptosis in the vertebrate ovary. Reprod.124:19-27,2002
15. Morita Y, Tilly JL. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. Dev Biol. 1999 Sep 1;213(1):1-17.
16. Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FI. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. N Engl J Med. 1973 Nov 29;289(22):1159-62.
17. Goldhirsch A, Gelber RD, Castiglione M. The magnitude of endocrine effects of adjuvant chemotherapy for premenopausal breast cancer patients. The International Breast Cancer Study Group. Ann Oncol. 1990;1(3):183-8.
18. Koyama H, Wada T, Nishizawa Y, Iwanaga T, Aoki Y. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. Cancer. 1977 Apr;39(4):1403-9.
19. Bines J, Oleske DM, Cobleigh MA. Ovarian function in premenopausal women treated with adjuvant chemotherapy for breast cancer. J Clin Oncol. 1996 May;14(5):1718-29.
20. Meirow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. Hum Reprod. 1999 Jul;14(7):1903-7.
21. Montz FJ, Wolff AJ, Gambone JC. Gonadal protection and fecundity rates in cyclophosphamide-treated rats. Cancer Res. 1991 Apr 15;51(8):2124-6.
22. Metindir J, Bozkurt J. Kanser Tedavilerinin Over Fonksiyonlarina Etkisi ve Fertilite Koruyucu Yaklasimlar. J Turkish German Gynecol Assoc.2005; 6 (1):23-29
23. Schover LR. Psychosocial aspects of infertility and decisions about reproduction in young cancer survivors: a review. Med Pediatr Oncol. 1999 Jul;33(1):53-9.
24. Ataya K, Moghissi K. Chemotherapy-induced premature ovarian failure: mechanisms and prevention. Steroids. 1989 Dec;54(6):607-26.

25. Ataya K, Ramahi-Ataya A. Reproductive performance of female rats treated with cyclophosphamide and/or LHRH agonist. Reprod Toxicol. 1993 May-Jun;7(3):229-35.
26. Bokser L, Szende B, Schally AV. Protective effects of D-Trp6-luteinising hormone-releasing hormone microcapsules against cyclophosphamide-induced gonadotoxicity in female rats. Br J Cancer. 1990 Jun;61(6):861-5
27. Jarrell JF, McMahon A, Barr RD, YoungLai EV. The agonist (d-leu-6,des-gly-10)-LHRH-ethylamide does not protect the fecundity of rats exposed to high dose unilateral ovarian irradiation. Reprod Toxicol. 1991;5(4):385-8.
28. Waxman JH, Ahmed R, Smith D, Wrigley PF, Gregory W, Shalet S, Crowther D, Rees LH, Besser GM, Malpas JS. Failure to preserve fertility in patients with Hodgkin's disease. Cancer Chemother Pharmacol. 1987;19(2):159-62.
29. Blumenfeld Z, Avivi I, Linn S, Epelbaum R, Ben-Shahar M, Haim N. Prevention of irreversible chemotherapy-induced ovarian damage in young women with lymphoma by a gonadotrophin-releasing hormone agonist in parallel to chemotherapy. Hum Reprod. 1996 Aug;11(8):1620-6.
30. Modan B, Ron E, Lerner-Geva L, Blumstein T, Menczer J, Rabinovici J, Oelsner G, Freedman L, Mashiach S, Lunenfeld B. Cancer incidence in a cohort of infertile women. Am J Epidemiol. 1998 Jun 1;147(11):1038-42.
31. Shushan A, Paltiel O, Iscovich J, Elchalal U, Peretz T, Schenker JG. Human menopausal gonadotropin and the risk of epithelial ovarian cancer. Fertil Steril. 1996 Jan;65(1):13-8.
32. Ginsburg ES, Yanushpolsky EH, Jackson KV. In vitro fertilization for cancer patients and survivors. Fertil Steril. 2001 Apr;75(4):705-10.
33. Chen WY, Yang JG, Huang SH, Li PS. Effects of cyclophosphamide on maturation and subsequent fertilizing capacity of pig oocytes in vitro. Chin J Physiol. 1998 Jun 30;41(2):75-83.
34. Fabbri R, Porcu E, Marsella T, Rocchetta G, Venturoli S, Flamigni C. Human oocyte cryopreservation: new perspectives regarding oocyte survival. Hum Reprod. 2001 Mar;16(3):411-6.

35. Zenzes MT, Bielecki R, Casper RF, Leibo SP. Effects of chilling to 0 degrees C on the morphology of meiotic spindles in human metaphase II oocytes. Fertil Steril. 2001 Apr;75(4):769-77.
36. Trounson A. Preservation of human eggs and embryos. Fertil Steril. 1986 Jul;46(1):1-12.
37. Porcu E, Fabbri R, Damiano G, Giunchi S, Fratto R, Ciotti PM, Venturoli S, Flamigni C. Clinical experience and applications of oocyte cryopreservation. Mol Cell Endocrinol. 2000 Nov 27;169(1-2):33-7.
38. Arav A, Zeron Y, Leslie SB, Behboodi E, Anderson GB, Crowe JH. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. Cryobiology. 1996 Dec;33(6):589-99.
39. Cha KY, Chian RC. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. Hum Reprod Update. 1998 Mar-Apr;4(2):103-20.
40. Hovatta O, Silye R, Abir R, Krausz T, Winston RM. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. Hum Reprod. 1997 May;12(5):1032-6.
41. Newton H, Fisher J, Arnold JR, Pegg DE, Faddy MJ, Gosden RG. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. Hum Reprod. 1998 Feb;13(2):376-80.
42. Oktay K, Newton H, Aubard Y, Salha O, Gosden RG. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? Fertil Steril. 1998 Jan;69(1):1-7.
43. Cox SL, Shaw J, Jenkin G. Transplantation of cryopreserved fetal ovarian tissue to adult recipients in mice. J Reprod Fertil. 1996 Jul;107(2):315-22.
44. Harp R, Leibach J, Black J, Keldahl C, Karow A. Cryopreservation of murine ovarian tissue. Cryobiology. 1994 Aug;31(4):336-43.
45. Parrot DM. The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue . J Reprod Fertil .1960;1:230-241.
46. Radford JA, Lieberman BA, Brison DR, Smith AR, Critchlow JD, Russell SA, Watson AJ, Clayton JA, Harris M, Gosden RG, Shalet SM. Orthotopic reimplantation of cryopreserved ovarian cortical strips after high-dose

chemotherapy for Hodgkin's lymphoma. Lancet. 2001 Apr 14;357(9263):1172-5.

47. Oktay K, Karlikaya G. Ovarian function after transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. N Engl J Med. 2000 Jun 22;342(25):1919
48. Smitz J, Cortvrindt R. Oocyte in-vitro maturation and follicle culture: current clinical achievements and future directions. Hum Reprod. 1999 Sep;14 Suppl 1:145-61.
49. Nugent D, Meirow D, Brook PF, Aubard Y, Gosden RG. Transplantation in reproductive medicine: previous experience, present knowledge and future prospects. Hum Reprod Update. 1997 May-Jun;3(3):267-80.
50. Revel A,Raanani H,Wang P,Chian RC, Casper RF. Oocyte retrieval and in vitro maturation from frozen thawed human ovarian cortex transplanted in immume supressed mice. 2001:Hum. Reprod.15,13.
51. Kaya H, Oral B, Ozguner F, Tahan V, Babar Y, Delibas N. The effect of melatonin application on lipid peroxidation during cyclophosphamide therapy in female rats. Zentralbl Gynakol. 1999;121(10):499-502.
52. Kaya H, Delibas N, Serteser M, Ulukaya E, Ozkaya O. The effect of melatonin on lipid peroxidation during radiotherapy in female rats. Strahlenther Onkol. 1999 Jun;175(6):285-8.
53. Otala M, Suomalainen L, Pentikainen MO, Kovanen P, Tenhunen M, Erkkila K, Toppari J, Dunkel L. Protection from radiation-induced male germ cell loss by sphingosine-1-phosphate. Biol Reprod. 2004 Mar;70(3):759-67. Epub 2003 Nov 12.
54. Morita Y, Perez GI, Maravei DV, Tilly KI, Tilly JL. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis in vitro. Mol Endocrinol. 1999 Jun;13(6):841-50.
55. Chao DT, Korsmeyer SJ. BCL-2 family: regulators of cell death. Annu Rev Immunol. 1998;16:395-419.
56. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science. 1998 Aug 28;281(5381):1322-6.

57. Tilly JL, Tilly KI, Kenton ML, Johnson AL. Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels. Endocrinology. 1995 Jan;136(1):232-41.

58. Kugu K, Ratts VS, Piquette GN, Tilly KI, Tao XJ, Martimbeau S, Aberdeen GW, Krajewski S, Reed JC, Pepe GJ, Albrecht ED, Tilly JL. Analysis of apoptosis and expression of bcl-2 gene family members in the human and baboon ovary. Cell Death Differ. 1998 Jan;5(1):67-76.

59. Rueda BR, Tilly KI, Botros IW, Jolly PD, Hansen TR, Hoyer PB, Tilly JL. Increased bax and interleukin-1beta-converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. Biol Reprod. 1997 Jan;56(1):186-93.

60. Goodman SB, Kugu K, Chen SH, Preutthipan S, Tilly KI, Tilly JL, Dharmarajan AM. Estradiol-mediated suppression of apoptosis in the rabbit corpus luteum is associated with a shift in expression of bcl-2 family members favoring cellular survival. Biol Reprod. 1998 Oct;59(4):820-7.

61. Knudson CM, Tung KS, Tourtellotte WG, Brown GA, Korsmeyer SJ. Bax-deficient mice with lymphoid hyperplasia and male germ cell death. Science. 1995 Oct 6;270(5233):96-9.

62. Perez GI, Robles R, Knudson CM, Flaws JA, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. Nat Genet. 1999 Feb;21(2):200-3.

63. Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. Endocrinology. 1995 Aug;136(8):3665-8.

64. Perez GI, Knudson CM, Leykin L, Korsmeyer SJ, Tilly JL. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. Nat Med. 1997 Nov;3(11):1228-32.

65. Lopez SG, Luderer U. Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. Free Radic Biol Med. 2004 Jun 1;36(11):1366-77.

66. Bergeron L, Perez GI, Macdonald G, Shi L, Sun Y, Jurisicova A, Varmuza S, Latham KE, Flaws JA, Salter JC, Hara H, Moskowitz MA, Li E, Greenberg A, Tilly JL, Yuan J. Defects in regulation of apoptosis in caspase-2-deficient mice. Genes Dev. 1998 May 1;12(9):1304-14.