



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**TAMOKSİFEN' İN OVARYUM FOLLİKÜLLERİ VE NOTCH SİNYAL YOLAĞI
ÜZERİNE ETKİSİ**

HÜLYA KURNAZ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Bursa-2015



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

TAMOKSİFEN'İN OVARYUM FOLLİKÜLLERİNE VE NOTCH SİNYAL YOLAĞI
ÜZERİNE ETKİSİ

HÜLYA KURNAZ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Berrin ZİK

Bursa-2015

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ' NE

Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Hülya KURNAZ tarafından hazırlanan " Tamoksifen' in Ovaryum Follikülleri ve Notch Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi " konulu Yüksek Lisans tezi 27/04/2015 günü, 13:30-14:30 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliğı/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Berrin ZİK	
Üye	Prof. Dr. Hatice ERDOST	
Üye	Prof. Dr. Nesrin ÖZFİLİZ	
Üye	Prof. Dr. Artay YAĞCI	
Üye	Yard. Doç. Dr. Cansel Ö. AKKOÇ	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Metin PETEK

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

TÜRKÇE ÖZET.....	II
İNGİLİZCE ÖZET.....	III
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	5
GEREÇ ve YÖNTEM.....	15
BULGULAR.....	24
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	36
KAYNAKLAR.....	41
TEŞEKKÜR.....	50
ÖZGEÇMİŞ.....	51

ÖZET

Tamoksifen, seçici östrojen reseptör modülatörlerinden biridir. Günümüzde menapoz öncesi ve sonrası yüksek risk grubunda yer alan kadınlarda meme kanserinin önlenmesinde ve meme kanserli hastaların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Tamoksifenin menapoz öncesi kadınlarda kullanılması, onların fertilitelerini etkileyebilir.

Sunulan tezin I. amacı; tamoksifenin puberta döneminde ovaryum follikül atrezisi ya da proliferasyonu üzerine etkilerini incelemektir. II. amacı; tamoksifenin ovaryum üzerine yapacağı etkilerin mekanizmasında Notch sinyal yolağının önemli bir rolünün olup/ olmadığını belirlemektir.

Bu amaçlarla hayvanlar; kontrol grubu (n: 20) , tamoksifenin eritildiği taşıyıcı solüsyonun enjekte edildiği (n: 20) , 0.5mg/fare/gün (n: 20) , 1.5mg/fare/gün (n: 20) tamoksifen enjekte edilen olmak üzere 4 gruba ayrıldı ve 5 gün süre ile subkutan enjeksiyon yapıldı.

Deney sonrasında hayvanların ovaryum ağırlığı ve canlı ağırlık kazancı değerlendirildi. Ovaryum kesitlerine genel yapı ve follikül sayımı için; üçlü boyama, apoptozisi belirlemek için; Tunel yöntemi uygulandı. Ayrıca hücre proliferasyonu için; Ki 67, Notch 2 ve Jagget 1 ekspresyonunu belirlemek için; immunohistokimyasal boyama yöntemi uygulandı.

Çalışmada, hayvan grupları arasında canlı ağırlık kazancı ve ovaryum ağırlığı bakımından istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi. Tamoksifen uygulanan grupların ovaryumunda, primordiyal folliküllerin sayısının kontrol grubuna göre yüksek, antral follikül sayısının ve korpus luteum sayısının ise az olduğu belirlendi. Bununla birlikte tamoksifenin folliküllerde atreziyi arttırdığı, hücre proliferasyon oranını azalttığı gözlemlendi. Tamoksifenin granuloza hücrelerinde Notch 2 ekspresyonunu arttırdığı; fakat Jagget 1 ekspresyonu üzerine etkili olmadığı belirlendi.

Sonuçta uygulanan tamoksifen dozlarının primordiyal follikül havuzunu etkilemediği; fakat follikül gelişimini baskıladığı gözlenmiştir. Ayrıca tamoksifenin folliküller üzerine yaptığı etkilerde Notch sinyal yolağının rolü olabilir.

Anahtar Kelimeler: Tamoksifen, Ovaryum Follikülleri, Notch, Fertilitite

SUMMARY

The effect of Tamoxifen on the Ovarian Follicles and Notch Signaling Pathway

Tamoxifen is a selective estrogen receptor modulator. Currently, tamoxifen is being used for the treatment of breast cancer and as a prophylactic agent in healthy women with high-risk for breast cancer. Tamoxifen use in premenopausal women may affect their fertility.

The first aim of this study is to investigate the effects of tamoxifen on ovary follicle atresia or follicle proliferation in puberty. The second aim of this study is to determine if the Notch signaling pathway serves a role in mediating the effects of tamoxifen on the ovary.

For these purposes, animals were divided to 4 groups: No injection group (n: 20) , vehicle injected group (n: 20) , 0.5 mg/mouse/day tamoxifen group (n: 20) , and 1.5 mg/mouse/day tamoxifen group (n: 20) . Mice were given daily s.c. injections for 5 days. At the end of the experiment, ovarian weights and body weights gain were determined. Ovarian sections were stained with triple to examine the general structure of the ovary and number of follicles. Tunel assay was used for apoptosis. Immunohistochemical analyses were performed on sections to determine the expressions of Notch 2 and Jagget 1 and Ki 67 for cell proliferation.

In the present study, there were no significant differences on weight gain and ovarian weight between control groups and tamoxifen-treated groups. The number of primordial follicles was higher while the number of antral follicle and corpus luteum was lower in the tamoxifen-treated groups than in the control groups. In addition, tamoxifen treatment increased follicular atresia and reduced cell proliferation. Tamoxifen caused an increase in Notch 2 expression in the granulosa cells while it had no effect on Jagged 1 expression.

As a result, tamoxifen did not change primordial follicles pool but suppressed the follicular development. However, the Notch signaling pathway may be involved in the observed effect of tamoxifen on follicles.

Keywords: Tamoxifen, Ovarian Follicles, Notch, Fertility

GİRİŞ

Ovaryum, her siklusta farklı hormonların ve yardımcı faktörlerin etkisiyle morfolojik ve biyokimyasal değişiklikleri yaşayan organizmanın dinamik bir organıdır (1) .

Günümüze kadar over fiziolojisi ve follikül dinamiği üzerine yapılan incelemeler, memeli ovaryumunun follikül rezervinin fetal hayatta belirlendiği, bununla birlikte follikül atrezisinin dişinin tüm hayatı boyunca meydana geldiği ve follikül popülasyonunun sürekli olarak azaldığı yönündedir. Ovaryumdaki primordiyal folliküller, folliküllerin en erken formunu temsil eder ve ovaryum rezervi primordiyal folliküllerin sayısı tarafından belirlenir. Sınırlı sayıdaki primordiyal folliküller, ovulasyon veya atrezi yoluyla tükenmektedir. Özellikle primordiyal follikülleri hedefleyen herhangi bir toksik etki reproduktif yaşam aralığını kısaltabilir ve prematür over yetmezliği oluşumuna neden olabilir. Prematür over yetmezliğinde germ hücrelerinin kitlesel ve hızlı ölümü (apoptozis) söz konusudur. Oosite direkt, indirekt ya da oositi çevreleyen steroid üreten somatik hücre katmanlarına (granuloza ve teka hücreleri) etki eden toksik maddeler apoptozise sebep olabilir (2) .

Ovaryum follikül rezervinin doğal süreçle ya da pek çok eksojen etkene bağlı olarak azalması kadınlarda infertiliteye ya da erken menapozu sebep olmaktadır. Bu etkenlerin başında bugün kanser tedavisinde kullanılan yüksek doz radyoterapi ve kemoterapi gelmektedir. Bu tedaviler kanserde hayatta kalma oranını belirgin olarak arttırmasına rağmen genç hastalarda ovaryan yetersizlik ve infertilite gibi önemli etkilere de sebep olmaktadır (3-5) .

Günümüzde kanser tedavilerinde dişi gonadları radyoterapi ve kemoterapinin olumsuz etkilerinden korumaya yönelik pek çok yöntem geliştirilmiştir. Bunlar arasında embriyo ya da oosit dondurma, ovaryum dokusunu dondurma, oosit donasyonu ve çeşitli gonadotropin hormonlar ile ovaryum fonksiyonlarının baskılanması en sık kullanılan yöntemlerdir (3, 6) . Ancak pratik kullanıma tam adapte olmuş bir yöntem bulunmamaktadır. Bu da yardımcı üreme teknikleri alanında daha çok deneysel çalışma yapılmasını zorunlu hale getirmektedir. Kanser teşhisi konulan kadınlar fertilitelerini koruma hususunda oldukça hassastır. Dolayısıyla kemotropik ilaçlar kanser tedavilerinde etkili olurken; diğer organlar üzerinde özellikle fertilitite üzerindeki etkileri geniş çaplı araştırma gerektiren bir konudur.

Meme kanseri, kadınlarda kansere bağılı ölümlerde, akciğer kanseri ve kolorektal kanserden sonra üçüncü sırada yer almaktadır. Görülme sıklığı da gün geçtikçe artmaktadır (7) . Mamografi ile takip programlarının yaygınlaşması ile hastalara daha erken evrelerde tanı konmaktadır. Meme kanseri kadınların % 25' inde premenopoz dönemde görülmektedir ve bunların % 60' ında hormon reseptörü pozitifdir (8) . 1985 yılına kadar kansere bağılı ölümlerde ilk sırayı alan meme kanserinin bugün üçüncü sıraya inmesinin temel nedeni, erken evre olguların artması ve cerrahi sonrası uygulanan adjuvant tedavi protokollerindeki gelişmelerdir. Bu gelişmelerden en ilgi çekici olanı 1973 yılında klinik kullanıma sunulan *Tamoksifen*' dir (9) . Tamoksifen (TAM) 30 yıldan daha uzun bir süredir östrojen reseptör pozitif (ER +) meme kanserlerinin tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Günümüzde TAM, menapoz öncesi ve menapozdaki kadınlarda gerek meme kanserinin tedavisinde, gerekse meme kanseri olma riski yüksek olan hastalarda koruyucu olarak çok sık kullanılmaktadır.

TAM, seçici östrojen reseptör modülatörlerinden biridir (SERM) . Endojen östrojen ile yarışarak östrojen reseptörlerine bağlanır, böylece östrojenik yada antiöstrojenik etkilerini dokuya spesifik olarak gösterirler. TAM' ın östrojen agonisti ya da antagonisti olarak belirlenen biyolojik etkisi, doku tipine, konsantrasyonuna ve türlere göre değişmektedir (10, 11) . TAM gibi seçici östrojen reseptör blokörlerinin doku spesifik etkileri; (i) endojen östrojen seviyesi, (ii) ER alfa ve beta'nın lokal konsantrasyonu ve oranları, (iii) ER polimorfizmi, (iiii) ER koaktivatörleri (östrojenik etki) ya da korepresörleri (antiöstrojenik etki) ve (iiiii) klasik yada non-klasik yolları aktive etmesi sonucunda gelişir (12) . TAM' ın meme kanserindeki etkisi onun antiöstrojenik özelliğinden kaynaklanmaktadır. TAM, meme dokusunda kanser hücrelerinin G1 fazında kalmasını sağlayarak hücre çoğalmasını bloke eder ve tümör regresyonuna sebep olur (13). Bu sebeple TAM, hormon bağımlı meme kanserlerinde en yaygın kullanılan ilaçtır.

TAM' ın antiöstrojenik etkisinin yanında dişi genital kanallarda ve bazı organlarda değişik doku bozulmaları ile sonuçlanan östrojenik etkisi de bulunmaktadır. *İn vivo* ve *in vitro* yapılan çalışmalarda endometriyum, karaciğer, kemik ve vajinada güçlü östrojenik etkileri gözlenmiştir (12, 14, 15) . İlacın ters etkileri endometriyum kanserlerine (16) , endometriyal poliplere (17) , adenomyomatöz poliplere (18) , adenomyosis (19) , leiomyoma (20) , servikal polip ve ovaryan kistlere (21, 22) sebep olmaktadır. TAM' ın ovaryum kanseri oluşturması üzerine etkisi ise bildirilmemektedir (23) .

TAM' ın ovaryum üzerine etkileri ile çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Yapılan taramalarda; Roshangar ve arkadaşları (24) , gebe farelere tek doz (100 µg i.p.) TAM

uygulayarak doğan yavrularda follikül gelişimini incelemişlerdir. TAM uygulanan yavrularda kontrol grubuna göre oosit kümelerinin interselluler köprülerinin ayrılmadığını, primordiyal follikülden primer folliküle geçişin engellendiğini ve sonuç olarak TAM'ın erken dönemde follikül gelişmesini baskıladığını; fakat farklılaşmış ovaryum follikülleri üzerine TAM'ın etkisi olmadığını belirtmişlerdir. Ayrıca TAM'ın kısa süreli kullanımlarında menapoz öncesi kadınlarda, menapoz semptomlarının görüldüğü, hipotalamus-over arasındaki bağlantıda bozulmalara neden olduğu; fakat bu etkilerin geri dönüşümlü olduğu, tedavi sonlandığında ortadan kalktığı belirtilmektedir (10). Tsujioka ve arkadaşları (25) farklı konsantrasyonlarda (0.005, 0.03 ve 0.2 mg/kg/gün oral) TAM'ı 2 ve 4 hafta sürecince erişkin ratlara vererek TAM'ın fertilité ve ovaryum üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Sonuç olarak 2 haftalık 0.2 mg/kg/gün ve 4 haftalık 0.2 ve 0.03 mg/kg/gün dozlarında, atretik folliküllerin ve intersitisyel hücrelerin sayısında artış, yeni gelişecek korpus luteum sayısında azalma gözlemlenmiş ve 2 haftalık uygulama ile 4 haftalık elde edilen sonuçlar arasında farklılık olmadığını belirterek 2 haftalık uygulamanın toksik çalışmada etkin olabileceğini belirtmişlerdir.

Notch sinyal yolağı, embriyogenesis sırasında hücrelerin kaderini belirleyen, postnatal gelişim sürecinde ise hücre proliferasyonu, farklılaşması ve apoptozis üzerine etkileri olan bir mekanizmadır (26). Notch ligand ve reseptörleri ile östrojen arasındaki ilişki birçok çalışmayla kanıtlanmıştır (27-32). Meme kanser hücrelerinde östrodiolün, Notch transkripsiyonal aktiviteyi azalttığı (27), bununla birlikte östrojenik bir bileşik olan Genistein' in prostat kanser hücrelerinde Notch 1' i baskıladığı bildirilmiştir (28, 29). Buna benzer olarak östrodiolün hipokampusteki nöronlarda Notch sinyalini azalttığı gösterilmiştir (30). Yine östrojenik özelliğe sahip olan bisphenol A, *Xenopus laevis* canlı türünde gamma sekretaz aktivitesini inhibe ederek Notch sinyalini bozmuş ve nörogelişimsel anomaliye sebep olmuştur (31). Bununla birlikte 17- β östradiolün; meme kanser hücrelerinde (MCF7) Notch 1 ve Jagget 1' in ekspresyonunu arttırdığı ortaya konulmuştur (32).

Yapılan taramalarda TAM'ın ovaryum üzerine etkisi hakkındaki bilgiler çelişkili olup, yeterli değildir. Ayrıca TAM'ın farklı dozlarının östrojen kaynağı olarak fonksiyon yapan ovaryum üzerine etkisinde, Notch sinyal yolağının etkili olup olmadığını belirleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Dolayısıyla sunulan tezin 1. amacı, iki farklı doz TAM'ın ovaryum follikül gelişimi üzerine etkisini, apoptozis ve proliferasyonu belirleyen kitlelerle detaylı olarak incelemektir. Tezin 2. amacı, TAM'ın farklı dozlarının östrojen kaynağı olarak fonksiyon yapan ovaryum üzerine etkisi ve TAM'ın ovaryum üzerine yapacağı

etkilerin mekanizmasında, kanserde ve follikül gelişiminde önemli rol oynayan Notch sinyal yolağının etkili olup olmadığını belirlemektir.

GENEL BİLGİLER

OVARYUM

Ovaryumun Genel Yapısı

Ovaryum, uterusun her iki tarafında lateral pelvik duvarlara yakın konumda fossa ovarika içinde yerleşmiş, salgıladığı östrojen ve progesteron hormonları ile dişi genital sisteminin bütün organları üzerinde etkili olan, genital siklusu düzenleyen, pembe beyaz görünümlü badem şekilli bir organdır. Ovaryumda üç katman gözlenir:

1. Epitelyum: Ovaryum yüzeyini örten, tek sıra kübik epitelden yapılmıştır. Germinatif epitel olarak adlandırılır. Epitelin peritona bakan yüzünde mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyumlar izlenir. Hücre sitoplazması mitokondriyonlar ve pinositoz veziküllerinden zengindir.

2. Tunika Albuginea: Bağ dokusundan yapılmıştır. Yaş ilerledikçe kalınlaşır ve sertleşir. Az damarlı, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır. Kollajen lifler yüzeye paralel demetler oluştururlar.

3. Ovaryum Stroması: Ovaryumun temel ve destek dokusudur. Ovaryumlar dışta korteks, içte medulla olmak üzere iki bölgeye ayrılır:

a- Korteks (cortex ovarii) : Ovaryumun dış ve işlevsel bölümüdür. Çeşitli gelişim aşamalarındaki ovaryum foliküllerini ve korpus luteum yapılarını içerir. Korteksin yapısında kollajen ve elastik lifler ile ince uzun mekik şeklinde stroma hücreleri yer alır. Stroma hücreleri fibroblastlardan farklı olarak hormon salgılayan teka interna hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir.

b- Medulla (medulla ovarii) : Ovaryumun iç bölgesi olup, gevşek bir bağ dokusu ve damardan zengin bir yapı gösterir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur. Korteksteki değişimlere uygun olarak çoğalıp azalabilen kan ve lenf damar ağına sahiptir. Bu damarlar korteks-medulla sınırında ağ şeklinde bir dağılım yaparlar. Bu arteriyel dağılım kortekste folliküller etrafında zengin bir kapillar ağ oluşturur. Venler ise postkapillar venül olarak başlar, arterlere eşlik ederek hilus bölgesine doğru ters yönde seyrederek. Medullada ayrıca oksidasyon enzimlerini ve diğer enzimleri içeren hücreler bulunur; bunların sayıları yaşla artar (33-35) .

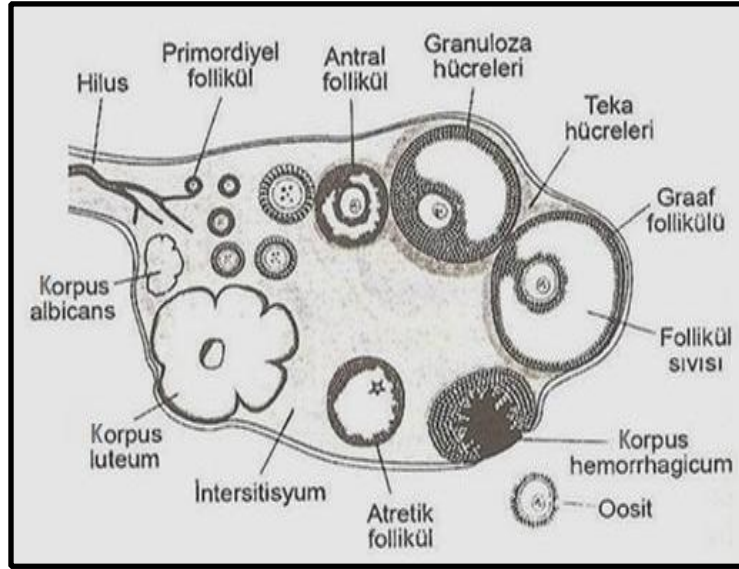
Ovaryum Follikül Yapısı ve Fonksiyonu

Folliküller, ovaryum üzerinde gelişen fonksiyonel yapılardır. Gelişmiş bir follikül, oosit ve oosit etrafındaki somatik granuloza hücreleri ile dışta teka hücre katmanından oluşmaktadır. Folliküllerin iki önemli fonksiyonu bulunmaktadır:

- Dışide gametlerin üretilmesi (gametogenezis)
- Steroid yapıdaki hormonların sentezlenip salgılanması (33, 36) .

Folliküler Gelişim

Ovaryum üzerinde bulunan primordiyal folliküllerin olgunlaşma sürecine *follikülogenezis* denir (şekil- 1) (37) . Her bir primordiyal follikülde, etrafı granuloza hücreleri ile çevrilmiş bir tane oosit bulunur. Oositin büyümesi ve etrafındaki hücrelerin farklılaşması ile birlikte follikülün yapısı değişmektedir (33) .



Şekil- 1: Follikül gelişimi; korpus luteum ve follikül atrezisinin şematik görünümü (37) .

Histolojik olarak üç tip ovaryum follikülü bulunur:

- 1- Primordiyal folliküller
- 2- Gelişmekte olan folliküller
 - a- Primer folliküller
 - b- Sekonder folliküller
 - c- Antral folliküller
- 3- Graaf (Tersiyer) folliküller

Bir ovaryumda tüm tiplerdeki folliküller aynı anda görülmektedir ancak primordiyal folliküller en yaygın olan tiptir (33, 38) .

Primordiyal Folliküller

Memelilerde primordiyal folliküller, fütal gelişimde ovaryumda belirir. Erken gelişim aşamasında bulunan primordiyal folliküller gonadotropin uyarımından etkilenmezler. Olgunlaşmış ovaryumda primordiyal folliküller, Tunika albuginea' nın hemen altında korteks stroması içinde bulunur. Primordiyal folliküllerde oosit tek tabaka yassı follikül hücreleriyle sarılmıştır. Follikül hücrelerinin dış bölümü bazal lamina ile sınırlandırılmıştır. Bu aşamadaki follikül içindeki oosit yaklaşık 30 µm çapındadır. Eksantrik yerleşmiş nükleusu içinde çok belirgin nükleolusu vardır. Oosit sitoplazmasında (ooplasma) *balbiani cisimciği* görülür. Balbiani cisimciği; golgi aygıtı membranları ve vezikülleri, endoplazmik retikulum, birçok mitokondri ve lizozomların birikmesiyle oluşmuş bir yapıdır (34, 38) .

Gelişmekte Olan Folliküller

Primer Folliküller

Çeşitli faktörlerin etkisiyle oositler ve buna eşlik edecek şekilde follikül hücreleri büyüme evresine girerler. Başlangıç olarak oosit hacimce büyür ve onu saran follikül epitel hücreleri çoğalmaya başlayarak kübik bir şekil alır. Primer folliküller, çoğunluğu kübik olmak üzere, hem kübik hem de yassı tek sıralı granuloza hücrelerine sahiptir (33) .

Sekonder Folliküller

Biraz daha gelişmiş folliküllerdir. Oositin gelişmesiyle birlikte, granuloza hücreleri çoğalır ve çok sıralı olarak oositi sarar. Oosit gelişimi devam ederken oosit çevresinde zona pellusida şekillenir. Sekonder follikül gelişimi devam ettikçe, çevresindeki stroma iki tabakaya ayrılır: Sekonder follikülü dıştan kuşatan hücre ve damardan zengin olan iç tabaka teka internadır. Hücreleri epitolooid karakterde olup steroid hormon sentezlerler. Dış kısımdaki tabaka (teka eksterna) , az sayıda konsantrik yerleşimli bağ doku yapısında olup, gelişen follikülün kapsülü görevini görür (33, 35) .

Antral Folliküller

Granuloza tabakası 6-12 hücre tabakasına ulaştığında granuloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar belirmeye başlar. Bu aşamadaki folikül ise *antral follikül* adını alır. Bu hyaluronik asitten zengin sıvıya *follikül sıvısı* denir. Bu sıvı birikmeye devam ettikçe boşluklar birleşir ve tek büyük bir boşluk halini alır ki buna da *antrum* denir. Antral

follikül aşamasından sonra eksantrik olarak yerleşmiş oosit büyüyemez ve azami 125 µm çapında kalır (33-36) .

Graaf (Tersiyer) Folliküller

İnsanda yaklaşık 1 cm çapındadır ve ovaryum yüzeyinde çıkıntı oluştururlar. Antrum, içinde sıvı birikimden dolayı giderek büyür ve granuloza hücreleri ince bir tabaka halinde bu boşluğun iç yüzünü döşer. Bu evrede kumulus ooforus hücreleri zona pellusidanın hemen üzerinde prizmatik bir şekil alarak düzenlenir ve *korona radiata* hücreleri olarak tanımlanır. Gelişimin bu döneminde graaf follikülü çevresindeki granuloza ve teka hücreleri, ovaryan hormonları salgılamaya başlar (36) .

Ovulasyon

Graaf follikülündeki oosit etrafındaki korona radiata hücreleri ile birlikte likör follikülü içerisinde serbest kalır. Follikül duvarı yüzeye doğru incelik. Ovaryumun korteksinde yer alan ve yüzeye dayanan graaf follikülü, germinatif epitele basınç yapar. Oosit, follikül sıvısının basıncı ile etrafındaki korona radiata hücreleriyle birlikte ovidukta atılır. Bu olaya *ovulasyon* denir. Ovule olan oosit, infundibulum kısmından tuba uterina içerisine girer ve 24 saat içerisinde sperm ile karşılaşırsa fertilize olabilir (33-36) .

Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra, follikülün granuloza ve teka interna hücreleri, korpus luteum (sarı cisim) denilen geçici bir iç salgı bezini oluşturmak üzere yeniden düzenlenir. Korpus luteum, ovaryumun korteks bölgesinde görülür. Follikül sıvısının boşalması ile follikül duvarı kıvrımlı bir hal alır. Follikül boşluğunda bir miktar kanama olur; bu kan pıhtılaşır (koagülasyon) ve daha sonra yerini bağ dokusu alır. Bu bağ dokusu ile birlikte giderek ortadan kaldırılan kan pıhtısı artıkları korpus luteumun en iç kısmını oluşturur.

Ovulasyondan sonra granuloza hücrelerinin boyutlarında büyük bir artış olur (20-35 µm çapında) . Bunlar korpus luteum parankima hücrelerinin yaklaşık % 80' ini oluşturur ve *granuloza lutein hücreleri* olarak adlandırılırlar. Bu hücreler, steroid salgılayan hücrelerin genel yapısal niteliklerine sahiptir. Teka internanın hücreleri de teka lutein hücrelerine dönüşerek korpus luteumun oluşumuna katkıda bulunur. Bu hücreler granuloza lutein hücrelerine benzer yapıda, ancak daha küçüktür (yaklaşık 15 µm çapında) ve daha koyu boyanırlar. Bu hücreler korpus luteum duvarının kıvrımlarında yerleşirler. Teka internanın kapiller ve lenfatik damarları korpus luteumun iç kısmına doğru gelişir ve

bu yapının zengin damar ağını oluştururlar. Oosit II atıldıktan sonra follikülün hücrelerinin yeniden düzenlenmesi ve korpus luteumun oluşması, ovulasyon öncesinde salgılanan lutenize edici hormonun (LH) uyarısı sonucu gerçekleşir. LH uyarımıyla korpus luteum hücrelerinin enzimlerinde de değişiklik olur ve korpus luteum progesteron ile östrojenleri salgılamaya başlar. Korpus luteumun durumu gebeliğin oluşup oluşmamasına bağlıdır. LH uyarımının ardından korpus luteum, 10-12 gün süreyle hormon salgılamak üzere programlanmıştır. Bunun dışında hormonal uyarı olmaz ve gebelik oluşmazsa, korpus luteum hücreleri apoptozis ile dejenere olur. Gebelik oluşmayınca, ovulasyondan 9-11 gün sonra korpus luteum hızla küçülmeye başlar ve progesteron, östrojen, inhibin seviyeleri düşer ve insanlarda menstruel kanama olur, diğer taraftan inhibinin etkisinden kurtulan follikül uyarıcı hormon (FSH) artmaya başlar, böylelikle yeni menstruel siklus başlar. Kısa bir süre varlığını sürdüren korpus luteum; *korpus luteum periyodikum* ya da *korpus luteum spurium* olarak adlandırılır ve hücre kalıntıları makrofajlar tarafından ortadan kaldırılır. Korpus luteumun bulunduğu yer fibroblastlar tarafından doldurulur ve burada sıkı bağ dokusundan oluşan bir cisim gelişir. Bu cisme *korpus albicans* (*corpus albicans*) denir.

Gebelik oluşursa, embriyonun trofoblastik hücrelerince sentezlenen insan karyonik gonadotropin hormonu (HCG) , korpus luteumu uyaran sinyaller gönderir. HCG' nin etkisi LH' ye eşdeğerdir, böylece korpus luteumun dejenerasyonu engellenir. Korpus luteum daha da büyür ve progesteron hormonu salgılar. Progesteron bu işlevlerinin yanı sıra uterus bezlerinin salgı yapısını da uyarır. Bu bezlerin salgıları, plasenta işleve başlayınca kadar embriyonun beslenmesi açısından önemli görölmektedir. Gebelikteki korpus luteuma *gebelik korpus luteumu* (*korpus luteum gravididas*, *korpus luteum pregnansi*, *korpus luteum verum*) denir. Gebelik korpus luteumu insanlarda 4-5 ay süresince aktiftir (34, 36) .

İntersitisyel Hücreler

Poligonal şekilli, ortada yuvarlak çekirdeği ve belirgin ekirdeğikçikleri olan epiteloid hücrelerdir. Sitoplazmalarında küçük yağ damlacıkları bulunur. Luteinize hücrelere benzedikleri için atreziye giden foliküllerin teka internalarından oluştukları düşünölmektedir. Ayrıca intersitisyel hücreler granuloza hücrelerinden ve primordiyal folliküllerden de köken alırlar. Bunlar ovaryum stromasında tek tek ya da gruplar halinde bulunur ve östrojen salgırlar (34, 35) .

Atrezi

Ovaryumda bulunan folliküllerin çok az bir kısmı ovulasyon yoluna girer. Folliküllerin büyük bir kısmı *atrezi* olur. Atrezi, programlanmış hücre ölümü yani *apoptozis* ile gerçekleşir. Apoptozis, ovaryum fonksiyonları ve gelişimi için gereklidir ve dişilerde biyolojik zamanlamayı yapan bir mekanizmadır. Fötal yaşamda sadece oositlerde apoptozis gözlenir ve oositlerin 2/3' ü doğumdan önce apoptozis ile ölür. Yaşamın ileri dönemlerinde apoptozis, gelişen folliküllerin granuloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde gözlenir.

Follikül atrezisi FSH, LH gibi endokrin faktörlerle, ayrıca insulin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1), epidermal büyüme faktör (EGF), basic fibroblast büyüme faktör (bFGF), activin ve interlökin 1 β (IL-1 β) gibi parakrin faktörlerle kontrol edilir. Lokal olarak üretilen büyüme faktörleri follikül yaşamı için önemli olmasına rağmen esas fizyolojik düzenleyiciler gonadotropinlerdir. Oosit apoptozisindeki gibi primordiyal follikül apoptozisinde de kit-kit ligant bağlantısı ve EGF, bFGF ayrıca küçük folliküllerin yaşamı için büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF-9) önemli bir yer tutar. Preantral folliküllerin yaşamı için FSH etkili bir faktör değildir, bu dönemde lokal üretilen büyüme faktörleri önemli rol oynar. Normal siklus boyunca insan ve rodentlerde erken antral folliküller, follikül gelişimi için en kritik dönemdedir. Bu dönemde folliküller yaşam için FSH' ye bağımlı hale gelirler ve FSH reseptörü ifade ederler. Ratların erken antral follikülleri için, FSH en önemli yaşamsal faktördür. Ayrıca IGF-1 ve IL-1 β rat antral follikül kültürlerinde follikül yaşamı için önemlidirler. Preovulatör folliküller LH reseptörü ifade ederler ayrıca her iki gonadotropin de, bu dönemde follikül yaşamı için gereklidir (39).

Atrezi sonucu oluşan morfolojik görüntü folliküler evreye bağlı olarak değişiklik gösterir. Primordiyal ve gelişen küçük folliküllerin atrezisinde oosit küçülür ve dejenere olur. Oosit çekirdeği çoğunlukla eksantrik pozisyonda ve oosit membranı ile ilişkili olarak bulunmaktadır. Atrezinin ileri evrelerinde, çekirdekçik ooplazmada serbest olarak bulunabilir. Benzer değişiklikler granuloza ve teka hücrelerinde de görülür. Atrezide öncelikle, hücrelerin çekirdeklerinde kromatin kümeleri yoğunlaşır ve çekirdek büzüşmesi gerçekleşir. Buna ek olarak; granuloza hücrelerinde çekirdek zarlarının yırtılarak kromatinin şekilsiz granüller şeklinde parçalanıp hücreden atılması da görülebilir. Dejenere olan hücreler makrofajlar tarafından fagosite edildikten sonra, etraftaki stromal hücreler bu bölgeye göç eder ve atretik follikülden bir iz kalmaz. Daha büyük folliküllerin

atrezisinde oosit dejenerasyonu, granuloza hücre dejenerasyonundan daha sonra meydana gelir (40, 41) .

TAMOKSİFEN

İlk kez 1896 yılında ileri evre meme kanserinin tedavisinde ooforektominin (ovariectomy) etkili olduğunu gösterilmiştir. O tarihlerde bu tedavinin etki mekanizması ve hormon deyimi bilinmiyordu. Overlerin endokrin fonksiyonu ilk kez 1923 yılında St. Louis' de Dr. Ailen ve Dr. Daisy tarafından tespit edilmiş ve over kaynaklı bu kimyasal maddelere *östrojen (estrus=çılgnlık)* adı verilmiştir (42) . Overlerin cerrahi olarak çıkarılması veya radyoterapi ile ablasyonu 1950' li yıllarda hem metastatik hastalığın tedavisinde hem de adjuvan uygulamalarda standart tedavi olarak kabul görmüştür. 1966 yılında Chicago Üniversitesi' nde östrojen reseptör proteini ilk kez bir sıçan uterusundan izole edilmiştir. 1971 yılında meme kanseri hücrelerinin bir kısmında östrojen reseptörü bulunduğu ve östrojen reseptörü bulunan tümörlerin endokrin tedaviye daha iyi yanıt vereceği fikri ortaya atılmıştır (43) . Östrojen reseptörü taşıyan tümörlerin endokrin ablasyona % 60 oranında yanıt verdiği gösterilmesi ile umutlar iyice artmış ve bunun için östrojenin meme dokusundaki etkilerini bloke edecek yeni bir antiöstrojen ajan araştırılmaya başlanmıştır. İlk antiöstrojen bileşik olan *Etamoksitrifetol* 1958 yılında sentez edilmiştir (44) . Ancak şiddetli yan etkileri nedeniyle kullanımı kısıtlı olmuştur. İlerleyen çalışmalarla birlikte daha sonra yeni ve daha az yan etkiye sahip bir antiöstrojen olan *tamoksifen (TAM)* geliştirilmiştir. Yapılan ilk çalışmada 46 postmenopozal ileri evre meme kanserli hastada denenilen ilaç, 10 hastanın olumlu yanıt vermesi ile popülerite kazanmıştır (45) . Bir nonsteroid antiöstrojen olan TAM' ın diğer antiöstrojenlere oranla daha güçlü bir antitümör etkisi ve daha az sistemik etkilerinin olmasından dolayı kullanımı artmıştır. TAM 1973 yılında *Nolvadex* piyasa adıyla ilerlemiş meme kanserinin tedavisi amacıyla İngiltere' de piyasaya çıkmış, 1977' de postmenopozal kadınlarda metastatik meme kanseri tedavisi için Amerika' da FDA (Food Drug Administration) onayı almıştır (9) . TAM' ın östrojen reseptör pozitif premenopozal meme kanserli hastalarda, hastaliksız intervali arttırdığının ve karşı memede meme kanseri gelişimini azalttığının çalışmaları gösterilmesi 15 yıl almıştır (46) .

Selektif östrojen reseptör modülatörlerinin atası sayılan TAM, meme dokusu üzerine antiöstrojenik etki gösterirken (47) , serum lipitleri (48) , kemik (49) ve endometriyum (50)

üzerine belirgin östrojenik etki göstermekte ve buna bağlı olarak TAM kullanan hastalarda endometriyal patoloji gelişme riski artmaktadır (51) .

TAM hem premenapozal hem postmenapozal hastaların tedavisinde yüksek oranda kullanılmaktadır (52, 53) . Günümüzde TAM, meme kanserine karşı yüksek risk taşıyan sağlıklı kadınların profilaksisinde (54) , iyi huylu meme hastalıklarının tedavisinde (55) ve infertil kadınlarda ovulasyon indüksiyonunda (56) kullanılmaktadır.

Etki Mekanizması

Meme kanserinde endokrin tedavinin temel prensibi, tümör hücresinin östrojenlerin (Estron (E1) , Estradiol (E2) , Estron sülfat (E1s)) büyümeyi uyarıcı etkisinden yoksun bırakılmasıdır. Normal meme dokusunun büyüme ve çoğalması esas olarak östrojen ve prolaktin hormonları tarafından düzenlenir (49) .

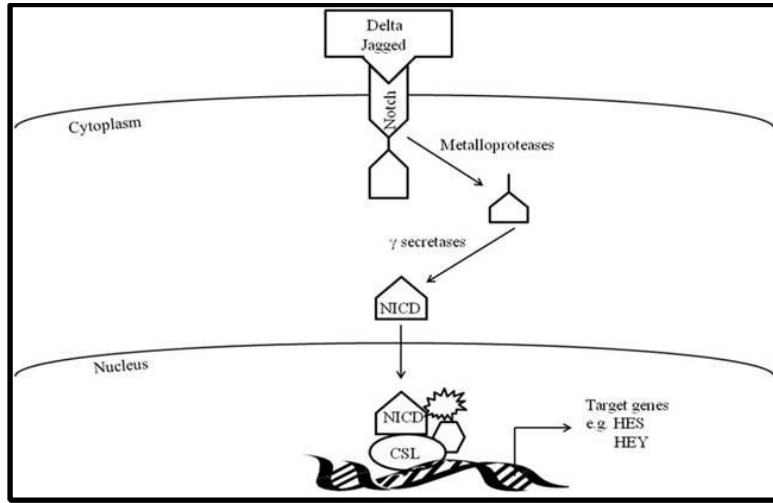
Meme kanserinin ortaya çıkmasından ve ilerlemesinden primer olarak östrojenler sorumludur (49, 57) . İlk kez 1975 yılında TAM' ın kültür ortamında östrojen reseptörü taşıyan meme kanseri hücrelerini inhibe ettiği ve bu etkinin ortama östrojen ilave edildiğinde geri döndürülebildiği gösterilmiştir (58) . Bundan yaklaşık 10 yıl sonra birbirinden bağımsız olarak TAM' ın meme kanseri hücrelerini siklusun G1 fazında bloke ettiği tespit edilmiştir (59, 60) .

TAM östrojen reseptörüne bağlandığı zaman reseptörde üç boyutlu bir değişmeye neden olmakta ve DNA' daki östrojen bağlanmasını inhibe etmektedir. Normal fizyolojik koşullarda östrojen stimülasyonu, tümör hücre ürünü transforming growth faktör β ' yı (TGF- β) arttırmaktadır. TAM tümör hücre büyümesinin otokrin inhibitörüdür. Bu yolları bloke eden TAM' ın net etkisi meme kanseri büyümesinin otokrin stimülasyonunu hücreyi G1 fazında bloke ederek azaltmaktır. Buna ek olarak insülin benzeri büyüme faktörü 1' in (IGF1) lokal oluşumunu da azaltır. IGF1 meme kanseri için parakrin büyüme faktörüdür (61) .

TAM daha çok tümörstatik bir ilaç olduğundan ve kısa süreli tedavi sonrası TAM kesildiğinde tekrarlanabilme ihtimali olduğundan uzun süreli tedavinin (en az 5 yıl) en iyi klinik strateji olduğu belirtilmektedir (62, 63) . 5-10 yıllık kullanım sonucunda TAM' a karşı herhangi bir tolerans gelişmezken, daha kısa süreli kullanımlardan sonra nükslerin görülme sıklığının arttığı bildirilmektedir (64) . Bugüne kadar yapılan tüm araştırmalar, TAM' ın meme kanserli olgularda sürviyi % 10 oranında arttırdığını desteklemektedir.

NOTCH SİNYAL YOLAĞI

Notch sinyal yolağı, nonkovalent hücre içi etki (NICD) ve hücre dışı etkiden oluşan, heterodimer transmembran reseptörleri içeren evrimsel olarak korunmuş bir yoldur. Memelilerde, dört Notch reseptörü (Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4) ve beş ligand (Jagged 1, Jagged 2, Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4) tespit edilmiştir. Notch reseptörleri ve ligandları, transmembran proteinlerdir ve bu nedenle Notch sinyalizasyon aktivasyonunda komşu hücrelerle bağlantıda önemli rol oynarlar (26). Ligandlar reseptörlere bağlandıkları zaman, Notch reseptörleri γ -sekretaz kompleksi aracılığıyla, Notch Intracellular Domain' ini (NICD) serbest bırakarak proteolitik bölünmeye duyarlı hale gelirler. NICD nükleusa girer ve bir DNA bağlanma alanı içeren rekombinasyon sinyal bağlayıcı protein-JK ile kompleks oluşturur. Bu kompleks, bölünmeyi arttırıcı (Hes) ve Notch hedef genlerin Hes ile bağlantılı transkripsiyon faktörlerini (Hey) düzenler (65-68) (Şekil- 2). Bu hedef genler, farklı hücrelerde diğer genlerin hareketlerini düzenleyen transkripsiyonel faktörler olarak çalışır.



Şekil- 2: Notch sinyal yolağı (69).

Notch yüzey reseptörleri, çeşitli hücre tiplerince hücre farklılaşması ve proliferasyonu gibi olaylarda ifade edilir. Notch özellikle embriyonik gelişim sırasında uygun damar oluşumu için ve doğum sonrasında damarların onarılması ve yeniden şekillendirilmesi için önemlidir (70). Notch sinyalizasyonu, merkezi sinir sistemi gelişiminde önemli rol oynadığı gibi, hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve apoptozun düzenlenmesi yoluyla kardiyovasküler gelişim, pankreas, bağırsak ve kemik gelişiminde de önemli rol oynar (26,

71) . Notch reseptörleri ve ligandlarında görülen mutasyonlar farelerde dolaşım ve immün sistem olmak üzere, birçok sistemde düzensizliklere yol açar ve embriyonik ölümlere sebep olur. İnsanlarda görülen Notch yolu mutasyonlarında ise, Alagille sendromu, Cadasıl sendromu, Fallot tetralojisi, Spondilokostal dizostozis gibi kalıtsal hastalıklar gözlenmiştir (72, 73) . Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda T-akut lenfoid lösemi gibi kötü huylu hematolojik oluşumlarda, solid tümörlerde, meme kanserinin gelişimi ve ilerlemesinde Notch' un rolü olduğu bildirilmektedir (73-76) .

Notch sinyal yolağının meme kanseri olan insanlarda, hücre proliferasyonu, apoptotik hücre ölümü, farklılaşma, invazyon, anjiyojenez, tümör metastazı ve kanser hücrelerinin kendini yenilemesinde kritik rol oynayan korunmuş ligand-reseptör sinyalleşme yolu olduğu bildirilmektedir (75, 77) .

Memeli overlerinde yapılan çalışmalarda, Notch sinyalizasyonu üyelerinin (Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4, Jagget 1, Jagget 2, Hes 1, Hes 5, Hey 1, Hey 2 ve Hey L) follikülogeneziste etkili olduğu bildirilmektedir (78, 79) .

GEREÇ VE YÖNTEM

Deney Hayvanları ve Bakım Koşulları

Çalışma Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi ve Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yürütüldü. Çalışma materyali olarak 80 adet aynı yaş ve genetik yapıya sahip (inbred) erişkin (8 haftalık) BALB/ c ırkı dişi fareler kullanıldı. Fareler için önerilen uygun çevresel koşullar aynı merkez tarafından sağlandı ve fareler standart fare yemi ile beslenerek, içme suyunu serbest olarak tüketerek, ışıklandırılması 12 saat aydınlık-12 saat karanlık, havalandırılması (% 60-70 nem) , oda ısısı (20-24 °C) kontrol edilen bir odaya yerleştirildi. Çalışmadaki tüm deneysel uygulamalar Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar no: 2012- 09/04) .

Deneysel Uygulama

Fareler ortama ve deney koşullarına uyum sağlayabilmesi için deneysel uygulamadan 2 gün önce tartılarak, kafes başına 5 fare olacak şekilde yerleştirildi. Kafeslerin üzerine gruplar ile enjeksiyonun başlangıç ve bitiş tarihini belirten plakalar yerleştirildi. Hayvanlar 4 gruba ayrıldı; hiçbir enjeksiyon yapılmayan (kontrol A grubu) , TAM' ın eritildiği taşıyıcı solüsyonun enjekte edildiği (kontrol B grubu) , 0.5mg/fare/gün TAM enjekte edilen (0.5 TAM) ve 1.5mg/fare/gün TAM (1.5 TAM) enjekte edilen olmak üzere gruplandırıldı. Çalışmada her grupta 20 fare olmak üzere toplam 80 hayvan kullanıldı. TAM, % 10 etanol: % 90 mısır yağı içerisinde eritildi ve bu eritme için hazırlanan solüsyon, kontrol B grubu için kullanıldı (0.1 ml/fare) . Eritilen TAM, 0.5 mg/fare ve 1.5 mg/fare dozda toplam 0.1 ml içinde subkutan yolla hayvanlara 5 gün boyunca enjekte edildi. TAM enjeksiyon öncesi her gün taze olarak hazırlandı, dokuların alınacağı gün hayvanlara enjeksiyon yapılmadı.

Dokuların Alınması

Histolojik Prosedür

Deney sonrasında, vaginal smear ile proöstrus döneminde olan hayvanlar ayrıldı ve ağırlıkları tartılarak ether inhalasyonu ile uyutuldu. Daha sonra hayvanların karın bölgeleri açıldı, her hayvanın sağ ovaryumu alınarak stereo mikroskop altında çevre yağ dokularından temizlendi ve ovaryumların tartımları yapıldı. Bu ovaryumlar

numaralandırılmış kasetler içerisinde Bouin tespit solüsyonuna alınarak 24 saat tespit edildi. Tespit solüsyonunda bulunan ovaryumlar değişik derecelerde alkol (% 50, 70, 80, 90, absölü) , ksilol ve parafin serisinden geçirilerek, granüllü, 58-60 °C' de eriyen parafinle bloklandı.

Her bir grupta ovaryumların tam ortasından geçecek şekilde parafin bloklardan yarı otomatik mikrotomla 5 mikrometre kalınlığında (Leica RM 2155, U.S.A.) 5' er kesit alındı ve bu kesitler % 30' luk lizinle hazırlanmış, lizinli lamlara çekildi. Her grupta bu ovaryum doku kesitlerinin bir tanesi genel yapının gözlenmesi ve follikül sayımlarının yapılması için Crossmann' ın modifiye üçlü boyama yöntemiyle (80) boyandı, diğer kesitler ise immunohistokimyasal değerlendirilmeler için ayrıldı.

Bouin Tespit Solüsyonunun Hazırlanışı

Doymuş Pikrik Asit.....75 ml
Nötr Formol.....25 ml
Asetik Asit.....5 ml (Kullanılacağı zaman eklenir) .

Üçlü Boyama Solüsyonlarının Hazırlanışı

Weigert Hematoxylin Solüsyonu

Solüsyon A;

Hematoxylin (Crist).....1 gr
% 95 alkol.....100 ml

Solüsyon B;

Distile su.....99 ml
Demir-3-Klorür.....1 gr (Sıvı ile 4 ml)
HCL1 ml

Solüsyonlar hazırlandıktan sonra erimeleri için bir gece bekletildi.

A ve B solüsyonları eşit miktarda hazırlanıp karıştırıldı.

Metil Alkol (Metil Karbonat) Solüsyonu

Distile su.....125 ml
Metil alkol (Metanol).....125 ml
Sodyum karbonat.....0.5 gr (Kendiliğinden erimesi için bir gece bekletildi) .

Asit Fuksin Solüsyonu

Asit fuksin.....1.4 gr
Distile su.....400 ml
Tymol.....0.26 gr
Asetik asit.....4 ml

Fosfotungistik Asit Solüsyonu

Phosphotungstic Asit.....3 gr
Distile su.....100 ml

Anilin-Blue Solüsyonu

Anilin-Blue.....2 gr
Distile su.....100 ml
Asetik asit.....2 ml

Asetik Asit Solüsyonu

Asetik Asit.....2 ml
Distile su.....100 ml

Üçlü Boyama Yöntemi

Boyama için hazırlanan lamlar köprü içersine yerleştirildi.

1. Köprü içersindeki lamlar deparafinizasyon işlemi için önce xylol I' e (10 dakika) ve daha sonra xylol II' ye (10 dakika) alındı.
2. Dehidrasyon işlemi için sırasıyla;
 - absolu alkol I (3 dakika) ,
 - absolu alkol II' ye geçirilip (3 dakika) ,
 - % 96' lık alkol (3 dakika) ,
 - % 80' lik alkol (3 dakika) ve
 - % 70' lik alkol (3 dakika) solüsyonlarından geçirildi.
3. Distile suda çalkalamaya alındı (2x3 dakika) .
4. Kesitler sonrasında çekirdek boyaması için Weiger Hematoxylin solüsyonunda bekletildi (8 dakika) .
5. Kesitler akarsuda yıkamaya alındı (5 dakika) .
6. Metil alkolde 1 dakika bekletildi.
7. Tekrar kesitler akarsuda yıkamaya alındı (5 dakika) .
8. Sonra distile suda yıkama yapıldı (2x3 dakika) .
9. Sitoplazma boyası için kesitler Asit Fuksin içine alındı (5 saniye daldırıp çıkarılarak) .
10. Tekrar distile suda yıkama işlemi yapıldı (2x3 dakika) .
11. Daha sonra kesitler fosfotungstik asit içine alındı (15 dakika) . Ancak pembe rengin kontrolü için mikroskop altında kesitler incelendi.
12. Tekrar distile suda yıkama yapıldı (2x3 dakika) .

13. Kesitler sonra bağ doku boyaması için Anilin-Blue solüsyonuna alındı (2 dakika) .
14. Tekrar distile suda yıkama yapıldı (2x3 dakika) .
15. Sonra asetik asit içine alındı (1 dakika) .
16. Distile suda yıkama yapıldı (2x3 dakika) .
17. Yıkama işleminden sonra kesitler -%96' lık alkol I (3 dakika) ,
-%96' lık alkol II (3 dakika) den geçirilip,
-absollü alkol I (3 dakika) ve
-absollü alkol II' ye alındı (3 dakika) .
18. Kesitler daha sonra -xylol I (5 dakika) ,
-xylol II (10 dakika) ,
-xylol III' den (15 dakika) geçirildi.
19. Kesitler üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

İmmunohistokimya

Ovaryumlardan alınan kesitlere immunohistokimyasal olarak, hücre proliferasyonunu belirlemek için Ki 67, ovaryum dokusunda Notch 2 ve Jagget 1 protein ekspresyonlarını belirlemek için spesifik antikolar ile İndirekt Streptavidin-Biotin Peroksidaz kompleks yöntemi uygulandı ve ışık mikroskobunda incelendi.

İmmunohistokimyasal Gereçler

Primer Antikolar: Ki 67 rabbit monoclonal antibody (Lab Vision-Clone SP6) , rabbit polyclonal Notch 2 (Cell Signaling 5732) , goat polyclonal Jagget 1 antibody (sc 6011) .

Sekonder Antikolar: Histostain Plus rabbit primary (Zymed kit: 85-6743) , İmmPRESS anti goat Ig Peroksidaz (MP-7405) .

Bufferlar ve Yıkama Solüsyonu: Sitrat Buffer solüsyonu pH 6 (Sitrik asit monohydrate (Merck-100244) , PBS tablet (Phosphat Buffer Saline pH 7.4) , % 30' luk hidrojen peroksit solüsyonu (Merck-K 33887597) , antibody dilüent (Zymed 00-3118) .

Kromojen: DAB (3-3 Diaminobenzidin) (Zymed-00-2020) .

Poly-l-lysine solüsyonu (Sigma P8920-US), % 30' luk lizin solüsyonunda hazırlanmış lizinli lamlar, lamel, entellan, mikrotom bıçağı, plastikten yapılan nemli bir ortam (nemlendirme kutusu-Işın Tıp-Türkiye) .

İmmunohistokimyasal Prosedür

Streptavidin-Biotin Peroksidaz yöntemine göre yapılan boyamada;

1. Polilizinli lama çekilen dokular 37° C' lik etüvde kurutuldu.
2. Deparafinizasyon işlemi için, dokular ksilole alındı (2x15 dakika) .
3. Dokular % 100' lük absolü alkol (2x5 dakika) , % 96' lık alkol (2x5 dakika) , % 80' lik ve % 70' lik alkol (5 dakika) ve distile suya geçirildi.
4. Dokulardaki antijeni açığa çıkarmak için Sitrat Buffer (pH: 6) solüsyonu içersine alınan kesitler mikrodalga fırında, 600 Watt' lık devirde, 4 defa olmak üzere 5' er dakikalık ısıtma işlemine tabi tutuldu. Daha sonra Sitrat Buffer solüsyonu içersindeki kesitler 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakıldı.
5. Sitrat Buffer solüsyonundan çıkarılan kesitler PBS ile yıkandı.
6. Endojen peroksidaz aktivitesini önlemek için, dokular % 3' lük hidrojen peroksit (6ml H₂O₂+64 ml distile su) solüsyonu içersinde 20 dakika inkübe edildi.
7. Dokular PBS içersinde 3 defa olmak üzere 5' er dakika yıkandı.
8. PBS solüsyonundan çıkarılan dokuların fazla sıvısı alınarak dokulara protein bloke edici solüsyon (Ki 67 ve Notch 2 için rabbit blocking serum, Jagget 1 için horse blocking serum) konuldu ve 60 dakika beklendi.
9. Dokular yıkanmadan üzerlerine 1/500 oranında sulandırılmış Ki 67; 1/400 oranında sulandırılmış Notch 2, 1/200 oranında sulandırılmış Jagget 1 primer antikorlar damlatılarak (30µl) , +4 °C' de 1 gece bekletildi.
10. Ertesi gün dokular PBS içersinde 3 defa olmak üzere 5' er dakika yıkandı.
11. PBS' ten çıkan Ki 67' li ve Notch 2' li dokular üzerine Biotinli sekonder antikor damlatılarak oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi ve daha sonra dokular PBS içersinde 3 defa olmak üzere 5' er dakika yıkandı. Jagget 1' li dokulara ise reagent solüsyonu damlatılarak 30 dakika inkübe edildi ve PBS içersinde 3 defa olmak üzere 5' er dakika yıkandı.
12. PBS' ten çıkan dokular üzerine, enzim olarak streptavidin-HRP kompleks damlatılarak oda sıcaklığında 15dakika inkübe edildi (Ki 67 ve Notch 2 antikorlu dokular için) .
13. DAB kromojen ve substrat karışımından (1 ml distile suya 1, 2 ve 3 numaralı solüsyonlardan 1' er damla karıştırılarak) dokuların üzerini kapatacak şekilde preparatlara damlatılarak 5 dakika beklendi.
14. Daha sonra dokular distile su ile yıkandı.
15. Distile sudan çıkan dokular çeşme suyunda yıkandı.

16. Daha sonra dokular karşı boyama için 10 saniye Harris hematoksilen solüsyonunda bekletildi.
17. Hematoksilen solüsyonundan çıkan dokular çeşme suyu ve distile suda yıkandı.
18. Daha sonra dokular dereceli alkollerden (% 96, 100) geçirilerek ksilole alındı (3x10 dakika) .
19. Dokular üzerlerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Tunel Yöntemi (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase Mediated dUTP Nick End Labeling)

Apoptozisin belirlenmesi amacı için Tunel (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling) tekniğinden yararlanıldı.

Tunel tekniğinde, DNA üzerindeki kırıklar apoptotik sinyaller oluşturmaktadır, açığa çıkan DNA parçacıklarının serbest 3'- OH uçlarına terminal deoksinükleotidil transferaz (TdT) kullanılarak biotin ile işaretlenmiş ve işaretlenmemiş deoksinükleotidler eklenir. Daha sonra biotin ile işaretlenmiş nükleotidler, streptavidin-horseradish peroksidaz konjugatı ile tespit edilir. Diaminobenzidine, işaretlenmiş örnek ile tepkimeye girerek DNA kırığı bölgesinde çözünemeyen bir substrat oluşturur. Metil yeşili ile zıt boyama yapılarak işlem sonlandırılır.

Gereçler

Tunel label mix (Roche 11767291910) , Tunel enzim (Roche1767305) , Tunel POD (Roche 1772465) , Tunel dilution buffer (Roche 11966006001) , PBS tablet (Phosphat Buffer Saline pH 7.4) , % 30' luk hidrojen peroksit solüsyonu, Proteinaz K (Zymed 00-3011) , TritonX-100 (% 10 stok solusyon) , Sitrat buffer (pH 6.0) , DNase, Methyl Green.

Tunel Boyama Prosedürü

1. Lizinli lama çekilen dokular 37° C' lik etüvde 12 saat etüvde bekletildi.
2. Deparafinizasyon işlemi için, dokular ksilole alındı (2x15 dakika) .
3. Dokular % 100' lük absölu alkol (2x5 dk) , % 96' lık alkol (3 dakika) , % 80' lik ve % 70' lik alkol (3 dakika) ve PBS' de (5 dakika) yıkandı.
4. Permiabilizasyonu artırmak amacıyla Proteinaz K (10 dakika) preparatlar üzerine (yaklaşık 60 µL) eklenerek oda ısısında bekletildi.
5. Dokular PBS içersinde 2x5 dakika yıkandı.

6. Dokulara % 0.1' lik TritonX-100 karışımı (1 ml PBS+1 µL TritonX-100) konarak (yaklaşık 20 µL) buz üstünde 5 dakika bekletildi.
7. Dokular PBS içersinde 2x5 dakika yıkandı.
8. Pozitif kontrol yapmak için dokulara DNase eklenerek 37 °C' de 10 dakika inkübe edildi.
9. Dokular PBS içersinde 2x5 dakika yıkandı.
10. Hazırlanan Tunel enzim kiti (10 kısım enzim+20 kısım dilüsyon buffer+45 kısım label oranında) dokulara eklenerek, 37 °C' de karanlıkta 1 saat inkübasyona bırakıldı.
11. PBS ile 3x1 dakika dokular yıkandı.
12. POD solüsyonu dokulara eklendi ve etüvde 30 dakika bekletildi.
13. PBS' de 4x2 dakika yıkandı.
14. PBS' den çıkan dokular kurularak, üzerine DAB kromojen ve substrat (peroksidaz substrat) karışımından (75 µL) damlatılarak oda sıcaklığında yaklaşık 3 dakika inkübe edildi. Bu arada renk gelişimi mikroskop altında incelendi.
15. Daha sonra dokular distile su ile 3x1 dakika yıkanarak, 5 dakika distile su içerisinde bırakıldı.
16. Dokular zıt boyama için 10 dakika % 0.5 methyl green solüsyonunda bekletildi.
17. Methyl green solüsyonundan çıkan dokular distile suda yıkandı.
18. Daha sonra dokular % 100 N- butanolden geçirilerek ksilole alındı (2 dakika) .
19. Dokular üzerlerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

Folliküllerin Morfolojik Sınıflandırması

Triple boyama ile folliküllerin morfolojik sınıflandırmasında; granuloza hücre şekli ve hücre katman sayısı göz önüne alındı. Buna göre; oositi çevreleyen yassı tek sıralı granuloza hücreleri içeren follikül *primordiyal follikül*, tek sıralı kübik granuloza hücreleri ile çevrili follikül *primer follikül*, iki ya da daha fazla sıralı kübik granuloza hücreli ve granuloza hücreleri arasında boşluk (antrum) şekillenmemiş, teka tabakası belirginleşmeye başlamış folliküller *sekonder follikül*, kübik granuloza hücreleriyle çevrili ve bu hücreler arasında antral boşluklar belirmeye başlamış, teka follikülleri daha belirgin olan folliküller *antral follikül*, çapı en geniş olan ve antral boşluğun ileri derecede geliştiği ve kumulat granuloza hücre tabakasının belirginleştiği follikül *graff follikül (tersiyer follikül)* olarak adlandırıldı ve folliküller sınıflandırmaya göre sayıldı (81) .

Kantitatif Analiz ve İstatistiksel Değerlendirmeler

Canlı Ağırlık Kazancı ve Ovaryum Ağırlık Değerleri

Grupların canlı ağırlık kazançlarını belirlemek için, deneyin başlangıcında ve sonunda hayvanların ağırlıkları tartılarak ağırlıklar arasındaki farklılık farelerin deney süresince canlı ağırlık kazancı olarak değerlendirildi.

Farelerin ovaryum ağırlıklarını belirlemek için, deney sonrası hayvanlar ether inhalasyonu ile uyutulup karın bölgeleri açıldı ve farelerin sağ ovaryum alınarak, ovaryumların tartımları yapıldı. Deney sonrasında, hayvanların canlı ağırlık kazancı ve ovaryum ağırlık değerleri bakımından gruplar arasındaki farklılıklar, istatistiki yönden incelendi.

Ki 67 Değerlendirmeleri

Grupların ovaryumlarında follikül proliferasyonu, gruplardaki tüm hayvanların ovaryum kesitlerinde Ki 67 boyanma gösteren granuloza hücreli folliküllerin, total folliküllere oranıyla belirlendi (82) . Ki 67 pozitif reaksiyon veren folliküllerin değerlendirilen tüm folliküllere oranı bakımından gruplar arasında farklılıklar, istatistiksel yönden incelendi.

Notch 2 ve Jagget 1 Değerlendirmeleri

Notch 2 ve Jagget 1 immunohistokimyasal değerlendirmeler, folliküllerde antikörlerin boyanma şiddetine göre yapıldı. Şiddetine göre; boyanma yok ise negatif (-) , hafif şiddette boyanma var ise hafif şiddette (+) , orta şiddette boyanma mevcut ise orta şiddette (++) , şiddetli boyanma gözlemleniyse şiddetli (+++) olarak folliküller değerlendirildi. Şiddetine göre yapılan skorlama sonucu, gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel yönden incelendi (83) .

Tunel Değerlendirmesi

Follikül sınıflarında Tunel ile işaretlenme, 0-2 skor değerleri ile gösterildi. Buna göre Tunel pozitif işaretlenen granuloza hücrelerinin oranı, folliküldeki tüm granuloza hücrelerinin % 5' inden az ise skor 0, bu oran % 5-10 arasında ise +1, % 10 ve % 10' dan fazla ise skor 2 olarak değerlendirildi. Tunel boyanma gösteren follikül sınıflarının yukarıda bahsedilen şekilde skor değerlendirmeleri yapılarak, gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel yönden incelendi. Tunel skor değerleri ile gruplar arasında

folliküllerin apoptotik indeksi belirlendi. Folliküllerde, Tunel 2 skor değere sahip olan folliküller atretik follikül olarak değerlendirildi. Ovaryum kesitlerinde atretik folliküllerin, total folliküllere oranı % olarak hesaplanarak ve gruplar arasında atretik follikül yüzdesi belirlendi (84) .

İstatiksel Analizler

Gruplarının canlı ağırlık kazancı, ovaryum ağırlıkları, follikül sayımı, immunohistokimyasal boyamalar ve Tunel yöntemi ile elde edilen verilerin ortalama ve standart hata değerleri bulunarak, gruplar arasındaki farklılıkların istatiksel açıdan önem gösterip göstermediği belirlendi. Gruplar arasında istatistiksel farklılıklar One Way Anova varyans analizi ile araştırıldı. Gruplar arasındaki farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemek için Tukey testi uygulandı. Güven düzeyini göstermede $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$ simgeleri kullanıldı. Çalışmanın istatistiksel analizleri Sigma Stat programı ile şekiller ise Sigma Plot programı kullanılarak yapıldı.

BULGULAR

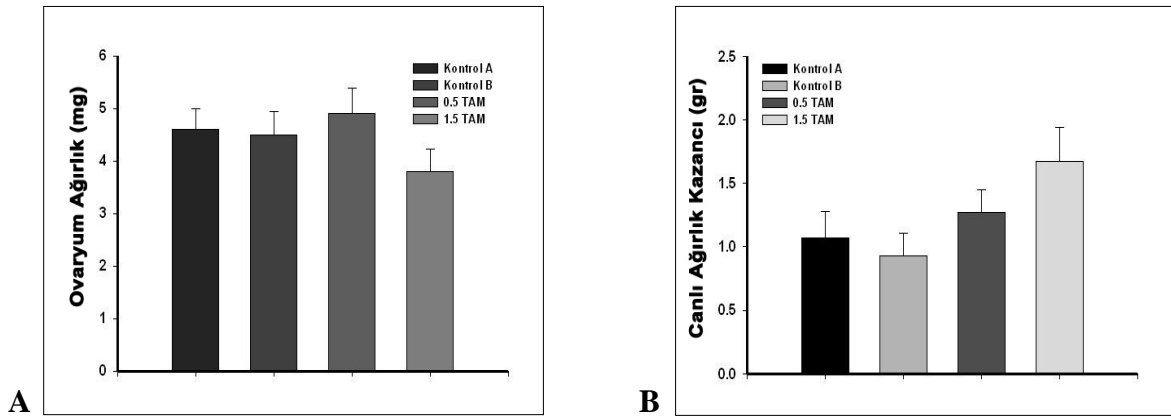
Canlı Ağırlık ve Ovaryum Ağırlık Değerlendirmeleri

Deney sonrasında, hayvanların ortalama canlı ağırlık kazançları, kontrol A grubunda $1,07 \pm 0,21$ gr, kontrol B grubunda $0,93 \pm 0,18$ gr ve 0.5 TAM grubunda $1,27 \pm 0,18$ gr, 1.5 TAM grubunda $1,67 \pm 0,27$ gr olarak saptandı. Ortalama canlı ağırlık kazancı bakımından, gruplar arasında istatistiki yönden önem belirlenmedi ($p \geq 0,05$) (Tablo- 1, Şekil- 3A) .

Deney sonrasında hayvanların ovaryum ağırlıkları değerlendirildiğinde; ortalama kontrol A grubunda $4,6 \pm 0,39$, kontrol B grubunda $4,5 \pm 0,45$, 0.5 TAM grubunda $4,9 \pm 0,49$, 1.5 TAM grubunda $3,8 \pm 0,39$ olarak belirlendi. Gruplar arasında ovaryum ağırlıkları bakımından da istatistiksel farklılık gözlenmedi ($p \geq 0,05$) (Tablo- 2, Şekil- 3B) .

Tablo- 1: Grupların deney sonrası ortalama canlı ağırlık kazancı (gr) ve ovaryum ağırlık (mg) değerleri.

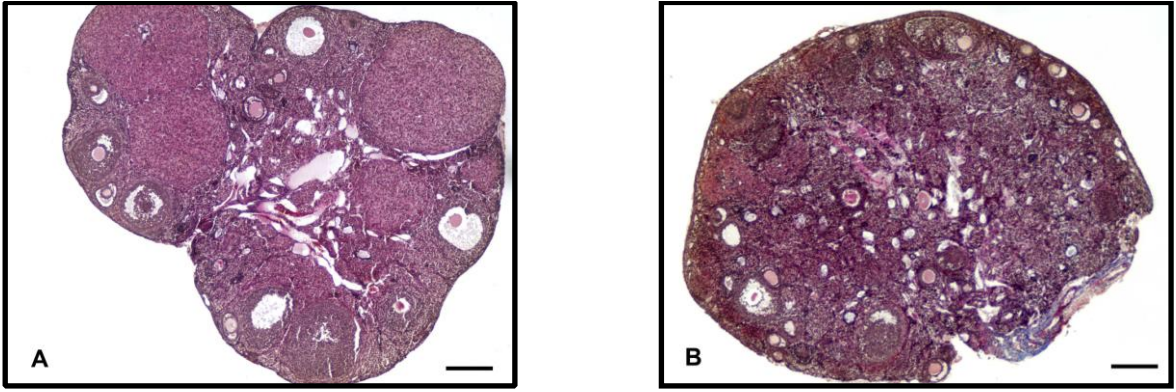
Gruplar	Kontrol A	Kontrol B	0.5mg TAM	1.5mg TAM
	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$
Canlı ağırlık (gr)	$1,07 \pm 0,21$	$0,93 \pm 0,18$	$1,27 \pm 0,18$	$1,67 \pm 0,27$
Ovaryum ağırlık (mg)	$4,6 \pm 0,39$	$4,5 \pm 0,45$	$4,9 \pm 0,49$	$3,8 \pm 0,43$



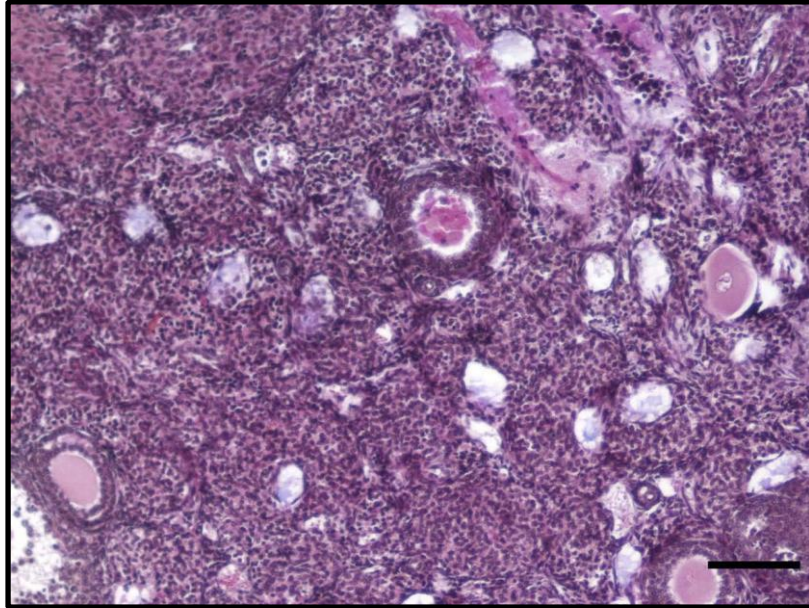
Şekil- 3: Grupların deney sonrası, (A) ortalama canlı ağırlık kazancı (gr) ve (B) ovaryum ağırlık (mg) değerleri.

Ovaryum Histolojisi ve Follikül Sayıları

DeneySEL prosedürün sonunda kontrol A, kontrol B grubu hayvanlardan alınan ovaryum kesitlerinde korteks ve medulla ayırımının yapılamadığı, ovaryuma folliküllerin hâkim olduğu gözlemlendi. TAM enjekte edilen gruplarda ise gelişmekte olan folliküllerin ve korpus luteumun oldukça az olduğu, ovaryum yüzeyinde korteks ve medulla ayırımının belirgin olduğu, intersitisyel alanın oldukça geniş ve intersitisyel hücrelerin artmış olduğu gözlemlendi. Bununla birlikte ovaryumda kistlerin yer aldığı belirlendi (Şekil- 4A, B ve Şekil- 5) .



Şekil- 4: Kontrol A grubu (A) ve 1.5 TAM grubunun (B) ovaryumundan genel görünüm. Üçlü boyama, Bar 200 µm.



Şekil- 5: TAM uygulanan grubun ovaryumunun medullasından görünüm. Üçlü boyama, Bar 100 µm.

Folikül Sayıları

TAM' ın folikül sayıları üzerine etkisini belirlemek için, deney sonrasında hayvanlardan ovaryumlar alındı ve bu ovaryumların tam ortasından geçen en büyük iki seri kesit değerlendirildi. Değerlendirmede üçlü boyama ve Tunel boyama yönteminin sonuçlarından yararlandı. Buna göre, ovaryum yüzeyindeki foliküller, sağlıklı ve atretik olmak üzere iki gruba ayrıldı. Gruplarda folikül sınıflarına göre sağlıklı folikül sayıları; **Primordiyal Folikül;** Ortalama olarak kontrol A ovaryum kesitlerinde primordiyal foliküller $18,14 \pm 2,44$, kontrol B grubunda $20,86 \pm 2,81$, 0.5 TAM grubunda $32,17 \pm 2,66$, 1.5 TAM grubunda $34,43 \pm 5,35$ olarak bulundu. Primordiyal folikül sayıları bakımından kontrol A ve 1.5 TAM grubu arasında $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiki önem gözlenirken, 1.5 TAM grubu kontrol B ile ayrıca 0.5 TAM grubu hem kontrol A hem de kontrol B grupları ile $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistik önem göstermiştir. 1.5 TAM grubu ile 0.5 TAM grupları arasında ise istatistiki önem gözlenmemiştir ($p \geq 0,05$) (Tablo- 2, Şekil- 6A) .

Primer Folikül; Ortalama olarak kontrol A grubunda primer folikül sayısı $3,57 \pm 0,79$, kontrol B grubunda $3,00 \pm 0,44$, 0.5 TAM grubunda $3,43 \pm 0,65$, 1.5 TAM grubunda $5,43 \pm 1,33$ olarak belirlendi. Primer folikül sayıları bakımından gruplar arasında istatistiki yönden önem belirlenmedi ($p \geq 0,05$) (Tablo- 2, Şekil- 6B) .

Sekonder Folikül; Ortalama olarak kontrol A grubunda sekonder folikül sayısı $8,43 \pm 1,49$, kontrol B grubunda $8,00 \pm 1,38$, 0.5 TAM grubunda $5,27 \pm 0,29$, 1.5 TAM grubunda $6,29 \pm 0,71$ olarak belirlendi. Sekonder folikül sayıları bakımından gruplar arasında istatistiki yönden önem belirlenmedi ($p \geq 0,05$) (Tablo- 2, Şekil- 6C) .

Antral Folikül; Ortalama olarak kontrol A grubunda antral folikül sayısı $4,14 \pm 0,88$, kontrol B grubunda $4,29 \pm 0,75$, 0.5 TAM grubunda $2,00 \pm 0,22$, 1.5 TAM grubunda $1,86 \pm 0,51$ olarak belirlendi. Antral folikül sayıları bakımından kontrol A ve kontrol B grupları, 0.5 TAM ve 1.5 TAM grupları ile $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistiki yönden önem gösterdi (Tablo- 2, Şekil- 6D) .

Korpus Luteum; Ovaryum doku kesitlerinde kontrol A grubunda $3,86 \pm 0,86$, kontrol B grubunda $3,17 \pm 1,33$, 0.5 TAM grubunda $1,29 \pm 0,64$, 1.5 TAM grubunda $0,57 \pm 0,30$ ortalama korpus luteum sayıları belirlendi. Gruplar arasında korpus luteum sayıları bakımından kontrol A ve kontrol B grupları, 0.5 TAM grubu ile $p \leq 0,05$ düzeyinde, kontrol A grubu 1.5 TAM grubu ile $p \leq 0,01$ düzeyinde istatistiki yönden önem gösterdi (Tablo- 2, Şekil- 6E) .

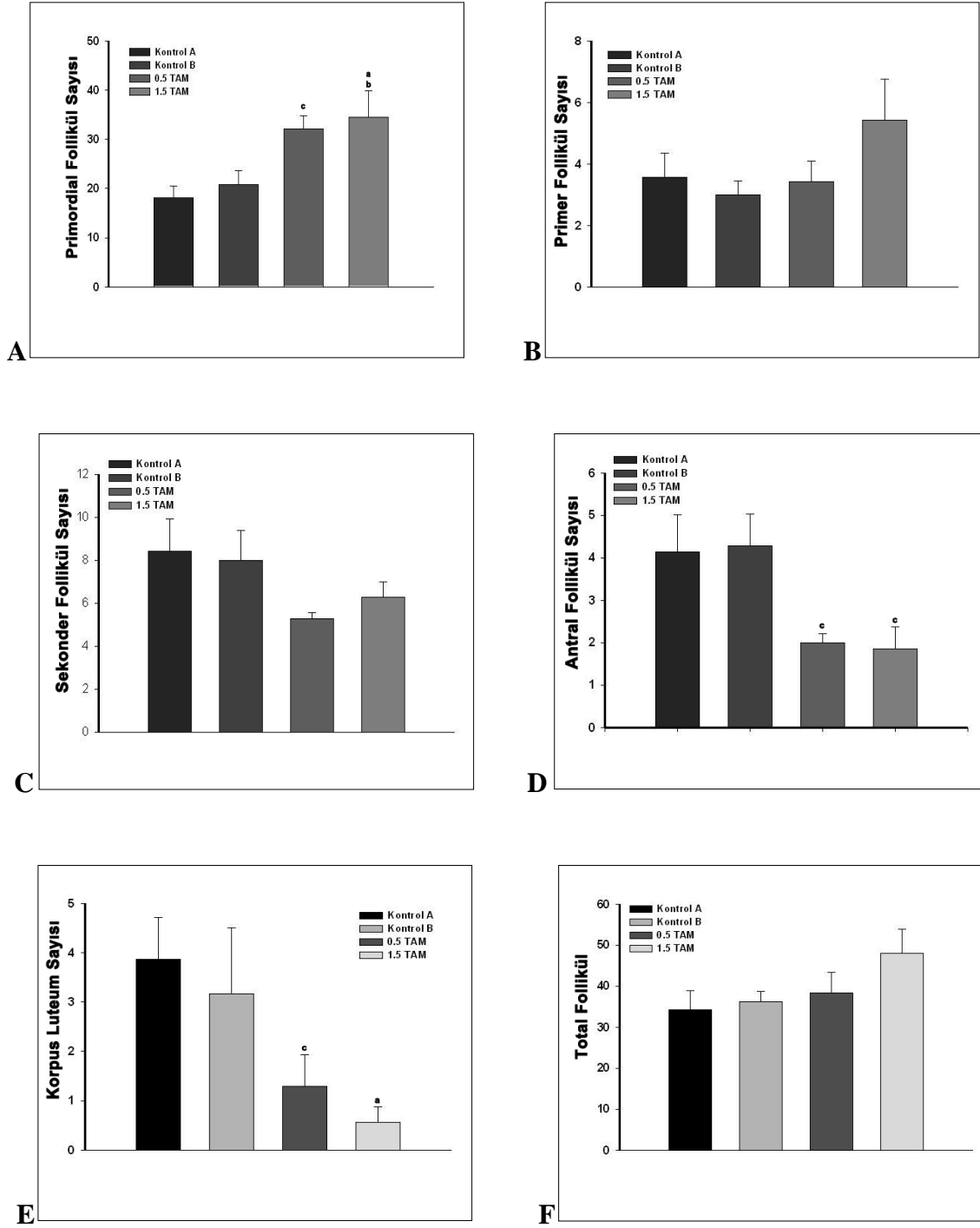
Total Follikül; Total sağlıklı follikül sayıları kontrol A grubunda $34,29 \pm 4,65$, kontrol B grubunda $36,14 \pm 2,65$, 0.5 TAM grunda $38,29 \pm 5,0$, 1.5 TAM grubunda $48,0 \pm 5,98$ belirlendi. Total follikül sayısı bakımından gruplar arasında istatistiki yönden önem belirlenmedi ($p \geq 0,05$) (Tablo- 2, Şekil- 6F) .

Tablo 2: Gruplarda follikül sınıfları ve follikül sayıları

<i>Gruplar</i>	Primordiyal	Primer	Sekonder	Antral	Korpus Luteum	Total
	<i>X ± Sx</i>	<i>X ± Sx</i>	<i>X ± Sx</i>	<i>X ± Sx</i>	<i>X ± Sx</i>	<i>X ± Sx</i>
<i>Kontrol A</i>	18,14 ± 2,44	3,57 ± 0,79	8,43 ± 1,49	4,14 ± 0,88	3,86 ± 0,86	34,29 ± 4,65
<i>Kontrol B</i>	20,86 ± 2,81	3,00 ± 0,44	8,00 ± 1,38	4,29 ± 0,75	3,17 ± 1,33	36,14 ± 2,65
<i>0.5 TAM</i>	32,17 ± 2,66 ^c	3,43 ± 0,65	5,27 ± 0,29	2,00 ± 0,22 ^c	1,29 ± 0,64 ^c	38,29 ± 5,0
<i>1.5 TAM</i>	34,43 ± 5,35 ^{a,b}	5,43 ± 1,33	6,29 ± 0,71	1,86 ± 0,51 ^c	0,57 ± 0,30 ^a	48,0 ± 5,98

a, Aynı sütunda, kontrol A' dan farklı ($p \leq 0,01$), **b**, aynı sütunda, kontrol B' den farklı ($p \leq 0,05$) , **c**, Aynı sütunda, kontrol A ve kontrol B' den farklı ($p \leq 0,05$) .

*Gruplar arasındaki farklılık, kontrol gruplarına göre belirlenmiştir.

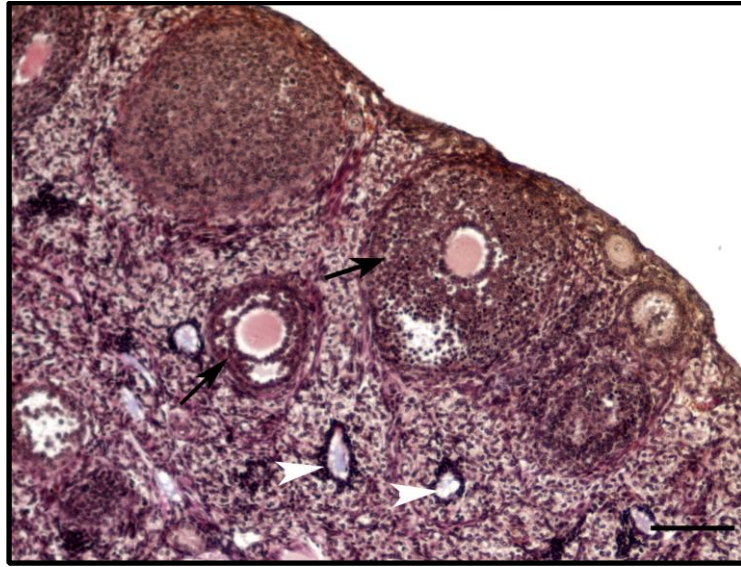


Şekil- 6: Gruplarda follikül sınıfları ve follikül sayıları **(A)** Primordiyal follikül, **(B)** Primer follikül, **(C)** Sekonder follikül, **(D)** Antral follikül, **(E)** Korpus luteum, **(F)** Total follikül sayısı. **a**, Aynı sütunda, kontrol A' dan farklı ($p \leq 0,01$) , **b**, aynı sütunda, kontrol B' den farklı ($p \leq 0,05$) , **c**, Aynı sütunda, kontrol A ve kontrol B' den farklı ($p \leq 0,05$) .

Atretik Follikül Değerlendirmeleri

Tunel ve Üçlü Boyama Değerlendirmeleri

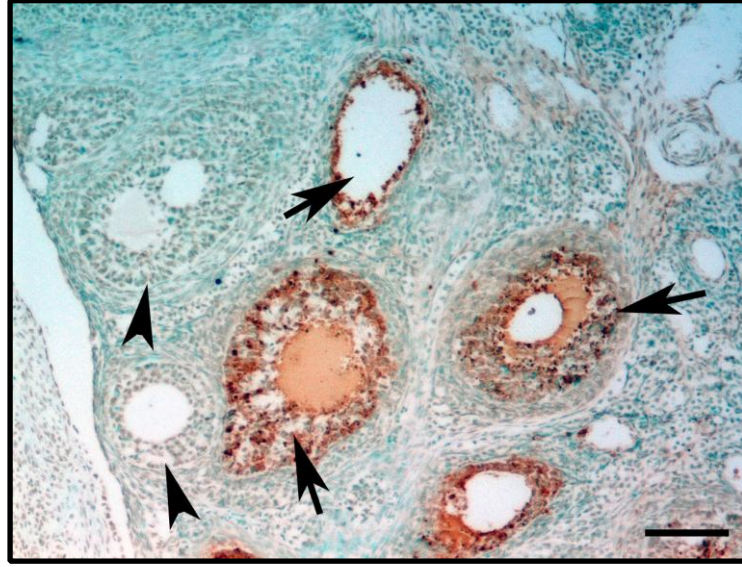
Ovaryum yüzeyindeki folliküller histolojik olarak incelenerek, folliküller sağlıklı ve atretik olmak üzere iki gruba ayrıldı (Şekil- 7) . Ovaryum kesitlerinde apoptozisi belirlemek için, Tunel boyama yöntemi uygulandı. Tunel değerlendirmeleriyle elde edilen veriler üçlü boyama yöntemiyle boyanan kesitlerle doğrulandı. Tunel metodunda reaksiyon hücre çekirdeklerinde gözlemlendi. Tunel kontrol dokularında tüm hücre çekirdeklerinin Tunel pozitif (+) reaksiyon verdiği, enzim uygulanmayan negatif kontrol dokularında ise reaksiyon gözlenmediği belirlendi.



Şekil- 7: Sağlıklı follikül (oklar) , apoptotik granuloza hücrelerinin hâkim olduğu atretik follikül (ok başları) . Üçlü boyama, Bar 200 µm

Sağlıklı folliküllerde bazen az sayıda granuloza hücrelerinin follikül antrumuna döküldüğü ve apoptotik yapı gösterdiği fakat follikül içerisindeki çoğu granuloza hücrelerinin çok iyi organize bir şekilde yerleştiği ve hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı belirlendi. Bu sağlıklı folliküllerin Tunel boyama yöntemiyle negatif (-) reaksiyon verdiği gözlemlendi. Ovaryum yüzeyindeki sağlıklı folliküllerin arasında ayrıca apoptotik özellik gösteren granuloza hücrelerinin çoğunlukta olduğu ve bazen granuloza tabakasının tamamen ortadan kalktığı atretik folliküllere de rastlandı (Şekil- 7) . Bu atretik folliküllerin Tunel boyama yöntemiyle pozitif (+) reaksiyon verdiği gözlemlendi (Şekil- 8) . Üçlü boyama yöntemi ile atretik folliküllerdeki granuloza hücrelerinin sağlıklı granuloza

hücrelerinden ayrıldığı, piknotik çekirdekli ve kromatin yoğunlaşması gibi apoptozisin morfolojik özelliklerine sahip olduğu ve antrum içerisine döküldükleri belirlendi. Yapılan değerlendirme sonucunda, tüm gruplarda primordiyal ve primer folliküllerde atrezi görülmezken, bazı sekonder ve antral folliküllerde atrezi gözlemlendi. Gruplar arasında hem üçlü boyama hemde Tunel pozitif reaksiyon gösteren atretik folliküllerin tüm değerlendirilen folliküllere oranı % olarak belirlendi (Tablo- 3) . Atretik follikül yüzde değerlendirilmesi bakımından gruplar arasında istatistiksel bir farklılık gözlemlenmedi. Bununla birlikte 1.5 TAM grubunda ve 0.5 TAM gruplarında atretik follikül yüzdesi diğer kontrol gruplarına göre yüksek belirlendi (Tablo- 3, Şekil- 9A) .



Şekil- 8: Tunel pozitif reaksiyon gösteren atretik folliküller (oklar) , Tunel negatif reaksiyon gösteren sağlıklı folliküller (ok başları) . Bar 100 µm.

Ki 67 Değerlendirmeleri

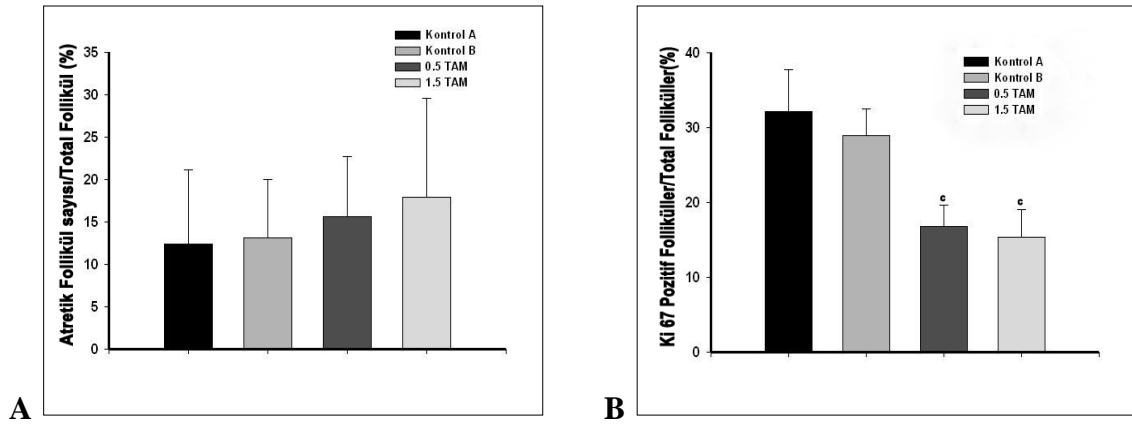
Ki 67 protein ekspresyonu, folliküllerin granuloza hücre sitoplazmasında ve çekirdeklerinde gözlemlendi (Şekil- 10) . Antikor uygulanmayan negatif kontrol dokularında ise boyanma gözlemlenmedi. Ovaryumun intersitisyel alanında ve korpus luteumlarda çok zayıf şiddette sitoplazmik boyanmış Ki 67 pozitif hücelere rastlandı. Tüm gruplarda Ki 67 pozitif reaksiyon, sekonder folliküller ve antral folliküllerin granuloza hücrelerinde gözlemlendi. Atretik folliküllerin granuloza hücrelerinde ise immunreaksiyon gözlemlenmedi (Şekil- 11) . Gruplar arasında Ki 67 immunreaksiyon şiddeti bakımından farklılık belirlenmedi. Bununla birlikte Ki 67 pozitif reaksiyon veren folliküllerin, değerlendirilen

tüm follüküllere oranı bakımından gruplar arasında istatistiksel farklılıklar belirlendi. Buna göre, gruplar arasında proliferasyon gösteren follüküllerin yüzdesi, 0.5 TAM ve 1.5 TAM gruplarında düşük olarak belirlendi ve bu gruplar hem kontrol A hemde kontrol B grupları ile $p \leq 0,05$ düzeyinde istatistiki önem gösterdi (Tablo- 3, Şekil- 9B) .

Tablo- 3: Grupların ovaryumunda Ki 67 pozitif follükül ve atretik follüküllerin değerleri (%)

Gruplar	Ki 67 pozitif follüküller	Atretik follüküller
	$X \pm Sx$	$X \pm Sx$
Kontrol A	32,14 \pm 5,54	12,43 \pm 8,71
Kontrol B	28,86 \pm 3,60	13,14 \pm 6,81
0.5 TAM	16,71 \pm 2,87 ^c	15,57 \pm 7,16
1.5 TAM	15,29 \pm 3,79 ^c	17,85 \pm 11,68

c, Aynı sütunda, kontrol A ve kontrol B' den farklı ($p \leq 0,05$) .



Şekil- 9: Total follüküllerde, (A) Atretik follüküllerin yüzde değeri. (B) Ki 67 pozitif reaksiyon veren follüküllerin yüzde değeri; c, Aynı sütunda, kontrol A ve kontrol B' den farklı ($p \leq 0,05$) .



Şekil- 10: Granuloza hücrelerinde Ki 67 immunreaksiyon (oklar) . Bar 100 μ m.



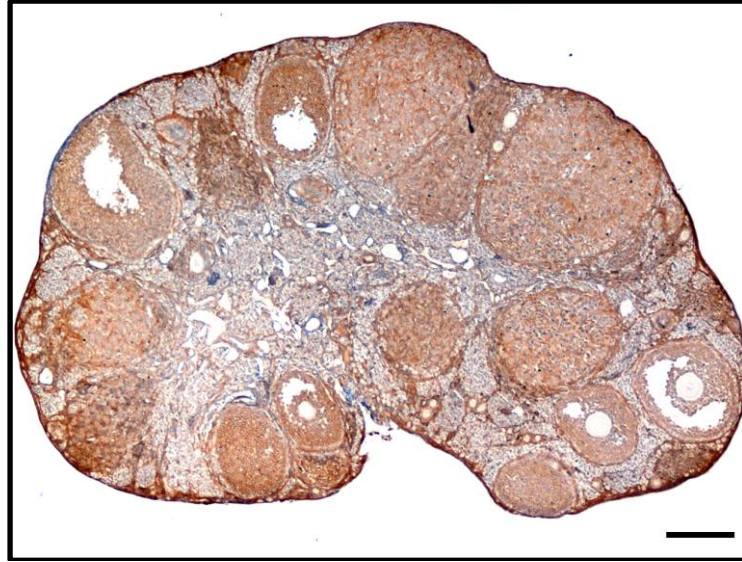
Şekil- 11: Kontrol A grubunda Ki 67 immunreaksiyon veren follüküller (oklar) . Bar 200 μ m.

Notch 2 Değerlendirmeleri

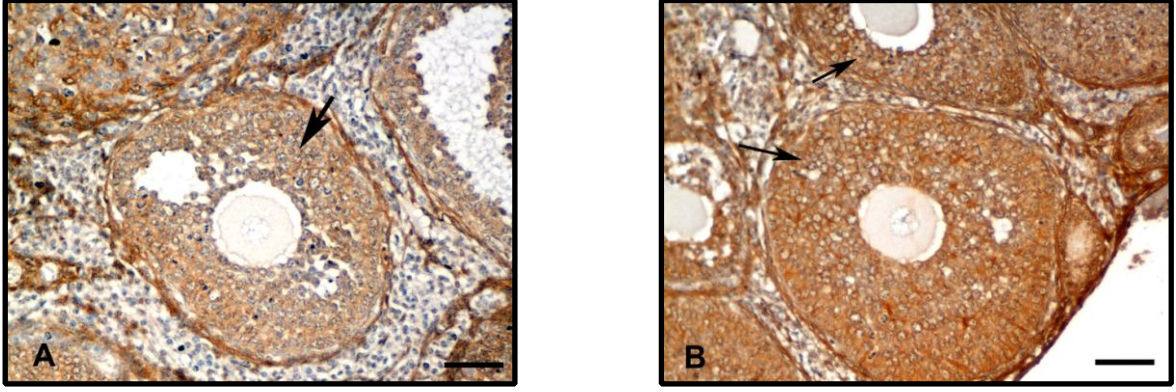
Notch 2 protein ekspresyonu hücrelerin sitoplazmalarında tespit edildi. Ovaryum dokusunda Notch 2 protein ekspresyonu tüm follüküllerin granuloza ve teka hücrelerinde, ovaryum yüzey epitel hücreleri ve korpus luteumlarda belirlendi (Şekil- 12) . Tüm grupların intersitisyel hücrelerinde Notch 2 protein ekspresyonu belirlenmezken, oosit sitoplazmalarında ve atretik follüküllerin granuloza hücrelerinde çok zayıf şiddette (+1) immunreaksiyon gözlemlendi. Yüzey epitel hücrelerinde, follüküllerin teka hücrelerinde ve

korpus luteum hücrelerinde ise şiddetli (+3) boyanma gözlemlendi. Reaksiyon şiddeti bakımından granuloza hücrelerinin, teka hücrelerine ve korpus luteumlara göre daha zayıf immunreaksiyon gösterdiği belirlendi.

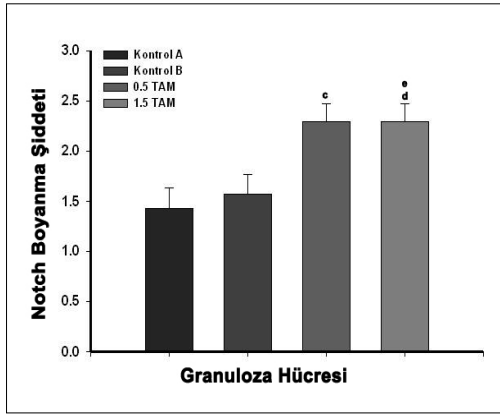
Gruplar arasında, Notch 2 boyanma şiddeti bakımından farklılıklar, granuloza hücrelerinde ve bu farklılık özellikle kontrol gruplarıyla, 0.5 TAM ve 1.5 TAM grupları arasında daha belirgindi (Şekil- 13A, B) . Gruplar arasında granuloza hücrelerinde Notch 2 ekspresyonu kontrol A grubunda $1,43 \pm 0,20$, kontrol B grubunda $1,57 \pm 0,20$, 0.5 TAM grubunda $2,29 \pm 0,18$, 1.5 TAM grubunda $2,29 \pm 0,18$ olarak saptandı. İstatistiksel değerlendirme sonucunda, 0.5 TAM grubu kontrol A ve kontrol B grupları ile $p \leq 0,05$ düzeyinde, 1.5 TAM grubu ise kontrol A ile $p \leq 0,05$ düzeyinde, kontrol B ile $p \leq 0,01$ düzeyinde önem göstermektedir (Şekil- 14) .



Şekil- 12: Kontrol A grubunda Notch 2 immunreaksiyonunun genel görünümü. Bar 200 μm .



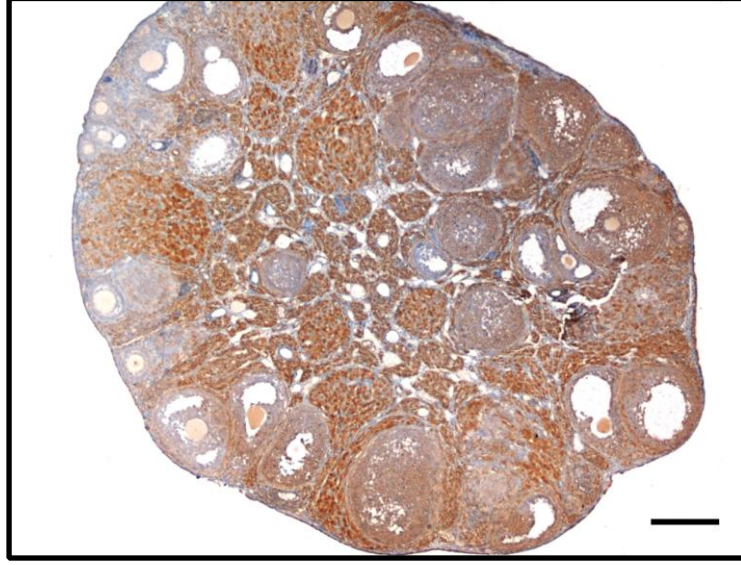
Şekil- 13: (A) kontrol A grubu granuloza hücrelerinde orta şiddette (+2) , (B) 1.5 TAM grubunda şiddetli (+3) Notch 2 immunreaksiyon. Bar 100 µm.



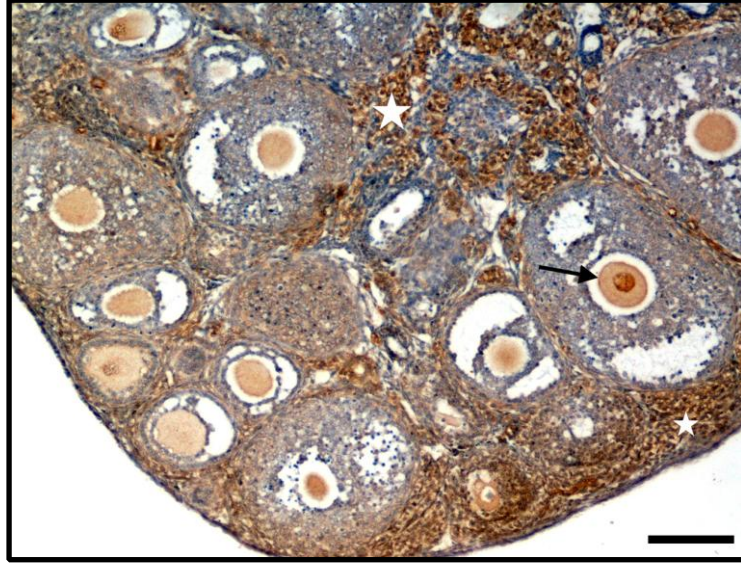
Şekil- 14: Folliküllerin granuloza hücrelerinde Notch 2 boyanma şiddeti. **c**, kontrol A ve kontrol B'den farklı ($p \leq 0,05$) , **d**, kontrol A' dan farklı ($p \leq 0,05$) , **e**, kontrol B' den farklı ($p \leq 0,01$) .

Jagget 1 Değerlendirmeleri

Ovaryum dokusunda Jagget 1 başlıca sağlıklı folliküllerin oosit sitoplazmasında, intersitisyel hücrelerde, korpus luteum hücrelerinde ve folliküllerin teka hücrelerinde gözlemlendi (Şekil- 15) . Ayrıca bazı folliküllerin granuloza hücrelerinde zayıf şiddette pozitif reaksiyon gözlemlendi. İmmunreaksiyon, atretik folliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde ayrıca yüzey epitel hücrelerinde gözlemlenmedi. Jagget 1 protein ekspresyonu hücre sitoplazmalarında belirlendi. Reaksiyon şiddeti bakımından gruplar arasında farklılık belirlenmedi. Tüm gruplarda intersitisyel hücrelerde ve korpus luteum hücrelerinde şiddetli (+3) , folliküllerin teka hücrelerinde ve oosit sitoplazmasında ise orta şiddette reaksiyon (+2) gözlemlendi (Şekil- 16) .



Şekil- 15: Jagget 1 immunreaksiyonun ovaryumdaki lokalizasyonu. Bar 200 μm .



Şekil- 16: 1.5 TAM grubunda oosit sitoplazmasında (ok) ve intersitisyel hücrelerde (yıldızlar) Jagget 1 immunreaksiyon. Bar 100 μm .

TARTIŞMA VE SONUÇ

Tamoksifen östrojen reseptör pozitif meme kanserlerinde tedavi amacıyla çok sık kullanılan seçici östrojen reseptör modülatörlerinden biridir. TAM dokular üzerinde farklı biyolojik aktiviteye sahiptir ve doku spesifik olarak östrojen agonist veya östrojen antagonist etkiler gösterir. TAM' ın bu etkileri uygulama süresine ve dozuna bağlı olarak değişmektedir (25, 85) .

TAM' ın diğer SERM bileşiklerine benzer olarak, yem tüketimi, enerji balansı, vücut ağırlığı yönünden östrojen agonist olarak rol oynadığı bildirilmektedir (86) .

Çalışmamızda gruplar arasında canlı ağırlık kazancı ve ovaryum ağırlıkları bakımından istatistiksel anlamda önemli bir farklılık gözlenmedi, bununla birlikte yüksek doz TAM uygulanan grupta diğer gruplara göre canlı ağırlık kazancının yüksek olduğu belirlendi.

Bizim çalışmamıza benzer olarak Hoskin ve arkadaşları (87) , TAM uygulanan premenapoz kadınlarda canlı ağırlık kazancının arttığını bildirmişlerdir. Ayrıca daha önceki çalışmalarda TAM gibi SERM' lerin gelişimi etkilediği bildirilmiştir (88, 89) .

Çalışmamızda uygulanan yüksek doz TAM' ın canlı ağırlık üzerine östrojen agonist etki gösterdiğini düşünmekteyiz. Ovaryum ağırlıkları ise canlı ağırlık kazancının aksine, yüksek doz TAM uygulanan grupta, kontrol gruplarına göre azaldığı fakat düşük doz TAM' ın ovaryum ağırlığı üzerine etkisi olmadığı belirlendi. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak Tsujioka ve arkadaşları (25) , 2 ve 4 hafta boyunca farklı dozlarda oral olarak TAM uygulanan hayvanlarda ovaryum ağırlığının azaldığını gözlemişlerdir. Çalışmamızda uygulanan TAM dozlarının gözlediğimiz ovaryum morfolojisiyle ilgili olarak ovaryum üzerinde olumsuz etki yaptığını düşünmekteyiz.

Sunulan çalışmada TAM' ın sağlıklı ve atretik follikül sayıları üzerine etkisini belirlemek için ovaryum kesitlerine üçlü boyama ve Tunel boyama yöntemi uygulandı. Buna göre TAM uygulanan gruplarda diğer kontrol gruplarına göre primordiyal follikül sayısının yüksek, sağlıklı antral follikül sayısının düşük olduğu belirlendi. Bizim sonuçlarımıza benzer olarak Kossoy ve arkadaşları (85) , meme tümörlü ratlara TAM uygulayarak, TAM uygulanan gruplarda primordiyal follikül sayısının ve atretik follikül sayısının yüksek, korpus luteum sayısının ise düşük olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bazı araştırmalar diğer bir SERM bileşiği olan Raloksifen uygulamasının, farelerde follikül gelişimini baskıladığını, korpus luteum sayısını azalttığını belirterek, ovaryumda anovulator hemorajik follikülleri gözlemişlerdir (11, 90) . Tsujioka ve arkadaşları (25)

farklı konsantrasyonlarda (0.005, 0.03 ve 0.2 mg/kg/günlük oral) TAM' ı 2 ve 4 hafta sürecince erişkin ratlara uygulayarak TAM uygulanan gruplarda doza bağlı olarak atretik folikül sayısının arttığını, korpus luteum sayısının azaldığını belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda da araştırmalara (11, 85) benzer olarak TAM uygulanan gruplarda, korpus luteum sayısının kontrol gruplarına göre düşük, atretik follikül sayısının ise yüksek olduğu, Tsujioka ve arkadaşlarının (25) bildirdiği gibi, ovaryumda follikül gelişiminin baskılandığı ve antral follikül sayısının azaldığı gözlemlendi. TAM' ın follikül gelişimi üzerine etkisi follikülün her safhasında, primordiyalden primere, primerden preantral folliküllere ya da preantralden antrale geçiş sırasında olabilir. Sunulan çalışmada TAM' ın follikülogenezis üzerine etkisi, follikül sayılarının istatistiksel değerlendirmesine göre preantral folliküllerin antral folliküllere geçiş döneminde gözlenmiştir. Bizim çalışmamızın aksine, son yıllarda Mahran ve arkadaşları (91) ratlara 1 mg/kg dozda uyguladığı TAM' ın, radyoterapinin etkilerine karşı koruyucu bir rol oynadığını, radyoterapinin oluşturduğu düzensiz hormon seviyesini TAM' ın düzenlediğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada ayrıca TAM uygulanan grupta primordiyal ve antral follikül sayılarının kontrol grubuna göre yüksek olduğu ve TAM' ın ovaryum follikül gelişimini uyardığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise follikülogenezisin baskılandığı gözlenmiştir. Bu farklılığın uygulanan TAM dozuyla ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca Ting ve arkadaşları (92) bazı kemoterapitik ajanların ve çevresel toksik ajan olan DMBA' nın ovaryumda oluşturduğu follikül hasarına karşı TAM' ın koruyucu rol oynadığını, ovaryumda primordiyal follikül rezervinin korunduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun hipotalamus-hipofiz-ovaryum döngüsünün bozulmasıyla, TAM' ın GnRH agonist etki göstererek follikül gelişimini baskıladığını ileri sürmüşlerdir. Bu sebeple premenapoz döneminde kemoterapi gören kadınlarda fertilitenin ve ovaryum fonksiyonlarının devamı için TAM' ın kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da primordiyal follikül sayısı TAM uygulanan gruplarda, kontrol gruplara göre yüksek gözlenmiştir. Yapılan taramalarda, TAM' ın ovaryum üzerine etkisinin agonist ya da antagonist olabileceği ve bunun uygulama süresi ve doza bağlı olarak değişebileceği bildirilmektedir (25, 85). Antiöstrojenik TAM mekanizmasında, TAM' ın geçici olarak hipotalamusta östrojen reseptörünü bloklayarak hipotalamusa ulaşan serum östrojen seviyesini düşürdüğünü bunun GnRH, dolaylı olarak hipofiz gonadotropin sekresyonunu arttırarak ovaryumu uyardığı ve follikül gelişimini tetiklediği bildirilmektedir (93, 94). Bir başka araştırmada da (95) TAM' ın ovaryum üzerine direkt etki ederek östrodiol seviyesinin yükseldiği ve ovaryumda follikül kistlerinin gelişimine sebep olduğu belirtilmektedir.

Melchor ve arkadaşları (96) , premenopoz meme kanserli hastalarda TAM tedavi sonrası östradiolde artış, menopoz sonrası kadınlarda ise FSH' da azalma gözlemiştir. Ayrıca Donath ve arkadaşları (97) TAM uygulanan ratlarda FSH ve LH seviyesinin düştüğünü belirtmişlerdir. Bu sonuçlara benzer olarak Terada ve arkadaşları (95) , düşük doz TAM uygulanan premenapoz kadınlarda serum östrodiol seviyesinin yükseldiğini buna karşın FSH ve LH seviyesinin düştüğünü bildirmişlerdir. Bununla birlikte uzun süreli TAM uygulamasının hiperöstrojenik etkiye sebep olarak premenapoz ve postmenapoz dönemdeki kadınların ovaryumunda kist oluşumuna neden olduğu bildirilmektedir (98) .

Çalışmamızda TAM uygulanan gruplarda ovaryum morfolojisi incelendiğinde, ovulasyonun çok az dolayısıyla korpus luteumun az olması, çok sayıda atretik ve kistik preantral follüküllerin görülmesi, stromanın geniş yer alması ratlarda polykistik over sendromuna (PCOS) benzer morfolojik sonuçları göstermektedir (99) . Östrojenler follikül gelişimi üzerine pozitif etki gösterirken yüksek dozlarda uygulandığında Chakravorty ve arkadaşlarının (100) belirttiği gibi follikül gelişimini bozabilirler.

Bu literatür bilgilerinin ışığında, çalışmamızda kullanılan TAM dozlarının ovaryum üzerine hiperöstrojenik etki gösterdiğini ve östrodiolün pozitif feedback etkisini baskılayarak gonadotropin sekresyonunu dolayısıyla follikül gelişimini baskıladığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda gruplar arasında hücre proliferasyonunu belirlemek için immunohistokimyasal olarak Ki 67 protein ekspresyonu incelendi. Ki 67 antijeni hücre siklusunun aktif fazında, hücrelerin onarımı sırasında veya hücre siklusunun başlamasıyla ekspre edilmektedir (101) . Çalışmamızda Ki 67 pozitif reaksiyon, antral ve sekonder follüküllerin granuloza hücrelerinde gözlemlendi. Atretik follüküllerin granuloza hücrelerinde ise immunreaksiyon gözlenmedi. Çalışmamızda TAM uygulanan gruplarda, proliferasyon gösteren follüküllerin yüzdesinin kontrol gruplarına göre düşük olduğu belirlendi. Ki 67 proteinin özellikle tümör dokularında ekspresyonu artmaktadır. Koruyucu ya da tedavi amacıyla TAM kullanan kadınlarda endometrial kanser riskinin arttığı, dolayısıyla bu dokularda Ki 67 immunreaksiyonunun arttığı (102) ayrıca erkek ve dişi ratlarda TAM' ın karaciğer kanserine (103) , neonatal ve erişkin ratlarda uterus tümörüne sebep olduğu bildirilmektedir (104, 105) . Cirpan ve arkadaşları (106) , TAM uygulanan ratlarda ovaryum ve uterustaki proliferasyon ve apoptozis markerlerinin immunohistokimyasal değerlendirmesini yaparak, TAM uygulamasının korpus luteum ve endometriyum bezlerinde de Ki 67 ekspresyonunun önemli oranda yüksek olduğunu gözlemiştir. Bununla birlikte TAM uygulamasının granuloza hücre tümörüne sebep olduğu ile ilgili

veriler de bulunmaktadır (107) .

Çalışmamızda TAM gruplarında atrezinin fazla olması, ovaryumda kistlerin gözlenmesi, antral follikül sayılarının az olması, follikül gelişiminin baskılandığını dolayısıyla follikül proliferasyonunda rol oynayan Ki 67 protein ekspresyonu gösteren folliküllerin oranının kontrol grubuna göre TAM uygulanan gruplarda düşük olmasını kaçınılmaz kılmaktadır.

Çalışmamızda ayrıca, TAM' in ovaryum üzerine Notch sinyal yolağı üzerinden etkili olup olmadığını belirlemek için ovaryum kesitlerinde Notch 2 ve onun ligandı Jagget 1' in protein ekspresyonu ilk defa tarafımızca incelenmiştir.

Memelilerde, Notch sinyal mekanizması; dört reseptör (Notch 1-4) ve beş Notch ligandını (Jagget 1, Jagget 2, Delta-like 1, Delta-like 3, Delta-like 4) içerir (26) . Notch sinyal yolu omurgalılarda merkezi sinir sistemi, kardiovasküler sistem, pankreas, mide, kemik, ovaryum gibi organların gelişimi sürecinde dokularda apoptozis, farklılaşma ve proliferasyon olaylarını düzenler. Bununla birlikte Notch sinyal yolağının ovaryum kanserleriyle birlikte ve pek çok kanser türlerinde etkili olduğu ve kanser tedavilerinde Notch inhibitörlerinin kullanılması gerektiği belirtilir (108, 109) . Notch 2' nin granuloza hücrelerinde, Jagget 1' in ise oosit sitoplazmasında ifade edildiği ve Notch sinyal yolağının hücre-hücre bağlantısıyla aktifleşerek, bu proteinlerin oosit ve granuloza hücre arasındaki bağlantıda rol oynadığı bildirilmektedir (78, 110) . Johnson ve arkadaşları (78) , memeli ovaryumunda Notch reseptör ve ligandlarını in situ hibridizasyon yöntemiyle belirleyerek Notch 2, 3 ve Jagget 2' yi gelişen folliküllerin granuloza hücrelerinde, Jagget 1' i ise oosit sitoplazmasında gözlemişler ve memeli follikülogenezisin düzenlenmesinde Notch sinyal yolağının önemli rol oynadığını belirtmişlerdir. Ayrıca Notch 2 reseptör yüksek seviyede neonatal ve erişkin fare ovaryumunun pregranuloza ve granuloza hücrelerinde gözlenmiştir (111, 112) . Son yıllarda Xu ve Gridley (113) , ilk defa genetik fonksiyon kayıplı bir çalışmada, Notch reseptörlerinin memeli oogenezis ve ovaryum gelişiminde önemli fizyolojik rol oynadığını ortaya koymuşlardır. Ayrıca *ex vivo* neonatal fare ovaryum kültürlerinde γ -secretase inhibitörlerle yapılan çalışmalarda primordiyal follikül oluşumu ve granuloza hücre proliferasyonunda defektler belirlenmiştir (111, 112) . Aynı zamanda Jovanovic ve arkadaşları (114) , Notch sinyalizasyon yolunun bloklanması ile fare ovaryumlarında folliküllerin gelişiminin bozulacağını belirtmişlerdir.

Notch reseptör ve ligandlarının ovaryumda follikülogenezis üzerinde etkili olduğu görülmektedir fakat yapılan taramalarda TAM' in Notch sinyal yolağı üzerine etkisiyle ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda Notch 2 immunreaksiyonu tüm

grupların granuloza hücrelerinde, teka hücrelerinde ve korpus luteumda gözlemlendi. İntersitisyel hücrelerde immunreaksiyon gözlenmezken, oosit sitoplazmalarında ve atretik folliküllerde ise çok zayıf Notch 2 protein ekspresyonu belirlendi. Çalışmamızda Notch 2'nin ovaryumdaki lokalizasyonu diğer araştırmalara (78, 110) benzer olarak gözlenmiştir. İmmunreaksiyon şiddeti bakımından ise Notch 2 immunreaksiyonu, TAM uygulanan grupların granuloza hücrelerinde kontrol gruplarına göre daha şiddetli belirlendi. Bu durumun TAM'ın ovaryum üzerine östrojen agonist etkisinden kaynaklanabileceğini ve yüksek seviyede östrojenik etkiden dolayı granuloza hücrelerinde Notch 2'nin ekspresyonunu arttırdığını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda Jagget 1 ekspresyonu, Johnson ve arkadaşlarının (78) erişkin farelerde gözlediği gibi oosit sitoplazmasında belirlendi. Bunun dışında tüm gruplarda intersitisyel hücrelerde, korpus luteum hücrelerinde şiddetli (+3), folliküllerin teka hücrelerinde ise orta şiddette reaksiyon (+2) belirlendi. Skrtic ve arkadaşları (99) erişkin olmayan sıçanlarda deneysel olarak polykistik over sendromu (PCOS) oluşturarak, bizim sonuçlarımıza benzer olarak Jagget 1 immunreaksiyonunu, oosit sitoplazmasında, granuloza hücrelerinde ve luteal hücrelerde farklı şiddetlerde pozitif olarak gözlerken atretik ve preantral folliküllerde çok zayıf şiddette belirlemişlerdir. Ayrıca Vorontchikhina ve arkadaşları (79), Jagget 1 immunreaksiyonu korpus luteum içerisindeki endotel hücrelerinde gözlemişlerdir. Çalışmamızda da ovaryum dokusunda diğer araştırmalara benzer olarak (79, 99) Jagget 1 protein lokalizasyonu belirlenmiştir. Çalışmamızda Jagget 1 immunreaksiyonunun şiddeti bakımından, gruplar arasında farklılık gözlenmedi. Elde edilen bu sonuç TAM'ın ovaryum üzerine östrojen agonist etkisi olduğu düşünüldüğünde, Rizzo ve arkadaşlarının da (27) belirttiği gibi östrodiolün Jagget 1 ekspresyonu üzerine etkili olmadığını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak çalışmamızda uygulanan yüksek doz TAM'ın canlı ağırlığı arttırdığı, ovaryum ağırlığını ise azalttığı gözlenmiştir. İki TAM grubunda da, primordiyal follikül sayısının yüksek olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte TAM'ın gonadotropine duyarlı gelişmekte olan folliküller üzerine etkili olduğu ve follikül gelişimini baskıladığı gözlenmiştir. TAM'ın granuloza hücrelerinde Notch 2 ekspresyonu üzerine etkili olduğu fakat Jagget 1 üzerine etkili olmadığı belirlenmiştir. TAM'ın folliküller üzerine yaptığı etkilerde Notch sinyal yolağının rolü olabilir.

KAYNAKLAR

1. BALLA A, DANILOVICH N, YANG Y, SAIRAM MR. Dynamics of Ovarian Development in The Forko Immature Mouse: Structural and Functional Implications for Ovarian Reserve. *Biology of Reproduction*, 69 (4) : 1281-1293, 2003.
2. OKTEM O, OKTAY K. Preservation of Menstrual Function in Adolescent and Young Females. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135: 237-243, 2008.
3. BLUMENFELD Z, DANN E, AVIVI R, EPELBAUM R, ROWE JM. Fertility After Treatment for Hodgkin's Disease. *Annals of Oncology*, 13 (1) : 138-147, 2002.
4. FONG SL, LUGTENBURG PJ, SCHIPPER I, THEMME APN, JONG FH, SONNEVELD P. Anti-Müllerian Hormone as A Marker of Ovarian Function in Women After Chemotherapy and Radiotherapy for Haematological Malignancies. *Human Reproduction*, 23: 674-678, 2008.
5. MEIROW D, NUGENT D. The Effects of Radiotherapy and Chemotherapy on Female Reproduction. *Human Reproduction Update*, 7 (6) : 535-543, 2001.
6. GIUSEPPE L, ATTILIO G, EDOARDO DN, LOREDANA G, CRISTINA L, VINCENZO L. Ovarian Function After Cancer Treatment in Young Women Affected Hodgkin Disease. *Hematol*, 12 (2) : 141-147, 2007.
7. GREENLEE RT, MURRAY T, BOLDEN S, WINGO PA. Cancer statistics 2000. *CA: A Cancer Journal for Clinicals*, 50 (1) : 7-33, 2000.
8. PUJOL P, DAURES JP, THEZENAS S, GUILLEUX F, ROUANET P, GRENIER J. Changing estrogen and progesterone receptor patterns in breast carcinoma during the menstrual cycle and menopause. *Cancer*, 83 (4) : 698-705, 1998.
9. WYLD DK, CHESTER JD, PERREN TJ. Endocrine aspects of the clinical management of breast cancer-current issues. *Endocrine- Related Cancer*, 5 (2) : 97-110, 1998.
10. OKTAY K, BUYUK E, DAVIS O, YERMAKOVA I, VEECK L, ROSENWAKS Z. Fertility Preservation in Breast Cancer Patients: IVF and Embryo Cryopreservation After Ovarian Stimulation With Tamoksifen. *Human Reproduction*, 18 (1) : 90-95, 2003.
11. LONG GG, COHEN IR, GRIES CL, YOUNG JK, FRANCIS PC, CAPEN CC. Proliferative Lesions of Ovarian Granulosa Cells and Reversible Hormonal Changes Induced in Rats by A Selective Estrogen Receptor Modulator. *Toxicologic Pathology*, 29: 719-726, 2001.
12. JORDAN VC, O'MALLEY BW. Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25: 5815-5824, 2007.

- 13. RIGGS BL, HARTMANN LC.** Selective Estrogen-Receptor Modulators-Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *The New England Journal of Medicine*, 348: 618-629, 2003.
- 14. PETERSON WF, NOVAK ER.** Endometrial Polyps. *Obstetrics & Gynecology*, 8 (1) : 40-49, 1956.
- 15. WOLF DM, JORDAN VC.** Gynecologic Complications Associated with Long-Term Adjuvant Tamoxifen Therapy for Breast Cancer. *Gynecologic Oncology*, 45 (2) : 118-128, 1992.
- 16. BERNSTEIN L, DEAPEN D, CERHAN JR.** Tamoxifen Therapy For Breast Cancer and Endometrial Cancer Risk. *The Journal of The National Cancer Institute*, 91 (19) : 1654-1662, 1999.
- 17. LAHTI E, VUOPALA S, KAAUPPILA A.** Maturation of Vaginal and Endometrial Epithelium in Postmenopausal Breast Cancer Patients Receiving Long-Term Tamoxifen. *Gynecologic Oncology*, 55: 410-414, 1994.
- 18. NASU K, ARIMA K, YOSHIMATSU J.** Adenomyomatous Polyp of The Uterus in A Patient Receiving Tamoxifen. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 27: 350-352, 1997.
- 19. COHEN I, BEYTH Y, TEPPER R.** Adenomyosis in Postmenopausal Breast Cancer Patients Treated with Tamoxifen: A New Entity? . *Gynecologic Oncology*, 58: 86-91, 1995.
- 20. LEO L, LANZA A, RE A.** Leiomyomas in patients receiving tamoxifen. *Clinical and experimental obstetrics & gynecology*, 21: 94-98, 1994.
- 21. BARBIERI RL, FERRACCI AL, DROESCH JN.** Ovarian Torsion in A Premenopausal Woman Treated with Tamoxifen for Breast Cancer. *Fertility and Sterility*, 59: 459-460, 1993.
- 22. SHUSHAN A, PERETZ T, UZIELYB.** Ovarian Cysts in Premenopausal and Postmenopausal Tamoxifen-Treated Women with Breast Cancer, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 174: 141-144, 1996.
- 23. METINDIR J, ASLAN S, BILIR G.** Ovarian Cyst Formation in Patients Using Tamoxifen for Breast Cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 35: 607-611, 2005.
- 24. ROSHANGAR L, RAD JS, AFSORDEH K.** Maternal Tamoxifen Treatment Alters Oocyte Differentiation in the Neonatal Mice: Inhibition of Oocyte Development and Decreased Folliculogenesis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, 36: 224-231, 2010.
- 25. TSUJIOKA S, BAN Y, WISE LD, TSUCHIYA T, SATO T, MATSUE K, IKEDA T, SASAKI M, NISHIKIBE M.** Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 3) Effects of 2- or 4- week repeated-dose toxicity and fertility studies with tamoxifen in female rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 34 (1) : 43-51, 2009.

- 26.** ARTAVANIS-TSAKONAS S, RAND M. D, LAKE RJ. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration In Development. *Science*, 284 (5415) : 770-776, 1999.
- 27.** RIZZO P, MIAO H, D'SOUZA G, OSIPO C, SONG LL, YUN J, ZHAO H, MASCARENHAS J, WYATT D, ANTICO G, HAO L, YAO K, RAJAN P, HICKS C, SIZIOPIKOU K, SELVAGGI S, BASHIR A, BHANDARI D, MARCHESE A, LENDAHL U, QIN JZ, TONETTI DA, ALBAIN K, NICKOLOFF BJ, MIELE L. Cross-talk Between Notch And The Estrogen Receptor in Breast Cancer Suggests Novel Therapeutic Approaches. *Cancer Research*, 68 (13) : 5226-5235, 2008.
- 28.** WANG Z, ZHANG Y, BANERJEE S, LI Y, SARKAR FH. Inhibition of Nuclear Factor Kappab Activity By Genistein is Mediated Via Notch-1 Signaling Pathway in Pancreatic Cancer Cells. *International Journal of Cancer*, 118 (8) : 1930-1936, 2006.
- 29.** WANG Z, LI Y, AHMAD A, BANERJEE S, AZMI AS, KONG D, WOJEWODA C, MIELE L, SARKAR FH. Down-Regulation of Notch-1 is Associated with Akt and FoxM1 in Inducing Cell Growth Inhibition and Apoptosis in Prostate Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112 (1) : 78-88, 2011.
- 30.** BENDER RA, ZHOU L, WILKARS W, FESTER L, LANOWSKI JS, PAYSAN D, KONIG A, RUNE GM. Roles of 17 β -estradiol Involve Regulation of Reelin Expression and Synaptogenesis in the Dentate Gyrus. *Cerebral Cortex*, 20 (12) : 2985-2995, 2010.
- 31.** BABA K, OKADA K, KINOSHITA T, IMAOKA S. Bisphenol A Disrupts Notch Signaling by Inhibiting Gamma-Secretase Activity and Causes Eye Dysplasia of *Xenopus Laevis*. *Toxicol Sci*, 108 (2) : 344-355, 2009.
- 32.** SOARES R, BALOGH G, GUO S, GARTNER F, RUSSO J, SCHMITT F. Evidence for the notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis. *Molecular Endocrinology*, 18 (9) : 2333-2343, 2004.
- 33.** GİRĞİN A, ALABAY B, LİMAN N, ÖZFİLİZ N, GÜLMEZ N, ÖZCAN Z, YÖRÜK M, ERDOST H, ASLAN Ş, ERGÜN L, ZİK B. Veteriner Özel Histoloji, Editör: Özer A, 2. Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, sayfa 219-231, 2010.
- 34.** JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J: Temel Histoloji. (Türkçe Çeviri) 10. baskı. Nobel Tıp Kitap Evleri, 2003.
- 35.** TANYOLAÇ A. Özel Histoloji, Yorum yayıncılık, Ankara, sayfa 144-157, 1999.
- 36.** ROSS HM, REİTH JE. Histology a text and atlas, 1nd edition, Harper Int Ed, New York, Cambridge, Philadelphia, San Francisco, page 658-666, 1985.
- 37.** THOMPSON FN. Duke`s Physiology of Domestic Animals, Twelfth edition, In Reece WO, Ed, Cornell University Press, NewYork, page 677-703, 2004.
- 38.** ROSS HM, KAYE GI, PAWLINA W. Histology: A Text and Atlas, 4nd edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, page 726-757, 2003.

- 39.** KAΪΠΪA A, HSUEH AJ. Regulation of Ovarian Follicle Atresia. *Annual Review of Physiology*, 59: 349-363, 1997.
- 40.** STERNBERG SS. *Histology for Pathologists*, 2nd Edition, New York, Philadelphia: Lippincott-Raven, Chapter 40, 1997.
- 41.** DEVINE PJ, PAYNE CM, MCCUSKEY MK, HOYER PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 63: 1245-1252, 2000.
- 42.** AILEN E, DOISY EA. An ovarian hormone: Preliminary report on its localisation, extraction and partial purification and action in test animals. *Jama*, 81: 819-821, 1923.
- 43.** JENSEN EV, BLOCK GE, SMITH S, KYSER K, DESOMBRE ER. Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Journal of The National Cancer Institute Monographs*, 34: 55-70, 1971.
- 44.** LEMER LI, HOLTHAUS FJ, THOMPSON CR. A nonsteroidal estrogen antagonist 1-p-2 diethylaminoethoxyphenyl -1-phenyl 2-p- methoxy phenyethanol. *Endocrinology*, 63: 215-318, 1958.
- 45.** COLE MP, JONES CTA, TODD IDH: A new antiestrogenic agent in last breast cancer: An Early Clinical Appraisal of ICI46474. *British Journal of Cancer*, 25: 270-275, 1971.
- 46.** Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31.000 recurrences and 24.000 deaths among 75.000 women. *Lancet*, 339 (8784) : 1-15; 339 (8785) : 71-85, 1992.
- 47.** WARD HWC. Antiestrogen therapy for breast cancer- A trial of tamoxifen at two dose levels. *British Medical Journal*, 1: 13-14, 1973.
- 48.** SAARTO T, BLOMQVIST C, EHNHOLM C. Anti atherogenic effect of adjuvant antiestrogens: A randomised trial comparing the effects of tamoxifen and toremifene on plasma lipid levels in postmenopausal women with node-positive breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 14: 429-433, 1996.
- 49.** LOVE RR, BARDEN HS, MAZESS RB, EPSTEIN S, CHAPPELL RJ. Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women after 5 years. *Archives of Internal Medicine*, 154: 2585-2588, 1994.
- 50.** DECENSI A, FONTANA V, BRUNO S, GUSTAVINO C, GATTESCHI B, COSTA A. Effect of tamoxifen on endometrial proliferation. *Journal of Clinical Oncology*, 14: 434-440, 1996.
- 51.** BARAKAT RR, GILEWSKI TA, SAIGO PE et al. The effect of adjuvant tamoxifen on the endometrium in women with breast cancer: An interim analysis of a prospective study (abstract) . *American Society of Clinical Oncology*, 779, 1995.

- 52.** SUNDERLAND MC, OSBORNE CK. Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: A review. *Journal of Clinical Oncology*, 9: 1283-1297, 1991.
- 53.** GOLDRISCH A, GELBER RD, CASTIGLIONE M. For The International Breast Cancer Study Group. Adjuvant therapy of breast cancer. *European Journal of Cancer*, 27: 399-402, 1991.
- 54.** POWLES TJ, TILLYER CR, JONES AL. Prevention of breast cancer with tamoxifen-an update on the Royal Marsden Hospital Pilot Programme. *European Journal of Cancer*, 26: 680-684, 1990.
- 55.** FENTIMAN IS, POWLES TJ. Tamoxifen and benign breast problems. *The Lancet*, 2: 1010-1017, 1987.
- 56.** WESELEY AC, MELNICK H. Tamoxifen in clomiphene-resistant hypothalamic anovulation. *International Journal of Fertility*, 32: 226-228, 1987.
- 57.** TRICHOPOULOS D, HSIEH C, MAC MAHON B. Age at first birth and breast cancer risk. *International Journal of Cancer*, 31: 701-704, 1983.
- 58.** LIPPMAN ME, BOLAN G. Oestrogen responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Nature*, 256: 592-593, 1975.
- 59.** OSBORNE CK, BOLDT DH, CLARK GH, TRENT JM. Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer*, 43: 3583-3585, 1983.
- 60.** SUTHERLAND RL, REDDEL RR, GREEN MD: Effects of oestrogens on cell proliferation and cell cycle kinetics: A hypothesis on the cell cycle effects of antiestrogens. *European Journal of Cancer and Clinical Oncology*, 19: 307-318, 1983.
- 61.** GILMAN AG. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 9 th edition, McGraw Hill, New York, page 1275, 1996.
- 62.** JORDAN VC, DIX CJ, ALLEN KE. The effectiveness of long term treatment in laboratory model for adjuvant hormone therapy of breast cancer. *Adjuvant therapy of cancer*, 2: 19-24, 1979.
- 63.** JORDAN VC. Laboratory studies to develop general principles for the adjuvant treatment of breast cancer with antiestrogens: Problem and potential for future clinical applications. *Breast Cancer Research and Treatment*, 3: 73-86, 1983.
- 64.** JORDAN VC. Use of the DMBA- induced rat mammary carcinoma system for the evaluation of tamoxifen as a potential adjuvant therapy. *Endocrinology Related Cancer*, 10: 49-55, 1978.
- 65.** HIGH FA, ZHANG M, PROWELLER A, TU L, PARMACEK MS, PEAR WS, EPSTEIN JA. An essential role for Notch in neural crest during cardiovascular development and smooth muscle differentiation. *Journal of Clinical Investigation*, 117: 353-363, 2007.

- 66.** SHIH IEM, WANG TL. Notch signaling, gamma-secretase inhibitors, and cancer therapy. *Cancer Research*, 67: 1879-1882, 2007.
- 67.** BRAY SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 7: 678-689, 2006.
- 68.** ISO T, KEDES L, HAMAMORI Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology* 194: 237-255, 2003.
- 69.** SUSAN T. Notch and Wnt Signaling, Physiological Stimuli and Postnatal Myogenesis. *International Journal of Biological Sciences*, 6 (3) : 268-281, 2010.
- 70.** TAKESHITA K, SATOH M, LI M, SILVER M, LIMBOURG FP, MUKAI Y, RIKITAKE Y, RADTKE F, GRIDLEY T, LOSORDO DW, LIAO JK. Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circulation Research*, 100: 70-78, 2007.
- 71.** BOLÓS V, GREGO-BESSA J, DE LA POMPA JL. Notch signaling in development and cancer. *Endocrine Reviews*, 28: 339-363, 2007.
- 72.** GRIDLEY T. Notch signaling in vascular development and physiology. *Development*, 134 (15) : 2709-2718, 2007.
- 73.** RANGANATHAN P, WEAVER KL, CAPOBIANCO AJ. Notch signalling in solid tumours: a little bit of everything but not all the time. *Nature Reviews Cancer* 11(5) : 338-351, 2011.
- 74.** LOBRY C, OH P, AIFANTIS I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *Journal of Experimental Medicine*, 208 (10) : 1931-1935, 2011.
- 75.** REEDIJK M. Notch signaling and breast cancer. *Advances in experimental medicine and biology*, 727: 241-257, 2012.
- 76.** GUO S, LIU M, GONZALEZ-PEREZ RR. Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1815: 197-213, 2011.
- 77.** HARRISON H, FARNIE G, BRENNAN KR, CLARKE RB. Breast cancer stem cells: something out of notching. *Cancer Research*, 70: 8973-8976, 2010.
- 78.** JOHNSON J, ESPINOZA T, MCGAUGHEY RW, RAWLS A, WILSON-RAWLS J. Notch pathway genes are expressed in mammalian ovarian follicles. *Mechanisms of Development*, 109: 355-361, 2001.
- 79.** VORONTCHIKHINA MA, ZIMMERMANN RC, SHAWBER CJ, TANG H, KITAJEWSKI J. Unique patterns of Notch1, Notch4 and Jagged1 expression in ovarian vessels during folliculogenesis and corpus luteum formation. *Gene Expression Patterns* 5: 701-770, 2005.

- 80.** CROSSMON CA. Modification of Mallory's Connective Tissue Stain with a Discussion of the Principles Involved. *The Anatomical Record*, 69: 33-38, 1937.
- 81.** HYTTEL P, SĪNOWATZ F, VEJLSTED M, BETTERIDGE K. *Essentials of Domestic Animals Embryology*, 1nd, Elsevier Limited, Toronto, page 32-56, 2010.
- 82.** DOLMANS MM, MARTINEZ-MADRID B, GADISSEUX E, GUIOT Y, YUAN W Y, TORRE A, CAMBONI A, ANNE VAN LANGENDONCKT A, DONNEZ J. Short-term transplantation of isolated human ovarian follicles and cortical tissue into nude mice. *Reproduction*, 134: 253-262, 2007.
- 83.** VASKIVUO TE, OTTANDER U, ODUWOLE O, ISOMAA V, VIHKO P, OLOFSSON JI, TAPANAINEN JS. Role of Apoptosis, Apoptosis-Related Factors and 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenases in Human Corpus Luteum Regression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 194: 191-200, 2002.
- 84.** GARRETT WM, GUTHRIE HD. Expression of Androgen Receptors and Steroidogenic Enzymes in Relation to Follicular Growth and Atresia Following Ovulation in Pigs. *Biology of Reproduction*, 55: 949-955, 1996.
- 85.** KOSSOY G, BEN-HUR H, ELHAYANY A, SCHNEIDER DF, KOSSOY N, ZUSMAN I. Effects of tamoxifen and soluble tumor-associated antigens on ovarian structure in mammary tumor-bearing rats. *Oncology Reports*, 14: 1317-1321, 2005.
- 86.** HOYT JA, FISHER LF, BUELKE-SAM JL, FRANCIS PC. The selective estrogen receptor modulator, raloxifene: reproductive assessments following pre-mating exposure in female rats. *Reproductive Toxicology*, 12 (3) : 233-245, 1998.
- 87.** HOSKIN P, ASHLEY S, YARNOLD JR. Weight gain after primary surgery for breast cancer-effect of tamoxifen *Breast Cancer Research and Treatment*. *Breast Cancer Research and Treatment*, 22 (2) : 129-132, 1992.
- 88.** GRAY JM, WADE GN. Food intake, body weight, and adiposity in female rats: actions and interactions of progestins and antiestrogens. *American Journal of Physiology*, 240: 474-481, 1981.
- 89.** WADE GN, HELLER HW. Tamoxifen mimics the effects of estradiol on food intake, body weight, and body composition in rats. *American Journal of Physiology*, 264: 1219-1223, 1993.
- 90.** COHEN IR, SIMS ML, ROBBINS MR, LAKSHMANAN MC, FRANCIS PC, LONG GG. The reversible effects of raloxifene on luteinizing hormone levels and ovarian morphology in mice. *Reproductive Toxicology*, 14: 37-44, 2000.
- 91.** MAHRAN YF, EL-DEMERDASH E, NADA AS, ALI AA, ABDEL-NAIM AB. Insights into the Protective Mechanisms of Tamoxifen in Radiotherapy-Induced Ovarian Follicular Loss: Impact on Insulin-Like Growth Factor 1. *Endocrinology*, 154: 3888-3899, 2013.

- 92.** TING AY, PETROFF BK. Tamoxifen decreases ovarian follicular loss from experimental toxicant DMBA and chemotherapy agents cyclophosphamide and doxorubicin in the rat. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27 (11) : 591-597, 2010.
- 93.** JOTLES CJ, SMOTKIN D, FORD KL, JONES KP. Cystic ovarian necrosis complicating tamoxifen therapy for breast cancer in a premenopausal woman: a case report. *The Journal of Reproductive Medicine*, 35: 299-300, 1990.
- 94.** PLOUFFE L, SIDDHANTI S. The effect of selective estrogen receptor modulators on parameters of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 949: 251-258, 2001.
- 95.** TERADA S, UCHIDE K, SUZUKI N, AKASOFU IL. A follicular cyst during tamoxifen therapy in a premenopausal breast cancer woman. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 35: 62-64, 1993.
- 96.** MELCHOR JC, RODRIGUEZ-ESCUADERO FJ, LUJÁN S, CORCÓSTEGUI B. Variation of Estrogen and Progesterone Receptor Status in Breast Cancer after Tamoxifen Therapy. *Oncology*, 47 (6) : 467-470, 1990.
- 97.** DONATH J, NISHINO Y. Effects of partial versus pure antiestrogens on ovulation and the pituitary-ovarian axis in the rat. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 66 (4) : 247-254, 1998.
- 98.** SEZGIN MI. Gynaecological effects of tamoxifen. *Journal of Clinical Pathology*, 52: 83-88, 1999.
- 99.** SKRTIC A, SOKOLIC L, BOROVECKI A, ROSA J, FENZL V. Immunohistochemical localization of CD 31, NOTCH 1 and JAGGED 1 proteins in experimentally induced polycystic ovaries of immature rats. *Acta Histochemica*, 113: 262-269, 2011.
- 100.** CHAKRAVORTY A, MAHESH VB, AND MILLS TM. Regulation of follicular development by diethylstilboestrol in ovaries of immature rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 92: 307-321, 1991.
- 101.** LELLE RJ. In situ determination of the Ki-67 growth fraction (Ki-67) in human tumors. *Acta Histochemica Supplementband*, 39: 109-124, 1990.
- 102.** SWERDLOW AJ, JONES ME. Tamoxifen treatment for breast cancer and risk of endometrial cancer: a case-control study. *Journal of the National Cancer Institute*, 97: 375-384, 2005.
- 103.** GREAVES P, GOONETILLEKE R, NUNN G, TOPHAM J, ORTON T. Two-year carcinogenicity study of tamoxifen in Alderley Park Wistar-derived rats. *Cancer Research*, 53: 3919-3924, 1993.
- 104.** MÄNTYLÄ E, NIEMINEN L, KARLSSONS. Endometrial cancer induction by tamoxifen in the rat. *European Journal of Cancer*, 31: 14, 1995.

- 105.** PHILLIPS DH, HEWER A, OSBORNE MR, COLE KJ, CHURCHILL C, ARLT VM. Organ specificity of DNA adduct formation by tamoxifen and alpha-hydroxytamoxifen in the rat: implications for understanding the mechanism(s) of tamoxifen carcinogenicity and for human risk assessment. *Mutagenesis*, 20 (4) : 297-303, 2005.
- 106.** CIRPAN T, TEREK MC, ULUKUS M, ULUKUS EC, AKMAN L, KANIT L. Immunohistochemical evaluation of cell proliferation and apoptosis markers in ovaries and uterus of tamoxifen-treated rats. *International Journal of Gynecological Cancer*, 18 (1) : 141-145, 2008.
- 107.** ABAHSSAIN H, KAIROUANI M, GHERMAN R, RABTI HM, ERRIHANI H. Granulosa cell tumor of the ovary and antecedent of adjuvant tamoxifen use for breast cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, 8: 67, 2010.
- 108.** HOPFER O, ZWAHLEN D, FEY MF, AEBI S. The Notch pathway in ovarian carcinomas and adenomas. *British Journal of Cancer*, 93: 709-718, 2005.
- 109.** JUNG SG, KWON YD, SONG JA, BACK MJ, LEE SY, LEE C. Prognostic significance of Notch 3 gene expression in ovarian serous carcinoma. *Cancer Science*, 101 (9) : 1977-1983, 2010.
- 110.** MATZUK MM, BURNS KH, VIVEIROS MM, EPPIG JJ. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. *Science*, 296: 2178-2180, 2002.
- 111.** TROMBLY DJ, WOODRUFF TK, MAYO KE. Suppression of Notch Signaling in the Neonatal Mouse Ovary Decreases Primordial Follicle Formation *Endocrinology*, 150: 1014-1024, 2009.
- 112.** ZHANG CP, YANG JL, ZHANG J, LI L, HUANG L, JI SY, HU ZY, GAO F, LIU YX. Notch signaling is involved in ovarian follicle development by regulating granulosa cell proliferation. *Endocrinology*, 152: 2437-2447, 2011.
- 113.** XU J, GRIDLEY T. Notch 2 is required in somatic cells for breakdown of ovarian germ-cell nests and formation of primordial follicles. *BMC Biology*, 11: 13, 2013.
- 114.** JOVANOVIC VP, SAUER CM, SHAWBER CJ, GOMEZ R, WANG X, SAUER MV, KITAJEWSKI J, ZIMMERMANN RC. Intraovarian regulation of gonadotropin-dependent folliculogenesis depends on notch receptor signaling pathways not involving Delta-like ligand 4 (Dll4) . *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11: 43, 2013.

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçilmesi, planlanması, yürütülmesi ve sonuçlandırılması süresince bilimsel ve manevi desteğini gördüğüm, bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemi sağlayan, benden hoşgörüsünü hiç esirgemeyen, öğrencisi olmaktan mutluluk duyduğum çok değerli hocam Prof. Dr.Berrin ZİK' a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum. Bilgi birikimlerinden yararlandığım ve desteklerini her zaman hissettiğim Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı, Prof. Dr. Hatice ERDOST' a, Prof. Dr. Nesrin ÖZFİLİZ' e, Yard. Doç. Dr. Cansel G. ÖZGÜDEN AKKOÇ' a ve Yard. Doç. Dr. Tuncay İLHAN' a çok teşekkür ediyorum. Tez çalışmam boyunca özellikle laboratuvar çalışmalarında benden yardımını, desteğini, sabrını esirgemeyen Araş. Gör. Sabire PEKER' e çok teşekkür ediyorum. Yine katkı ve de arkadaşlıkları ile yanımda olan Doktora öğrencisi Eser İNCE ve Laborant Nesrin SALÇA AKTAŞ' a çok teşekkür ediyorum.

Bunun dışında tüm yaşamım boyunca yanımda olan ve destek veren canım aileme çok teşekkür ediyorum.

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Erzurum’ da doğdum. İlköğretim eğitimimi Bursa Ticaret ve Sanayi Odası İlköğretim Okulu’ nda, lise eğitimimi Bursa Cumhuriyet Lisesi’ nde tamamladım. Üniversite eğitimime ise 2002 yılında Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’ nde başlayıp, 2006 yılında mezun oldum. 2006-2014 yılları arasında Bursa Tüp Bebek Merkezi’ nde çalıştım. 2012 yılında Uludağ Üniversitesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı’ nda Yüksek Lisans eğitimime başladım.