



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

**TAMOKSİFENİN FARE OVERİNDEKİ FOLİKÜL SAYISI VE SERUM ANTI-
MÜLLERİAN HORMON DÜZEYİNE OLAN ETKİSİ**

Dr. Ayşe TOPCU AKDUMAN

UZMANLIK TEZİ

Bursa-2013



**T.C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI**

**TAMOKSİFENİN FARE OVERİNDEKİ FOLİKÜL SAYISI VE SERUM ANTI-
MÜLLERİAN HORMON DÜZEYİNE OLAN ETKİSİ**

Dr. Ayşe TOPCU AKDUMAN

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Doç. Dr. Kemal ÖZERKAN

Bursa-2013

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İçindekiler	i
Türkçe Özet	iii
İngilizce özet	iv
Giriş	1
Over Gelişimi	2
Germ Hücre Gelişimi	2
Overde Foliküler Gelişim	3
Folikülogenez	5
Primordial Folikül Oluşumu	5
Folikül Gelişiminin Başlaması	5
Folikül Gelişiminde Preantral ve Antral Aşamalar	7
Antral Aşamadan Sonra Folikül Gelişimi	8
Ovulasyon Oluşumu	10
Korpus Luteum	12
Over Rezerv Testleri	12
Folikül Stimülan Hormon (FSH)	12
Serum Östrodiol Seviyesi (E2)	13
Antral Folikül Sayımı	13
Anti Müllerian Hormon (AMH)	14
Selektif Estrojen Reseptör Modülatörleri (SERM'ler)	15
Tamoksifen	15
Etki Mekanizması	16
Yan Etkileri	17
Gereç ve Yöntem	19
ELİSA ile AMH Ölçümü	20

Over Dokusunun Histolojik İncelenmesi	20
Foliküllerin Morfolojik Sınıflandırması	21
İstatistiksel Yöntem	22
Bulgular	23
Tamoksifen ve Kontrol Grubu AMH Değerleri Karşılaştırılması	23
Tamoksifen ve Kontrol Grubu Folikül Sayıları Karşılaştırılması	25
Tartışma	30
Kaynaklar	36
Ekler	45
EK-1: Kısaltmalar	45
Teşekkür	46
Özgeçmiş	47

ÖZET

Bir antikanser ilacı olan tamoksifenin, over rezervi üzerine olan etkisini araştırmayı amaçladık.

Bu çalışmada 30 adet, 25-30 gr ağırlığında, 8-12 haftalık BALB/c dişi fare üzerinde çalışıldı. Fareler iki gruba ayrıldı: kontrol ve deney. Vajinal smear ile östrus siklusları takip edildi. Deney grubuna 100 µl i.p. tamoksifen enjekte edildi. Kontrol grubuna tamoksifenin eritildiği taşıyıcı solüsyon enjekte edildi. İki östrus siklusu sonunda, fareler öldürüldü, overleri çıkarıldı ve ışık mikroskopunda folikül sayımı yapıldı. Aynı zamanda ~2cc kan alındı ve serum AMH düzeyine bakıldı.

Grup-1: Tamoksifenin enjekte edildiği grup. (toplam 15 fare).

Her bir fareye intraperitoneal tek doz 100 µl tamoksifen etanol:mısır yağında eritilerek enjekte edildi.

Grup-2: Kontrol grubu. (toplam 11 fare).

Her bir fareye intraperitoneal etanol:mısır yağı enjekte edildi.

Tamoksifen grubu ve kontrol grubu karşılaştırıldığında, gruplar arasında AMH değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Histolojik değerlendirmede iki grup arasında primordiyal, primer, antral ve sınıflandırılmayan foliküllerin sayısı açısından anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0.05$). Her iki grup arasında sekonder ve preantral foliküller açısından anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).

Çalışmamızda, tamoksifenin ge safhadaki folikülleri baskıladığı, ancak over rezervinin göstergesi olan primordial folikülleri etkilemediği sonucuna ulaşılmıştır.

Anahtar kelimeler: Tamoksifen, anti mülleryan hormon, over rezervi, folikülogenezis, fare.

SUMMARY

Investigating the Effects of Tamoxifen, Anticancer Drug on Ovarian, Experimental Study

In our study we aimed to investigate the effects of tamoxifen, an anticancer drug, on ovarian reserve.

Thirty adult BALB/c female mice were used in the present study. The female mice were divided into two groups: control and experimental. The observation of a vaginal plug was estrus cycle, the mice received 100 μ l tamoxifen by i.p. injection. At the end of two estrus cycle mice were killed and their ovaries were fixed and prepared for light microscopic studies. Follicles were counted and classified. Also, a blood sample of ~2cc was obtained from heart of mice for evaluating the level of Anti Müllerian Hormone.

Grup-1: Tamoxifen injected group (15 mice)

A single dose of 100 μ l tamoxifen, resolved in 1cc corn oil, was injected intraperitoneally to each mouse.

Grup-2: 1cc ethanol:corn oil injected intraperitoneally to each mouse (11 mice)

When two the groups were compared, AMH levels did not show any significant difference ($p=0,097$). Microscopic studies revealed that the number of secondary and pre-antral follicles were significantly ($p<0.05$) reduced in the experimental group compared to the control group. However, the numbers of primordial and primary, antral, unknown follicles in experimental and controls groups were not significantly different ($p>0.05$).

The result of our study indicate that tamoxifen suppresses follicular differentiation at late stages but does not affect the development of already differentiated follicles.

Key words: Tamoxifen, anti müllerian hormon, ovarian reserve, folliculogenesis, mouse.

GİRİŞ

Over, kadın hayatı boyunca, yapısında ve fonksiyonunda değişikliklerin olduğu dinamik bir organdır. Folikül ise, overin en önemli reproduktif ve endokrin kompartımanıdır. Foliküllerin kalitesi ve sayısı, kadının üreme potansiyelini ve üreme ömrünü belirler ve yenilenemez (1, 2).

Kanser tedavisinde kullanılan bazı ilaçlar, gonadal tahribata neden olmaktadır. Bu negatif etkinin boyutu tedavinin sitotoksik potansiyeli, dozu, süresi ve hastanın yaşına bağlı olarak değişebilmektedir.

Primordial foliküller, foliküllerin en erken ovaryan formunu temsil ederler ve dormant fazda oldukları düşünülür. Over rezervi, primordial foliküllerin sayısı tarafından belirlenir. Özellikle primordial foliküller üzerine olan toksik bir etki, reproduktif yaşam aralığını kısaltabilir ve prematür over yetmezliğine neden olabilir. Oosit doğrudan ya da dolaylı olarak etkilenebilir. Oositi çevreleyen steroid üreten somatik hücre katmanlarına (granüloza ve teka hücreleri) toksik etki de bunlara neden olabilir (3).

Tamoksifen, meme kanserinde yaygın olarak kullanılan selektif östrojen modülatörü (SERM) olan bir kemoterapötiktir (4).

Kemirgenler de dahil olmak üzere yapılan hayvan çalışmaları, insan ve hayvan overleri arasında farklılıklar olmasına rağmen, çeşitli kanser tedavilerinin gonadotoksitesini göstermekte bize önemli bilgiler sağlamaktadır.

1. Over Gelişimi

1.1. Germ Hücre Gelişimi

Fetal dönemde, insan overinin gelişim süreci dört evrede incelenebilir(2).

1. Farklılaşmamış gonad evresi
2. Farklılaşma evresi
3. Oogonal çoğalma ve oosit formasyonu dönemi

4. Folikül oluşma evresi

Fetal gelişimin yaklaşık 5. haftasında, gonad çifti yapısal olarak gonadal çıkıntılarını oluşturmak üzere, mezonefroz üzerinde çöломik çıkıntı şeklinde yoğunlaşır. Bu noktada, gonadın morfolojik olarak over ya da testis olduğu ayırt edilememektedir. Gonad, dışta çöломik yüzey epitel hücreleri ile iç içe olan ilkel germ hücreleri ve içte merkezde bulunan medüller mezenşimal dokudan oluşmaktadır. Bu farklılaşmamış dönem yaklaşık 7-10 gün sürmektedir (1).

Primordiyal germ hücreleri (PGH), ilkel ektodermden gelişmektedir. Germ hücreleri ilk olarak, fertilizasyondan sonraki üçüncü haftanın sonunda kaudal uçtaki ilkel endodermden ve yolk kesesine komşu olan bölgede tespit edilir ve ayrıca arka barsaktaki (hindgut) splanknik mezodermden de kısa bir süre sonra belirir (5, 6). Gonadal çıkıntı, germ hücrelerinin hayatta kalabileceği tek yerdir. Germ hücreleri gebeliğin 4. ve 6. haftaları arasında gonadal bölgeye ameboid hareketlerle göç ederler. Gebeliğin 7. haftasında, gonadal dokunun germ hücreleriyle kolonizasyonu tamamlanır (3).

PGH gonada ulaşır ulaşmaz, büyük bir hızla çoğalır. Gebeliğin 6. haftasında 10 bin, 8. haftasında 600 bin sayısına ulaşır. Bu hızdaki mitozla, gebeliğin yirminci haftasında sayıları 6 milyona ulaşır (5, 7, 8). Bu gonadın ulaşabileceği maksimum kapasitedir. Bu dönemden sonra, atrezi başlar, germ hücre sayısı giderek azalır ve doğumda 1 milyon, pubertede sadece 300-400 bin kalır. Germ hücrelerinin büyük çoğunluğu atrezi geçirerek, yaklaşık 300 tanesi, menopozdan önce ovulasyona girebilir ve menopozda overde sadece 1000 folikül kalır (3, 9).

PGH, gonadlara ulaştığında oogonyum olarak adlandırılır. Oogonyumların PGH'den daha fazla mitotik aktiviteleri vardır. Mayoza girmeden önce birkaç defa mitoz geçirirler. Oogonyumun mitotik aktivitesi, oosit havuzunun önemli belirleyicisidir. Oogonyumlarda mitoz, atrezinin arttığı gebeliğin 28. haftasında sona erer. Bu nedenle over rezervinin oluşmasında sadece mitoz değil, aynı zamanda atrezide önemlidir (3).

Oogonyumlar ilk mayoz bölünmeye girip profaz evresinde durdukları dönemde *oositlere* dönüşürler. Bu süreç 11-12. haftalarda başlar (10).

Mayozun diploten evresine ilerlemesi ancak gebeliğin geri kalanında olmakta ve doğumda tamamlanmaktadır. Mayozun durdurulması, büyük bir olasılıkla granüloza hücreleri tarafından üretilen engelleyici maddeler ile sağlanır. Bir ovum, oositin iki kez mayotik bölünmesinden oluşur; bu bölünmelerin birincisi tam ovulasyon öncesinde, ikincisi (haploid ovumun oluşması) ise sperm girişi zamanındadır. Fazla genetik materyal ise, her mayotik bölünmede oluşan kutup cisimciği (polar body) ile atılmaktadır (5).

1.2. Overde Foliküler Gelişim

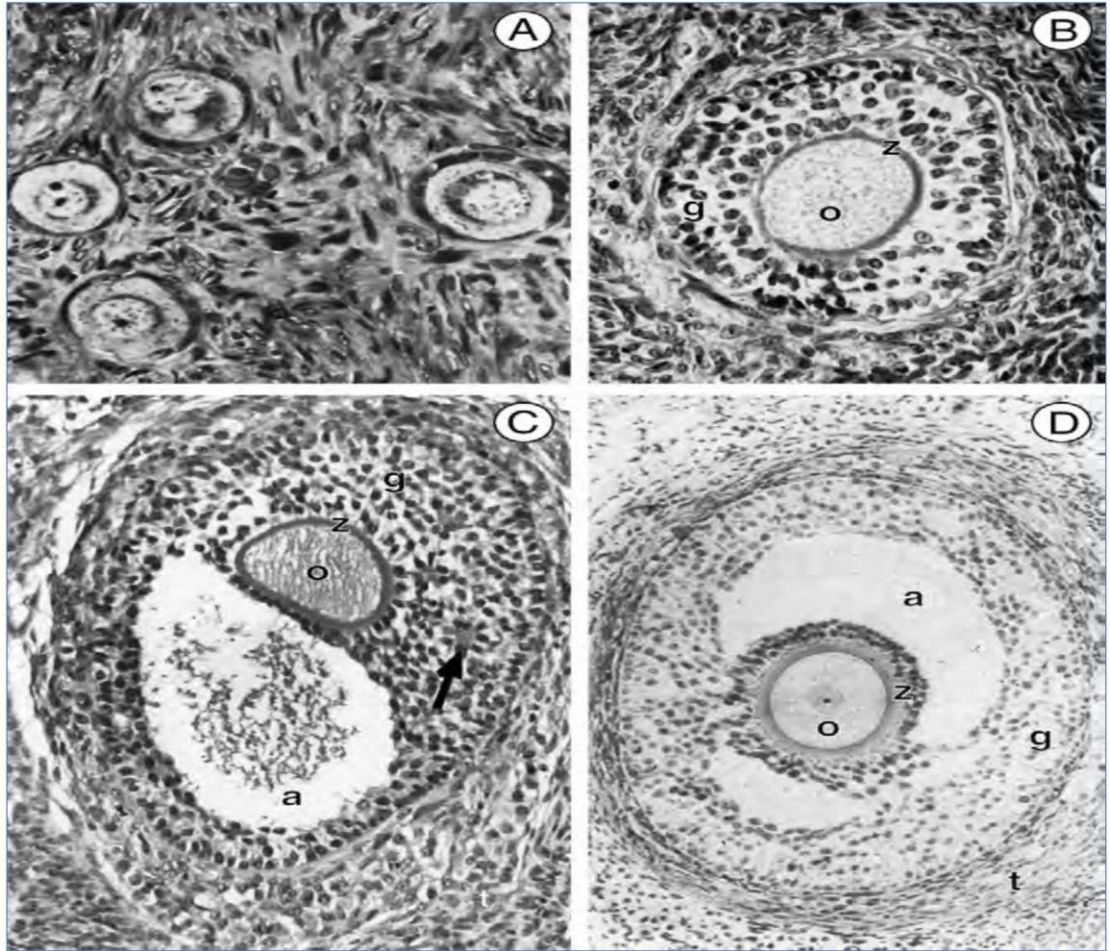
Gestasyonun 18-20. haftalarında, hücreden oldukça zengin olan korteks daha derindeki medullar bölgeden kaynaklanan vasküler kanallar tarafından yavaş yavaş delinir ve bu folikül oluşmasının başlangıcını belirtir (11). Parmak şeklindeki vasküler çıkıntıların kortekse girmesiyle korteks sekonder seks kordlarının görüntüsünü alır. Kan damarları invaze oldukça, yoğun kortikal hücre kütlelerini gittikçe daha küçük kısımlara ayırır. Mezenşimal ya da epitelyal kaynaklı perivasküler hücreler de damar ile birlikte sürüklenir ve bu hücreler mayozun birinci evresinde olan oositleri çevreler. Sonuç olarak oluşan birim, primordial folikül olarak adlandırılır. Primordial folikül; mayozun profaz evresinde duraklamış olan bir oosit (30–60 µm) ve onun etrafında bazal membran tarafından çevrelenen tek katlı ağ şeklinde öncül granüloza hücreleridir.

Sonunda bütün oositler bu şekilde kaplanır. Primordial folikül oluşumunda kullanılmayan mezenşim kalıntıları folikül aralarındaki ilkel ovaryum stromasını oluşturmakta kullanılır. Henüz netlik kazanmasa da, granüloza hücreleri çölemik epitelyum veya mezenşim öncülerinin farklılaşmasından oluşur. Primordial foliküler gelişim süreci, diploten evresindeki bütün oositlerin foliküllerin içine alınmasına kadar sürer, bu süreç gebeliğin 15. haftasında başlar ve doğumdan altı ay sonrasına kadar uzayabilir (5).

İnsan ve hayvanlarda yapılan transkriptomik çalışmalarda, primordial folikül gelişiminde rol alan birçok transkripsiyon faktörü (Fig I alpha), zona proteinleri, mayoz-spesifik enzimler ve sinir büyüme faktörleri tanımlanmıştır.

Ancak günümüzde, over rezervini belirlemede kullanılacak, primordial foliküllerin hormonal ya da başka bir belirteci tanımlanamamıştır (3).

Oositin öncül granüloza hücreleri tarafından çevrenmesinden hemen sonra, folikülün tamamı değişik derecelerde olgunlaşmaya başlar. Öncül granüloza hücrelerinden oluşan tabakanın kübik granüloza hücre tabakasına dönüşmesi ile primer folikülün oluşumu belirlenir. Daha ileri bir farklılaşma ile gebeliğin 6. ayında daha tamamlanmış bir granüloza hücre çoğalması ile preantral folikül belirir. Gebeliğin sonunda ise antral foliküller belirir. Teka hücrelerinin folikülleri çevrelemesi ancak son trimesterde olur (8) (Şekil-1).



Şekil-1: Over folikülleri. A: primordial foliküller B: Sekonder foliküller C: Preantral foliküller D: Antral foliküller (40).

1.2.1. Folikülogenez

Folikülogenez over korteksinde meydana gelmektedir.

1.2.1.1. Primordial Folikül Oluşumu

Primordial foliküller, overin temel reproduktif birimleridir. Çünkü tüm dominant foliküllerin, dolayısıyla da menstruel siklusun kaynağını oluştururlar.

Histolojik olarak primordial folikül, mayozun profaz evresinde bekleyen, küçük bir primer oosit (~25 µm çaplı), tek katlı yassı veya kollumnar dizilim gösteren granüloza hücresi ve bazal lamina içermektedir. Bazal lamina sayesinde granüloza hücresi ve oosit, mikroçevrede bulunan diğer hücrelerle direkt temasta değildir. Primordial foliküllerin bağımsız bir kanlanması yoktur, dolayısıyla endokrin sistemden daha sınırlı olarak etkilenirler.

Granüloza hücrelerinin mitotik potansiyel kazanması ve şekillerinde yassıdan kübik epitele dönüşüm, folikül seçiminin histolojik göstergeleri olarak değerlendirilmektedir (3). Bunu gen aktivasyonu ve oosit gelişimi takip eder. Hayvanlarda, granüloza–orijinli kit ligant (12), teka-orijinli kemik morfogenetik protein (BMP)-7 (13) ve yüksek hipofiz FSH düzeyi gibi aktivatörler ve müllerian inhibe edici madde (MIS) gibi inhibitörler, bu gelişimi (recruitment) pozitif veya negatif yönde kontrol eden faktörlerdir (14). Klinik önemine rağmen insanda, folikül seçiminin nasıl kontrol edildiği hakkında henüz yeterli bilgi yoktur (3).

1.2.1.2. Folikül Gelişiminin Başlaması (Primordial Folikülün Primer Foliküle Geçişi)

Primer folikül; oosit etrafında tek kat olarak dizilen bir veya daha fazla kübik granüloza hücresinin görülmesi ile tanımlanır. Primer folikülde izlenen en önemli gelişmeler; FSH reseptörü ekspresyonu, oosit büyümesi ve oosit farklılaşmasıdır.

Primordial foliküller, primer foliküle geçene kadar uyku fazında (dormant faz) bekler. Bekleyen primordial folikülden, büyüyen primer foliküle geçiş, *recruitment* olarak adlandırılmaktadır. Bu geçişin tek bir yol ile değil, oositler ve somatik hücreler (granuloza hücreleri ve teka hücreleri),

ekstraselüler matriks komponentleri, büyüme faktörleri, otokrin ve parakrin faktörlerin olduğu multi-faktöriyel yolla olduğuna inanılır (15-18).

Bununla birlikte son zamanlarda farelerde yapılan çalışmalar, primordial folikülleri uyku fazında tutan bazı inhibitörlerin olduğunu kanıtlamıştır. Bunlar *tumor suppressor tuberous sclerosis complex 1* (Tsc-1), *phosphatase ve tensin homolog deleted on chromosome 10* (PTEN), Foxo3a, p27 ve Foxl2 kapsamaktadır. Foliküler aktivasyon için, bu inhibitör moleküllerin fonksiyon kaybı, primordial folikül havuzunun erken aktivasyonuna yol açar (19-22). Primordial foliküllerin tamamının aktive olması, kaçınılmaz olarak folikül havuzunun erken tükenmesine ve prematür ovaryan yetmezliğe neden olur (POF). Ancak, insanlarda, incelenen genlerden sadece Foxl2 mutasyonunun, POF'la bağlantılı olduğu gösterilmiştir (23).

Primordial folikülün yassı granüloza hücreleri, kübik hücrelere dönüşürken buna oositte meydana gelen dikkat çekici değişiklikler eşlik etmektedir. Preantral dönem boyunca oosit, ~25 µm'den ~120 µm'ye ulaşmaktadır. Bu devasa büyüme, oosit genomunun reaktivasyonu sonucu oluşmaktadır (24).

Growth diferansiyasyon-faktörü-9 (GDF-9) ve *transforming growth factor beta* (TGF-B) ailesinin bazı üyeleri (BMP-4,BMP-7,BMP-6,BMP-15) büyüyen oositte eksprese olan diğer önemli proteinlerdir (25-28). Çalışmalardan ortaya çıkan genel konsept, oosit tarafından üretilen yeni bazı büyüme faktörlerinin preantral folikülogenezisin regülasyonunda önemli rol alabileceği yönündedir (29). İnvitro olarak GDF-9'un insan preantral foliküllerinin gelişimi üzerinde sitümüle edici etkisinin olduğu gösterilmiştir (25-27).

Primordial foliküllerin gelişiminde, parakrin etkili büyüme faktörleri ve sitokinler de rol almaktadır. Örneğin *kit-ligand* (KL) ve *leukemia inhibiting factor* (LIF: granüloza hücrelerinde sentezlenir). LIF aynı zamanda PGC'lerin proliferasyonunu, oosit ve teka hücrelerinin gelişmesini stimüle eder (29,30).

Bütün bu bulgular ışığında, preantral folikülogenezis oosit büyüme faktörleri ile yönetiliyor gibi görünmektedir. Ayrıca, primordial foliküller FSH

reseptörü eksprese etmezler ve primordial folikülün primer foliküle geçiş aşamasında FSH gerekli değildir (15).

1.2.1.3. Folikül Gelişiminde Preantral ve Antral Aşamalar

Granüloza hücrelerinin mitotik ekspansiyonuyla, tek tabakalı primer folikül, çok katlı sekonder foliküle dönüşür. Oosit çapının artması, bazal lamina oluşması, zona pellusida ve teka hücre tabakasının oluşumu gelişimin diğer bileşenleridir (31).

Preantral evrede folikül çapı 40-60 µm den, 120-150 µm ulaşmaktadır. Folikül daha fazla büyüyerek antral evrenin başında 200 µm ulaşır. Bu aşama sırasında aynı zamanda, granüloza hücreleri arasında daha sonra antral kaviteyi oluşturacak olan sıvı boşluklar oluşmaya başlar, teka hücre tabakasının damarlanması artar, teka ve granüloza hücrelerinin çoğalması ve oositin büyümesi devam eder.

İnsanlarda tek tabakalı primer folikülün, çok tabakalı sekonder foliküle gelişmesi aylar alır. Preantral foliküllerde FSH reseptörleri ekspre edilse bile, bu yavaş gelişim aşamasında gonodotropinlerin rolü yok gibi görünmektedir (15).

Preantral folikül gelişiminde FSH' in tartışmalı rolüne rağmen, granüloza hücrelerinden (aktivinler) ve teka hücrelerinden (BMP-4 ve BMP-7) lokal olarak salınan TGF β ailesinin, yada oosit kaynaklı GDF-9 ve BMP-15'in kritik rolü vardır (3).

Teka hücrelerinin folikül gelişiminde pek çok açıdan önemli rolü vardır. İlk olarak, granüloza hücrelerinde sentezlenen östrojen prekürsörlerinin kaynağı olan androjenleri sentezlerler. İkinci olarak BMP-4 ve BMP-7 teka orijinlidir. Üçüncü olarak teka hücreleri ile granüloza hücreleri arasındaki iki yönlü iletişimi sağlayan, *hepatocyte growth factor* (HGF) ve *keratinocyte-growth factor* (KGF) teka hücre kaynaklıdır (32). Dördüncü olarak preantral-antral folikül hızlı büyüme döneminde, BMP-4 ve BMP-7 FSH regülasyonunda rol alır, LH'ı inhibe ederek, progesteron sentezini azaltır ve E2 sentezini artırır (33).

Preantral ve antral folikül gelişiminde pek çok aktivasyon faktörü tanımlanmıştır. Bunlardan en önemlileri granüloza hücre kaynaklı aktivinler

ve teka hücre kaynaklı TGF- β 'dir. Aktivinin değişik formları (aktivin A, AB, B) olsa bile folikülogeneziste aktivin A önemlidir. Aktivin A lokal ve parakrin etkiyle preantral folikül gelişimini ve granüloza hücre proliferasyonunu uyarır (16, 34, 35).

TGF- β 'nın 3 değişik izoformu (TGF- β_1 , β_2 , β_3) vardır. TGF- β , granüloza hücrelerinin çoğalmasını artırır, progesteron ve östrojen üretimini uyarır (36).

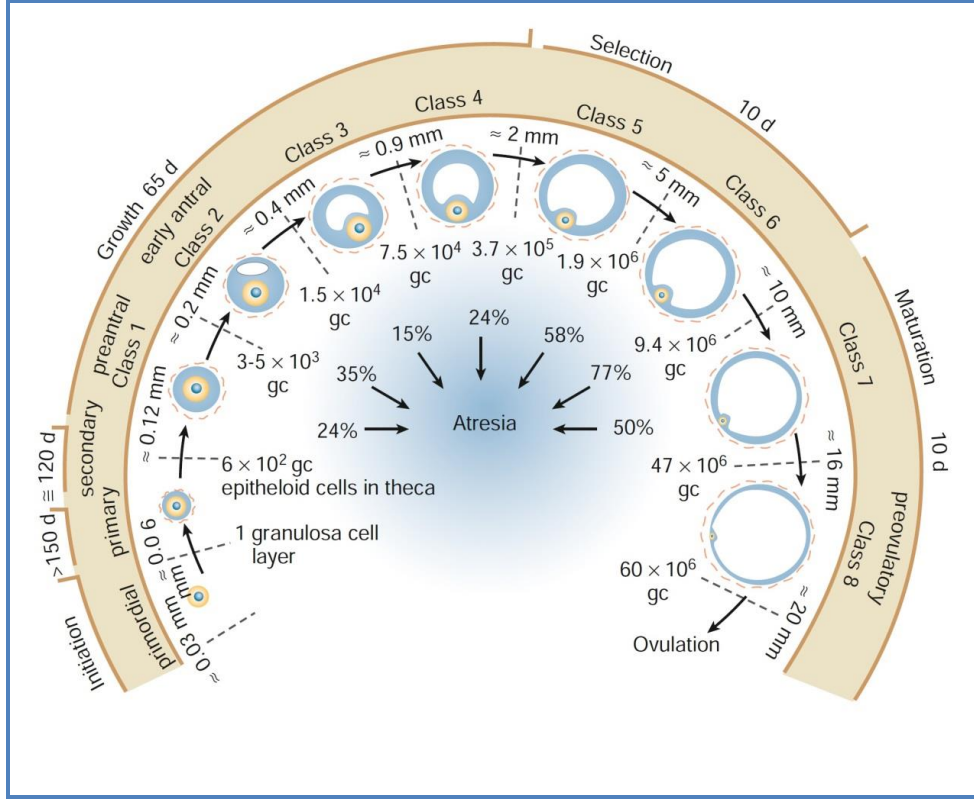
AMH'nın preantral folikül gelişiminde negatif etkisi olduğu düşünölmektedir. Primordial foliköller AMH sentezlemezler. İlk defa primer folikül evresinde sekresyonları başlar ve mid-antral döneme kadar devam eder. AMH; sekonder, preantral ve antral folikülün çapı 4mm altında olduğu dönemde en yüksek düzeye ulaşır. Bu bulgular primordial-primer geçişin dışında, preantral folikül gelişiminde AMH'nın negatif etkisi olduğunu göstermektedir (37, 38).

1.2.1.4. Antral Aşamadan Sonra Folikül Gelişimi ve Dominant Folikül Seçimi

Antral aşamadan sonra folikül gelişimi granüloza ve teka hücrelerinin proliferasyonu, vaskölarizasyonun artması, oosit gelişimi, folikül içinde antral boşluğun oluşumu ile karakterizedir. FSH bu aşamada kritik rol oynar.

Çeşitli foliköller sınıflamalar olmakla beraber Gougeon (39), granüloza hücrelerinin sayısına ve folikülün büyüklüğüne göre sınıflama yapmıştır (Şekil 2). Bu şemaya göre primordial folikülden dominant folikül gelişimi yaklaşık 1 yıl sürer. Bu uzun periyod boyunca (tahminen 300 gün) foliköller, gonadotropinlerden bağımsız olarak gelişir. Gonadotropinlerin etkisi son 50 günde olur.

Normal siklusları olan bir kadında, dominant folikül menströel siklusta luteal fazın sonunda klas 5 foliköllerden seçilmektedir (39). Mid-luteal faz sonrasında granüloza hücrelerinde mitoz oranında artış görölmektedir. Bu da luteolizisin, bir şekilde graaf foliköllerin granüloza hücrelerindeki mitozu arttırdığını düşöndürmektedir.



Şekil 2: İnsan overinde folikülerin gelişim aşamaları (40).

Bir kohorddaki folikülde granüloza hücrelerinde mitoz oranı rölatif olarak artarken, aynı kohorddaki diğer foliküllerde granüloza hücrelerinde proliferasyon yavaşlamaktadır. Bu durum, seleksiyonun meydana geldiğinin ilk göstergesi olup, yaklaşık olarak menstrüasyon zamanına denk gelmektedir. Graaf folikül gelişim sürecinin geriye kalan kısmında, granüloza ve teka hücrelerinin mitoz hızı yüksek olarak kalır. Foliküler faz ilerledikçe dominant folikül büyümesi hızlanır: 1-5. günlerde $6,9 \pm 0,5$ mm iken, 6.-10. günlerde $13,7 \pm 1,2$ mm ve 11.-14. günlerde $18,8 \pm 0,5$ mm olarak ölçülmektedir. Aksine, kohorddaki diğer graaf foliküllerinde büyüme daha yavaş ilerler (41).

Ovulasyondan 5-6 gün önce folikül, granüloza hücre proliferasyonuna ve antral sıvı toplanmasına bağlı olarak hızlıca büyür ve overin yüzeyine doğru ilerler. Folikülün hızlı büyümesi mittelschmerz olarak da adlandırılan pelvik ağrıya neden olur. Cyclin D2, ekspansiyondan sorumlu gendir. Bu

büyüme evresinin tamamlanmasından sonra folikül, graaf folikülü olarak adlandırılır ve ovulasyon için hazırdır (41).

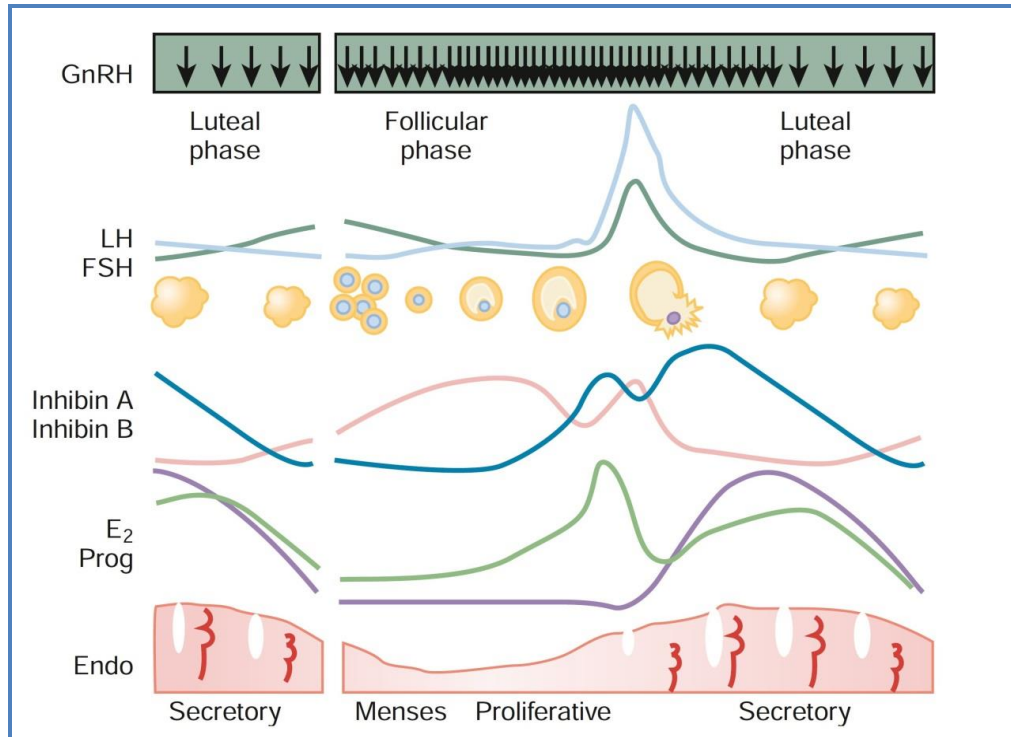
Seleksiyonun altında yatan mekanizma, plasma FSH düzeyinde görülen sekonder artıştır. Menstrüel siklus boyunca, luteal fazın sonunda plasma progesteron düzeyinin bazal seviyeye düşmesinden birkaç gün önce sekonder FSH artışı başlamaktadır. FSH seviyeleri siklusun foliküler fazının ilk haftası boyunca yüksek kalır. Korpus luteumda üretilen östriol ve inhibin-A miktarının azalmasının, sekonder FSH düzeyinin artışı ve dominant folikül seçimi için en önemli nedenler olduğuna inanılmaktadır. FSH'daki sekonder artış, dominant folikül mikroçevresindeki foliküler sıvı içeriğindeki FSH düzeyini artırır. Aksine, dominant olmayan foliküllerde, foliküler sıvıdaki FSH seviyeleri düşüktür. Foliküler sıvı içerisine FSH'nın girmesi seleksiyon için gerekli stimülasyonu başlatır. Kohortdaki foliküllerden sadece birinin mikroçevresindeki FSH'yı konsantre edebilme kapasitesini nasıl kazandığı, henüz bilinmemektedir (41).

1.2.2.Ovulasyon Oluşumu

Ovulasyonu tetikleyen ana olay, over ile hipotalamo-hipofizer sistem arasındaki hormonal etkileşimdir. Bu dönemde salgılanan günlük östrojenin %80'i dominant folikülden, kalan kısmı ise immatür foliküllerden, periferik testesteron, androstenedion ve östriol'un dönüşümünden oluşmaktadır. Serumda yeterli (50 saat süreyle, 200 pg/ml'nin üzerinde) östrojen eşik değerine ulaşıncaya, östrojen tepe noktasından yaklaşık 12-24 saat sonra pozitif feedback etki ile LH sekresyonu stimüle olur. LH artışı ile dominant folikül sıvısında bulunan ve primer oositin mayoz bölünmenin 1.fazında duraklamasını sağlayan oosit mayoz inhibitörü (OIM) devre dışı bırakılarak, mayoz bölünme tekrar başlatılır. Ovulasyon sırasında overden salınan oosit, 1.mayoz bölünmesi tamamlanmış, kromozom sayısı yarıya düşmüş olan 23 kromozumlu sekonder oositir. Ovulasyon anı, LH artışının başlangıcından 34-36 saat, LH pikinden 10-12 saat sonrasına denk gelir. LH yüksekliği, dominant folikülden granuloza hücre LH reseptörleri üzerinden progesteron yapımını artırır. Progesterondaki az fakat önemli olan kısa süreli yükseliş, pozitif feedback etki ile LH pikinin ortaya çıkmasını ve mid-siklus FSH pikinin

oluşumunu hızlandırır. LH artışı, oositte durmuş olan mayozun yeniden başlamasını, granüloza hücrelerinin luteinizasyonunu, oosit ile çevresindeki kümulus tabasının serbestleşmesini ve folikül rüptürü için gerekli olan prostaglandinlerin ve diğer eikozanoidlerin sentezini sağlamaktadır (1).

FSH, LH ve progesterondaki bu fizyolojik değişimlerin, folikül duvar kollajeninin dejenerasyonuna, folikül duvarının ince ve gergin hale gelmesine ve sonuçta da rüptürüne neden olduğu üzerinde durulmaktadır. LH'ın ovulasyon tetiğini çekebilmek için progesteron reseptörlerinin otokrin etkisine ihtiyaç duyduğu belirtilmektedir. Gonadotropinlerin etkisi altında foliküler sıvıda plazminojen aktivörlerinin sentezi artar. Ovulasyon yaklaştıkça granüloza hücre plazminojen aktivörleri sekresyonu çoğalır ve plazminojenden oluşan plazmin etkisi ile de folikül duvarının gerilim gücü zayıflar. Prostaglandinler, folikül duvarından proteolitik enzimlerin serbestleştirilmesine, histamin ve bradikinin oluşturulmasına ve anjiyogenezis ile hiperemik, inflamatuvar bir ortam oluşturulmasına neden olur. Diğer yandan prostaglandinlerin bir diğer etkisi, folikül çevresindeki teka tabakasındaki düz kasların kasılmasını sağlayarak ovulasyona yardımcı olmalarıdır (Şekil-3)(1).



Şekil-3: Normal menstrüel siklus (42).

1.2.3. Korpus Luteum

Oosit salınması ile luteal faz başlar. Korpus luteum luteinize olmuş granüloza hücreleri ile teka interna ve teka eksterna tabakalarından oluşur. Korpus luteumun asıl görevi, salınmış oositi desteklemek ve endometriumu implantasyona hazırlamak için progesteron salgılamaktır. Progesteron salgısı LH salgısından 6-8 gün sonra en yüksek noktaya ulaşır (1, 43).

Granüloza hücrelerine endositoz yoluyla alınan LDL-kolesterol, serbest kolesterol ve aminoasitlere hidroliz olur. Serbest kolesterol mitokondride pregnanolon, progesteron ve az miktarda androjene dönüşür. Östrojen ve inhibinin de katkısı ile korpus luteumdan salgılanan progesteron, lokal ve santral etki ile yeni folikülün gelişimini durdurur. Gebelik olmazsa ovulasyondan 9-11 gün sonra korpus luteum hızla küçülmeye başlar ve progesteron, östrojen ve inhibin seviyeleri düşer. Menstruel kanama olur. Ayrıca, inhibinin etkisinden kurtulan FSH artmaya başlar, böylelikle yeni menstrüel siklus başlar. Gebelik olduğu takdirde korpus luteumun gelişimi, ilk 3 ay gebelikte artan *human chorionic gonadotropin*(HCG) tarafından desteklenmektedir (1).

2. Over Rezerv Testleri

2.1. Folikül Stimülan Hormon (FSH)

FSH, over rezervini değerlendirmede en yaygın kullanılan testtir. 1980'li yıllardaki IVF deneyimlerinde, erken foliküler fazdaki FSH seviyesinin reproduktif sonuçlarla ilişkili olduğu saptanmıştır (44).

Over rezervi iyi olan kadınlarda, siklusun erken döneminde küçük foliküllerden salınan, ovaryan hormonlar sayesinde FSH düşük seviyede kalır. Aksine, zayıf over rezervi olan kadınlarda, oosit sayısının azalması ve ovaryan hormon üretimindeki (östradiol) azalma hipotalamik/hipofizer FSH sekresyonu üzerindeki negatif feedback etkisini kaldırarak FSH yükselmesine neden olur (44).

Normal FSH değeri, fertilitiyi değerlendirmede yararlı değildir. Fakat yüksek anormal değerler (FSH >20 mIU/mL) ile spontan gebelik Şansı çok azdır (45).

Bu bulgular ışığında, 3.gün FSH düzeyi, düşük maliyeti ve basit olması nedeniyle over rezervini değerlendirmede en yaygın kullanılan testtir. FSH değeri, 10 mIU/mL altında olduğunda over rezervinin yeterli olduğu dŐnlmektedir. 10 ile 15 mIU/ml arası ise ara değerler olarak kabul edilmektedir. FSH'ın normal değerinin üst eŐięi çalıŐılan laboratuvara göre deęiŐmektedir. Kullanılan laboratuvar metoduna ve kitine göre, cut off 10- 25 mIU/mL olarak kabul edilmektedir (46).

2.2. Serum Östradiol Seviyesi (E2)

Fizyolojik olarak kadın östradiolnn önemli bir kısmı ovaryan granüloza hücrelerinden kaynaklanır. Adipoz dokuda testesteronun östradiola çevrilmesi diğer nongonadal kaynak olarak gösterilmiştir. Ayrıca E2 sınırlı miktarda adrenal korteks, beyin ve endotel hücrelerinde de üretilir. Bazal E2 seviyesinin, overin gonadotropine olan cevabıyla ters bir korrelasyonu olduğu gösterilmiştir (1)

IVF programındaki kadınlarda yapılan bir prospektif çalışmada, bazal 3.gün E2 seviyeleri yüksek olan (>80 pg/ml) hastaların daha yüksek siklus iptali ve daha düşük gebelik oranları bulunmuştur (47). Bu alıŐma, östradiol ile tedavi sonuçları arasında açık bir ilişki olmadığını söyleyen çalışmalar ile zıtlık oluŐturmaktadır. IVF hastalarında bazal östradiolün tanısal değerini araŐtıran 10 adet çalıŐmayı değerlendiren meta-analizde, kötü gebelik sonuçları açısından E2 testinin tanısal değerinin düşük olduğu saptanmıştır (48).

Over rezervini belirlemede, çeliŐkili veriler olmasına rağmen, siklusun 3. günü E2 seviyesi bakılmaya devam edilmektedir (48, 49). Genelde <80 pg/mL değerler, yeterli over rezervi olarak düŐünülürken, değişik cut-off değerlerde kullanılmaktadır. Yüksek östradiol değerleri, FSH'yı baskılayabilir ve perimenopozal kadınlarda düşük over rezervini maskeleyebilir. Bundan dolayı FSH ve E2 yanlış negatif sonuçları önlemek için birlikte bakılmalıdır.

2.3. Antral Folikül Sayımı (AFS)

Yaşlanma ile ovarian rezerv kaybı, antral folikül sayısının azalması ile ilişkili olduğundan dolayı infertilite tedavisi öncesi, transvajinal ultrasonografi ile over yapısı ve aktivitesi görüntülenmektedir. Siklusun 2.-4. günlerinde, AFS 2-10'dan az olduğu zaman düşük over rezervi olarak düşünülür (50).

AFS over rezervini ve cevabını değerlendirmede iyi bir prediktör olmasına rağmen, oositin kalitesi, IVF ile gebelik şansı ve gebelik sonuçlarını belirleme açısından, over rezervini değerlendirmesine göre daha zayıf bir prediktördür (51).

2.4. Anti Müllerian Hormon (AMH)

Antimüllerian hormon, *transforming growth faktör B* ailesine ait, homodimerik disulfid bağla bağlı, molekül ağırlığı 140 kDa olan bir glikoproteindir (52). İnsanlarda 19. kromozomun kısa koluna yerleşmiştir (53). AMH geni 2750 Bp uzunluğunda ve 5 exon parçasından oluşmaktadır. Üçüncü exon parçası molekülün aktif kısmını oluşturmakta olup, *guanin* ve *sitozinden* zengindir.

AMH, erkeklerde testiküler sertoli hücrelerinden puberteye kadar fazla miktarda salgınırken, kadınlarda granüloza hücrelerinden ve doğumdan menopoza kadar salgınır (53, 54).

Sadece reproduktif organlara spesifik gibi görünen AMH, kadın internal reproduktif organların öncüsü olan müllerian duktusun regresyonuna neden olur. AMH yokluğunda ise her iki seks organları gelişir (54-56).

AMH, 8 mm'den küçük, preantral ve erken antral foliküllerden sentezlenir. AMH seviyesi primordial folikül havuzunun boyutunu yansıtır. Yetişkin kadınlarda, yaşla birlikte primordial folikül sayısı azalırken, AMH seviyesi de düşer (57). Menopozda ise ölçülemeyecek seviyelere iner (58).

AMH seviyesi, azalan over fonksiyonlarının erken, güvenilir, doğrudan bir göstergesidir. Bununla birlikte, uygun eşik değeri üzerinde fikir birliği yoktur (58-61). 0.5 ng/ml üzerinde serum AMH seviyesi, iyi bir over rezervini gösterirken daha düşük seviyeler tükenmiş over rezervine işaret eder. IVF başarısı, 0.15 ng/ml'den daha az AMH düzeylerinde çok azalmaktadır (59).

AMH ölçümü, kanser hastaları gibi bazı hastalarda, azalmış over rezervini belirlemede faydalı rol oynayabilir (60). Ayrıca preantral foliküllerden siklik olarak değil de, sürekli olarak eksprese edildiğinden, minimal değişkenlik gösterir ve AMH ölçümü için menstrüel siklusta belirli bir güne gerek yoktur.

3. Selektif Östrojen Reseptör Modülatörleri (Serm'ler)

Östrojenlerin, hedef hücrelerde en az iki tip reseptörünün (ER alfa ve ER beta) bulunması, bunların organlar arasında dağılımının ve farklılığının gösterilmesi, doku veya organa selektif östrojen agonist ve antagonistlerinin geliştirilmesine yol açmıştır (4).

Selektif östrojen modülatörü (SERM) olan, başlıca 3 ilaç tanımlanmıştır: *Tamoksifen*, *Toremifen*, *Raloksifen* (4). Bu üç ilaç östrojen reseptörlerine (ER) bağlanan, östrojenenin kompetitif inhibitörüdür. Hepsinin hedef dokularında, mikst agonist ve antagonist aktivitesi vardır (62).

Bu özelliklere sahip ve uzun zamandır kullanılan *tamoksifen*, SERM'lerin birinci kuşağının üyesidir.

3.1. Tamoksifen

1950 lerin sonlarında, ilaç firmaları kontraseptif olarak kullanılacak anti-östrojen bileşikler araştırılmaya başladılar. 1966 da Dora Richardson, o zaman *ICI-46,474* olarak adlandırılan *tamoksifeni* sentezlemeyi başardı (63).

1980 sonunda tamoksifen infertilite ilacı olarak onay almasına rağmen bu bileşikler hiç bir zaman kontraseptif olarak kullanılmadı (64).

Östrojen ve meme kanseri arasındaki ilişki yıllardır bilinmekteydi (63). Bu konuda ilk klinik çalışma, 1971 de Christie Hospital da yapıldı ve ileri evre meme kanserindeki etkisi gösterildi (66). Fakat o zamanlarda kanser tedavileri öncelikli değildi ve 1972 de ICI (Imperial Chemical Industries -şimdi AstraZeneca-) *Alderley Park Araştırma Laboratuvarları'nın* ilaç geliştirme programı fesih edildi. Tamoksifenin geliştirmesi 2. klinik çalışmayla, *Harold W.C. Ward* tarafından *Queen Elizabeth Hospital, Birmingham'da* yapıldı.

Ward'ın çalışması, daha yüksek dozda daha etkin cevabı gösterdi.1973'de, ileri evre meme kanserinde kullanılmasını sağlayan yine de Walpole oldu (64). Ardından ABD'de 1977 yılında onaylandı. Fakat ilaç nispeten küçük bir piyasada diğer hormonal ilaçlarla yarışıyor ve klinik ya da mali olarak olağanüstü değildi.

1980'lerde henüz Östrojen reseptörleri (ER) tanımlanmamıştı ve klinik deneyler tamoksifenin etkinliğini tam olarak ortaya çıkaramıyordu. Fakat 1998 yılında *Oxford based Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* tam olarak tamoksifenin etkinliğini ortaya koydu ve erken evre meme kanserinde hayat kurtardığını kanıtladı (67).

3.1.1. Etki Mekanizması

Tamoksifen, hedef dokularda östrojen reseptörlerine (ER) kompetitif olarak bağlanan, DNA sentezini azaltan, östrojen etkilerini inhibe eden, *triphenylethylene* türevi, nonsteroid anti-inflamatuar ajandır. Hücre siklusunu G0 fazından G1 fazına geçişi aşamasında bloke eden, sitostatik bir ilaçtır (68).

Tamoksifenin kendisi ön ilaçtır, hedef proteine düşük afinite gösterir. Karaciğerde *cytochrome P450* ile metabolize olur ve aktif metaboliti olan *4-hidroksitamoksifene* döner. 4-OH metaboliti, ana bileşiğe göre 50-100 kez daha aktiftir (68).

Meme dokusunda östrojen reseptörlerine antagonist olarak bağlanır, östrojen reseptörlerini kodlayan genleri inhibe eder. Tamoksifen östrojen reseptörlerine bağlandığında DNA da değişiklikler yapmaya başlar. ER/tamoksifen kompleksi östrojen sentezleyen genleri durdurmak için koreseptörleri kuvvetlendirir. Bu proteinlerden bazıları, NCoR and SMRT'dir(69). Tamoksifenin fonksiyonu, ErbB2/HER2 gibi değişik *growth factor* proteinleriyle düzenlenir. Yüksek ErbB2 düzeyleri tamoksifene dirençli kanserlerde gösterilmiştir (70). Tamoksifenin tam olarak antikanser etkisini gösterebilmesi için PAX2 proteinine ihtiyacı vardır (70-72). Yüksek PAX2 varlığında ER/Tamoksifen kompleksi ErbB2 proteinini baskılayabilir. Tersine AIB-1expresyonu PAX2 den fazla olursa ER/Tamoksifen kompleksi, meme

kanserinin ilerlemesine neden olacak ERBB2'nin ekspresyonuna neden olur. (70-73).

Tamoksifen, meme dokusunda, östrojen reseptör antagonistidir. Agonistik etkinliği zayıf da olsa vardır, diğer dokularda örneğin endometriumda agonist gibi davranır bu nedenle gerçekte parsiyel agonisttir.

Premenopozal veya postmenopozal dönemdeki östrojen bağımlı (östrojen reseptörü-pozitif) meme kanseri olgularının palyatif tedavisi için ve adjuvan olarak kullanılır (74). Ayrıca erkek meme kanserinin hormonal tedavisinde kullanılır (75). Aynı zamanda, meme kanseri için yüksek risk taşıyanlarda kullanımı, FDA tarafından onaylanmıştır (76).

Tamoksifenin diğer kullanım alanları, McCune-Albright sendromunda prematür puberte tedavisi için (77-79), Amenore veya anovulatuvar menstrüel siklus nedeniyle infertil olan kadınların tedavisi için klomifen ile olduğu gibi kullanılır (80), jinekomasti (81), bipolar hastalık (82, 83), kanser tedavisinde anti-anjiogenezis faktör olarak (84, 85), gen ekspresyonu çalışmalarında (86), Riedel's tiroidit'inde (87)'de kullanılmaktadır.

3.1.2. Yan Etkileri

Kemik: Tamoksifenin yararlı yan etkilerinden biri, kemik hücrelerinde östrojen reseptör agonisti olarak etki göstererek, kemik kaybını önlemesidir. Osteoklastları inhibe ederek, osteoporozu önler (88).

Endometrial kanser: Endometrium üzerine parsiyel agonist olarak etki göstererek bazı kadınlarda endometrium kanserine neden olabilir. Beş yıldan fazla kullanımda endometrium kanseri riskini 2-4 kat artırır (89).

Kardiyovasküler ve metabolik etkiler: Tamoksifenin, lipoprotein metabolizması üzerinde, parsiyel agonist olmasından ileri gelen östrojenik olumlu etkileri gösterilmiştir. Ancak kronik kullanılıştta kardiyoprotektif etkisi ortaya konulamamıştır (90). Bazı kadınlarda serum trigliseridinde artışa neden olabilir. Major cerrahiden sonra ya da immobiliteden sonra tromboemboli riskini artırır (90). Aynı zamanda karaciğerde yağlanmaya neden olur (91).

Santral sinir sistemi: Tamoksifenle tedavi edilen meme kanserli hastalarda, en önemli yan etkilerden biri kognitif fonksiyonlarda azalmadır.

Şematik hafıza skoru düşer (92). Bu durum meme kanseri tedavisinde kullanılan bir aromataz inhibitörü olan anastrozolle karşılaştırıldığında daha az ciddidir (93).

Diğer etkiler: En sık görülen akut yan etkisi sıcak basması, bulantı ve kusmadır. Olguların %25'inde ortaya çıktığı bulunmuştur. Menstrüasyon bozukluğu, vajinal kanama, akıntı ve ciltte döküntü yapabilir. Tümörün ağrısını artırabilir. Lökopeni ve trombositopeni oluşturabilir. Yüksek dozda seyrekde olsa retinopati yapabilir. Kemik metastazı olan hastalarda hiperkalsemi yapabildiği bildirilmiştir. Tamoksifenle tedavi edilen hastalarda ortaya çıkan diğer önemli yan etki ise libido azalmasıdır (94, 95)

Çalışmamızın amacı, bir antikanser ilacı olan tamoksifenin, over rezervi üzerine olan etkisini araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma projesi Uludağ Üniversitesi Bilimsel Çalışma Etik Kurulu'na sunuldu ve onay alındıktan sonra çalışma süreci başlatıldı (etik kurul onay tarihi: 27.03.2012 ve no:2012-04/08).

Çalışmada, Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden alınan, ergin 30 adet BALB/c fare kullanıldı.

BALB/c fareler, dünya genelinde en çok kullanılan inbred soylardır. İnbred soylar, erkek ve dişi kardeşlerin çiftleşmesiyle oluşan ardışık 20 veya daha fazla jenerasyonunun sonucudur. Erkek-dişi kardeşlerin eşleşmesiyle koloni içinde bireyler arasındaki tüm genetik varyasyon ortadan kalkar. Kolonideki tüm hayvanlar genetik olarak aynıdır (94).

Fareler için önerilen uygun çevresel koşullar aynı merkez tarafından sağlandı ve fareler ışıklandırılması 12 saat karanlık-12 saat aydınlık, havalandırılması (%60-70 nem), oda ısısı (20-24⁰C) kontrol edilen bir odaya yerleştirildi. Fareler çalışma boyunca, tabanı ve yanları plastik, üstü demir tel örgü ile kapalı olan, fare veya sıçanlar için özel üretilmiş standart kafeslerde yaşatıldı. Her kafese en fazla beş fare konuldu. Kafesin tabanı daima kuru ağaç talaşı ile kaplıydı. Bu talaş iki günde bir kez değiştirildi. Hayvanların beslenmesinde, standart pellet yemi ve şehir suyu kullanıldı.

Östrus döngüsü göstermeyen deneklerin dahil edilmesini engellemek amacıyla, iki günlük adaptasyon süresinin ardından, bir siklusu tamamlayana kadar vajinal smear takibi yapıldı, bu sürenin sonunda 4-5 günlük östrus siklusu gösterip, fazları düzenli devam eden denekler çalışmaya dahil edildi.

Hayvanlar üzerine test ve kontrol muamelelerinin etkileri karşılaştırılmak istendiğinde ve bireysel tepkinin bilinmediği durumlarda, mevcut hayvanlar kontrol ve test gruplarına rastgele dağıtılır (randomizasyon). Bu işlem, bireyler arası varyasyonun deney ve kontrol gruplarına eşit olarak dağılmasını sağlar. Bu çalışmada da hayvanlar rastgele 2 gruba ayrıldı. Kafeslerin üzerine, grupları ve enjeksiyonun tarihini belirtecek plakalar yerleştirildi.

Tamoksifen enjekte edilen (deney grubu), ve tamoksifen'in salt etkisini görebilmek için tamoksifen'in eritildiği taşıyıcı solüsyonun enjekte edildiği (kontrol grubu) olmak üzere 2 grup oluşturuldu. Her bir grupta tamoksifen enjeksiyonu için 15; kontrol grubu için 15 fare olmak üzere toplam 30 hayvan kullanıldı. Tamoksifen etanol: mısır yağında (%10 etanol:% 90 mısır yağı) eritildi ve 100µl dozda, intraperitoneal yolla, tek doz halinde deney grubundaki farelere, proöstrus döneminde enjekte edildi.

Östrus siklusundaki değişimleri gözleyebilmek amacıyla vajinal smear yönteminden yararlanıldı. Deney süresince her gün, bir kez smear alınmak suretiyle, östrus fazları takip edildi. Vajinal smear yöntemi; farelerin vajinasına distile su verildi ve bu sıvı geri alınarak lama yayıldı, ışık mikroskopunda değerlendirildi.

Enjeksiyon sonunda iki östrus siklusu geçiren ve vajinal smear ile proöstrus döneminde olduğu tesbit edilen hayvanlar eter inhalasyonu ile uyutuldu. Uygulamayı takiben hayvanların göğüs kafesi açılarak Anti-Müllerian Hormon seviyesini belirlemek için kalpten 5 cc'lik vakumlu tüplerle (venojet) ~ 2 cc kan örnekleri ependorf tüplere alındı. Örnekler 3000 devir/dk da 15 dakika santrifüje edildi ve serumları ayrıştırıldı. Biyokimyasal tetkik yapılarına kadar -20 C'de saklandı.

1. ELISA ile AMH Ölçümü

Farelerden elde edilen serum örneklerinde AMH düzeyleri *Mouse Anti-Mullerian Hormone* (AMH) (Hangzhou Eastbiopharm Co. Ltd. Hangzhou, CHINA) kiti ile ELISA yöntemi kullanılarak çalışıldı. Prospektüste kitin analitik duyarlılığı 0,05 ng/mL ve analiz sınırları 0.1-40 ng/mL olarak bildirilmekteydi.

2. Over Dokusunun Histolojik İncelenmesi

Kan alınımını takiben farelerin karın bölgeleri açıldı ve ovaryumları alındı. Alınan ovaryumlar numaralandırılmış kasetler içerisinde %10'luk tamponlanmış nötür formol solusyonuna alınarak 24 saat tespit edildi. Tespit solüsyonunda bulunan ovaryumlar değişik derecelerde (%50, 70, 80, 90, absolü) alkol, ksilol ve parafin serisinden geçirilerek, granüllü, 58-60°C'de eriyen parafinde bloklandı.

Parafine gömülen dokulardan, mikrotom ile 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kontrol ve deneme grubuna ait ovaryumların merkezinden geçen en büyük kesitler, *Crossmonn*'un üçlü boyama yöntemi ile boyandı. Kontrol ve deney grubuna ait ovaryum dokularında yer alan primordial, gelişme aşamasındaki folliküller (Tablo-1) ve atretik folliküller belirlenerek, folliküllerin sayımı yapıldı. Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirildi.

2.1. Folliküllerin Morfolojik Sınıflandırması

Çalışmada, folliküller klasik folikül sınıflandırması ve daha önceki yayınlar göz önüne alınarak sınıflandırıldı (97-99). Bu sınıflandırmada, granüloza hücre şekli ve hücre katman sayısı göz önüne alınmaktadır. Buna göre; oositi çevreleyen yassı tek sıralı granüloza hücreleri içeren folikül, *Primordial folikül (A)*, tek sıralı kübik granüloza hücreleri ile çevrili folikül, *primer folikül (B)*, iki ya da daha fazla sıralı kübik granüloza hücreleri ile çevrili folikül, *sekonder folikül (C)*, çapı diğer foliküllere göre oldukça geniş, granüloza hücreleri arasında küçük boşlukların olduğu ve granüloza hücre sırasının 3'den fazla olduğu folikül *preantral folikül (D)*, çapı en geniş olan ve antral boşluğun ileri derecede geliştiği follikül, *antral folikül (E)*, granüloza hücrelerinin teka hücreleriyle çevrildiği, açıkça oositin görülmediği foliküller *bilinmeyen folikül (F)* olarak adlandırıldı (Tablo-1).

Tablo-1. Folliküllerin sınıflandırılması (99).

	Adlandırma	Tanım
A	Primordial	Tek katlı yassı granüloza hücre (GH) katmanı
B	Primer	Tek katlı kübik (GH) katmanı
C	Sekonder	2-3 sıralı kübik (GH) katmanı
D	Preantral	3≤ sıralı GH'li geniş antral boşluk, belirgin teka tabakalı
E	Antral	Kumulus-oosit kompleksi, antral boşluk ve belirgin teka tabakalı
F	Bilinmeyen	Granüloza hücreleri teka hücreleri ile çevrili ancak oosit yok

GH: granüloza hücre.

3. İstatistiksel Yöntem

Çalışmada; sürekli ve kesikli değişkenler, betimleyici istatistik olarak medyan (minimum-maksimum) değerleriyle; kategorik değişkenler, frekans ve ilgili yüzde değerleriyle ifade edilmiştir. Gruplar arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda, *Mann Whitney U* testi kullanılmıştır. Çalışmanın analizleri SPSS 20.0 programında yapılmış olup $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

Çalışmaya dahil edilen deney hayvanlarında, her 2 grupta deney başarı ile tamamlandı.

Kontrol grubuna, tamoksifen'in eritildiği taşıyıcı solüsyon (etanol:mısır yağı) enjekte edildikten 2 gün sonra 4 fare öldü. Ölen farelerin batını açıldı, olası barsak perforasyonu açısından değerlendirildi. Ancak ölüm sebebini açıklayabilecek herhangi bir patolojik bulgu saptanamadı.

1. Tamoksifen ve Kontrol Grubu AMH Değerleri Karşılaştırılması [Gösterim: Medyan (Minimum-Maksimum)];

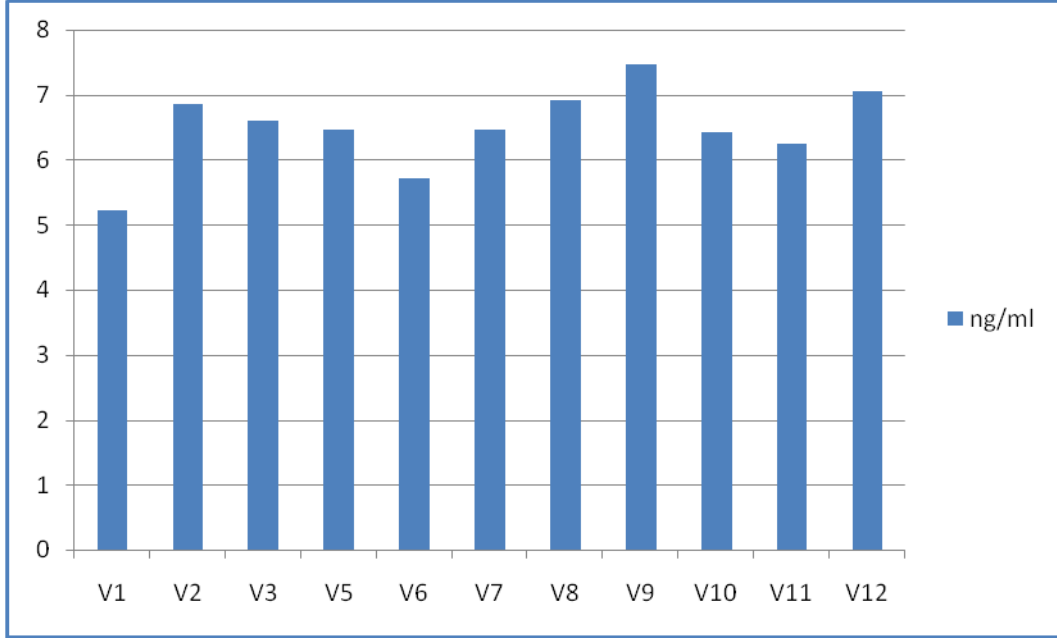
Kontrol grubunda odds ratio (OD) değeri 1450 (635-1596) olarak bulunmuştu. Tamoksifen grubunda OD değeri 1401 (1304-1503) olarak bulunmuştu. Gruplar arasında AMH değerleri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmadı ($p=0.097$)(Tablo-2, Şekil-3, 4, 5).

Tablo-2: Tamoksifen ve Kontrol grubu arasında, AMH(ng/ml) seviyelerinin karşılaştırılması.

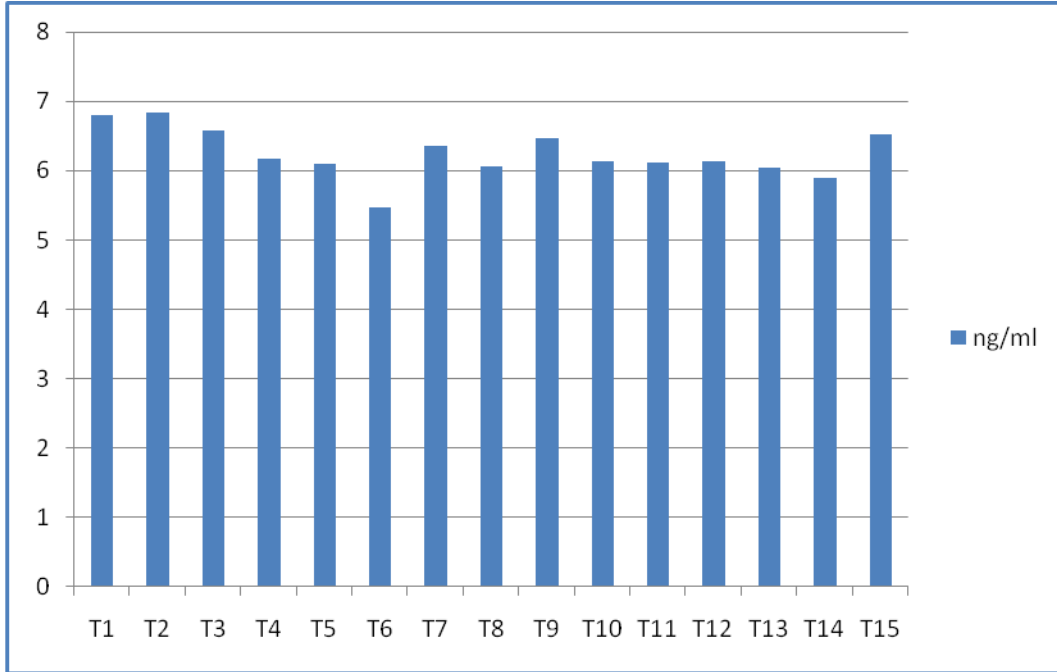
Tamoksifen (n,15)		Kontrol (n,11)		P
Medyan	min.-max.	Medyan	min.-max.	
6,1374	5,47-6,84	6,4725	5,21-7,47	0,097

Mann Whitney U testi kullanıldı.

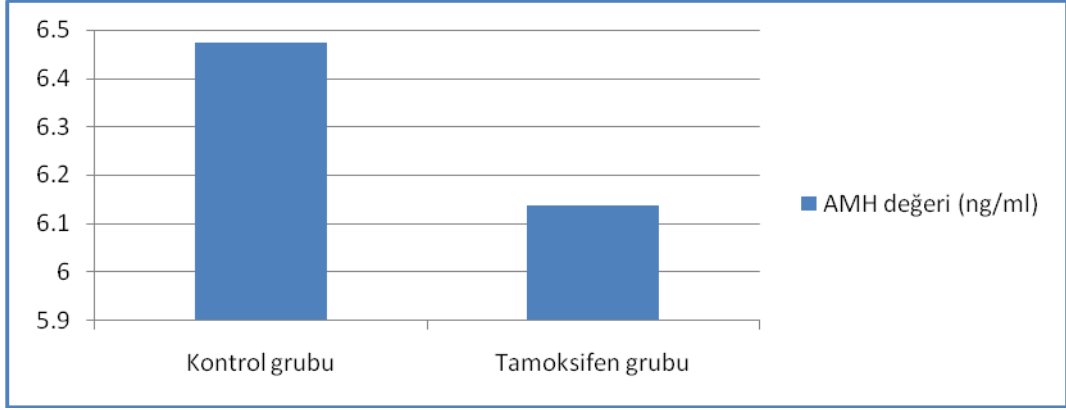
*: $p < 0.05$ anlamlı



Şekil-4: Kontrol grubu AMH değerleri (ng/ml).



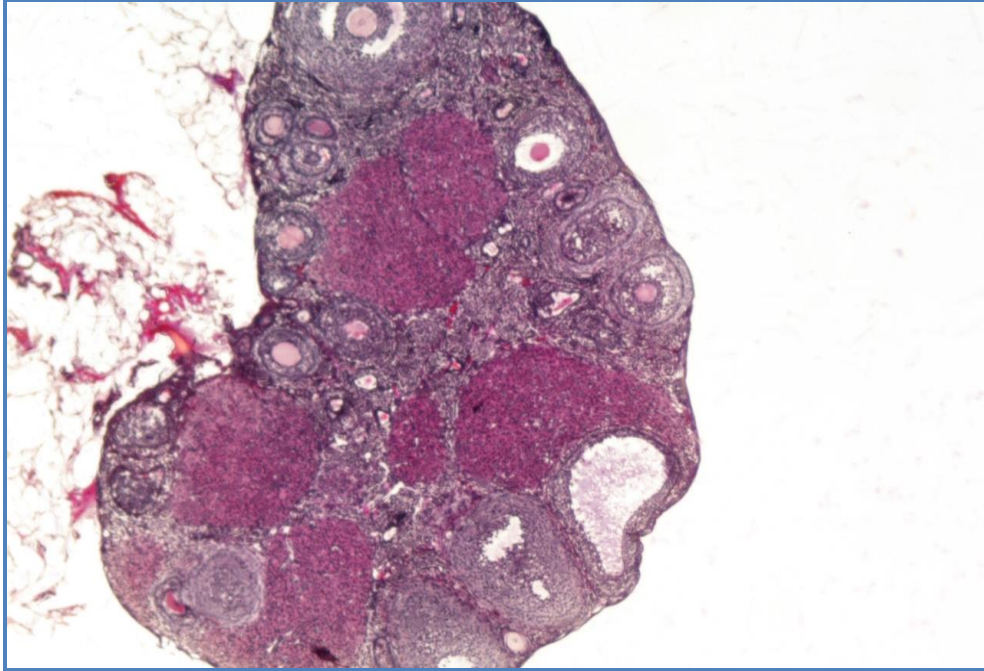
Şekil-5: Tamoksifen grubu AMH değerleri (ng/ml).



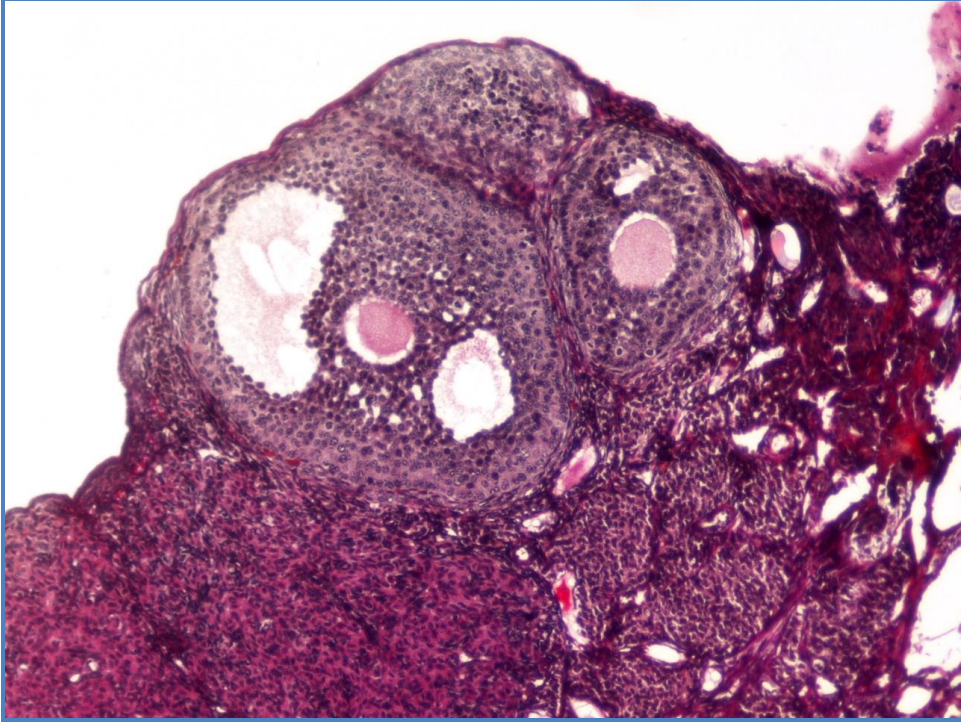
Şekil-6: Tamoksifen ve kontrol grubu AMH (ng/ml) değerlerinin karşılaştırılması.

2. Tamoksifen ve Kontrol Grubu Folikül Sayıları Karşılaştırılması

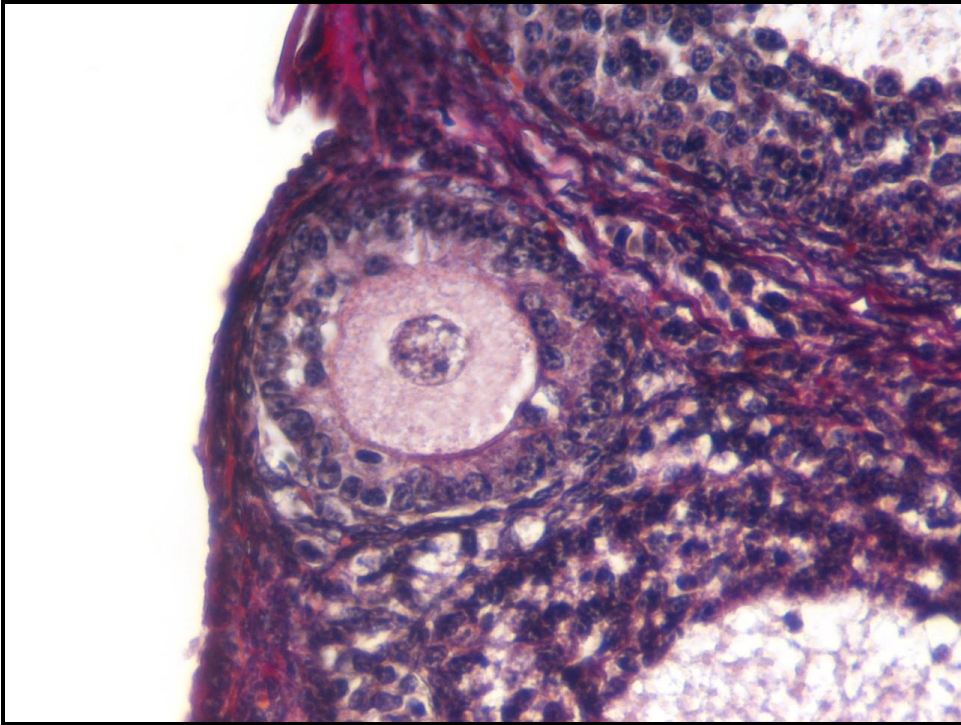
Kontrol ve deney gruplarına ait ovaryum kesitleri, *Crossmann*'ın üçlü boyama yöntemi ile boyanıp incelendi. Hazırlanan preparatlarda primordial, primer, sekonder, preantral, antral ve sınıflandırılmayan folikül sayımı yapıldı (Şekil-7, 8, 9, 10, 11, 12).



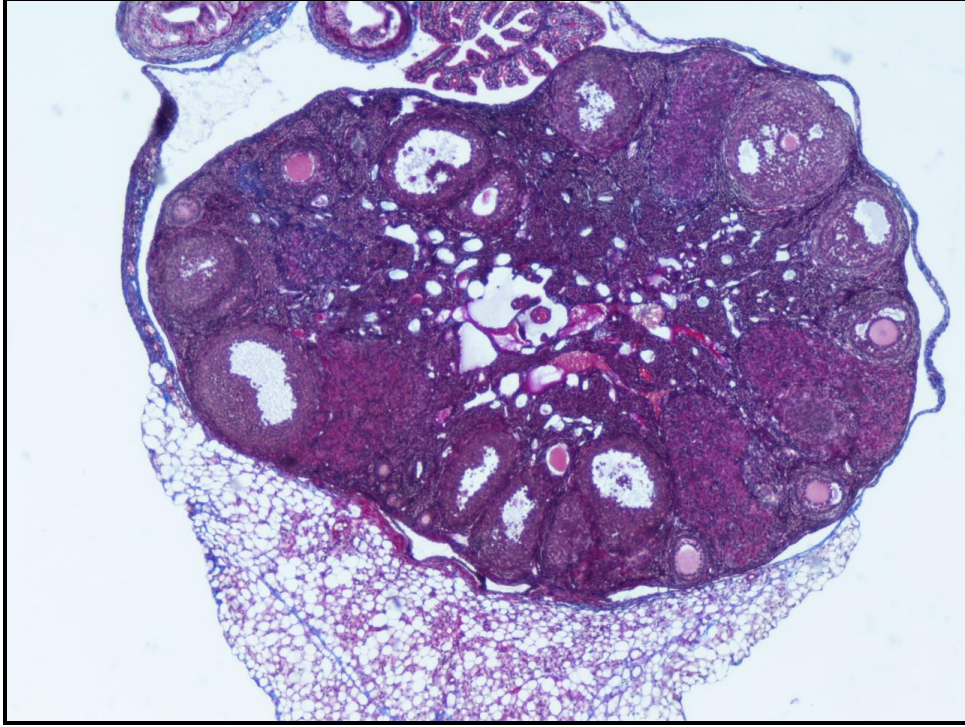
Şekil-7: Tamoksifen grubunda ovaryumun genel görünümü, *Crossmann*'ın üçlü boyama yöntemi ile stereo mikroskop görüntüsü (X4'lük büyütme).



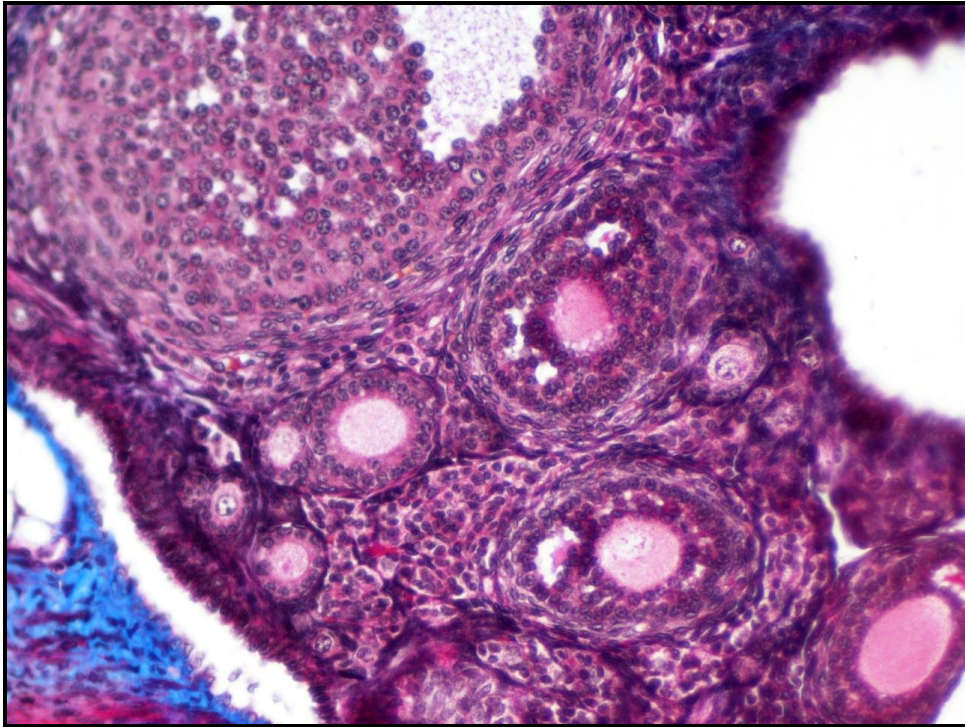
Şekil-8: Tamoksifen grubunda preantral ve sekonder foliküllerin görünümü, *Crossmann*'ın üçlü boyama yöntemi ile stereo mikroskop görüntüsü (X10'lük büyütme).



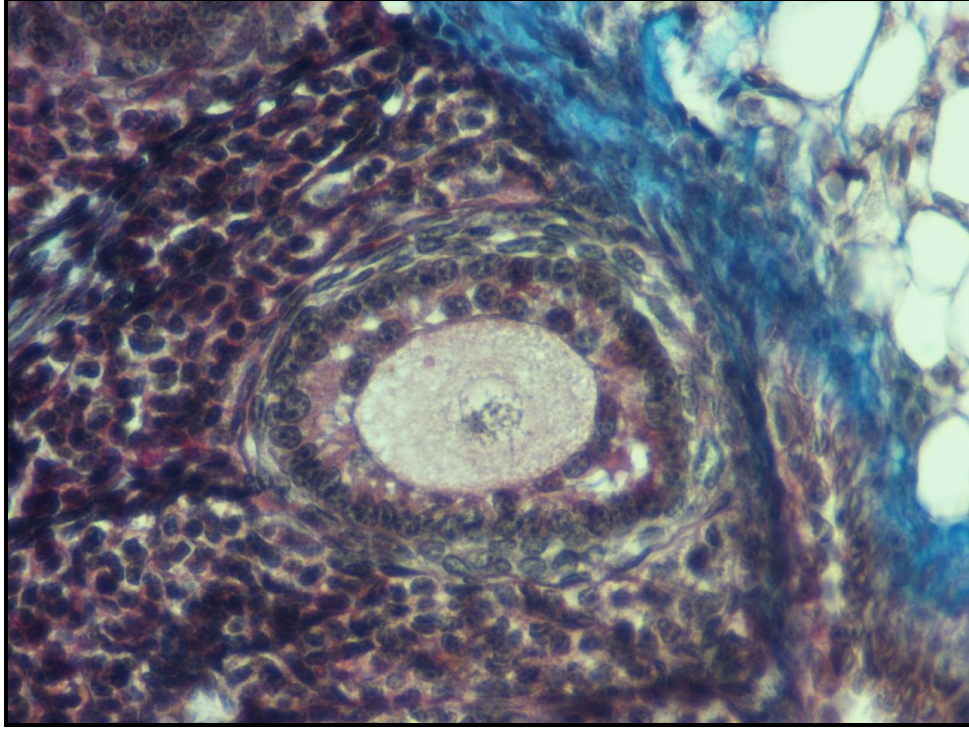
Şekil-9: Tamoksifen grubunda primordial folikülün görünümü, *Crossmann*'ın üçlü boyama yöntemi ile stereo mikroskop görüntüsü (X40'lük büyütme).



Şekil-10: Kontrol grubunda ovaryumun genel görünümü, *Crossmann*'ın üçlü boyama yöntemi ile stereo mikroskop görüntüsü (X4'lük büyütme).



Şekil-11: Kontrol grubunda foliküllerin genel görünümü, *Crossmann*'ın üçlü boyama yöntemi ile stereo mikroskop görüntüsü (X20'lük büyütme).



Şekil-12: Kontrol grubunda primer folikülün görünümü, *Crossmann*'ın üçlü boyama yöntemi ile stereo mikroskop görüntüsü (X60'lük büyütme).

İstatistiksel değerlendirmede Mann Whitney U testi kullanıldı ve $p < 0.05$ anlamlı olarak kabul edildi.

Tüm gruplarda bakılan parametrelerin, medyan (minimum-maksimum) değerleri Tablo-2'de verilmiştir.

Tamoksifen grubuna ait 15 farenin ovaryumlarının mikroskopik incelemesinde, medyan primordial folikül sayısının 4(0-12), kontrol grubuna ait 11 farenin ovaryumlarının mikroskopik incelemesinde medyan primordial folikül sayısı 3(2-11) olarak saptandı. İki grup arasında istatistik olarak fark saptanmadı ($p=0,878$).

Tamoksifen grubu medyan primer folikül sayısı 4(1-8), kontrol grubu primer folikül sayısı 3(1-6) olarak bulunmuştur. İki grup arasında istatistik olarak fark saptanmadı ($p=0,507$).

Tamoksifen grubu medyan sekonder folikül sayısı 3(1-5), kontrol grubu sekonder folikül sayısı 6(1-11) olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak fark saptandı ($p=0,011$).

Tamoksifen grubu medyan pre-antral folikül sayısı 5(0-7), kontrol grubu pre-antral folikül sayısı 8(1-15) olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (p=0,002).

Tamoksifen grubu medyan antral folikül sayısı 3(1-6), kontrol grubu antral folikül sayısı 2(0-7) olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,799).

Tamoksifen grubu medyan sınıflandırılmayan folikül sayısı 5(0-7), kontrol grubu sınıflandırılmayan folikül sayısı 5(0-13) olarak saptandı. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,330) (Tablo-3).

Tablo-3: Tamoksifen ve Kontrol grubu arasında folikül sayılarının karşılaştırılması.

	Tamoksifen (n,15)		Kontrol (n,11)		P
	Ortalama	(min.-max.)	Ortalama	(min.-max.)	
Pirimordial	4	(0-12)	3	(2-11)	0.878
Primer	4	(1-8)	3	(1-6)	0.507
Sekonder	3	(1-5)	6	(1-11)	0.011*
Pre-antral	5	(0-7)	8	(1-15)	0.002*
Antral	3	(1-6)	2	(0-7)	0.799
Sınıflanamayan	5	(0-7)	5	(0-13)	0.330

Mann Whitney U testi kullanıldı.

*: p< 0.05 anlamlı

TARTIŞMA

Meme kanseri, kadınlarda görülen kanserlerin dördte birini oluşturur. Kadınlarda, kansere bağlı ölümlerde, akciğer kanseri ve kolorektal kanserden sonra üçüncü sırayı alır. 1985 yılına kadar kansere bağlı ölümlerde, ilk sırayı alan meme kanserinin bugün üçüncü sıraya düşmesinin temel nedeni, erken evre olguların artması ve cerrahi sonrası uygulanan adjuvan tedavi protokollerindeki gelişmelerdir (100). Bu gelişmelerden en ilgi çekici olanı 1973 yılında klinik kullanıma sunulan tamoksifendir (101).

Meme kanseri tedavisinin 3 amacı vardır (102).

- 1-Primer tümörü kontrol altına almak
- 2-Metastatik hastalık risklerini azaltmak
- 3-Hastanın hayat kalitesini artırmak

Bizde, meme kanseri tedavisinde en çok satılan ve kullanılan ilaç olan tamoksifenin, folikül gelişimi ve farklılaşmasına olan etkisini değerlendirmek amacı ile yaptığımız çalışmanın sonuçlarını, literatür bulguları ışığında tartışmak istedik.

Tamoksifen oral olarak iyi tolere edilen, sentetik nonsteroid yapıda, ER'yi kompetitif olarak bloke eden, antiöstrojen ajandır. Fakat aynı zamanda agonistik özelliğinden dolayı östrojenik etkileri de vardır. Bu değişik etkileri, doza, organa, türe ve hücre tipine bağlıdır. Bu ikiliğin kesin mekanizması tam olarak anlaşılamamıştır. Fakat belirli hücrelerin ER çeşitliliğine bağlı olduğu düşünülmektedir (103).

Meme kanserli hastalarda, tamoksifenin over rezervi ya da folikül havuzuna olan etkisini net olarak değerlendirmek mümkün değildir. Hastaların yaşı, genetik yapısı, tümörün evresi, lenf nodu tulumunun varlığı, BMI farklılığı ya da aldıkları değişik kemoterapi rejimi gibi faktörler, net bir değerlendirme yapmayı mümkün kılamamaktadır. Biz çalışmamızı deneysel çalışma olarak düzenlerken, aynı genetik yapıya sahip, aynı ağırlıkta kardeş fareler seçerek bireysel farklılığı en aza indirmeyi hedefledik.

Günümüzde Tamoksifen, ovulasyonu stimüle etmek ya da antikanser ilaç olarak, iki farklı endikasyonda kullanılmaktadır. Tamoksifen, GnRH ve gonadotropinleri kontrol eden, santral sinir sisteminde ve hipofizde anti-östrojendir. Normal ovulatuar premenopozal kadınlar tamoksifenle tedavi edildiğinde, gonadotropin düzeyinin artması, multifoliküler gelişime, multipl ovulasyonun olmasına ve östrojen ve progesteronun artmasına neden olmaktadır. Kanser tedavisinde ise, meme dokusundaki östrojen hormonu reseptörlerini durdurarak kanserin yayılmasını önlemektedir (68).

Kırk yaşın altındaki genç kadınlarda meme kanseri insidansının artması ve çocuk sahibi olma yaşının giderek ertelenmesi, meme kanseri tedavilerinde fertilitate koruyucu rejimlerin ön plana çıkmasına neden olmuştur (1101). Meme kanseri tanısı alan kadınların %25'i 40 yaşın altındadır. Genç meme kanserli hastalar, sistematik tedavinin neticesinde fertilitelerinin azalması konusunda korku içindedir. Son yapılan anketlerde, bu hastaların yarısından fazlasının, infertilite hakkında bilgi sahibi olmak istedikleri, bu konuyla ilgili sorular sordukları ve en az %30'unun tedavi tecihlerinde, infertilitenin belirleyici olduğu gösterilmiştir (104).

Premenopozal meme kanserli hastalarda, primer tümörün asıl tedavisi olan cerrahi ya da radyasyon gibi lokal tedaviler, hastaların üreme fonksiyonunu etkilememektedir (104). İnfertilite, uzun kombine kemoterapi rejimlerinden sonra görülmektedir. Hatta kemoterapi esnasında, hala adet gören hastalarda bile infertilite geliştiği gözlenmiştir (105). *Cyclophosphamide*, *methotrexate* ve *5-fluorouracil* gibi ya da daha sıklıkla *anthracycline* temelli kemoterapiyle ilişkili amenore insidansı hastaların %68'inde raporlanmıştır (106). Tedavi esnasındaki hastanın yaşı ve ilacın toplam dozu, bu sınıf ilaçların etkisini değiştiren önemli faktörlerdir. Over yetmezliğine neden olan bu ilaçlar üç sınıfa ayrılabilir: *Cyclophosphamide* gibi kesinlikle gonadal toksisiteye neden olanlar, *methotrexate*, ve *5-fluorouracil* ve *6-mercaptopurine* gibi gonadal toksisiteye neden olma ihtimali olanlar ve *doxorubicin*, *bleomycin*, vinka alkaloidleri (*vincristine* ve *vinblastin*), *cisplatin*, *nitrosoureas*, *cytosine*, ve *arabinoside* gibi gonadal toksisite etkisi bilinmeyenler (106).

Sukumvanich ve ark.(107) yaptıkları bir çalışmada, meme kanseri tedavisinde kullanılan standart kemoterapi rejimleri, amenore yapmaları açısından karşılaştırılmış. Çalışmanın sonucunda, *cyclophosphamide*, *methotrexate*, ve *5-fluorouracil* (CMF); *doxorubicin* and *cyclophosphamide* (AC); *doxorubicin*, *cyclophosphamide*, and *paclitaxel* (ACT)'den oluşan bu üç protokol arasında, amenore oranı benzer olarak bulunmuştur.

Goodwin ve ark.(108)'nin yaptığı ve diğer pek çok çalışmada, kemoterapiye bağlı menopoz riskinde en önemli faktörün, hastanın teşhisdeki yaşı olduğu gösterilmiştir. Otuz beş yaşının altında menopoz riski yaklaşık olarak %15 olarak bildirilmişken, 40 yaşın üstünde risk %40'dan fazla bulunmuştur.

Hormon reseptörü pozitif olan meme kanserli hastalarda, kemoterapi yalnız başına tedavide yetersiz kalmaktadır. Bu hastalara endokrin tedavi önerilmektedir (109). Geleneksel tedavi tamoksifendir. Ancak LHRH analogları, oofektomi, over radyasyonu alternatif tedavi olarak ya da tamoksifenle kombine olarak kullanılmaktadır. Premenopozal kadınlarda, kemoterapiden sonra, tamoksifenin yalnız başına kullanılmasını, yoksa ovaryan supresyonla birlikte kullanılmasını daha iyi olduğu konusu henüz netlik kazanmamıştır (110-114). Bunun ötesinde tamoksifenle optimal tedavi süresi 5 yıldır, teratojenitesi nedeniyle tedavi tamamlanana kadar hastalar gebeliği ertelemek zorunda kalmakta ve yaşla birlikte fertilité doğal olarak azalmaktadır (115).

Günümüzde henüz folikülogenezisin mekanizması, net olarak aydınlatılamamıştır. Ancak, dişi üreme sisteminin gelişim basamaklarının herhangi bir döneminde, maruz kalınan östrojenin, kadınların ve çeşitli hayvan türlerinin üreme fonksiyonuyla ilişkisi olduğu kesindir (116, 117). Germ hücreleri parakrin ya da endokrin yolla kendi gelişimlerini doğrudan etkileyen östrojenleri sentezleyebilirler (118). E2 eksikliği olan sıçanlarda primordial ve primer folikül havuzunun azaldığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (119, 120). Sonuç olarak E2, primordial folikül havuzu üzerinde rol oynar (121). Söz konusu kanıtlara göre kuvvetle önerilmektedir ki, tamoksifenle folikülogenezis arasında bir ilişki olmalıdır (122).

Pamela ve ark.(108) yaptıkları, yaş ortalaması 43.7 olan (tümör, nod, evre sınıflamasına göre T1-3 N0-1 M0) 183 premenopozal kadını değerlendikleri çalışmalarında, hastaların %45.4'ine CMF, %13.7'sine FEC ve %25'ine cerrahi sonrası adjuvan tamoksifen kullandılar. Bu çalışmada, menopoz riskinin yaşla, herhangi bir kemoterapi rejimiyle veya yalnız tamoksifenle artmış olduğu saptanmıştır.

Fornier ve ark.(123) 2005'de yayınladıkları retrospektif analizde, *Memorial Sloan-Kettering Cancer Merkezi*'nde yaş ortalaması 36 olan (27-40 yaş), 166 premenopozal meme kanseli hastayı değerlendirdiler. Olguların tamamı düzenli siklusları olan hastalardan oluşmaktaydı. Adjuvan *anthracycline* ve *taxane* tedavisinin sonunda, 25 hastada (15%) uzun dönem amenore gelişti ve 141 hastanın (85%) düzenli siklusları devam etti. 82 hasta kemoterapiden sonra tamoksifen aldı. Bunların arasında amenore, hastaların %17'inde saptandı.

Swain ve ark.(124)'nın 2009 yılında yaptıkları, NSABP B-30 çalışmasında, AC-Taxotere alan 708 hasta, aynı zamanda amenore açısından da değerlendirildi. Bu hastaların tedavilerine tamoksifen eklendiğinde amenore oranının anlamlı olarak arttığı gösterildi.

Roshangar ve ark.(125) çalışmalarında, tamoksifenin, oosit ve foliküler gelişim ve diferansiyasyonu üzerindeki etkisini araştırmak için gebe farelere, tamoksifen verip, yavru farelerin overlerini histolojik olarak değerlendirdiler. Yaptıkları morfometrik çalışmalarda, oosit nestlerinin sayısı ve çaplarının çalışma grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı şekilde azaldığı, bununla birlikte primordiyal ve primer foliküllerin sayısı ve çapları arasında anlamlı farklılık bulunmadığını saptadılar. Sonuç olarak tamoksifenin, foliküler diferansiyasyonu erken fazlarda süprese ettiğini fakat farklılaşmış folikülleri etkilemediğini, tamoksifenin üreme sistemini negatif yönde etkilediğini vurguladılar.

Balasinor ve ark.(126, 127) yaptıkları 2 ayrı çalışmada, uzun süre oral tamoksifen tedavisi verilen yetişkin erkek farelerin, testis, aksesuar bez ve hipotalamo hipofizer akslarında östrojenik etkileri gösterdiler. Ayrıca erkek farelerin yavrularında implantasyondan önce ve sonra artmış düşük oranları

saptadılar. Tamoksifenin embriyo gelişimini etkilediğini ve fertilitiyi azalttığını gösterdiler.

Birçok kanser ilacı çoğalan hücrelere etki eder. Bu nedenle folikülde çoğalmayan oositlerden daha çok, granüloza ve teka hücrelerinin etkilenmesi beklenir. Tipik olarak, kemoterapiye maruz kalmış overlerde primordial foliküller çok az etkilenirken, matür foliküller çok daha büyük oranda azalmaktadırlar (128, 129).

Bu histolojik bulguların klinik yansımaları pek çok kadında gözlenir. Özellikle 40 yaşın altında, kemoterapi sırasında amenore görülür, serum FSH düzeyi artar, kemoterapinin kesilmesinden sonrada pek çok hastada menstrüel sikluslar ve fertilité geri döner (130-132).

Literatürde taranan çalışmaların hepsinde menopoz belirleyicisi olarak amenore insidansının değerlendirildiği gözlemlendi. Ancak amenore ile over rezervini değerlendirmek yanlış olacaktır. Muhtelemen amenore, tamoksifenin hipotalomo-hipofizer aksa yaptığı hormonal supresyon sonucu gözlenmektedir. Hastaların büyük bir kısmında tedavi kesildikten sonra menstrüel sikluslarının başlaması ve 35 yaş altında istatistiksel anlamlılık olmaması bu görüşü desteklemektedir. Fertilitenin asıl belirleyicisi, over rezervinin en doğru göstergesi olan primordial folikül sayısının azaldığı ya da AMH'nin azaldığı hiç bir çalışmada gösterilememiştir. Bizim yaptığımız çalışmada, tamoksifenin foliküler gelişimi bazı aşamalarda inhibe ettiği, overde sekonder ve preantral folikül sayısını azalttığı gösterildi. Bununla birlikte, primordial folikül sayısında ve AMH düzeyinde, deney ve kontrol grubu arasında anlamlı fark saptanmadı. Östrojen antagonisti olan tamoksifenin oluşturduğu hipoöstrojenik çevrede preantral aşamadaki foliküllerin etkilenmesinin doğal olduğu düşünüldü. Ancak sayısı sabit olan primordial foliküller üzerine etkisinin olmaması, tamoksifenin over rezervini etkilemediği kanısını destekledi.

Sonuç olarak;

- Düzenli östrus siklusu gösteren BALB/c soyu dişi fareler kullanıldı.
- Tamoksifen 100 µl dozunda intraperitoneal olarak uygulandı.
- Tamoksifen grubu ve kontrol grubu arasında AMH değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.
- Histolojik değerlendirmede her iki grup arasında,
 - a) Primordial, primer, antral ve sınıflandırılmayan foliküllerin sayısı açısından, anlamlı farklılık saptanmadı.
 - b) Sekonder ve preantral foliküller açısından, anlamlı fark saptandı.

Sonuç olarak, tamoksifenin geç safhadaki folikülleri baskıladığı, ancak over rezervinin göstergesi olan primordial folikülleri etkilemediği gösterilmiştir.

Premenopozal meme kanserli hastalar, kanser tedavisi sırasında erken menopoza girmekte, doğurganlık kapasitelerinin yanında, menopozun pek çok etkisine genç yaşta maruz kalmaktadırlar. Adjuvan tedavilerin menopoza katkıları olduğu düşünülse de, bunu kanıtlamak için daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Seperoff L, Glass R.H, Kase. Clinical. Endocrinology and Infertility. In: N.G, eds. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 6th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999.
2. Rabinovici J, Jaffe RB. Development and regulation of growth and differentiated function in human and subhuman primate fetal gonads. *Endocr Rev* 1990;11:532-57.
3. Oktem O, Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod* 2010;25:2944-54.
4. Cosman F, Lindsay R. Selective estrogen receptor modulators: clinical spectrum. *Endocr Rev* 1999;20:418-34.
5. Baker TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1963;158:417-33.
6. Wylie C. Germ cells. *Cell* 1999;96:165-74.
7. Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human reproduction. I. The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod Update* 1997;3:281-95.
8. Gondos B, Bhiraless P, Hobel CJ. Ultrastructural observations on germ cells in human fetal ovaries. *Am J Obstet Gynecol* 1971;110:644-52.
9. Oktem O, Oktay K. The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann NY Acad Sci* 2008;1127:1-9.
10. Gondos B, Westergaard L, Byskov A. Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155:189-95.
11. Ammini AC, Pandey J, Vijayaraghavan M, Sabherwal U. Human female phenotypic development: role of fetal ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;79:604-8.
12. Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 1999;140:4262-71.
13. Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol Reprod* 2001;65:994-9.
14. Findlay JK, Drummond AE, Dyson ML, et al. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Cell Endocrinol* 2002;191:35-43.
15. Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:3748-51.
16. Oktay K, Karlikaya G, Akman O, Ojakian GK, Oktay M. Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. *Biol Reprod* 2000;2:457-61.

17. Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001;6:829–38.
18. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 2005;5:461–71.
19. Castrillon DH, Miao L, Kollipara R, Horner JW, DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 2003;5630:215–8.
20. Rajareddy S, Reddy P, Du C, et al. p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Mol Endocrinol* 2007;9:2189–202.
21. Reddy P, Liu L, Adhikari D, et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 2008;5863:611–3.
22. Adhikari D, Zheng W, Shen Y, et al. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Hum Mol Genet* 2010;3:397–410.
23. De Baere E, Beysen D, Oley C, et al. FOXL2 and BPES: mutational hotspots, phenotypic variability, and revision of the genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 2003;2:478–87.
24. Rankin T, Familiar M, Lee E, et al. Mice homozygous for an insertional mutation in the Zp3 gene lack a zona pellucida and are infertile. *Development* 1996;9:2903–10.
25. Dong J, Albertini DF, Nishimori K, et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996;6600:531–5.
26. Carabatsos MJ, Elvin J, Matzuk MM, Albertini DF. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Dev Biol* 1998;2:373–84.
27. Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 2000;10:3814–20.
28. Nilsson EE, Skinner MK. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod* 2003;4:1265–72.
29. Nilsson EE, Skinner MK. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol* 2004;1–2:19–25.
30. Nilsson EE, Skinner MK. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol Reprod* 2002;3:1018–24.
31. Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006;2:191–206.
32. Kezele P, Nilsson EE, Skinner MK. Keratinocyte growth factor acts as a mesenchymal factor that promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Biol Reprod* 2005;5:967–73.

33. Shimasaki S, Zachow RJ, Li D, et al. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;13:7282–7.
34. Smitz J, Cortvrindt R, Hu Y, Vanderstichele H. Effects of recombinant activin A on in vitro culture of mouse preantral follicles. *Mol Reprod Dev* 1998;3:294–304.
35. Oktem O, Oktay K. The role of extracellular matrix and activin-A in in vitro growth and survival of murine preantral follicles. *Reprod Sci* 2007;4:358–66.
36. Liu X, Andoh K, Abe Y, et al. A comparative study on transforming growth factor-beta and activin A for preantral follicles from adult, immature, and diethylstilbestrol-primed immature mice. *Endocrinology* 1999;6:2480–5.
37. Weenen C, Laven JS, Von Bergh AR, et al. Anti-Mullerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod* 2004;2:77-83.
38. Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2005;1-2:81-6.
39. Gougeon A. Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod* 1986;1:81-7.
40. Jerome F. Strauss III and Carmen J. Williams. The ovarian life cycle. In: Strauss JF, Barbieri RL (eds). *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*. 6th edition. Saunders and Elsevier Inc. Philadelphia, 2009.
41. Erickson GF. The graafian follicle: A functional definition. In: Adashi EY (ed). *Ovulation: Evolving scientific and clinical concepts*. Springer-Verlaag, New York, 2000.
42. Janet E. Hall. Neuroendocrine control of the menstrual cycle. In: Strauss JF, Barbieri RL (eds). *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*, 6th edition. Saunders and Elsevier Inc. Philadelphia, 2009.
43. Cevrioğlu SA. Ovarian fizyoloji. In: Çiçek N, Akyürek C, Çelik Ç, Haberal A (eds). *Kadın hastalıkları ve doğum bilgisi*. Ankara: Güneş Kitabevi, 2004.
44. Abdalla H, Thum MY. An elevated basal FSH reflects a quantitative rather than qualitative decline of the ovarian reserve. *Hum Reprod* 2004;19:893-8.
45. Jain T, Soules MR, Collins JA. Comparison of basal follicle-stimulating hormone versus the clomiphene citrate challenge test for ovarian reserve screening. *Fertil Steril* 2004;82:180-5.
46. Kuohung W, Hornstein MD. Evaluation of female infertility. [Internet] Uptodate [cited 2013 April 21] Available from: <http://www.uptodate.com/contents/evaluation-of-female-infertility>
47. Smotrich DB, Widra EA, Gindoff PR, et al. Prognostic value of day 3 östradiol on in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 1995;64:1136–40.
48. Broekmans FJ, Kwee J, Hendriks DJ, Mol BW, Lambalk CB. A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Hum Reprod Update* 2006;12:685–718.

49. Licciardi FL, Liu HC, Rosenwaks Z. Day 3 östradiol serum concentrations as prognosticators of ovarian stimulation response and pregnancy outcome in patients undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril* 1995;64:991-4.
50. Rombauts L, Onwude JL, Chew HW, Vollenhoven BJ. The predictive value of antral follicle count remains unchanged across the menstrual cycle. *Fertil Steril* 2011;96:1514-8.
51. Hsu A, Arny M, Knee AB, et al. Antral follicle count in clinical practice: analyzing clinical relevance. *Fertil Steril* 2011;95:474-9.
52. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell* 1986;45:685-98.
53. Cohen-Haguenaer O, Picard JY, Mattéi MG, et al. Mapping of the gene for anti-müllerian hormone to the short arm of human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet* 1987;44:2-6.
54. Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol* 2003;211:21-31.
55. Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK. Müllerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev* 2001;22:657-74.
56. Knebelmann B, Boussin L, Guerrier D, et al. Anti-Müllerian hormone Bruxelles: a nonsense mutation associated with the persistent Müllerian duct syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3767-71.
57. Seifer DB, Baker VL, Leader B. Age-specific serum anti-Müllerian hormone values for 17,120 women presenting to fertility centers within the United States. *Fertil Steril* 2011;95:747-50.
58. de Vet A, Laven JS, de Jong FH, Themmen AP, Fauser BC. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril* 2002;77:357-62.
59. Gnoth C, Schuring AN, Friol K, et al. Relevance of anti-Müllerian hormone measurement in a routine IVF program. *Hum Reprod* 2008;23:1359-65.
60. Lutchman Singh K, Muttukrishna S, Stein RC, et al. Predictors of ovarian reserve in young women with breast cancer. *Br J Cancer* 2007;96:1808-16.
61. Weghofer A, Dietrich W, Barad DH, Gleicher N. Live birth chances in women with extremely low-serum anti-Müllerian hormone levels. *Hum Reprod* 2011;26:1905-9.
62. Conzen SD, Ellis M. Mechanisms of action of selective estrogen receptor modulators [Internet] Uptodate [cited 2013 April 21] Available from: <http://www.uptodate.com/contents/mechanisms-of-action-of-selective-estrogen-receptor-modulators>
63. Sneader W. Tamoxifen, hormone analogues (ch 18). In: Sneader W (ed). *Drug discovery: a history*. 1st edition. New York: Wiley;2005.
64. Jordan VC. Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:205-13.

65. Jordan VC. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *Br J Pharmacol* 2006;147:S269-76.
66. Cole MP, Jones CT, Todd ID. A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer. An early clinical appraisal of ICI46474. *Br J Cancer* 1971;25:270-5.
67. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early breast cancer trialists' collaborative group. *Lancet* 1998;351:1451-67.
68. Kayaalp SO. Androjenler, anabolik steroidler ve antiandrojenik ilaçlar(Bölüm:8,Konu:81) In: Kayaalp SO (ed). *Tıbbi farmakoloji*. 10. Baskı. Ankara: Hacettepe-TAŞ; 2002.
69. Derman O, Kanbur NO, Kutluk T. Tamoxifen treatment for pubertal gynecomastia. *Int J Adolesc Med Health* 2003;15:359-63.
70. Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:353-61.
71. Hurtado A, Holmes KA, Geistlinger TR, et al. Regulation of ERBB2 by oestrogen receptor-PAX2 determines response to tamoxifen. *Nature* 2008;456:663-6.
72. Alkner S, Bendahl P, Grabau D, et al. The role of AIB1 and PAX2 in primary breast cancer: validation of AIB1 as a negative prognostic factor. *Ann Oncol* 2013;24:1244-52.
73. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell* 2007;130:811-23.
74. BIG 1-98 Collaborative Group, Mouridsen H, Giobbie-Hurder A, et al. Letrozole therapy alone or in sequence with tamoxifen in women with breast cancer. *N Engl J Med* 2009;361:766-76.
75. Eggemann H, Ignatov A, Smith BJ, et al. Adjuvant therapy with tamoxifen compared to aromatase inhibitors for 257 male breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2013;137:465-70.
76. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research [Internet] Tamoxifen [cited 2013 April 21] Available from: <http://www.fda.gov/NewsEvents/Testimony/ucm115118.htm>
77. Eugster EA, Shankar R, Feezle LK, Pescovitz OH. Tamoxifen treatment of progressive precocious puberty in a patient with McCune-Albright syndrome. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999;12:681-6.
78. Arnheim N. Preimplantation genetic diagnosis--a rolling stone gathers no moss! *Hum Reprod* 1992;7:1481.
79. Sawathiparnich P, Osuwanaratana P, Santiprabhob J, Likitmaskul S. Tamoxifen improved final height prediction in a girl with McCune-Albright syndrome: patient report and literature review. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2006;19:81-6.
80. Steiner AZ, Terplan M, Paulson RJ. Comparison of tamoxifen and clomiphene citrate for ovulation induction: a meta-analysis. *Hum Reprod* 2005;20:1511-5.

81. Akgül S, Kanbur N, Güçer S, Safak T, Derman O. The histopathological effects of tamoxifen in the treatment of pubertal gynecomastia. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2012;25:753-5.
82. Zarate CA Jr, Singh JB, Carlson PJ, et al. Efficacy of a protein kinase C inhibitor (tamoxifen) in the treatment of acute mania: a pilot study. *Bipolar Disord* 2007;9:561-70.
83. Yildiz A, Güteryüz S, Ankerst DP, Ongür D, Renshaw PF. Protein kinase C inhibition in the treatment of mania: a double-blind, placebo-controlled trial of tamoxifen. *Arch Gen Psychiatry* 2008;65:255-63.
84. Mele T, Generali D, Fox S, et al. Anti-angiogenic effect of tamoxifen combined with epirubicin in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Oct;123(3):795-804.
85. Blackwell KL, Haroon ZA, Shan S, et al. Tamoxifen inhibits angiogenesis in estrogen receptor-negative animal models. *Clin Cancer Res* 2000;6:4359-64.
86. Feil R, Brocard J, Mascrez B, et al. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:10887-90.
87. Dabelic N, Jukic T, Labar Z, et al. Riedel's thyroiditis treated with tamoxifen. *Croat Med J* 2003;44:239-41.
88. Krum SA, Miranda-Carboni GA, Hauschka PV, et al. Estrogen protects bone by inducing Fas ligand in osteoblasts to regulate osteoclast survival. *EMBO J* 2008;27:535-45.
89. Jones ME, van Leeuwen FE, Hoogendoorn WE, et al. Endometrial cancer survival after breast cancer in relation to tamoxifen treatment: pooled results from three countries. *Breast Cancer Res* 2012;14:R91.
90. Esteva FJ, Hortobagyi GN. Comparative assessment of lipid effects of endocrine therapy for breast cancer: implications for cardiovascular disease prevention in postmenopausal women. *Breast* 2006;15:301-12.
91. Decensi A, Maisonneuve P, Rotmensz N, et al. Effect of tamoxifen on venous thromboembolic events in a breast cancer prevention trial. *Circulation* 2005;111:650-6.
92. Eberling JL, Wu C, Tong-Turnbeaugh R, Jagust WJ. Estrogen- and tamoxifen-associated effects on brain structure and function. *Neuroimage* 2004;21:364-71.
93. Bender CM, Sereika SM, Brufsky AM, et al. Memory impairments with adjuvant anastrozole versus tamoxifen in women with early-stage breast cancer. *Menopause* 2007;14:995-8.
94. Mortimer JE, Boucher L, Baty J, et al. Effect of tamoxifen on sexual functioning in patients with breast cancer. *J Clin Oncol* 1999;17:1488-92.
95. Cella D, Fallowfield L, Barker P, et al. Quality of life of postmenopausal women in the ATAC ("Arimidex", tamoxifen, alone or in combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for early breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2006;100:273-84.
96. Broman KW. The genomes of recombinant inbred lines. *Genetics* 2005;169:1133-46.

97. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil* 1968;17:555-7.
98. Parrott JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* 1999;140:4262-71.
99. Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol Reprod* 1995;53:295-301.
100. Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. *CA Cancer J Clin* 2011;61:212-36
101. Lawrenz B, Neunhoeffer E, Henes M, et al. Management of fertility preservation in young breast cancer patients in a large breast cancer centre. *Arch Gynecol Obstet* 2010;282:547-51.
102. Barbieri RL. The Breast. in: Jerome F. Strauss, Robert L. Barbieri. (eds) Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology. 6th edition Philadelphia: Saunders, an imprint of Elsevier Inc.; 2009.
103. Clemons M, Danson S, Howell A. Tamoxifen ("Nolvadex"): a review. *Cancer Treat Rev* 2002;28:165-80.
104. Lee MC, Gray J, Han HS, Plosker S. Fertility and reproductive considerations in premenopausal patients with breast cancer. *Cancer Control* 2010;17:162-72.
105. Poniatowski BC, Grimm P, Cohen G. Chemotherapy-induced menopause: a literature review. *Cancer Invest* 2001;19:641-8.
106. Badawy A, Elnashar A, El-Ashry M, Shahat M. Gonadotropin-releasing hormone agonists for prevention of chemotherapy-induced ovarian damage: prospective randomized study. *Fertil Steril* 2009;91:694-7.
107. Sukumvanich P, Case LD, Van Zee K, et al. Incidence and time course of bleeding after longterm amenorrhea after breast cancer treatment: a prospective study. *Cancer* 2010;116:3102-11.
108. Goodwin PJ, Ennis M, Pritchard KI, Trudeau M, Hood N. Risk of menopause during the first year after breast cancer diagnosis. *J Clin Oncol* 1999;17:2365-70.
109. Aebi S, Gelber S, Castiglione-Gertsch M, et al. Is chemotherapy alone adequate for young women with oestrogen-receptor-positive breast cancer? *Lancet* 2000;355:1869-74.
110. International Breast Cancer Study Group (IBCSG), Castiglione-Gertsch M, O'Neill A, Price KN, et al. Adjuvant chemotherapy followed by goserelin versus either modality alone for premenopausal lymph node-negative breast cancer: a randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1833-46.
111. Ovarian ablation in early breast cancer: overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. *Lancet* 1996;348:1189-96.
112. Kaufmann M, Jonat W, Blamey R, et al. Survival analyses from the ZEBRA study. Goserelin (Zoladex) versus CMF in premenopausal

- women with node-positive breast cancer. *Eur J Cancer* 2003;39:1711-7.
113. De Placido S, De Laurentiis M, De Lena M, et al. A randomised factorial trial of sequential doxorubicin and CMF vs CMF and chemotherapy alone vs chemotherapy followed by goserelin plus tamoxifen as adjuvant treatment of node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2005;92:467-74.
 114. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687-717.
 115. Gabriel CA, Domchek SM. Breast cancer in young women. *Breast Cancer Res* 2010;12:212.
 116. Susiarjo M. Identification and characterization of estrogen mediated effect on female meiosis: Studies of bisphenolA and estrogen receptors. [internet] [cited 2013 April 21] Available from: <http://etd.ohiolink.edu/send-pdf.cgi/Susiarjo%20Martha.pdf?case1158685403>
 117. Britt KL, Saunders PK, McPherson SJ, et al. Estrogen actions on follicle formation and early follicle development. *Biol Reprod* 2004;71:1712-23.
 118. Solakidi S, Psarra AM, Nikolaropoulos S, Sekeris CE. Estrogen receptors alpha and beta (ERalpha and ERbeta) and androgen receptor (AR) in human sperm: localization of ERbeta and AR in mitochondria of the midpiece. *Hum Reprod* 2005;20:3481-7.
 119. Zachos NC, Billiar RB, Albrecht ED, Pepe GJ. Developmental regulation of baboon fetal ovarian maturation by estrogen. *Biol Reprod*. 2002;67:1148-56.
 120. Vitt UA, McGee EA, Hayashi M, Hsueh AJ. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 2000;141:3814-20.
 121. Couse JF, Korach KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 1999;20:358-417.
 122. De Vos FY, van Laarhoven HW, Laven JS, et al. Menopausal status and adjuvant hormonal therapy for breast cancer patients: a practical guideline. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;84:252-60.
 123. Fournier MN, Modi S, Panageas KS, Norton L, Hudis C. Incidence of chemotherapy-induced, long-term amenorrhea in patients with breast carcinoma age 40 years and younger after adjuvant anthracycline and taxane. *Cancer* 2005;104:1575-9.
 124. Swain SM, Land SR, Ritter MW, et al. Amenorrhea in premenopausal women on the doxorubicin-and-cyclophosphamide-followed-by-docetaxel arm of NSABP B-30 trial. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113:315-20.
 125. Roshangar L, Rad JS, Afsordeh K. Maternal tamoxifen treatment alters oocyte differentiation in the neonatal mice: inhibition of oocyte

- development and decreased folliculogenesis. *J Obstet Gynaecol Res* 2010;36:224-31.
126. Balasinor N, Gill-Sharma MK. Effect of paternal administration of an antiestrogen, tamoxifen on embryo development in rats. *Mol Cell Endocrinol* 2002;190:159-66.
 127. Balasinor N, Parte P. Effect of tamoxifen on sperm fertilising ability and preimplantation embryo development. *Mol Cell Endocrinol* 2001;178:199-206.
 128. Warne GL, Fairley KF, Hobbs JB, Martin FI. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. *N Engl J Med* 1973 Nov;289:1159-62.
 129. Nicosia SV, Matus-Ridley M, Meadows AT. Gonadal effects of cancer therapy in girls. *Cancer* 1985 May;55:2364-72.
 130. Siris ES, Leventhal BG, Vaitukaitis JL. Effects of childhood leukemia and chemotherapy on puberty and reproductive function in girls. *N Engl J Med* 1976;294:1143-6.
 131. Bakri YN, Pedersen P, Nassar M. Normal pregnancy after curative multiagent chemotherapy for choriocarcinoma with brain metastases. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1991;70:611-3.
 132. Hershlag A, Schuster MW. Return of fertility after autologous stem cell transplantation. *Fertil Steril* 2002;77:419-21.

Ekler

Ek-1: Kısaltmalar

AMH: Antimüllerian hormon

PGH: Primordiyal germ hücresi

FSH: Folikül stimulan hormon

LH: Luteinizan hormon

MIS: Müller inhibe edici madde

OIM: oosit mayoz inhibitörü

POF: *Prematüre ovarian failure*

AFS: Antral folikül sayımı

HCG: human chorionic gonadotropin

TGF-B: transforming growth faktör B

ER: östrojen reseptörü

TEŞEKKÜR

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı'nda aldığım uzmanlık eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım ve değerli hocam Doç. Dr. Kemal ÖZERKAN'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Araştırma süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, Histoloji-Embriyoloji ABD öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Berrin ZİK'a araştırma boyunca anlayış ve rehberliği için en derin teşekkürlerimi sunarım. Farmakoloji ABD öğretim üyesi Doç. Dr. Mehmet CANSEV'e, Histoloji-Embriyoloji ABD Arş. Gör. Sabire PEKER'e yardımlarından dolayı ayrıca teşekkür ederim.

Tez projemi destekleyerek bana maddi olanak sağlayan U.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Prof. Dr. Şakir KÜÇÜKKÖMÜRÇÜ, Prof. Dr. Candan CENGİZ, Prof. Dr. Mehpare TÜFEKÇİ, Prof. Dr. Ahmet ESMER, Prof. Dr. Hakan OZAN, Prof. Dr. Gürkan UNCU, Prof. Dr. Osman DEVELİOĞLU, Prof. Dr. Tufan BİLGİN, Prof. Dr. Yalçın KİMYA, Doç. Dr. M. Barış ATA, Yrd. Doç. Dr. Bilge ÇETİNKAYA DEMİR ve Yrd. Doç. Dr. M. Aral ATALAY'a; birlikte çalışmaktan zevk aldığım asistan arkadaşlarıma, klinik-poliklinik hemşire ve çalışanlarına;

Sevgili eşime, canım kızıma, bugünlere gelmemde emeği olan tüm hocalarıma ve bana her türlü eğitim ve öğrenim olanağı sunan aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr Ayşe TOPCU AKDUMAN

Bursa-2013

ÖZGEÇMİŞ

12 Aralık 1977 tarihli, Kayseri doğumluyum. İlk, Orta ve Liseyi Sivas'da tamamladıktan sonra İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi'ne kaydoldum. 2003 yılında mezun olduktan sonra, İstanbul Büyükşehir Belediyesi Kayışdağı Darülaceze, Kocaeli 2 nolu F Tipi Yüksek Güvenlikli Kapalı Ceza İnfaz Kurumu, Üsküdar Paşakapısı Kadın Kapalı Ceza İnfaz Kurumu'nda doktor olarak görev yaptım. 2005-2008 yılında Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesinde İç Hastalıkları AD'da araştırma görevlisi olarak çalıştım. 2008 yılından beri, Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD'da araştırma görevlisi olarak çalışmaktayım.

Yabancı dilim İngilizce olup, evli ve bir çocuk annesiyim.