



T. C.

ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**TAMOKSİFEN'İN FARE OVARYUMUNDA IGF-I SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE
ETKİSİ**

ENDER DENİZ ASMAZ

Prof. Dr. Berrin ZİK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİMDALI

BURSA-2017

Her Hakkı Saklıdır

TEZ ONAYI

Ender Deniz ASMAZ tarafından hazırlanan 'Tamoksifen'in Fare Ovaryumunda IGF-I Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi' adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Berrin ZİK

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Başkan:	Prof. Dr. Berrin ZİK Uludağ Üniversitesi Veteriner Fak. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	
Üye	Prof. Dr. Hikmet Sami YILDIRIMHAN Uludağ Üniversitesi Fen Edb. Fak. Zooloji Anabilim Dalı	
Üye	Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ Afyon Kocatepe Üniversitesi Veteriner Fak. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	

Yukarıdaki sonucu onaylarım


Prof. Dr. Ali BAYRAM

Enstitü Müdürü

21/12/2017

U.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi, - kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

21/12/2017

Ender Deniz ASMAZ

ÖZET

Yüksek Linsans Tezi

TAMOKSİFEN'İN FARE OVARYUMUNDA IGF-I SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ

Ender Deniz ASMAZ

Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Berrin ZİK

Bu çalışmada İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-I) ve İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörünün ovaryum foliküllerindeki ekspresyonları incelenerek, ovaryum üzerinde Tamoksifenin (TAM) gösterdiği etki mekanizmasında IGF-I sinyal yolağının rolünün olup olmadığı araştırıldı. Bu amaçla erişkin farelere subkutan yolla iki farklı dozda Tamoksifen enjeksiyonu yapıldı ve hayvanlar 3 gruba ayrıldı; taşıt madde (kontrol) grubu (n: 20), 0.5 mg/fare/gün TAM grubu (n:20), and 1.5 mg/fare/gün TAM grubu (n:20). Ovaryumda IGF-I ve IGF-IR'nün etkilerini belirlemek için farelere subkutan yolla 5 gün boyunca yapılan enjeksiyon sonrası immunohistokimyasal yöntem kullanılarak IGF-I ve IGF-IR ekspresyonu incelendi. Yüksek doz TAM grubunda antral foliküllerin ve korpus luteumun kontrol grubuna oranla çok daha az olduğu gözlemlendi ve TAM gruplarında atretik foliküllerin ve küçük kistik yapıların sayısında bir artış belirlendi. TAM'ın granuloza hücrelerinde IGF-I'nin ekspresyonunu değiştirmediği ancak IGF-IR'nün ekspresyonunu arttırdiği belirlendi. İntersitisyel hücrelerde TAM dozlarına bağlı olarak hem IGF-I hemde IGF-IR ekspresyonlarda bir artış gözlemlendi. Bununla birlikte TAM'ın oositlerde de hem IGF-I hemde IGF-IR ekspresyonlarını arttırdiği tespit edildi. TAM korpus luteumda IGF-I ekspresyonunu değiştirmeyenken IGF-IR'nün ekspresyonu düşürmüştür. Sonuç olarak; TAM'ın doza bağlı olarak, ovaryumda IGF-I ve IGF-IR ekspresyonlarını değiştirdiği belirlendi. TAM'ın ovaryum foliküllerinde IGF'leri genel olarak stimüle ettiği ve östrojen agonist bir etkiye neden olduğu, bununda farelerde polikistik over sendromuna neden olabileceği sonucuna varılabilir. Bu da, uzun vadede kadın deneklerde infertilite sorunlarına yol açabilir.

Anahtar Kelimeler: Tamoksifen, ovaryum follikülleri, dişi üreme sistemi, IGF-I, IGF-IR

2017, xi + 71sayfa

ABSTRACT

Msc Thesis

THE EFFECT OF TAMOXIFEN ON IGF-I SIGNAL PATHWAY IN MOUSE OVARY

Ender Deniz ASMAZ

Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Berrin Zık

This study was carried out to investigate expression of insulin like growth factor 1 (IGF-I) and insulin like growth factor 1 receptor (IGF-IR) on ovarian follicles and to examined whether or not IGF-I signaling pathway, plays a role in the effect mechanism of Tamoxifen (TMX) on the ovary. For this purpose, TMX was administered subcutaneously to adult mice in two different doses and animals were divided to 3 groups: vehicle injected group (n: 20), 0.5 mg/mouse/day TMX group (n:20), and 1.5 mg/mouse/day TMX group (n:20). Mice were injected subcutaneously for 5 days and IGF-I and IGF-IR expressions were examined using immunohistochemical method to find out the effects of IGF-I and IGF-IR in ovary. It was determined that there were significantly fewer antral follicles and corpus luteum in the higher dose TMX group than in the control group and the number of atretic follicles and small cystic structures were increased in TMX group. It was found that TMX did not affect IGF-I expression in granulosa cells, while IGF-IR expression increased. Depending on the doses of TMX were observed to increase in expression of both IGF-I and IGF-IR in interstitial cells. It was also observed that doses of TMX increased both IGF-I and IGF-IR expression in oocytes. TMX did not affect IGF-I expression in the corpus luteum, but decreased IGF-IR expression. As a result; It has been determined that TMX changes the IGF-I and IGF-IR expressions in the ovary in a dose-dependent manner. It can be concluded that TMX generally stimulates IGFs in ovarian follicles and shows an agonist effect on estrogen and may cause polycystic ovary syndrome in mice. This can lead to infertility problems in female subjects in long terms.

Keywords: Tamoxifen, ovarian follicles, female reproductive system, IGF-I, IGF-IR

2017, xi + 71 pages

TEŞEKKÜR

Tez konumun seçimi, planlanması, yürütülmesi ve sonuçlanması sürecinde benden bilimsel ve manevi desteğini asla esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle yetişmemi sağlayan, bir danışmandan çok akıl hocam olarak gördüğüm çok değerli Danışmanım Prof. Dr. Berrin ZİK'a (Uludağ Üniversitesi) sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Ayrıca tez çalışmam boyunca özellikle laboratuvar çalışmalarında benden yardımını ve güler yüzünü asla esirgemeyen sevgili Araş. Gör. Sebire PEKER'e (Uludağ Üniversitesi) çok teşekkür ediyorum.

Sunulan tez çalışması TÜBİTAK-TOVAG 117O695 numaralı proje ile "1002 Hızlı Destek Programı" kapsamında desteklenmiştir.

Bununla birlikte tüm yaşamım boyunca her anlamda yanımda olan, benden maddi ve manevi desteklerini asla esirgemeyen, canım annem ve ablama sonsuz sevgi ve özlemlerle teşekkür ederim.

Ender Deniz ASMAZ

21/12/2017

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	7
2.1. Ovaryum.....	7
2.1.1. Ovaryum Histolojisi.....	7
2.1.2. Ovaryum Embriyolojisi.....	8
2.1.3. Ovaryumda Foliküler Gelişim.....	9
2.1.3.1. Folikül Gelişimi -Primordiyal Foliküller.....	10
2.1.3.2. Folikül gelişimi- Primer Foliküller.....	11
2.1.3.3. Folikül gelişimi- Sekonder Foliküller.....	11
2.1.3.4. Folikül Gelişimi- Sekonder Folikül'den Preantral Foliküle Geçiş.....	12
2.1.3.5. Folikül Gelişimi- Antral (Graaf) Folikülü.....	13
2.1.4. Ovulasyon.....	15
2.1.5. Korpus Luteum.....	15
2.1.6. İntersitisyel Hücreler.....	16
2.2. Tamoksifen.....	17
2.2.1. Etki Mekanizması.....	18
2.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü.....	19
2.3.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I (IGF-I).....	20
2.3.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I Reseptörü (IGF-IR).....	22
2.3.3. IGF Bağlayıcı Proteinler (IGFBP).....	24
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	25
3.1. Deney Hayvanları ve Bakım Koşulları.....	25
3.2. Deneysel Uygulama.....	25
3.2.1. Dokuların Alınması.....	26
3.2.1.1. Histolojik Prosedür.....	26
3.2.1.2. Üçlü Boyama Yöntemi.....	27
3.2.1.3. İmmunohistokimya.....	28

3.3. Değerlendirme.....	32
3.4. İstatistiksel Analiz.....	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. Folikül Kompozisyonu ve Ovaryum Histolojisi	33
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular	35
4.2.1. IGF-I.....	35
4.2.2. IGF-IR.....	42
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	52
5.1. Genel Morfolojik Yapı.....	52
5.2. İmmunohistokimya	53
5.2.1. Oositte IGF-I Ekspresyonu	53
5.2.2. Granuloza Hücrelerinde IGF-I'in Ekspresyonu	53
5.2.3. Korpus Luteum, Teka ve İnterstisyel Hücrelerde IGF-I'in Ekspresyonu	54
5.2.4. Oositte IGF-IR'ün Ekspresyonu	55
5.2.5. Granuloza Hücrelerinde IGF-IR'in Ekspresyonu	56
5.2.6. Korpus Luteum, Teka ve İnterstisyel Hücreler Üzerinde IGF-IR'nün Ekspresyonu	56
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	71

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler

μm	Mikron metre
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat / Derece

Kisaltmalar

Kisaltmalar	Açıklama
A	Antral foliküller
ACTH	Adrenokortikotropik hormon
BMP-4/BMP-7	Kemik morfogenetik protein
DMBA	Dimetilbenz[a]antrasen
ECM	Ekstrasellüler matriks
EGF	Epidermis büyüme faktörü
ERK-1-2	Extracellular signal-regulated kinase 1-2
ER	Östrojen reseptör
E1	Estron
E2	Estradiol
E1s	Estron sülfat
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FSH	Folikül stimüle edici hormon
GH	Büyüme Faktörü
GnRH	Gonadotropini serbestleştirici hormon
hCG	İnsan koryon gonadotropini
İCH	İlkel cinsiyet hücreleri
IGFBP	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Bağlayıcı Proteinler
IGF-I	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I
IGF-IR	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü Reseptörü-I
IRS-1	İnsulin reseptör substrat-1
kDa	Kilo Dalton
LH	Luteinleştirici hormon
MAPK	Mitojen ile aktive olan protein kinaz
NSILA I ve II	Baskılanamayan insülin benzeri aktivite
PA	Preantral foliküller
PBS	Phosphate-buffered saline
PDGF	Kan Plaketlerinden köken alan büyüme faktörü
PO	Primordiyal foliküller
PR	Primer foliküller
PI-3K	Fosfatidilinositol-3 kinaz
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma.
Ras	Rat sarcoma
S	Sekonder foliküller
SERM	Seçici östrojen reseptör modülatörü
SH	Standart Hata
Shc	Src-Homology Collage
TAM	Tamoksifen

TBF
TGF- β
ZP

Testis-belirleyici faktör
Dönüştürücü büyüme faktörü β
Zona Pellucida



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.2. İnsülin ve İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-IR) arasındaki benzerlik.....	20
Şekil 4.1. (A); Kontrol grubu, (B); 0,5 TAM grubu ve (C); 1.5 TAM grubunun ovaryumundan genel görünüm.....	34
Şekil 4.2. 1,5 TAM grubunun ovaryumunda atretik ve sağlıklı foliküller	34
Şekil 4.3. Kontrol grubu ovaryumunda IGF-I ekspresyonu. (A); genel görünüm (B); oosit sitoplazmasında, (C); granuloza hücrelerinde ve intersitisyel hücreler, (D); korpus luteum, teka hücreleri ve intersitisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonu.....	36
Şekil 4.4. 0,5 TAM grubu ovaryumunda IGF-I ekspresyonu. (A); sekonder folikül oosit sitoplazmasında ve intersitisyel hücrelerde, (B); preantral foliküllerin oosit sitoplazmasında, intersitisyel ve granuloza hücrelerinde, (C); korpus luteum, teka ve intersitisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonu.....	37
Şekil 4.5. 1,5 TAM grubu ovaryumunda IGF-I ekspresyonu. (A); preantral folikül oosit sitoplazmasında, granuloza hücreleri ve intersitisyel hücrelerde, (B); oosit sitoplazmasında, intersitisyel, granuloza ve teka hücrelerinde IGF-I ekspresyonu.....	39
Şekil 4.6. Kontrol ve deney gruplarında foliküler düzeyde oosit sitoplazmalarında IGF-I'nin ekspresyon şiddetleri.....	40
Şekil 4.7. Kontrol ve deney gruplarında foliküler düzeyde granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyon şiddetleri.....	41
Şekil 4.8. Kontrol ve Deney gruplarında intersitisyel, teka ve korpus luteum hücrelerinde IGF-I ekspresyon şiddetleri.....	42
Şekil 4.9. Kontrol grubu ovaryumunda IGF-IR ekspresyonu. (A); genel görünüm. (B); preantral folikülün granuloza hücrelerinde, (C); preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde, korpus luteumda, teka ve intersitisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu.....	44
Şekil 4.10. 0,5 TAM gurubu ovaryumunda oosit sitoplazmasında, granuloza hücrelerinde, korpus luteumda, teka ve intersitisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu.	46
Şekil 4.11. 1,5 TAM gurubu ovaryumunda oosit sitoplazmasında, granuloza, teka ve intersitisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu.	47
Şekil 4.12. Kontrol ve Deney gruplarında foliküler düzeyde oosit sitoplazmalarında IGF-IR'nün ekspresyon şiddetleri.	48
Şekil 4.13. Kontrol ve deney gruplarında foliküler düzeyde granuloza hücrelerinde IGF-IR'nün ekspresyon şiddetleri.....	49
Şekil 4.14. Kontrol ve deney gruplarında intersitisyel, teka ve korpusl luteumda IGF-IR ekspresyon şiddetleri.....	50

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.1.	Ovaryum foliküllerinin sınıflandırılması.....	10
Çizelge 4.1.	Kontrol ve deney gruplarındaki foliküllerin oositlerinde IGF-I ekspresyonu.....	39
Çizelge 4.2.	Kontrol ve deney gruplarındaki foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu.....	40
Çizelge 4.3.	Kontrol ve Deney grupları arasında, korpus luteum hücrelerinde IGF-I ekspresyonu.....	41
Çizelge 4.4.	Kontrol ve Deney grupları arasında, intersitisyel ve teka hücrelerinde IGF-I ekspresyonu.....	41
Çizelge 4.5.	Kontrol ve deney gruplarındaki foliküllerin oositlerinde IGF-IR ekspresyonu.....	48
Çizelge 4.6.	Kontrol ve deney gruplarındaki foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu.....	49
Çizelge 4.7.	Kontrol ve deney grupları arasında, korpus luteum hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu.....	50
Çizelge 4.8.	Kontrol ve deney grupları arasında, İntersitisyel ve teka hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu.....	50

1. GİRİŞ

Ovaryum her siklusta çeşitli hormon ve faktörlerin etkisiyle morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal değişiklikleri yaşayan organizmanın dinamik bir organıdır (Balla ve ark. 2003). Memeli ovaryumunda follikül rezervi fetal hayatta belirlenmekle birlikte follikül atrezisi dışının tüm hayatı boyunca meydana gelir ve follikül popülasyonunun sürekli olarak azalmasına neden olur. Ovaryumda bulunan follikül rezervi doğal süreçle azalabildiği gibi pek çok eksojen etkenlere bağlı olarakta azalmakta ve kadınlarda infertilite 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 arttırmaktadır ancak, genç hastalarda ovarian yetersizlik ve sterilite gibi önemli yan etkilere de sebep olmaktadır (Meirow ve Nugent 2001, Blumenfeld ve ark. 2002, Fong ve ark. 2008). Günümüzde kanser tedavilerinde dişi gonadları radyoterapi ve kemoterapinin olumsuz etkilerinden korumaya yönelik pek çok yöntem geliştirilmektedir. Bunlar arasında embriyo ya da oosit dondurma, ovaryum dokusu dondurma, oosit donasyonu ve çeşitli gonadotropin hormonlar ile ovaryum fonksiyonlarının baskılanması en sık kullanılan yöntemlerdir (Blumenfeld ve ark. 2002, Socie ve ark. 2003). Ancak şu ana kadar pratik kullanıma tam adapte olmuş bir yöntem bulunmamaktadır (Giuseppe ve ark. 2007, Fong ve ark. 2008). Bu da yardımcı üreme teknikleri alanında daha çok deneysel çalışma yapılmasını zorunlu kılmaktadır. Kanser teşhisi konulan kadınlar fertilitelerini koruma hususunda oldukça hassastır. Dolayısıyla kanser tedavilerinde kullanılan kemotropik ilaçlar kanser tedavisinde etkili olurken diğer organlar üzerindeki etkileri özellikle fertilitite üzerine etkileri geniş çaplı araştırma gerektiren bir konudur. Meme kanseri, kadınlarda kansere bağlı ölümlerde, akciğer kanseri ve kolorektal kanserden sonra üçüncü sırada yer almaktadır ve kadınlarda oluşan kanserlerin dörtte birinden sorumludur (Greenlee ve ark. 2000). 1985 yılına kadar kansere bağlı 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 tamoksifendir (Wyld ve ark. 1998). 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 profilaktik olarak çok sık kullanılmaktadır. Ancak Ovaryumda tamoksifenin etkisi, ovaryumun kompleks hücreli yapısından dolayı çok fazla anlaşılammakta ve meme kanserli hastalarda kullanılan tamoksifenin bu kanserli hastaların ovaryumları üzerindeki etkisi hakkındaki bilgiler de çelişkilidir. Tamoksifen, seçici östrojen reseptör modülatörüdür (SERM). Endojen östrojen ile yarışarak östrojen reseptörlerine bağlanır, böylece östrojenik yada anti-östrojenik etkilerini dokuya spesifik olarak gösterirler (Shang ve Brown 2002). Tamoksifenin östrojen antagonist özelliği, özellikle ER pozitif meme kanserli hastaların tedavisinde önemlidir ve günümüzde bu amaçla çok sık kullanılmaktadır (Fisher ve ark. 1998). Tamoksifenin menapoz sonrası oluşan metastatik meme kanserli hastaların tedavisinde ilaç olarak kullanımı 1977 yılında uluslararası gıda ve ilaç komitesi tarafından onaylanmıştır. Erken tedavi, metastatik meme kanserli hastalarda hastalığın ilerleyişini geciktirmektedir (Nicolini ve ark. 1997). Yapılan araştırmalarda tamoksifenin profilaktik olarak kullanımının sağlıklı kadınlarda ER pozitif meme kanserin insidensini %45 azalttığı gözlenmiş ve 1998 yılında da menapoz öncesi ve sonrası kadınlarda koruyucu amaçla da kullanılabileceği uluslararası komite tarafından kabul edilmiştir (Fisher ve ark. 1998). Şu anda Tamoksifen menapoz öncesi ve menapoz sonrası kadınlarda meme kanserinin tüm evrelerinde kullanılabilmektedir. Tamoksifen'in meme kanserindeki etkisi onun anti östrojenik özelliğinden kaynaklanmaktadır. Tamoksifen meme dokusunda, kanser hücrelerinin G1 fazında kalmasını sağlayarak, hücre çoğalmasını bloke eder ve tümör regresyonuna sebep olur (Riggs ve Hartmann 2003). Bu sebeple hormon bağımlı meme kanserlerinde en yaygın kullanılan ilaçtır. Tamoksifenin anti östrojenik etkisinin yanında dişi genital kanallarda değişik lezyonlarla sonuçlanan östrojenik etkisi de bulunmaktadır. İn vivo ve invitro yapılan çalışmalarda endometrium, karaciğer, kemik ve vajinada güçlü östrojenik etkileri gözlenmiştir (Peterson ve Novak 1956, Wolf ve Jordan 1992, Jordan ve O'Malley 2007). Tamoksifenin GnRH, FSH ve LH' nin üretiminde artışla östrojen feedback mekanizmasını baskıladığı hipotalamusta ER bloklayarak ovaryumları aşırı uyardığı, östrojen sentezini arttırdığı ve sonuç olarak kistler oluşturabileceği bildirilmektedir. Tamoksifen tedavisinde FSH ve LH seviyelerinin dalgalı seyrettiği, östrodiolün deney grubunda kontrol grubuna göre yükseldiği bildirilmektedir (Sherman ve ark. 1979). Bununla birlikte kardio vasküler sistem için risk faktörü olabileceği gibi,

uterus ve iskelet sisteminde de östrojen agonist etkileri gösterilmektedir. İlacın ters etkileri endometrium kanserlerine (Killackey ve ark. 1985, Clarke ve ark. 1988, Fisher ve ark. 1994, Bernstein ve ark. 1999) endometrial poliplere (Corley ve ark. 1992, Kedar ve ark. 1994, Lahti ve ark. 1994), adenomyomatöz poliplere (Nasu ve ark. 1997), adenomyosis (Cohen ve ark. 1995), leiomyoma (Dilts ve ark. 1992, Leo ve ark. 1994, Kang ve ark. 1996), servikal polip ve ovarial kistlere (Sawka ve ark. 1986, Barbieri ve ark. 1993, Terada ve ark. 1993, Cohen ve ark. 1994, Shushan ve ark. 1996, Nasu ve ark. 1999) sebep olur. Tamoksifenin ovaryum kanser oluşturması üzerine etkisi ise bildirilmemektedir (Cohen ve ark. 1999, Metindir ve ark. 2005). Ting ve ark. (2008) ovaryum ve ER pozitif meme kanser modellerinde tamoksifen uygulamasının meme kanserini önlediği fakat deneysel oluşturulan ovaryum kanseri üzerine etkili olmadığını belirtmişlerdir (Ting ve ark. 2008). Bununla birlikte TAM'ın erişkin erkeklerde hipofiz, hipotalamus, eklenti bezleri ve testisler üzerine östrojen agonist etki gösterdiği, testiküler seminifer epitelyumun bozulduğu ve multinukleotid hücrelerin oluşumunun indüklendiği (Krause ve ark. 1992, Souza 2004), fertilitenin düştüğü bildirilmektedir (Balla ve ark. 2003). İlacın östrojen agonist etkisinin ise sinir sistemi üzerine olumlu etkiler yaptığı, menapoz sonrası kadınlarda özellikle Alzaymır gibi nöyrodejeneratif hastalıkların önlenmesinde düşük doz TAM ile yapılan tedavilerin etkili olduğu, hipokampüsteki nöyronlarda anti apoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı ve apoptozisi önlediği bildirilmektedir (Sharma ve Mehra 2008). Dolayısıyla TAM'ın östrojen antagonisti ya da agonisti olarak belirlenen biyolojik etkisi, doku tipine, konsantrasyonuna ve türlere göre değişmektedir (Long ve ark. 2001, Kennel ve ark. 2003). Tamoksifen gibi seçici östrojen reseptör blokörlerinin doku spesifik etkileri; (i) endojen östrojen seviyesi, (ii) ER alfa ve beta'nın lokal konsantrasyonu ve oranları, (iii) östrojen reseptör polimorfizmi, (iiii) ER koaktivatörlerinin (östrojenik etki) yada korepresörlerinin (anti-östrojenik etki) (iiii) klasik yada non-klasik yolları aktive etmesi sonucunda gelişir (Jordan ve O'Malley 2007). Tamoksifen'in ovaryum üzerine etkileri ile çalışmalar oldukça sınırlı sayıdadır. Yapılan taramalarda; Roshangar ve ark. (2010) 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 etkilemediğini belirtmişlerdir (Roshangar ve ark. 2010). Ayrıca TAM'ın kısa süreli kullanımlarında, menapoz öncesi kadınlarda, menapoz semptomlarının görüldüğü, hipotalamus-gonadal hatta bozulmalara neden olduğu fakat bu etkilerin reverzibl olduğu, tedavi sonlandığında ortadan kalktığı belirtilmektedir (Oktay ve ark. 2003). Tsujioka ve ark. (2009) farklı konsantrasyonlarda (0.005, 0.03 ve 0.2 mg/kg/günlük oral) TAM'ı 2 ve 4 hafta sürecince erişkin ratlara vererek tamoksifenin 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 sayısında, intersitisyel hücrelerin sayısında artış, yeni gelişecek korpus luteum sayısında azalma gözlemişler ve 2 haftalık uygulama ile 4 haftalık elde edilen sonuçlar arasında farklılık olmadığını belirterek 2 haftalık uygulamanın toksik çalışmada etkin olabileceğini belirtmişlerdir (Tsujioka ve ark. 2009). Bununla birlikte, ratlarda ovotoksik etkili kanserojenik ajanlarla (DMBA ve Cyclophosphamide) yapılan bir çalışmada, TAM uygulamasının rat ovaryumunda kanserojenik ilaçlara karşı koruyucu etki gösterdiği, ovaryum follikül kaybını önlediği ve follikül rezervini koruduğu, sonuç olarakda premenapoz döneminde kemoterapi gören kadınlarda fertilitenin ve ovaryum fonksiyonlarının devamı için TAM'ın kullanılabilirliğini belirtmişlerdir (Ting ve Petrof 2010). Ayrıca Tamoksifen'in östrojen benzer etkisiyle anti-oxidant ve anti-apoptotik özellikte olduğu bildirilmektedir (Duncan ve ark. 1994, Nathan ve Chaudhuri 1998). Ovaryumda follikülogenezis, steroidogenezis, atrezi ve seleksiyon gibi olaylarda anahtar rol oynayan IGF-I ve IGF-IR ile TAM'ın ilişkisi hakkında yeterli bilgi ve literatür bulunmamaktadır. Büyüme hormonunun (GH), büyüme, kıkırdak ve protein metabolizmasına etkileri somatomedinler aracılığıyla olmaktadır. Somatomedinler büyüme hormonunun uyarıcı etkisiyle, karaciğer ve diğer dokulardan salınan polipeptid yapısındaki büyüme faktörleridir. Daha sonraları da büyüme faktörleri adı altında toplanarak büyük bir ailenin üyeleri halinde, birçok farklı doku ve organı etkileyen çok çeşitli somatomedinler belirlenmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda en az dört farklı somatomedin tespit edilmiştir. Bunlardan bazılarının büyüme üzerindeki birçok etkisi insülinin büyüme üzerindeki etkilerine benzediği için insülin benzeri büyüme faktörleri olarak adlandırılmıştır (Ganong 2002). İnsanda kan dolaşımındaki başlıca somatomedinler, IGF-I ve IGF-II'dir. Bu faktörler, molekül yapısındaki C zincirlerinin

ayrılmamış olması ve A zincirlerinin ucunda D domeni denilen bir uzantıya sahip olmaları hariç, insülin molekülüne benzer. İnsülinde, C peptid zinciri bulunmamaktadır. IGF-I ve IGF-II'de, A ve B zincirleri (domenleri) birbirlerine C peptidi bağı ile bağlı olup, ayrıca bir D parçasına sahiptir. IGF-I büyümeye etkisini hücre zarındaki reseptörlerine bağlanarak yapar ve hücrel büyüme artırır (Yılmaz 1999). Pek çok endokrin bozucunun (çevresel östrojenin) ovaryum ve uterus gibi östrojen duyarlı organlarda da IGF-I ve IGF-IR ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir (Klotz ve ark. 2000). Östrojenik özellikteki pek çok madde, ER α 'nın yanı sıra IGF-I ve östrojenin sinyal iletim yollarının bir parçası olan MAPK sinyal kaskadını da aktive eder. Bu kaskad hücre büyümesi, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi olaylarda etkilidir (Liu ve ark. 1993, Frigo ve ark. 2004). Daha önceki çalışmalarda IGF-IR'nin iki ekstraselüler α subunit ile iki transmembran β subunit içermekte olduğu belirtilmiştir. α subunitler IGF için bağlanma bölgeleridir, ligand bağlayıcı özelliklere sahiptir ve disülfid bağları ile bağlanır. Konumları ligand bağlaması için gerekli olan sisteinden zengin alanlar içermektedir ve yakın bölgeleri insülin bağlayıcı özelliği göstermede sorumludur (Jones ve Clemmons 1995). α subunitinin intraselüler komponenti otofosforilasyon ile aktive edilen tirozin kinazdır. IGF-IR güçlü antiapoptotik sinyaller göndererek hücrelerin gelişmesini, hücrelerin transformasyonunu ve bazı hücre tiplerinde ise farklılaşmayı uyarmaktadır. Son yıllarda IGF-IR ile yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarda, bu reseptörün hücre gelişmesi ve farklılaşmasında önemli rol oynadığı gözlenmiştir (Baserga 2000, Chen ve ark. 2000). IGF-IR, tirozin kinaz aktivitesine sahip bir hücre membran reseptörüdür. Herhangi bir nedenle IGF-IR aktive edilince, hücre içi tirozin fosforilasyon zinciri indüklenir ve bu da sonuçta hücre proliferasyonu ve transformasyonu için gerekli transkripsiyon faktörlerin aktivasyonuna yol açar (Duncan ve ark. 1994).

Ovaryumda IGF-I ve IGF-IR' ün ifadesi; IGF-I ovaryumda hem östradiol, hem de progesteronun sentezinde etkilidir (Luigi ve ark. 1997). Sıçanların granuloza ve teka hücrelerinde IGF-I ifadeleri detaylı araştırılmıştır (Giudice 1992, Adashi 1995, Erickson 1995). Bu araştırmalarda IGF-I'in, östradiol ve progesteron üretmek üzere granuloza hücrelerini FSH ile stimüle ederek eş-gonadotropin gibi hareket ettiği, granuloza ve teka hücrelerinde LH reseptörü ekspresyonunu uyardığı belirtilmektedir. Ayrıca, granuloza

hücrelerinde FSH reseptörünün ekspresyonu için IGF-I'in gerekli olduğu bildirilmektedir (Magoffin ve Weitsman 1994). Granuloza hücrelerinde FSH ile inhibin-a ekspresyonunun uyarılması, endojenik olarak üretilen IGF-I'in protein tirozin kinazları aktive etmesiyle yani IGF-I sinyalizasyonunun yanıt mekanizmasında mecburi olduğu bildirilmektedir (Bicsak ve ark. 1986, Li ve ark. 1998). IGF-I ayrıca granuloza ve teka hücrelerinde DNA sentezini de uyarır (Bley ve ark. 1992). IGF-I'in granuloza ve teka hücrelerinin farklılaşması ve çoğalmasındaki rolüne ilaveten, apoptozisi inhibe edebildiği için granulozanın hayatta kalmasında önemli bir rol oynar (Hsueh ve ark. 1994). Nükleer DNA'nın endonükleaz vasıtasıyla düzenli olarak bölünmesi ile bağlantılı granuloza hücre apoptozisi, foliküler atreziyle ilişkilidir (Tilly ve ark. 1992). IGF-I ve IGF-IR esas olarak folliküllerin gelişim evrelerinde ifade olmaktadır (Wandji ve ark. 1998). Bununla birlikte, yüksek seviyede IGF-I ifadeleri ile over kanser gelişimi arasında güçlü bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Burger ve ark. 2005). Ayrıca dolaşımda IGF-I seviyesinin artması, polikistik over sendromunun oluşmasına ve follikül gelişimi bozukluklarına neden olduğu belirtilmektedir (Rzeczynska ve ark. 2009). Üreme çağındaki dişilerin ovaryumunda bulunan foliküllerin %99 dan fazlası atreziye uğramaktadır (Hsueh ve ark. 1994). Atrezi, oositlerin ve folikül hücrelerinin apoptozisi sonucunda ortaya çıkmaktadır. Başarılı bir folikül gelişimi, ovaryumda folikül gelişimini destekleyen ve apoptozdan hücreleri koruyan sağkalım faktörlerinin varlığına bağlıdır (Quirk ve ark. 2004). Yapılan araştırmalar, IGF-I'in, foliküler gelişimin farklı evrelerinde, endokrin, parakrin ve otokrin mekanizmalar vasıtasıyla ovaryum fizyolojisini etkilediğini göstermektedir (Kaiser ve ark. 2001, Ulug ve ark. 2007). Büyüme faktörlerinin, granuloza hücreleri arasındaki hücre ölüm-sağkalım dengesini ayarladığı görülmektedir (Luciano ve ark. 2000), bunun yanısıra ovaryumda foliküller gelişimin düzenlenmesinde de önemli bir rol oynamaktadır (Monget ve ark. 2002, Mazerbourg ve ark. 2003, Quirk ve ark. 2004). Sunulan çalışmanın amacı, östrojen kaynağı olarak fonksiyon yapan ovaryumda, özellikle premenapoz döneminde meme kanseri tedavisinde ya da koruyucu olarak çok sık kullanılan TAM'ın ovaryum üzerine yapacağı etkilerin mekanizmasında, ovaryumda, güçlü antiapoptotik sinyaller göndererek hücrelerin gelişmesini ve farklılaşmasını, folikülogenezisi, steroidogenezisi yakından etkileyen IGF-I sinyal yolağının rolünün olup olmadığını belirlemektir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Ovaryum

2.1.1. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumun yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı prizmatik veya kübik epitel ile döşelidir. Ancak bursa ovarikanın bağlandığı hilus bölgesi tek katlı yassı epitelle döşelidir. Epitelin peritona bakan yüzünde mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyumlar gözlenir. Hücrelerin sitoplazması ise mitokondriyonlar ve pinositoz veziküllerinden zengindir. Germinal epitel altında ovaryuma beyazımsı rengini veren tunika albuginea yer alır. Tunika albuginea yaş ilerledikçe kalınlaşır ve sertleşir. Az damarlı, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır. Kollajen lifler yüzeye paralel demetler oluştururlar (Tanyolaç 1999, Junqueira ve Carneiro 2003, Özer ve ark 2010). Bu tabakanın altında oositleri içeren farklılaşma yeteneğine sahip ovaryum foliküllerinin bol miktarda bulunduğu kortikal bölge (korteks bölgesi) bulunmaktadır. Foliküller kortikal bölgenin bağ dokusu (stroma) içinde gömülüdür. Stroma ovaryumun temel ve destek dokusudur. Ovaryumlar dışta korteks, içte medulla olmak üzere iki bölgeye ayrılır. Korteks ve medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur (Tanyolaç 1999, Junqueira ve Carneiro 2003, Özer ve ark 2010).

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.

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. Korteksteeki 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 foliküller etrafında zengin bir kapillar ağ oluşturur. Venler ise postkapillar venül olarak başlar, arterlere eşlik ederek hilus bölgesine doğru ters yönde seyreder. Medullada ayrıca oksidasyon enzimlerini ve diğer enzimleri içeren hücreler bulunur; bunların sayıları yaşla artar (Tanyolaç 1999, Junqueira ve Carneiro 2003, Girgin ve ark. 2010).

Stroma tipik iğ biçiminde fibroblastlar içerir ve bu fibroblastlar hormonal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıt verir. Fibrositler intersitisyel hücelere dönüşerek hormon (östrojen/ E2) salgırlarlar. Ovaryumun en iç kısmı gevşek bağ doku içinde zengin bir damar ağı içeren medüller (medulla bölgesi) bölgedir (Junqueira ve Carneiro 2003). Bu bölge kollagen ve elastik iplikler ile az sayıda düz kas hücresi içerir. Bağ doku içerisinde yaygın kan ve lenf damarları ile sinir telleri bulunur (Tanyolaç 1999).

2.1.2. Ovaryum Embriyolojisi

Farklılaşmamış gonad döneminde, vitellüs kesesinden köken alan ilkel cinsiyet hücreleri (İCH) genital kabartıya doğru göç eder. İlkel cinsiyet hücrelerinin genital kabartıya gelmesiyle, mezenşim hücreleri ve sölom epitelinin çoğalmasıyla genital kabartı hızlıca gelişir (Surani 2001). Genital kabartıda, mezonefrik tubul ve körelen glomerul kapsül epitel hücrelerinin oluşturduğu düzensiz şekilli ilkel cinsiyet kordonları oluşur. Bu ilkel cinsiyet kordonları her iki cinste de yüzey epitel hücreleriyle geçici olarak bağlantılıdır. Bu dönem gonadların farklılaşmadığı dönemdir (Seymen 2010). Dişi ilkel cinsiyet hücreleri, iki X kromozomuna sahiptir. Y kromozomunun seks belirleyen bölgesinde yerleşik SRY geni tarafından kodlanmış testis-belirleyici faktör (TBF) bulunmaktadır. Bu faktörün varlığıyla fötusun cinsiyeti erkek tipinde, yokluğunda da dişi tipinde gelişir. İlkel cinsiyet hücrelerinin varlığı, gonadların farklılaşmasında önemlidir. İlkel cinsiyet hücreleri genital kabartıya ulaşmaz ise ya da anormal, dejenere yapıdaysa (XO gibi) gonad geriler ve “streak ovaryum” meydana gelir (Sadler 2012). Sıçanlarda İCH’ler, çiftleşme sonrası 7.0-7.5. günlerde, gelişimin erken evrelerinde, gonad taslağına doğru arka barsak ve mezenter boyunca ilerleyerek genital kabartıya yerleşirler (Uzumcu ve Zachow 2007). İCH ler göç esnasında ve genital kabartıya ulaştıktan sonrada mitoz bölünme geçirerek genital kabartının korteks bölgesini işgal ederler (Hirshfield, 1997). Bu hücreler genital kabartıya ulaşamazsa gonadlar gelişemez. Gonadların over ve testise farklılaşmasında İCH’lerinin indükleyici etkisi vardır. Genital kabartının korteksinde medullaya göre çok daha fazla İCH yer almaktadır ve bunlar o bölgede bulunan ve kökeni hala tartışılan folikül hücreleri olarak adlandırılan somatik hücrelerle kaynaşır (Hirshfield 1997). Folikül hücrelerinin (pregranuloza) kökeninin sölom epitelinden, mezonefrik kökenli cinsiyet

kordonlarından ve her ikisinin kompozisyonundan olmak üzere üç bölgeden geldiği ileri sürülmektedir (Choi ve Rajkovic 2006, Pepling 2006). Bu hücrelerle sarılan İCH ovogonyum olarak adlandırılır. Fötal ovaryumunda, farelerde çiftleşme sonrası 13.5 günden itibaren mitoz bölünmeleri tamamlanmış ovogonyumlar primer ovosit olmak için 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girer ve crossing over (homolog kromozomların oğul olmayan kromatidleri arasında genetik bilgi alışverişi)'ın tamamlanmasından sonra bu evrede beklerler (Hirshfield 1997, Pepling 2006). Mayozun başlamasıyla ovogonyumlar 'ovosit' olarak, pregranuloza hücreleri ile ilişkili oosit kümeleri ise ovosit kistleri veya ovosit yuvaları' olarak adlandırılır (Choi ve Rajkovic 2006, Pepling 2006). Primer ovosit ve folikül hücreleri birlikte primordiyal folikülleri oluşturur. Ovogonyum ve ovositler birbirine sitoplazmik köprülerle bağlanarak senkronize bir şekilde gelişirler. Ovogonyumlar hızlıca mitoz geçirerek çoğalırlar bazı türlerde sayıları milyona ulaşır. Fakat çoğu ovogonyum ve ovosit yuvaları apoptozis yoluyla yıkılmaları, ovositler tek tek yassı folikül hücreleri ile çevrilerek primordiyal folikülleri oluştururlar (Hirshfield ve DeSanti 1995, Kezele ve Skinner 2003, Skinner 2005, Akkaya ve ark. 2017). Primordiyal folikülü, foliküler gelişim ile birlikte iki farklı son bekler. Ya gelişimi normal bir şekilde tamamlayarak ovulasyonla atılır ya da çeşitli gelişim aşamalarında hücrel apoptozis ile atretik foliküle dönüşür. Ovulasyon ya da foliküler atrezi sonucunda azalmaya başlayan primordiyal rezervinin yeri asla doldurulamaz (Nelson ve ark. 1985, Kezele ve ark. 2002).

2.1.3. Ovaryumda Foliküler Gelişim

Dişide siklus üç evreden oluşur; foliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre. Foliküler evrede primordiyal folikülden olgun folikül ya da antral (Graaf) folikülü gelişir. Gelişen folliküller, primer, sekonder ve preantral folikül olarak üç kategoriye ayrılır. Ovaryumda tüm evrelerde foliküller bulunur ancak primordiyal folikül sayısı daha fazladır. Ovaryum üzerinde bulunan primordiyal folliküllerin olgunlaşma sürecine folikülogenezis denir. Her bir primordiyal follikülde, etrafı granuloza hücreleri ile çevrilmiş bir tane oosit bulunur. Oositin büyümesi ve etrafındaki hücrelerin farklılaşması ile birlikte folikülün yapısı değişmektedir (Çizelge 2.1.).

Histolojik olarak ovaryum follikülleri;

- 1- Primordiyal folliküller
- 2- Primer folliküller
- 3-Sekonder folliküller
- 4- Preantral folliküller
- 5- Antral foliküller şeklinde kısımlara ayrılarak incelenmektedir.

Çizelge 2.1. Ovaryum foliküllerinin sınıflandırılması (Uzumcu ve ark. 2006).

Folikül Sınıfları	Ovosit	Ovositi Çevreleyen Folikül Epitel Hücreleri
Primordiyal Folikül	Primer Oosit	Tek katlı yassı pregranuloza hücreleri ve en fazla 1 tane kübik granuloza hücresi içerirler.
Primer Folikül	Primer Oosit	Tek katlı, iki ya da daha fazla sayıda kübik granuloza hücresi içerirler.
Sekonder Folikül	Primer Oosit	İki ya da üç katlı kübik granuloza hücresi içerirler.
Preantral Folikül	Primer Oosit	Üç kattan daha fazla granuloza hücresi içerirler. Antrum şekillenmemiştir ya da granuloza hücreleri arasında küçük aralıklar oluşmuştur.
Antral Folikül	Primer Oosit	Çok katlı granuloza hücreleri içerirler ve antrum şekillenmiştir.

2.1.3.1. Folikül Gelişimi -Primordiyal Foliküller

Primordiyal folikül, folikül gelişiminin en erken evresidir. Farelerde apoptozisin ve primordiyal folikül oluşumunun pik yaptığı postnatal 0-3. günleri; tüm ovosit yuvacıklarının yıkımlanıp primordiyal folikülleri şekillendirdiği için artık ovaryum kesitlerinde ovosit yuvacıklarının gözlenmediği ve primordiyalden primer foliküle

geçişin olduğu postnatal 4-7. günleri kapsar (Hirshfield ve DeSanti 1995, Pepling ve Spradling 2001, Kezele ve Skinner 2003). Primordiyal foliküllerin gelişimi, henüz fonksiyonel olmayan folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) reseptörleri gelişmediğinden gonodotropinin stimülasyonundan bağımsızdır. Olgun ovaryumda primordiyal foliküller korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında yer almaktadır. Oositi tek bir tabaka halinde yassı folikül epitel hücreleri çevreler. Folikül hücrelerinin dış yüzeyi bazal lamina ile sınırlandırılmıştır. Bu aşama oosit ve onu çevreleyen folikül hücreleri birbirlerine sıkıca yaklaşmışlardır (Ross ve ark. 2003).

2.1.3.2. Folikül gelişimi- Primer Foliküller

Primer folikül, büyümekte olan folikülün gelişiminde ilk evredir. Bir primordiyal folikül, büyümekte olan foliküle dönüştüğünde, oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler meydana gelir. İlk olarak oosit büyür, evcil hayvanlarda 30-120 µm çapında ve oositi çevreleyen yassı folikül hücreleri kübik şeklini alırlar. Folikül hücrelerinin kübik hal aldığı bu evredeki folikül epitel hücreleri granuloza hücreleri olarak adlandırılırken, oluşan foliküle primer folikül denir (Ross ve ark. 2003). Gelişim süresince primer folikülde oosit sitoplazmasında kortikal granüllerin oluşumunu da içeren pek çok morfolojik değişiklikler şekillenir.

2.1.3.3. Folikül gelişimi- Sekonder Foliküller

Oosit büyüdükçe özel proteinler salgılanır ve bu proteinler bir araya gelerek oosit çevresinde ekstraselüler bir örtü olan zona pellusidayı oluşturur. Bu yapı oosit ve granuloza hücreleri arasındaki bağlantıyı sağlar. Bu katman en az üç farklı glikoprotein içerir (Junqueira ve Carneiro 2003). Bunların içinde en önemlisi ZP3 glikoproteinidir. ZP3, spermatozoa-bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyon indükleyicisi olarak fonksiyon görmektedir. Glikozaminoglikanlar, glikoproteinlerden zengin ve periyodik asid- Schiff (PAS) reaksiyonu ile boyanan ZP' nin sentezine hem oositlerin hem de folikül hücrelerinin katkıda bulunduğu düşünülmektedir (Ross ve ark. 2003, Junqueira ve Carneiro 2003). Sekonder folikülde yer alan granuloza hücreleri proliferasyona uğrayarak 2-3 katlı kübik ya da prizmatik hücreler oluşturur. Granuloza hücreleri proliferasyona uğrarken folikülün çevresindeki stromal hücreler, bazal laminanın hemen

dışında teka folikülü adı verilen bir bağ dokusu, kılıf şeklinde folikülü sarar. Daha sonra bu yapı iki tabakaya ayrılır; teka interna ve teka eksterna. Gelişimin ilerleyen dönemlerinde, intersitisyel hücrelerden köken alan teka interna ve düz kas hücrelerinin değişmesiyle teka eksterna tabakası oluşur (Erickson 1993). Teka interna yüksek düzeyde vaskülarizedir ve kübik salgı hücrelerinden oluşmuş iç tabakadır. Buradaki hücreler steroid üreten hücrelerin ince yapı özelliklerine ve çok sayıda Lüteinize edici hormon (LH) reseptörlerine sahiptir. LH stimülasyonu ile östrojen prekürsörü olan androjenlerin sentez ve salınımı artar. Teka internada sekretuar hücrelere ek olarak fibroblast, kollajen fibrilleri ve endokrin organlarda olduğu gibi iyi gelişmiş bir damar ağı mevcuttur. Teka eksterna ise, bağ dokusunun dış katmanıdır. Ana olarak, düz kas hücreleri ve kollajen lifleri içerir. Teka tabakaları arasındaki ayırım belirgin değildir. Ancak bazal lamina, granuloza hücre tabakası ile teka interna arasında belirgin bir sınır çizer. Bu yapı teka internadaki zengin damar yatağı ile avasküler granuloza katımı ayırır. Gonadotropinler (FSH ve LH), reseptörlerinin sekonder folikül aşamasında ekspresyonu ile birlikte folikül gelişimi boyunca etkin bir şekilde rol alırlar (Ross ve ark. 2003).

2.1.3.4. Folikül Gelişimi- Sekonder Folikül'den Preantral Foliküle Geçiş

Sekonder folikülün gelişiminin devam etmesiyle üçten fazla granuloza hücre katmanına sahip antrum içermeyen ya da granuloza hücreleri arasında küçük boşluklar halinde yavaş yavaş şekillenen bir antruma sahip preantral folikül oluşur (Uzumcu ve ark. 2006). Bu olayların tam zamanı tartışılmakla birlikte türe spesifik olarak farklı zamanlarda gelişir. Bu süreçte de granuloza hücre fonksiyonlarının çoğu, oositin salgıladığı faktörler tarafından düzenlenmekte ve bunların başında da granuloza hücre fonksiyonu ve bölünmeleri, LH reseptör oluşumu, steroidogenesis ve aynı zamanda kumulus hücre büyümesini düzenleyen faktörler gelmektedir (McGee ve Hsueh 2000). 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, granuloza hücrelerinin arasında daha sonra antral kaviteyi oluşturacak olan sıvı boşluklar oluşmaya başlar ve hücrelerarası boşluğa follikül sıvısı birikir (Lee ve ark. 2001). Bu sıvı glikozaminoglikan, proteoglikan ve hormon bağlayıcı proteinler içeren kan plazması benzeri bir sıvıdır. Follikül sıvısı hormonlardan progesteron,

östradiol, inhibin, follistatin ve FSH ile LH salınımını düzenleyen aktivin içerir (Garner ve ark. 2001, Ross ve ark. 2003). Teka hücre tabakasının damarlanması artar, teka ve granuloza 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 oldukça azdır (Lee ve ark. 2001).

Teka hücrelerinin folikül gelişiminde pek çok açıdan önemli rolü vardır. İlk olarak, granuloza hücrelerinde sentezlenen östrojen prekürsörlerinin kaynağı olan androjenleri sentezlerler. İkinci olarak BMP-4 ve BMP-7 teka orijindir. Üçüncü olarak teka hücreleri ile granuloza hücreleri arasındaki iki yönlü iletişimi sağlayan, hepatosit büyüme faktörü (HGF) ve keratinosit büyüme faktörü (KGF) teka hücre kaynaklıdır. 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 (Akduman ve ark. 2014). Gonadotropinler (FSH ve LH), reseptörlerinin sekonder folikül aşamasında ekspre olmasıyla birlikte folikül gelişimi boyunca etkin bir şekilde rol alırlar (Uzumcu ve Zachow 2007, Zama ve Uzumcu 2010). Gonotropinler preantral foliküllerin büyümesini ve farklılaşmasını uyarsa da gonodotropin yokluğunda da foliküller antral aşamaya kadar gelişebilirler (Uzumcu ve Zachow 2007, Zama ve Uzumcu 2010) fakat daha ileriki aşamalarının görülebilmesi için preantral folikülün maturasyonu sırasında FSH ve LH salgılanması gereklidir (Uzumcu ve Zachow 2007). Aktivin, FSH ile birlikte gençlerde folikülerin şekillenmesini ve büyümesini aktive eder. Neonatal dönemde FSH'nın, inhibin ve östrojen üretimindeki uyarımını tetikler. İn vivo olarak sekonder folikülden salınan aktivin küçük antral foliküllerin durağan kalmasına neden olur. Bununla birlikte aktivinin erken folikül gelişiminde, aşamalara bağlı etkileri tam olarak aydınlatılmış değildir (McGee ve Hsueh 2000).

2.1.3.5. Folikül Gelişimi- Antral (Graaf) Folikülü

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 (Ross ve ark. 2003, Girgin ve ark. 2010). Olgun folikül, matür sekonder oosit içerir. Antral folikülün çapı yaklaşık olarak 10 mm (1cm)'dir. Folikülün boyutu nedeniyle, ovaryum kortesinin kalınlığı artar ve bulunduğu ovaryum yüzeyinde bir şişkinlik-çıkıntı oluşturur. Folikül maksimum boyuta ulaştığında granuloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Antrum boyutu attıkça stratum granulozum tabakası incilir. Ovulasyona hazırlanırken, granuloza hücreleri arasındaki boşluklar genişler, oosit ve kumulus hücreleri ile geriye kalan granuloza hücreleri arasındaki bağlar gevşer. Oositin hemen çevresindeki kumulus hücreleri krona radiatanın tek hücre tabakasını oluşturur. Bu hücreler ve bunlara gevşekçe bağlı kumulus hücreleri ovulasyonda oositle kalırlar.

Folikül maturasyonun bu periyodunda teka tabakaları daha belirgin hale gelir. Teka interna hücrelerinin sitoplazmasında yağ damlacıkları görülmeye başlar ve hücreler, steroid üreten hücrelerle aynı yapısal özellikleri gösterir. LH uyarısıyla teka interna hücrelerinden östrojen prekürsörü olan androjenler salınır. Androjenlerin bazıları granuloza hücrelerinin düz endoplazma retikulumlarına taşınır. FSH'a yanıt olarak, granuloza hücreleri androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizler (Ross ve ark. 2003) Granuloza hücreleri, östrojenlerin doğrudan üretimi için gerekli olan enzimlere sahip değildir. Bu nedenle foliküler hücreler folikülogenez sırasında steroid prekürsörlerini üretemezler (Kierszenbaum 2006). Östrojen granuloza hücrelerini proliferere olup folikül boyutunu arttırmak üzere stimüle eder. Foliküler ve sistematik kaynaklardan gelerek artan östrojen düzeyleri, gonadotrop hücrelerin gonadotropin serbestleştirici hormona duyarlılığı arasında korelasyon vardır. Ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce adenohipofizde FSH ya da LH salıverilmesinde ani bir artış indüklenir. LH'in ani artışına yanıt olarak granuloza hücrelerindeki LH reseptörleri azalır ve artık granuloza hücreleri LH'a yanıt olarak östrojen üretmezler. Primer oositin birinci mayotik bölünmesi ani artış tarafından tetiklenerek kaldığı yerden devam eder. Bu dalgalanmanın kesilmesi ile primer oosit I. mayozunu tamamlar. Bu olay LH pikinden 12-24 saat sonra gerçekleşir, sekonder oosit ve I. polar cisimcik oluşumu ile sonuçlanır. Granuloza ve teka hücreleri ise lüteinize olur ve progesteron üretmeye başlar (Ross ve ark. 2003).

2.1.4. Ovulasyon

Graaf folikülü, FSH ve LH'nin etkisiyle ani bir büyüme gösterir ve ovaryum yüzeyinde kistik bir kabartı oluşur (Balasch ve ark. 1995). Stigma, kısa sürede küçük damarsız bir nokta şeklinde bu kabartının yüzeyinde belirir. Ovulasyon öncesi, sekonder oosit ve kumulus ooforusun bazı hücreleri gerginleşmiş folikülün iç yüzeyinden ayrılır. Ovulasyon, LH üretimindeki ani yükselişle tetiklenir. LH düzeyinin artması sonucu uyarılan teka eksterna ve tunika albuginea içindeki proteolitik etkinlik, olgun Graaf (antral) folikülün yırtılmasını kolaylaştırır (Kierszenbaum 2006). Ovulasyon genellikle LH artışından 12-24 saat sonra olur. LH artışı stigmanın dışarıya balonlaşmasına yol açarak bir vezikül oluşturur. Daha sonra stigma patlar ve sekonder oosit folikül sıvısıyla birlikte atılır. Oositin atılması, folikül içi basıncın artması ve teka eksternadaki düz kasların, prostaglandin uyarımına bağlı olarak kasılmasının bir sonucudur. Folikül duvarının enzimlerle parçalanması, ovulasyona neden olan ana mekanizmalardan biri olarak görülmektedir. Atılan sekonder oosit; zona pellusida, bir ya da daha fazla tabakalı ışınal tarzda dizilmiş folikül hücrelerinin oluşturduğu korona radiata ve kumulus tabakası ile sarılmıştır. Böylece oosit-kumulus kompleksi oluşur (Hyttel ve ark. 2010). Dışarı atılan oosit, ovaryuma çok yaklaşmış olan ovidukta girer. Ovulasyondan birkaç saat önce foliküler hücre tabakası ve teka interna korpus luteuma dönüşmeye başlar (Kierszenbaum 2006).

2.1.5. Korpus Luteum

Ovulasyondan sonra luteal faz başlar geride kalan foliküllerin (granuloza ve teka interna hücrelerinin) hücre tabakası büzülür ve hormon salgılayan majör bir bez olan korpus luteuma dönüşür. Bu dönüşümün izlediği evreler şu şekilde özetlenebilir; 1) Folikülün bazal mebranı yıkılır 2) Öncesinde damarsız olan foliküler hücre kümesi içine kan damarları girmeye başlar. Antrum boşluğuna kan dolar ve pıhtılaşır; böylece, geçici bir yapı olan korpus hemorajikum oluşur. Daha sonra, yeni oluşmuş kan damarları (anjyogenez), fibroblast ve kollajen lifler fibrin pıhtı içine girer. 3) Foliküler hücreler ve teka interna hücrelerinin değişimi. Folikül hücreler, foliküler lutein hücrelere dönüşüp tipik olarak steroid sentezleyen hücre özellelikleri gösterir (Kierszenbaum 2006). Teka internanın kapiller ve lenfatik damarları korpus luteumun iç kısmına doğru gelişir ve bu yapının zengin damar ağını oluştururlar. Oosit II atıldıktan sonra folikülün

hücrelerinin yeniden düzenlenmesi ve korpus luteumun oluşması, ovulasyon öncesinde salgılanan lutenize edici hormonun (LH) uyarısı sonucu gerçekleşir (Junqueira ve Carneiro 2003). Bundan sonrasında FSH ve LH uyarısına yanıt olarak progesteron ve östrojen salgılar. Foliküler hücrelerde LH reseptörlerinin görülmeye başlanması, luteinizasyon için kritik bir olaydır. Teka interna hücreleride teka lütein hücrelerine dönüşür ve LH uyarısına yanıt olarak androstenoidon ve progesteron üretir. Teka lütein hücreleri androstenoidon sağlayarak foliküler hücrelerle işbirliği yapar. Androstenoidon daha sonra foliküler lütein hücrelerinde östrodiyole çevrilir. Korpus luteum büyümeye devam eder ve gebelik gerçekleşmemişse ovulasyondan sonra gerileme evresine girer. Fertilizasyon olmuşsa, korpus luteum büyümeye devam eder ve progesteron ile östrojen üretmeyi sürdürür. Korpus luteumun yaşamasını sağlayan implante embriyonun trofoblast hücrelerinde üretilen ‘insan koryonik gonadotropik’in (hCG) uyarıcı etkisidir (Kierszenbaum 2006). hCG’ nin etkisi LH’ ye eşdeğerdir, böylece korpus luteumun dejenerasyonu engellenir. Korpus luteum daha da büyür ve progesteron hormonu salgılar (Junqueira ve Carneiro 2003). Luteoliz sonucundan korpus luteumun gerilemesiyle korpus albicans oluşur. Bu süreçte korpus luteumun dejenere olan luteal hücre kümelerinin yerini stromal bağ dokusu alır (Kierszenbaum 2006). Gebelikteki korpus luteuma gebelik korpus luteumu (korpus luteum graviditas, korpus luteum pregnansi, korpus luteum verum) denir. Gebelik korpus luteumu insanlarda 4-5 ay süresince aktiftir (Junqueira ve Carneiro 2003).

2.1.6. İntersitisyel Hücreler

Folikül atrezisi esnasında granuloza hücreleri ile oositler çözümlenip bozulmasına rağmen, teka interna hücreleri korteks stromasında çoğu kez tek ya da küçük gruplar halinde kalır (Junqueira ve Carneiro 2003). Bu hücreler, poligonal şekilli, ortada yuvarlak çekirdeği ve belirgin çekirdekçikleri olan epitelooid hücrelerdir ve intersitisyel hücreler adını alırlar. Sitoplazmalarında küçük yağ damlacıkları bulunur. Ayrıca intersitisyel hücreler granuloza hücrelerinden ve primordiyal folliküllerden de köken alırlar. Bunlar LH tarafından uyarılarak östrojen (steroid) salgırlar (Tanyolaç 1999, Junqueira ve Carneiro 2003).

2.2. Tamoksifen

İlk kez 1896 yılında ileri evre meme kanserinin tedavisinde ovorektominin (ovariectomy) etkili olduğu gösterilmiştir. Overlerin endokrin fonksiyonu ise ilk kez 1923 yılında St. Louis' de Dr. Ailen ve Dr. Daisy tarafından tespit edilerek over kaynaklı bu kimyasal maddelere östrojen (estrus=çılgınlık) adı verilmiştir (Ailen ve Doisy 1923). 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 (Jensen ve ark. 1971). 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 (Lemer ve ark. 1958). 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 denenen ilaç, 10 hastanın olumlu yanıt vermesi ile popülerite kazanmıştır (Cole ve ark. 1971). 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 (Wyld ve ark. 1998). TAM' ın östrojen reseptör pozitif premenopozal meme kanserli hastalarda, sağ kalım şansını arttırdığının ve karşı memede meme kanseri gelişimini azalttığının çalışmalarla gösterilmesi 15 yıl almıştır (Ward 1973). Selektif östrojen reseptör modülatörlerinin atası sayılan TAM, meme dokusu üzerine antiöstrojenik etki gösterirken (Ward 1973), serum lipitleri (Saarto ve ark. 1996), kemik (Love ve ark. 1994) ve endometriyum (Decensi ve ark. 1996) üzerine belirgin östrojenik etki göstermekte ve buna bağlı olarak TAM kullanan hastalarda endometriyal patoloji gelişme riski artmaktadır (Barakat ve ark. 1995). TAM

hem premenapozal hem postmenapozal hastaların tedavisinde yüksek oranda kullanılmaktadır (Goldrisch ve ark. 1991, Sunderland ve Osborne 1991). Günümüzde TAM, meme kanserine karşı yüksek risk taşıyan sağlıklı kadınların profilaksisinde (Powles ve ark. 1990), iyi huylu meme hastalıklarının tedavisinde (Fentiman ve Powles 1987) ve infertil kadınlarda ovulasyon indüksiyonunda (Weseley ve Melnick 1987) kullanılmaktadır.

2.2.1. Etki Mekanizması

Meme kanserinde endokrin tedavinin temel prensibi, tümör hücresinin östrojenlerin (Estron (E1) , Estradiol (E2) , Estron sülfat (E1s)) büyüme uyarıcı etkisinden yoksun bırakılmasıdır. Normal meme dokusunun büyüme ve çoğalması esas olarak östrojen ve prolaktin hormonları tarafından düzenlenir (Love ve ark. 1994).

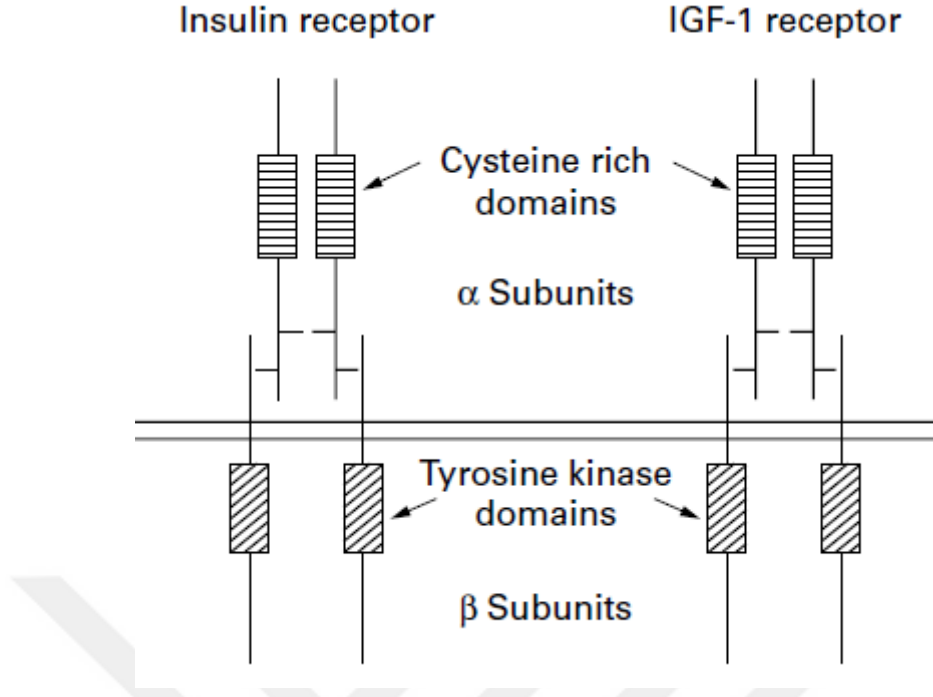
Meme kanserinin ortaya çıkmasından ve ilerlemesinden primer olarak östrojenler sorumludur (Trichopoulos ve ark. 1983, Love ve ark. 1994). İlk kez 1975 yılında TAM' in kültür ortamında östrojen reseptörü taşıyan meme kanseri hücrelerini inhibe ettiği ve bu etkinin ortama östrojen ilave edildiğinde geri döndürülebildiği gösterilmiştir (Lippman ve Bolan 1975). Bundan yaklaşık 10 yıl sonra birbirinden bağımsız olarak TAM' in meme kanseri hücrelerini siklusun G1 fazında bloke ettiği tespit edilmiştir (Osborne ve ark. 1983, Sutherland ve ark. 1983). 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' in net etkisi meme kanseri büyümesinin otokrin stimülasyonunu hücreyi G1 fazında bloke ederek azaltmaktır. Buna ek olarak insülin benzeri büyüme faktörü 1' in (IGF-I) lokal oluşumunu da azaltır. IGF-I meme kanseri için parakrin büyüme faktörüdür (Gilman 1996). 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 (Jordan ve ark. 1979, Jordan 1983). 5-10 yıllık kullanım sonucunda TAM' a karşı herhangi bir tolerans gelişmezken, daha kısa süreli kullanımlardan sonra nükslerin görülme sıklığının arttığı

bildirilmektedir (Jordan 1978). Sonuç olarak, TAM' ın meme kanserinde hayatta kalım oranını %10 arttırdığı düşünülmektedir.

2.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I ve IGF-II), ilk olarak 1957'de Salmon ve Daughaday tarafından (Salmon ve Daughaday 1957) sıçan kıkırdağına -sülfatın katılmasını stimüle etme kabiliyeti ile "sülfatlayıcı faktör" olarak tanımlanmıştır (Laron 1971). Froesch ve ark. (1963) ise IGF'leri, iki serum bileşeninin (NSILA I ve II) baskılanamayan insülin benzeri aktivitesi (NSILA) olarak tanımlamışlardır (Froesch ve ark. 1963). 1972'de, sülfatlayıcı faktör ve NSILA tanımlamalarının yerini "somatomedin" terimi almıştır (Daughaday ve ark. 1972). Rinderknecht ve Humbel (1976) proinsülinin yapısal benzerliklerine bağlı olarak "insülin benzeri büyüme faktörü 1 ve 2" (IGF-I ve II) olarak yeniden isimlendirilen iki aktif maddeyi insan serumundan izole etmişlerdir (Laron 1999). Dolaşımdaki IGF'nin asıl kaynağı karaciğer olsa da, pek çok dokuda olduğu gibi, özellikle doğum sonrası gelişim esnasında, geniş çapta ifade oldukları görülmektedir (Daughaday ve Rotwein 1989).

IGF'ler relaxin protein hormonunu da içeren insülinle bağlantılı peptid ailesinin bir üyesidir (Blundell ve Humbel 1980). IGF sistemi pek çok elemanın birleşimi ile meydana gelmektedir. Sistem iki adet ligand (IGF-I ve II) ve iki adet reseptör içermektedir. IGF-IR insülin reseptörüne yüksek homoloji gösteren ancak daha yüksek konsantrasyonlara sahip tirozin kinaz ailesinin bir transmembran reseptörüdür (Şekil 2.3.) (Izadyar ve ark. 1998). İnsülin reseptörü (IR) karaciğerde, yağ ve kas dokusunda baskınken, IGF-IR hemen hemen bütün hücre tiplerinde baskındır ve genellikle fibroblastlar, kontrositler ve osteoblastlarda çok daha yaygın bulunmaktadır (Kritsch 2000).



Şekil 2.2. İnsülin ve İnsülin benzeri büyüme faktörü 1 reseptörü (IGF-IR) arasındaki benzerlik (Laron 2001).

2.3.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I (IGF-I)

IGF-I, 7649 kDa'lık molekül ağırlığına sahip, 70 amino asitten oluşan küçük bir peptiddir (Daughaday ve Rotwein 1989). IGF-I, insülin'e benzer şekilde, disülfid bağlarıyla bağlı A ve B zincirine sahiptir. C-peptid bölgesi IGF-I de 12 amino asitten meydana gelmektedir. IGF-I'in insüline yapısal benzerliği, insülin reseptörüne bağlanma kabiliyetini de (düşük afinite ile) açıklamaktadır (Laron 2001).

IGF'ler birçok hücre tipinden hormon sentezlemesinde rol oynarlar. IGF-I ve IGF-II, ovaryumun granuloza ve teka hücrelerinden hormon sentezini ve sekresyonunu uyarır ayrıca FSH ve östrojen ile birlikte karşılıklı sinerjik etkiler göstermektedir (Giudice 1992). Timus epitel hücreleri tarafından timulin hormonun salgısı da yine IGF-I tarafından stimüle edilmektedir (Timsit ve ark. 1992). Adrende fasikülata hücrelerinin IGF-I ile tedavisi ACTH reseptör sayısını artırır ve ACTH'ye yanıt olarak steroid hormon sentezini güçlendirir (Penhoat ve ark. 1989). Diğer bir taraftan, bu hücrelerin ACTH ile tedavisi IGF-I sentezini uyarır; bu sentez ACTH etkisini daha da güçlendirmek için bir otokrin faktör olarak mevcuttur (Penhoat ve ark. 1989). IGF-I

aynı zamanda Leydig hücrelerinden ve tiroid folikül hücrelerinden hormon sentezlenmesini uyarmaktadır (Lowe 1991).

IGF'ler geniş ölçüde pek çok hücreye özgü işlevi de etkileyebilir. Örneğin in vitro olarak hipofiz somatotropinlerinde, IGF-I doğrudan GH sentezini inhibe eder (Yamasaki ve ark. 1991). Ayrıca, IGF-I ve IGF-II, IGF-I reseptörü aracılığıyla, immünoglobülin E'ye yanıt olarak bazofillerden histaminin salınmasını güçlendirir (Koshino ve ark. 1993). Purkinje hücrelerinde ise IGF-I, 7-amino bütirik asitin glutamat uyarımıyla salınmasını engelleyerek bu hücreler için in vivo olarak bir nöromodülatör olarak işlev görebilir (Castro-Alamancos ve Torres-Aleman 1993). Bunun yanı sıra, IGF-I değişiminin T lenfositlerde (Tapsos ve ark. 1988), bronşiyal epitel hücrelerinde (Shoji ve ark. 1990), endotel hücrelerinde (Grant ve ark. 1987), melanom hücrelerinde (Stracke ve ark. 1989) ve retinal pigment epitel hücrelerinde (Grant ve ark. 1990) kemotaktik migrasyonu arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, insan rhabdomyosarkom hücrelerinde, IGF-II'ye kemotaktik bir cevaba karşı IGF-II reseptörünün aracılık ettiği gösterilmiştir (Minniti ve ark. 1992). IGF-I ayrıca keratinositlerin göçünü de uyarmaktadır (Ando ve Jensen 1993). IGF'lerin metabolik etkileri, mitojenik etkilerden farklı yollarla sağlanır ve bazı hücrelerde reseptör tirozin kinaz aktivitesinin uyarılması gerekmeyebilir (McClain ve ark. 1990). Fonksiyonel IGF-I reseptörlü hücrelerin çoğunda, IGF'ler belli bir dereceye kadar amino asit, glikoz alımını ve genel protein sentezini uyarmaktadır. İskelet kasında in vitro çalışmalarda, IGF-I'in, glukoz alımı, glikoliz ve glikojen sentezi üzerinde insülin benzeri uyarıcı etkilere sahip olduğu fakat insülinin aksine glikoz oksidasyonunu uyarmadığı gösterilmiştir (Dimitriadis ve ark. 1992). IGF-I, ekstrasellüler matriks (ECM) proteinlerinin, özellikle kollajenlerin ve proteoglikanların sentezini arttırmak için kondrositleri (Trippel ve ark. 1989, Hill ve ark. 1992), osteoblastları, fibroblastları ve endotel hücrelerini de uyarır (Lowe 1991). IGF'nin hareket mekanizmasında somatomedin modeli, GH'nün IGF-I seviyelerini kontrol altında tuttuğunu ve IGF-I'in direkt olarak hücresele seviyede hareket ettiğini öngörmüştür. Başlangıçta somatomedinlerin GH'e cevap olarak karaciğer tarafından sentezlenen dolaşımdaki hormonlar olarak işlev gördüğü düşünülmekteydi. Bazı dokulardaki IGF-I mRNA düzeyleri ve lenfdeki peptid konsantrasyonlarının GH ile tedaviden sonra arttığı

gösterilmiştir dolayısıyla dokulardaki IGF-I seviyeleri GH'na da bağımlıdır (Roberts ve ark. 1987, Davis ve ark. 1992). IGF-I yaygın olarak lokal bazda sentezlenir ve dokularda potansiyel bir parakrin-otokrin etkiye sahiptir. Epifizyal büyüme plağı (Jennische ve ark. 1992), ovaryum (Giudice 1992) ve böbrek (Chin ve ark. 1992) gibi lokal IGF-I sentezinin yapıldığı dokularda kısmen GH ile düzenlenir, böylece endokrin seviyelerinin yanısıra somatomedin modeli de her iki otokrin / parakrin mekanizması için de geçerliliğini korur.

Östrojen sentezini kontrol ettiği görülen uterus gibi diğer dokularda (Murphy ve ark. 1987), IGF-I ekspresyonu GH'dan bağımsızdır. IGF-II'nin ekspresyonunun düzenlenmesi ise, çoğunlukla GH'den bağımsızdır. Hem IGF-I hem de IGF-II ekspresyonunun GH'dan bağımsız olduğu durumlarda, fetal gelişim sırasında baskın olarak mezenkimal orijinli hücreler tarafından dokularda ekspresyon olur (Han ve ark. 1992). IGF-I seviyeleri GH'ye bağımlı hale geldiğinde, serum seviyeleri doğum sonrası yaşamda çok daha düşüktür (Daughaday ve Rotwein 1989). Fötüste IGF hareketi bu nedenle çoğunlukla otokrin / parakrin ve GH'den bağımsızdır.

2.3.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I Reseptörü (IGF-IR)

Glikoprotein yapıdaki IGF-IR hücre membranında konumlanmıştır. IGF-IR, iki özdeş α -altbiriminin ve iki özdeş β -altbiriminin tetrameridir (LeRoith ve ark. 1995, Stewart ve ark. 1996, Sepp-Lorenzino ve ark. 1998). Yapısal olarak, IGF-IR, insülin reseptörünü andırır ve aralarında % 60 homoloji bulunur. IGF'ler ve insülin, tercih edilen ligand haricinde çok daha zayıf bağlanma afinitesine sahip olsa da birbirlerinin reseptörüne çapraz bağlanabilmektedir (Steele-Perkins ve ark. 1988, Frattali ve ark. 1993).

IGF-IR'ün İnsülin reseptörü ile benzerliği, IGF-IR α 'nın bolca sistein içeren bir hormon bağlama bölgesine sahip olmasından ve IGF-IR β 'nın tirozin kinaz aktiviteli sitoplazmik bölgesinden kaynaklanmaktadır (Baserga 2000). İnsülin benzeri büyüme faktörü I'in reseptörüne (IGF-IR α altbirimine) bağlanması; tirozin fosforilasyonu ile birlikte insulin-reseptör substrat-1 (IRS-1) ve Shc gibi adaptör proteinlerin fosforilasyonuna neden olur (Dudek ve ark. 1997). Böylece proliferatif ve antiapoptotik bir sinyal başlar sonuçta hücrenin çoğalmasında ve hayatta kalmasında rol alan Ras / Raf / mitojen-aktive edici

protein kinaz (MAPK)'ın ya da fosfatidilinositol-3 kinaz (PI-3K) yolağının aktivasyonu gibi insülin reseptörünün etkilerine benzer olaylar meydana gelir (Poretsky ve ark. 1999). IGF-IR ifadesi steroid hormonları ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenir (Stewart ve ark. 1996, Sepp-Lorenzino ve ark. 1998). Yüksek IGF-I seviyeleri, IGF-IR'de düşüşe neden olduğundan, IGF'ler IGF-IR ifadesini baskılamaya yönelik negatif feedback sinyalleri şeklinde görev yapabilir (Yang ve ark. 1996, Hernandez-Sanchez ve ark. 1997). IGF'lerin etkisinin tersine, bazik FGF, PDGF ve EGF de dahil olmak üzere diğer büyüme faktörleri IGF-IR ekspresyonunu uyarır (Rosenthal ve ark. 1991, Rubini ve ark. 1994, Sepp-Lorenzino ve ark. 1998). IGF-IR ekspresyonu ayrıca östrojen, glukokortikoidler, GH, FSH, luteinize edici hormon ve tiroid hormonları tarafından da uyarılır (LeRoith ve ark. 1995, Sepp-Lorenzino ve ark. 1998). IGF'lerin IGF-IR'ye bağlanması, sinyal iletim yolunda pek çok melekülün reaksiyon kaskadını tetiklemenin yanı sıra reseptörün tirozin kinaz aktivitesini aktive eder. IGF-IR için iki farklı sinyal iletim yolu belirlenmiştir. **Birinci yol;** Ras proteinini, Raf proteinini ve Mitojen-aktiviteli protein kinazı (MAPK)'ı aktive eder. Bu yolun aktivasyonu hücre büyümesi, gelişimi ve çoğalmasına bağlıdır. **İkinci yol ise** Fosfodiinotitol 3-kinaz (PI3-kinaz) ve Akt aktivasyonunu içerir. Bu yolun aktivasyonu ise hücre metabolizması, büyümesi ve antiapoptotik süreçlere bağlıdır (Jones ve Clemmons 1995, LeRoith ve ark 1995). MAP-kinaz (ERK-1-2) transkripsiyon faktörlerini aktive eder. Ayrıca DNA sentezini ve IGF-I stimülasyonu ve mitogenezisi düzenlediği bilinmektedir. PI3-kinaz glikoz transportunun stimülasyonu, protein ve glikojen sentezi, apoptozisin inhibisyonu, IGF-I ve insülinin metabolik büyüme ve fonksiyonel etkilerinin taşınması için etkilidir (Saetrum ve Wang 2005). Bunun dışında IGF-IR ile başlatılan diğer sinyal iletim yollarının varlığında muhtemeldir (Lopaczynski 1999). Ligand bağlanması ile IGF-IR'nün aktivasyonu, IGF'lerin aktivitesine aracılık etmesini sağladığı için gereklidir. IGF'lerin mitojenik ve antiapoptotik etkilerine aracılık etmenin yanı sıra IGF-IR hücre dönüşümünde de etkin rol oynamaktadır. In vitro deneyler, IGF-IR genini ortadan kaldırarak, hücre ekspresyonunu baskılayarak veya fonksiyonunu inhibe ederek hücre zarından IGF-IR'nin uzaklaştırılmasının hücre transformasyonunu ortadan kaldırdığını göstermiştir (Baserga 1995).

2.3.3. IGF Bağlayıcı Proteinler (IGFBP)

Plazmada, IGF'lerin % 99'u, serbest IGF-I'in dokulara uygunluğunu modüle eden bir bağlayıcı protein ailesi ile kompleks oluşturmaktadır. Hem IGF-I'in hemde IGF-II' nin kontrolünde biyolojik olarak kullanılabilen, yüksek afinite ile bağlanmasına yardımcı olan altı adet bağlayıcı protein bulunmaktadır (Baxter 2000). IGFBP'ler tüm biyolojik sıvılarda bulunmaktadır ve iki grupta sınıflandırılabilir: (1) serumda bulunan IGFBP-1, -2, -4, -5 ve -6 (24-35 kDa); ve (2) serumda en baskın IGFBP olarak kabul edilen IGFBP-3'tür. Bu sıvıdaki IGFBP-3 ağırlıklı olarak IGF-I veya -II'den oluşan ve aside dayanıksız olarak 85 kDa altbiriminden oluşan 150 kDa formunda bulunur. Serumda IGFBP-I ve -II'nin konsantrasyonları negatif olarak düzenlenip GH'dan etkilenmezken, IGFBP-3'ün konsantrasyonu GH ve IGF-I ile pozitif olarak düzenlenir (Monget ve ark. 2002). IGFBP'ler, IGF'lerin hedef hücrelerdeki hareket aktivitesini inhibe edebileceği gibi güçlendirebilir. IGFBP'lerin IGF-I ve -II için afinitesi tip I reseptörünün afinitesi ile aynı sıralamaya sahiptir dolayısıyla IGF'lerin hareket mekanizmasını engelleyerek bunların etkisini inhibe edebilirler. Bununla birlikte IGFBP'ler ECM'ye (ekstra selüler matrikse) (IGFBP-5) bağlandığında veya proteolize girdiklerinde (IGFBP-3 ve 4) IGFBP'lerin IGF'lere afinitesi azaltılabilir (Spicer 2004). Bu proteoliz, hücre zarı seviyesinde meydana gelebilir (Baxter 2000). IGF'lerin biyo yararlanımının artması, IGF'lerin IGFBP'ler için afinitesini azaltabilir ve bu durum ligandların hareketinde bir inhibisyondan ziyade bir potansiyelizasyona neden olabilir (Monget ve ark. 2002). Genel olarak, IGFBP'lerin IGF aktivitelerinin düzenlenmesinde dört temel fonksiyonu vardır: 1; plazmada transport proteinleri olarak davranabilirler, 2; metabolik klirenslerini düzenleyerek IGF'lerin yarı ömrünü uzatırlar, 3; Doku ve hücre tipine spesifik hedefleme mekanizmasında rol alır ve 4; doğrudan IGF'lerin reseptörleri ile olan etkileşimini modüle ederek dolaylı yoldan biyolojik aktivitelerini kontrol eder (Silva ve ark. 2009).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Sunulan tez çalışmasında, başka materyal kullanma ilkesine uygun olarak (replacement) tekrar deney hayvanı kullanılmaması için, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji- Embriyoloji Anabilim dalında bir önceki projede (Tübitak 112O574) aşağıdaki deneysel prosedürü uygulanan hayvanlardan elde edilen ovaryum doku blokları kullanıldı.

3.1. Deney Hayvanları ve Bakım Koşulları

Çalışma Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışma materyali olarak 60 adet aynı yaş ve genetik yapıya sahip (inbred) erişkin (8 haftalık) BALB/ c ırkı dişi fareler kullanılmıştır. Fareler için önerilen uygun çevresel koşullar aynı merkez tarafından sağlanmış 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 yerleştirilmiştir. Çalışmadaki tüm deneysel uygulamalar Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylanmıştır (Karar no: 2012- 09/04).

3.2. Deneysel Uygulama

Fareler ortama ve deney koşullarına uyum sağlayabilmesi için deneysel uygulamanın 2 gün öncesinde kafes başına 5 fare olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kafeslerin üzerine gruplar ile enjeksiyonun başlangıç ve bitiş tarihini belirten plakalar yerleştirilmiştir. Deney hayvanları araştırma merkezinden temin edilen hayvanlar, 3 gruba ayrılmış; I. grup; Hayvanlara subkutan olarak (s.c.) 0.5mg/fare TAM, II. grup; 1,5mg/fare TAM ve III. grup; taşıt madde (kontrol grubu) etanol: susam yağı (%10 etanol:% 90 susam yağı) 5 gün süre ile uygulanmıştır (Zhang ve ark. 2005, Madisen ve ark. 2010). Her bir grupta 20 fare olmak üzere toplam 60 hayvan kullanılmıştır. TAM'ın dozları taşıt madde içinde hazırlanmıştır.

3.2.1. Dokuların Alınması

3.2.1.1. Histolojik Prosedür

Deney sonrasında, vaginal smear ile proöstrus döneminde olan hayvanlar ayrılmış ve ether inhalasyonu ile uyutulmuştur. Daha sonra hayvanların karın bölgeleri açılmış, her hayvanın sağ ovaryumu alınarak stereo mikroskop altında çevre yağ dokularından temizlenmiştir. Bu ovaryumlar numaralandırılmış kasetler içerisinde Bouin tespit solüsyonuna alınarak 24 saat tespit edilmiştir. Tespit solüsyonunda bulunan ovaryumlar değişik derecelerde alkol (% 50, 70, 80, 90, absölü), ksilol ve parafin serisinden geçirilerek, granüllü, 58-60 °C' de eriyen parafinle bloklanmıştır.

Daha önceden bu aşamaya kadar deneysel prosedüre tabi tutulan hayvanlardan elde edilen bu ovaryum dokuları, sunulan tez projesinde kullanılmıştır. Ovaryum doku bloklarından, yarı otomatik mikrotomla 5 µm kalınlığında (Leica RM 2155, U.S.A.) 5' er kesit alındı ve bu kesitler % 30' luk lizinle hazırlanmış, lizinli lamlara çekildi. Her bir gruptaki ovaryum doku kesitlerinden birer tanesine ovaryumun genel yapısı incelemek amacıyla, Crossmann' ın modifiye üçlü boyama yöntemi uygulandı (Crossmon 1937), diğer ovaryum doku kesitlerinde ise IGF-I ve IGF-IR ekspresyonunu belirlemek amacıyla immunohistokimyasal değerlendirmeler 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 Hematoksilen Solüsyonu

Solüsyon A;

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

Solüsyon B;

Distile su.....90 ml
Demir-3-Klorür.....1 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

Anilin-Blue Solüsyonu

Anilin-Blue.....2 gr

Distile su.....100 ml

Asetik asit.....2 ml

Fosfotungstik Asit Solüsyonu

Phosphotungstic Asit.....3 gr

Distile su.....100 ml

Asetik Asit Solüsyonu

Asetik Asit.....2 ml

Distile su.....100 ml

3.2.1.2. Üçlü Boyama Yöntemi

Deparafinizasyon ve Dehidrasyon

- Ksilen : 2 x 10 dakika
- %100 Alkol : 2 x 3 dakika
- %96 Alkol : 3 dakika
- %80 Alkol : 3 dakika
- %70 Alkol : 3 dakika
- %50 Alkol : 3 dakika
- Distile Su : 2 x 3 dakika

Boyama

- Musluk suyu : 5 dakika
- Weigert Hematoksilen: 10 dakika (Çekirdek boyaması)
- Musluk suyu : 5 dakika
- Metil karbonat : 1 dakika
- Musluk suyu : 5 dakika
- Distile su : 2 x 3 dakika

- Asit fuksin : 2 x 2 saniye (Sitoplazma Boyaması)
 - Distile su : 2 x 3 dakika
 - Fosfotungstik asit: 15 dakika (Mikroskopta renk kontrolü)
 - Distile su : 2 x 3 dakika
 - Anilin Blue: 2 dakika (Bağ doku boyası)
 - Distile su: 2 x 3 dakika
- Alkol Serilerinden Geçirilmesi*
- % 96 Alkol 2 x 3 dakika
 - %100 Alkol 2 x 3 dakika
- Ksilende Parlatma*
- Ksilen 1 5 dakika
 - Ksilen 2 : 10 dakika
 - Kapatma
- Boyanan kesitler entellan ile kapatıldı.

3.2.1.3. İmmunohistokimya

Parafin bloklardan elde edilen 5-7 µm kalınlığındaki ovaryum doku kesitlerinde, TAM'ın IGF-I ve IGF-IR ekspresyonları üzerine etkisini belirlemek için, spesifik antikolar ile indirekt Streptavidin-Biotin Peroksidaz immunohistokimyasal yöntem uygulandı ve ışık mikroskobunda incelendi.

İmmunohistokimyasal Gereçler

Primer Antikorlar: IGF-I (G-17) Santa Cruz sc: 1422

IGF-IR (C-20) Santa Cruz sc: 713

Sekonder Antikorlar: İmmPRESS anti goat Ig Peroksidaz (MP-7405).

İmmPRESS anti rabbit Ig Peroksidaz (MP-7401).

Bufferlar ve Yıkama Solüsyonu: Sitrata Buffer solüsyonu pH 6 (Sitrata 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) (Steady DAB/Plus (ab103723)).

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).

Solüsyonlar

PBS

- Sodyum klorid, NaCl : 7,20 g
- Sodyum dihidrojen fosfat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0,43 g
- Disodyum dihidrojen fosfat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 1,48 g
- Distile su : 1000 ml

Sitrat Buffer pH 6 solüsyonu

- Sitrik asit: 2,1 g
 - Distile su : 1000 ml
- pH, HCL ve NaOH ile 6'a ayarlandı.

Hidrojen Peroksit

- Distile su : 64 ml
- %3'lük hidrojen peroksit : 6 ml

Primer Antikor (IGF-I, IGF-IR)

IGF-I: 1/150

- IGF-I primer antikor : 1ml
- Antikor dilüent solüsyonu : 149 ml

IGF-IR: 1/100

- IGF-I primer antikor : 1ml
- Antikor dilüent solüsyonu : 99 ml

Substrat-Kromojen Solüsyonu

- Steady DAB/Plus Buffer: 1 ml
- Konsantre Steady DAB/Plus Kromojen: 20 µl (1 damla)

Harris Hematoksilen

- Hematoksilen krist (Hematoxylin crystals): 5g
- %100 Alkol : 50 ml
- □Potasyum allum : 100 g
- □Distile su : 1000 ml
- □Merkurik oksit [Mercuric oxide (red)] : 2,5 g

Hematoksilen alkol içinde, potasyum allum sıcak distile su içinde eritildi. İki solusyon karıştırıldı ve karışım kaynama noktasına geldiğinde ateşten alınıp üzerine yavaşça Merkurik oksit ilave edildi. Su içerisinde menekşe-mor rengini alana kadar soğutularak hazırlandı.

İmmünohistokimyasal Yöntem

Streptavidin-Biotin Peroksidaz yöntemine göre yapılan boyamada;

- Polilizinli lama çekilen dokular 37° C' lik etüvde kurutuldu.

Deparafinizasyon ve Rehidrasyon

- Ksilen : 3 x 5 dakika
- %100 Alkol : 2 x 3 dakika
- %96 Alkol : 3 dakika
- %80 Alkol : 3 dakika
- %70 Alkol : 3 dakika
- %50 Alkol : 3 dakika
- Distile Su : 2 x 3 dakika

Antijen retriyavel (antijenlerin açığa çıkarılması)

- Sitrat Buffer (pH 6) : 3x5 (Mikrodalga fırın, 600 W)
- Oda ısısında soğumaya bırakma: 20 dakika

Yıkama

- PBS : 3 x 5 dakika

Endojen peroksit aktivitesinin giderilmesi

- H₂O₂ (%3) : 10 dakika

Yıkama

- PBS : 3 x 5 dakika

Bloking

- Normal Horse Serumu %2.5 (kit içerisinde): 20 dakika

İnkübasyon

- Kesitler, IGF-I 1/150, IGF-IR 1/100 konsantrasyonlarda antikor dilüent içerisinde hazırlanan primer antikorda, negatif kontrol preparatlarına ise sadece antikor dilüent konularak + 4 °C'de 1 gece (16 saat) inkübe edildi.

Yıkama

- PBS : 3 x 5 dakika

Sekonder Antikor Uygulaması

- Reagent anti Goat IGF-I için : 30 dakika

- Reagent anti Rabbit IGF-IR için: 30 dakika

Yıkama

- PBS : 3 x 5 dakika

Substrat-Kromojen Uygulaması

- DAB substrat-kromojen solüsyonu : 5 dakika (Kontrollü)

Yıkama

- Distile su : 5 dakika

Zit Boyama

- Harris hemotoksilen : 30 saniye

- Çeşme suyu : 10 dakika

- Distile su : 5 dakika

Alkol Serilerinden Geçirilmesi

- % 96 Alkol : 3 dakika

- % 100 Alkol : 3 dakika

Ksilen'de Parlatılma

- Ksilen 1 : 5 dakika
- Ksilen 2 : 5 dakika

Kapatma

- Boyanan kesitler entellan ile kapatıldı.

3.3. Değerlendirme

İmmunohistokimyasal değerlendirme; hedef hücrelerin boyanıp boyanmamasına, boyanma karakterine ve boyanan hedef hücrelerdeki boyama yoğunluğuna bakılarak yapıldı. Boyanmanın yoğunluğuna; boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanma (++) , şiddetli boyanma(+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verilerek skora yapıldı (Fromowitz ve ark. 1987, Ergin ve ark. 2008).

3.4. İstatistiksel Analiz

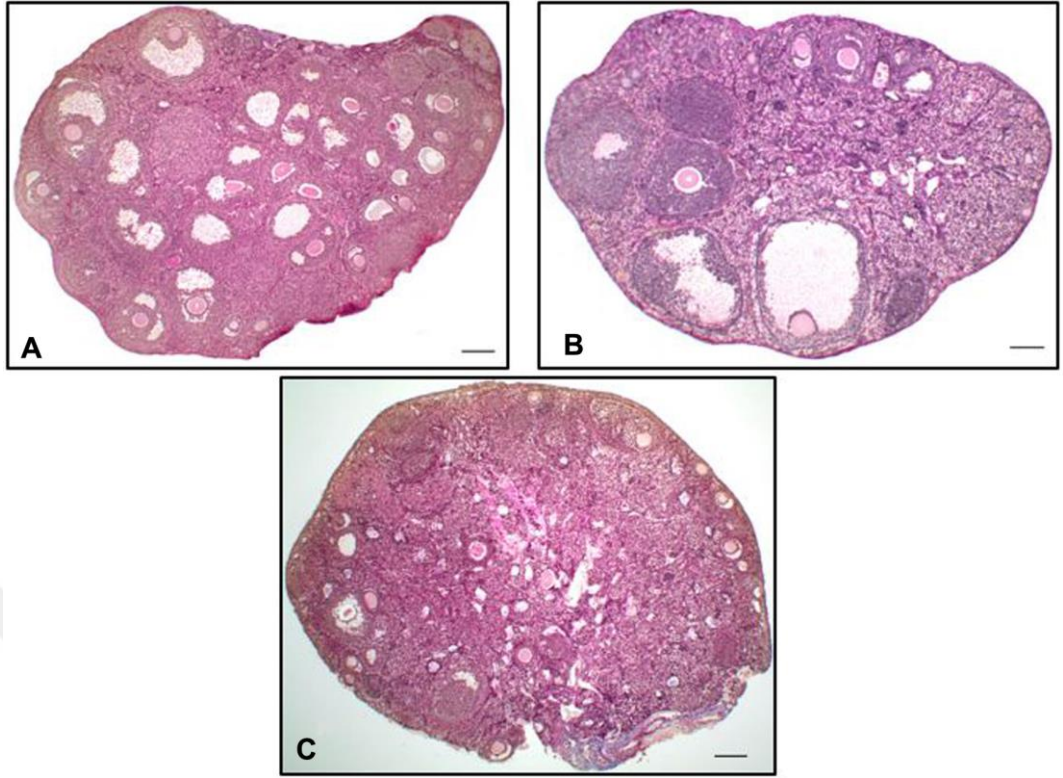
İmmunohistokimyasal boyamalar ile elde edilen verilerin ortalama ve standart hata değerleri bulunarak, gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önem gösterip göstermediği belirlendi. Deney ve kontrol grupları arasında IGF-I ve IGF-IR ekspresyonları bazında istatistiksel farklılıklar Non-Parametrik Kruskal Wallis testi ile araştırıldı. Gruplar arasındaki farklılığın hangi grup ya da gruplardan kaynaklandığını belirlemek için 2'li bağımsız değişken arasında istatistiksel önemi analiz eden Mann-Whitney U testi kullanıldı. Güven düzeyini göstermede $p \leq 0,001$, $p \leq 0,05$ simgeleri kullanıldı. İstatistiksel farklılıklar hem tablo hemde grafikler üzerinde "**Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiksel yönden önem gözlenmiştir**" ibaresiyle a-b-c harfleriyle gösterildi. Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 23.0 (Statistical Package For Social Sciences) programı kullanılarak yapıldı.

4. BULGULAR

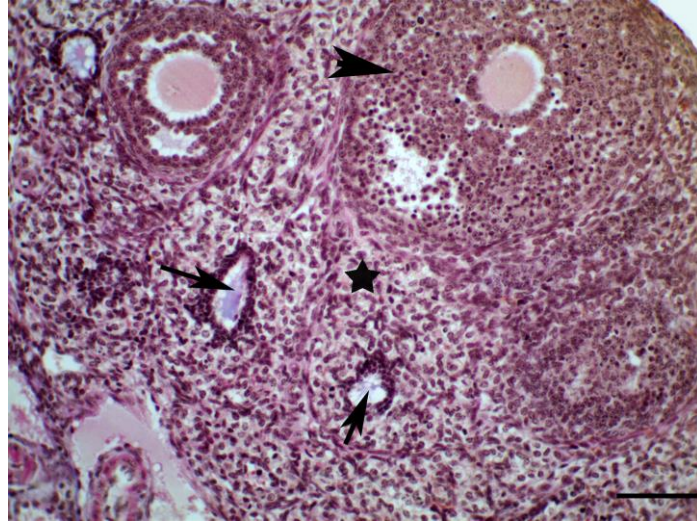
4.1. Folikül Kompozisyonu ve Ovaryum Histolojisi

Deneysel prosedürün sonunda, kontrol grubundaki ovaryum kesitlerinde foliküllerin tüm ovaryum yüzeyinde yayıldığı, korteks medulla ayırımının yapılmadığı gözlemlendi (Şekil 4.1.1.A). Üçlü boyama ile boyanan ovaryum kesitlerinde primer oositi içeren tek katlı yassı pregranuloza hücreleri ile çevrili **primordiyal foliküller (PO)**, tek katlı, iki veya daha fazla kübik folikül epitel hücreleri ile sarılmış **primer foliküller (PR)**, iki ya da üç katlı, kübik granuloza hücreleri ile kuşatılmış **sekonder foliküller (S)**, dört ya da daha fazla katlı granuloza hücreleri ile çevrili primer oositten oluşan ve antrumun henüz şekillenmediği ya da granuloza hücreleri arasında küçük aralıkların görüldüğü **preantral foliküller (PA)**, çok katlı granuloza hücreleri ile kuşatılmış primer oosit içeren ve antrumun şekillendiği **antral foliküller (A)** gözlemlendi.

TAM enjekte edilen gruplarda ise, ovaryum yüzeyinde korteks ve medulla ayırımının belirgin olduğu, intersitisyel alanın oldukça geniş, foliküllerin özellikle antral foliküllerin kontrol grubuna göre çok az olduğu gözlemlendi. Ayrıca TAM'ın dozuna bağlı olarak ovaryum yüzeyinde korpus luteumun oldukça az olduğu belirlendi (Şekil 4.1.). Ovaryum yüzeyinde gerek kontrol gerekse deney gruplarında sağlıklı ve atretik foliküller gözlemlendi. Üçlü boyama yöntemi ile atretik foliküllerdeki granuloza hücrelerinin piknotik çekirdekli ve kromatin yoğunlaşması gibi apoptozisin morfolojik özelliklerine sahip olduğu ve antrum içerisine döküldükleri belirlendi. Sağlıklı foliküllerin bir kısmında ise, az sayıda granuloza hücrelerinin folikül antrumuna döküldüğü ve apoptotik yapı gösterdiği fakat folikül içerisindeki çoğu granuloza hücrelerinin çok iyi organize bir şekilde yerleştiği ve hücre membran bütünlüğünün bozulmadığı belirlendi. Bu morfolojik değerlendirmeye bağlı olarak, kontrol grubuna göre deney grubunda, doza bağlı olarak atretik foliküllerin ovaryum yüzeyinde oldukça fazla olduğu, ayrıca medulla bölgesinde küçük kistik yapıların varlığı belirlendi. Yapılan değerlendirmeler sonucunda, tüm gruplarda primordiyal ve primer foliküllerde atrezi görülmezken, bazı sekonder, preantral ve antral foliküllerde özellikle deney grubunda kontrol grubuna göre daha fazla atretik folikül gözlemlendi (Şekil 4.2.).



Şekil 4.1. (A); Kontrol grubu, (B); 0,5 TAM grubu ve (C); 1,5 TAM grubunun ovaryumundan genel görünüm. Üçlü boyama, Bar 50 μm .



Şekil 4.2. 1,5 TAM grubunun ovaryumunda atretik ve sağlıklı foliküller. ok: atretik foliküller, ok başı: sağlıklı foliküller, yıldız: intersitisyel hücreler. Üçlü boyama. Bar 25 μm .

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

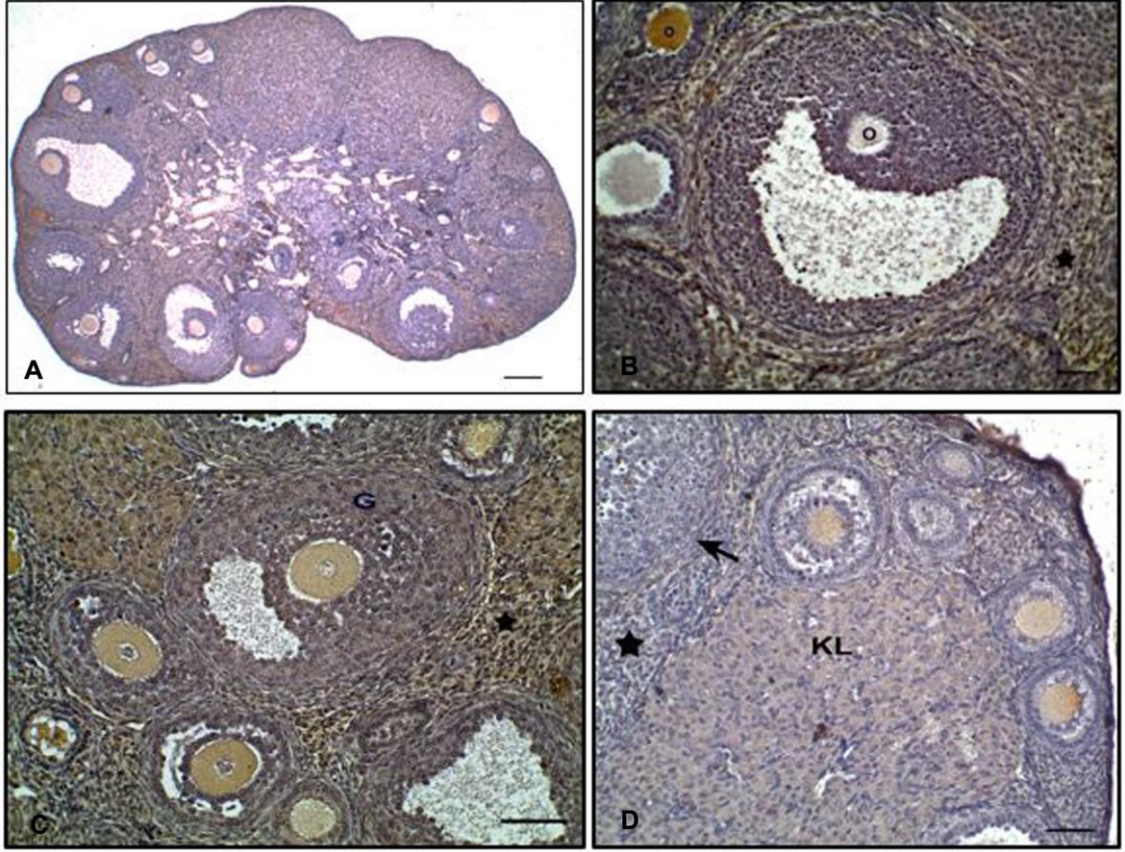
4.2.1. IGF-I

A. Kontrol Grubu

Foliküllerin oositlerinde IGF-I ekspresyonu: Kontrol grubunun ovaryumunda yer alan foliküllerin oositlerinde negatif ile orta şiddet arasında değişen IGF-I ekspresyon seviyelerine rastlandı. IGF-I ekspresyonu sekonder ve preantral foliküllerin oositlerinde orta şiddette iken, primer ve antral foliküllerde negatif ile zayıf arası şiddette bir reaksiyon gösterdi (Şekil 4.3. ve Şekil 4.6.) En az immünreaksiyon gösteren folikül grubu ise, primordiyal foliküllerin oositleri oldu (Çizelge 4.1.).

Granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu: Foliküllerdeki granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonları incelendiğinde IGF-IR' de olduğu kadar yoğun bir reaksiyon olmadığı dikkat çekti. Tüm folikül gruplarının granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu zayıf şiddette gözlemlendi. En şiddetli denebilecek öne çıkan bir folikül grubu belirlenemedi (Şekil 4.3. ve Şekil 4.7.) (Çizelge 4.2.).

Korpus luteum, Teka ve İntersitisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonu: Korpus luteum ve intersitisyel hücrelerde IGF-I ekspresyon düzeyleri yakın değerlerde olup zayıf ile orta arası şiddette reaksiyon belirlendi. Teka hücreleri ise genel olarak folikül gruplarında zayıf reaksiyon gösterdi (Şekil 4.3. ve Şekil 4.8.) (Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.).



Şekil 4.3 Kontrol grubu ovaryumunda IGF-I ekspresyonu. (A); genel görünüm. Bar 50 μm . (B); oosit sitoplazmasında, (C); granuloza hücrelerinde ve intersitisyel hücreler, (D); korpus luteum, teka hücreleri ve intersitisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonu. G: Granuloza hücresi, O: Oosit, Yıldız: İntersitisyel hücreler, KL: korpus luteum, ok: teka hücreleri. Bar 25 μm .

B. Deney grubu

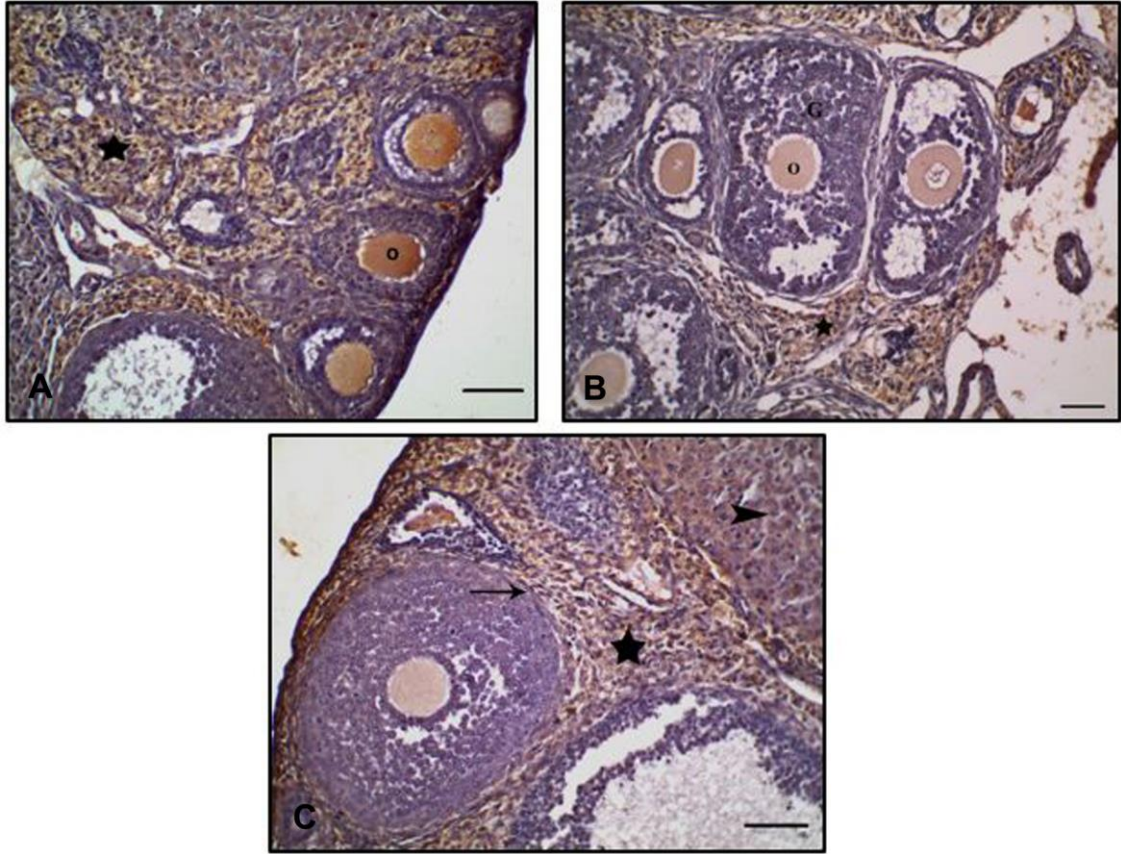
Doz: 0.5mg/fare/gün TAM Enjeksiyonu

Tamoksifen'in günlük 0.5mg doz, 5 gün süreyle uygulanan fare deney gruplarında IGF1 ekspresyonu incelendi.

Foliküllerin oositlerinde IGF-I ekspresyonu; Folikül gruplarında, oositler zayıf ile orta şiddetli arası reaksiyon gösterdi. Orta şiddette boyanma gösteren sekonder folikül oositleri en güçlü IGF-I ekspresyonu gösteren folikül grubu oldu (Şekil 4.4. ve Şekil 4.6.). Diğer folikül gruplarında (PO, PR,PA,A) IGF-I immunreaksiyon zayıf şiddette gözlenirken, PA ve A folikül oositlerinin sitoplazmasındaki reaksiyon şiddeti, PO ve PR den daha şiddetli gözlemlendi. (Çizelge 4.1.).

Granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu; Foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-I immunreaksiyon, negatifle ile zayıf arasında reaksiyon gösterdi (Şekil 4.4. ve Şekil 4.7.). Granuloza hücrelerinde en şiddetli reaksiyonu zayıf şiddeti ile (+) primer foliküllerde belirledik (Çizelge 4.2.).

Korpus luteum, Teka ve İntersitisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonu; Korpus Luteum hücrelerinde zayıf ile orta şiddetli arasında boyanma gösteren IGF-I, intersitisyel hücrelerde orta şiddette reaksiyon gösterdi (Şekil 4.4. ve Şekil 4.8.). Genel olarak foliküllerdeki teka hücrelerinde IGF-I'in ekspresyonu zayıf şiddette görülmüştür (Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.).



Şekil 4.4. 0,5 TAM grubu ovaryumunda IGF-I ekspresyonu. (A); sekonder folikül oosit sitoplazmasında ve intersitisyel hücrelerde, (B); preantral foliküllerin oosit sitoplazmasında, intersitisyel ve granuloza hücrelerinde, (C); korpus luteum, teka ve intersitisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonu. G: granuloza hücresi, O: oosit sitoplazması, yıldız: intersitisyel hücreler, ok; teka hücreleri, ok başı; korpus luteum. Bar 25 µm.

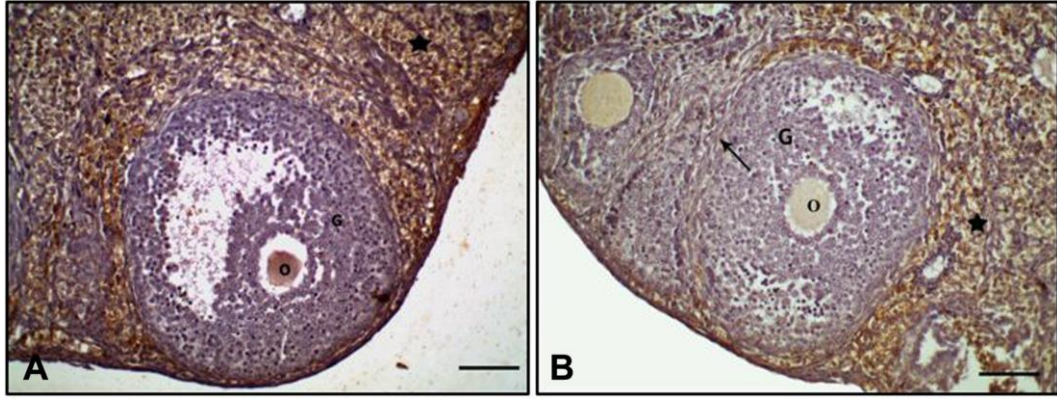
Doz: 1.5mg/fare/gün TAM Enjeksiyonu

Tamoksifen'in günlük 1.5mg doz, 5 gün süreyle uygulanan fare deney gruplarında IGF1 ekspresyonu incelendi.

Foliküllerin oositlerinde IGF-I ekspresyonu; Oositlerde negatif ile orta şiddet arasında IGF-I ekspresyon düzeyleri belirlendi. En şiddetli IGF-I ekspresyonu orta şiddetiyle preantral folikül oositlerinde gözlemlendi (Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.). Genel olarak ekspresyon düzeyleri, primordiyal folikülden, preantral foliküle doğru artış gösterdi, ancak değerlendirme yapılabilecek kadar yeterli sayıda antral foliküle rastlanılmadı (Çizelge 4.1.).

Granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu; Foliküllerde bulunan granuloza hücreleri üzerinde IGF-I ekspresyon seviyesi zayıf şiddetli belirlendi (Çizelge 4.2.). En az ekspresyon seviyesi, negatif ile zayıf şiddetli arasında oluşuyla primer foliküllerin granuloza hücrelerinde görülürken, zayıf şiddette boyanma gösteren primordiyal, sekonder ve preantral foliküllerin granuloza hücreleri arasında belirgin bir farka rastlanmadı (Şekil 4.5. ve Şekil.4.7.).

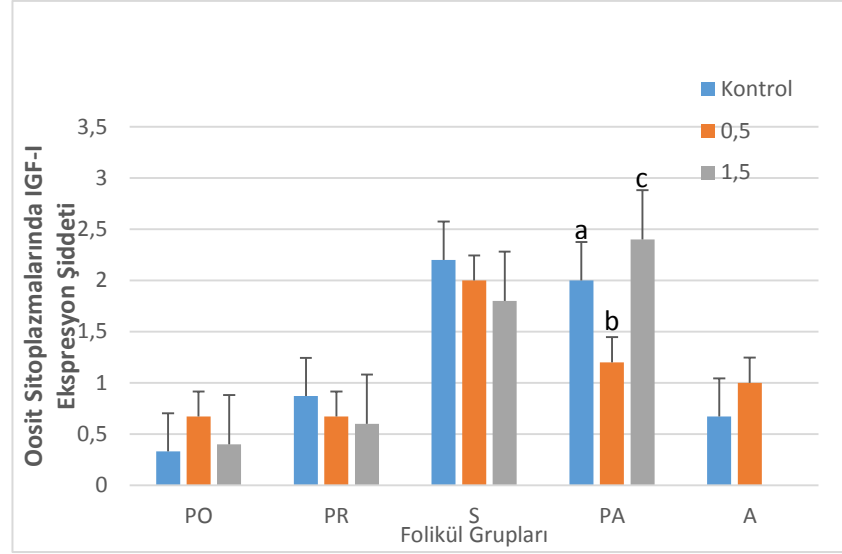
Korpus luteum, Teka ve İntersitisyel hücrelerde IGF1 ekspresyonu; İntersitisyel hücrelerde orta ile şiddetli arasında IGF-I immüreaksiyonu gözlenirken, teka hücreleri zayıf şiddette IGF-I ekspresyonu gösterdi (Şekil 4.5 ve Şekil 4.8.). Ovaryum yüzeyinde değerlendirme yapabilecek kadar korpus luteum bulunamadığı için 1.5 mg dozda TAM enjektinde edilen farelerde IGF-I ekspresyonu ile ilgili herhangi bir değerlendirmede bulunulamadı (Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.).



Şekil 4.5. 1,5 TAM grubu ovaryumunda IGF-I ekspresyonu. (A); preantral folikül oosit sitoplazmasında, granuloza hücreleri ve intersitisyel hücrelerde, (B); oosit sitoplazmasında, intersitisyel, granuloza ve teka hücrelerinde IGF-I ekspresyonu. G: granuloza hücresi, O: oosit sitoplazması, yıldız: intersitisyel hücreler, ok; teka hücreleri. Bar 25 μ m.

Çizelge 4.1. Kontrol ve deney gruplarındaki foliküllerin oositlerinde IGF-I ekspresyonu. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki yönden önem gözlenmiştir. a ve b arasında $**p<0,001$, a ve c; b ve c arasında $*p<0,05$.

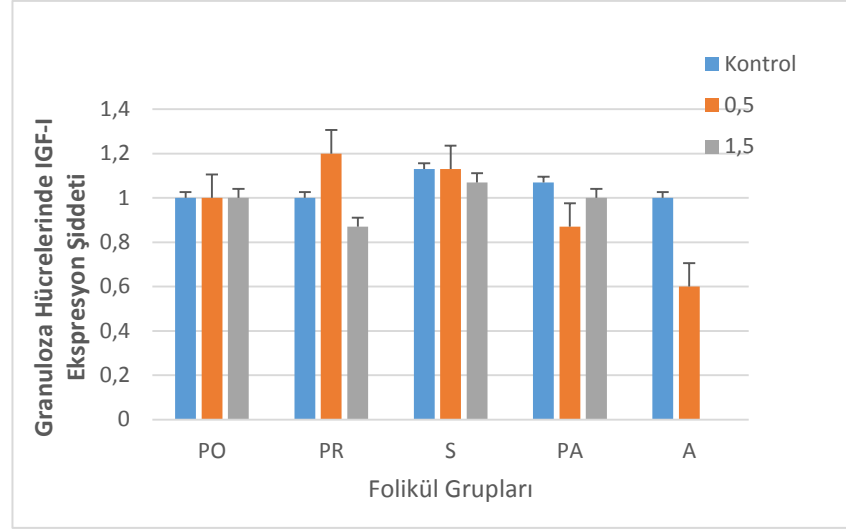
Değişken	Grup	N	Ortalama \pm SH	P
PO	<i>Kontrol Grubu</i>	20	0,33 \pm 0,12	0,160
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	0,67 \pm 0,12	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	0,40 \pm 0,13	
PR	<i>Kontrol Grubu</i>	20	0,87 \pm 0,09	0,253
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	0,67 \pm 0,12	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	0,60 \pm 0,13	
S	<i>Kontrol Grubu</i>	20	2,20 \pm 0,26	0,667
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	2,00 \pm 0,19	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	1,80 \pm 0,39	
PA	<i>Kontrol Grubu</i>	20	2,00 \pm 0,00 ^a	0,001**; 0,05*
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	1,20 \pm 0,14 ^b	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	2,40 \pm 0,32 ^c	
A	<i>Kontrol Grubu</i>	20	0,67, \pm 0,25	0,126
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	1,00 \pm 0,00	



Şekil 4.6 Kontrol ve deney gruplarında foliküler düzeyde oosit sitoplazmalarında IGF-I'nin ekspresyon şiddetleri. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir.

Çizelge 4.2. Kontrol ve deney gruplarındaki foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu. Gruplar arasında istatistiki yönden önem gözlenmedi $p > 0.05$.

Değişken	Grup	N	Ortalama \pm SH	P
PO	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,00 \pm 0,00	1,00
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	1,00 \pm 0,09	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	1,00 \pm 0,00	
PR	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,00 \pm 0,00	0,067
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	1,20 \pm 0,14	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	0,87 \pm 0,09	
S	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,13 \pm 0,09	0,837
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	1,13 \pm 0,13	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	1,07 \pm 0,07	
PA	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,07 \pm 0,07	0,445
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	0,87 \pm 0,19	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	1,00 \pm 0,00	
A	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,00 \pm 0,00	0,061
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	0,60 \pm 0,13	



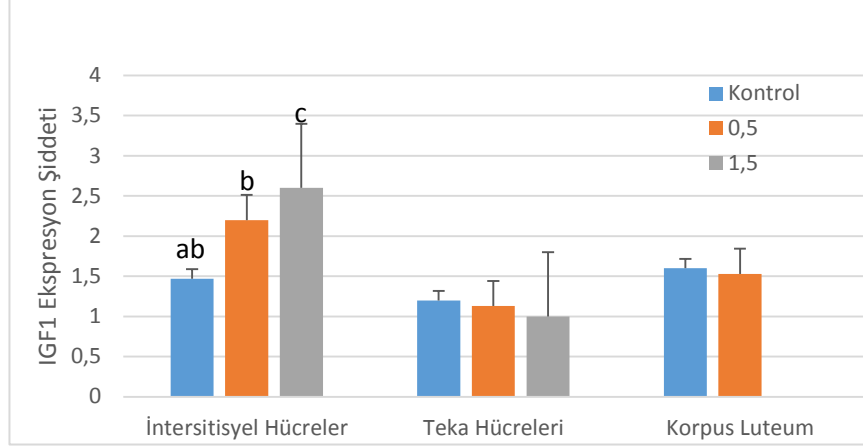
Şekil 4.7. Kontrol ve deney gruplarında foliküler düzeyde granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyon şiddetleri.

Çizelge 4.3. Kontrol ve Deney grupları arasında, korpus luteum hücrelerinde IGF-I ekspresyonu. Gruplar arasında istatistiki yönden önem gözlenmedi $p > 0.05$.

Değişken	Grup	N	Ortalama \pm SH	P
Korpus Luteum	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,60 \pm 0,21	0,330
	<i>0,5 Grubu</i>	20	1,53 \pm 0,13	

Çizelge 4.4. Kontrol ve Deney grupları arasında, intersitisyel ve teka hücrelerinde IGF-I ekspresyonu. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir. ab ve c arasında $**p < 0,001$, b ve c arasında $*p < 0,05$.

Değişken	Grup	N	Ortalama \pm SH	P
İntersitisyel Hücreler	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,47 \pm 0,24 ^{ab}	0,001**; 0,05*
	<i>0,5 Grubu</i>	20	2,20 \pm 0,11 ^b	
	<i>1,5 Grubu</i>	20	2,60 \pm 0,23 ^c	
Teka Hücreleri	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,20 \pm 0,26	0,495
	<i>0,5 Grubu</i>	20	1,13 \pm 0,09	
	<i>1,5 Grubu</i>	20	1,00 \pm 0,00	



Şekil 4.8. Kontrol ve Deney gruplarında intersitisyel, teka ve korpus luteum hücrelerinde IGF-I ekspresyon şiddetleri. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir.

Sonuç olarak;

- Preantral foliküllerin oositlerinde tüm gruplar arasında istatistiki önem belirlenmiştir (Çizelge 4.1. ve Şekil 4.6.).
- Granuloza hücrelerinde, korpus luteumda ve teka hücrelerinde gruplar arasında istatistiki bir önem saptanmamıştır (Çizelge 4.2., Çizelge 4.3. ve Çizelge 4.4.) (Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.).
- İntersitisyel hücrelerde, kontrol ve düşük doz TAM uygulanan gruplar dışında, diğer gruplar arasında istatistiki önem saptanmıştır (Çizelge 4.4. ve Şekil 4.8.).

4.2.2. IGF-IR

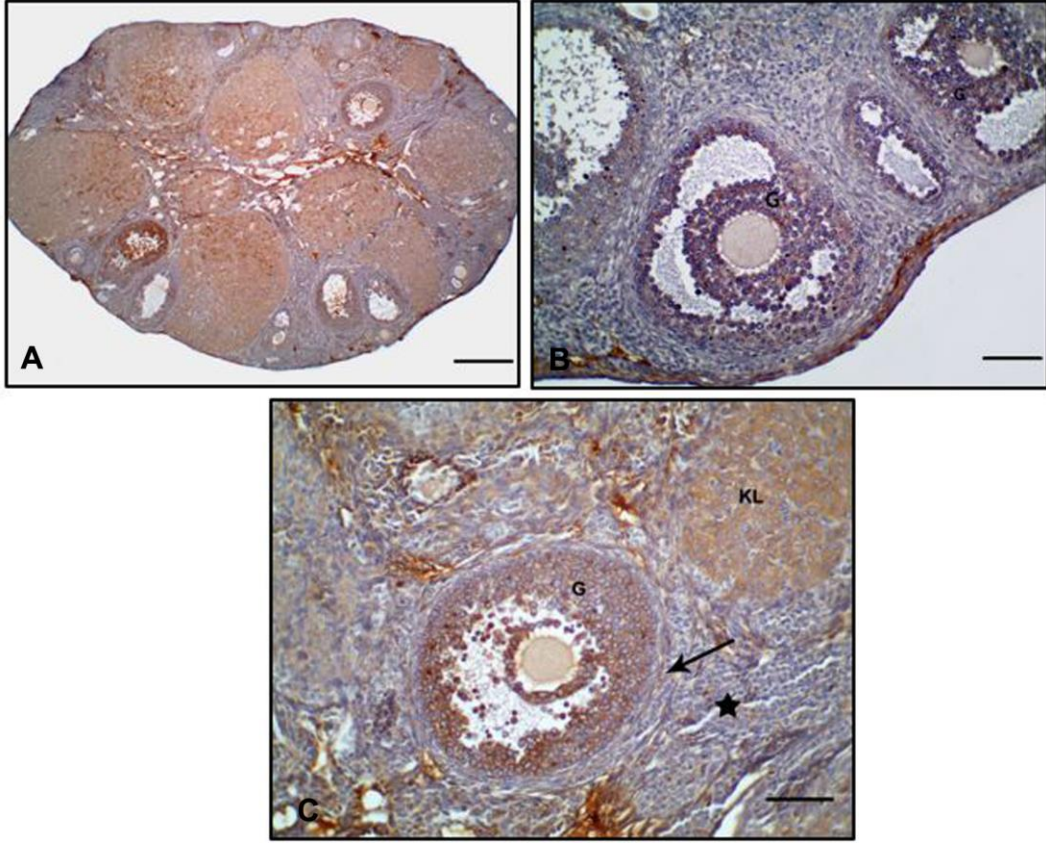
A. Kontrol Grubu

Foliküllerin Oositlerinde IGF-IR Ekspresyonu; Yapılan çalışmada kontrol gruplarında IGF-IR ekspresyonu primordiyal, primer, sekonder ve preantral foliküllerin oositlerinde negatifle zayıf arasında, antral folikülde ise baskın olarak zayıf, nadiren orta arasında değişen bir şiddette gözlendi. Primordiyal foliküllerde negatif şiddetinde ifade olan IGF-IR'nün, sekonder ve preantral foliküllerde ifade olma şiddeti arasında herhangi bir fark gözlenmedi. Kontrol grubunda folikül gelişim aşamaları arasında (PO-

PR-S-PA-A) IGF-IR ekspresyon düzeyleri değerlendirildiğinde, kontrol grubunun oositlerinde IGF-IR ekspresyonunun primordiyalden antral foliküle doğru arttığı tespit edildi (Şekil 4.9. ve Şekil 4.12.) (Çizelge 4.5.).

Granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu; Genel olarak foliküllerin granuloza hücrelerinde, orta ile şiddetli arasında ekspresyon seviyeleri gözlemlendi. Folikül gelişim aşamaları arasında (PO-PR-S-PA-A) granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu incelendiğinde, genel olarak, primordiyal foliküllerden antral foliküle kadar orta ile şiddetli arasında artarak değişen immunreaksiyon belirlendi. Granuloza hücrelerinde IGF-IR'nün en şiddetli ekspresyonu preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde gözlemlendi (Şekil 4.9. ve Şekil 4.13.) (Çizelge 4.6.).

Korpus luteum, Teka ve İntersitisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu; Korpus luteum hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu orta ile şiddetli arasında bir reaksiyon göstermiştir. Teka hücrelerinde ve intersitisyel hücrelerde ise genel olarak tüm folikül gruplarında zayıf ile orta şiddette bir reaksiyon belirlendi (Şekil 4.9. ve Şekil 4.14.) (Çizelge 4.7. ve Çizelge 4.8.).



Şekil 4.9. Kontrol grubu ovaryumunda IGF-IR ekspresyonu. (A); genel görünüm. Bar 50 µm. (B); preantral folikülün granuloza hücrelerinde, (C); preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde, korpus luteumda, teka ve intersitisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu. G: granuloza hücresi, yıldız: intersitisyel hücreler, KL: korpus luteum, ok; teka hücreleri. Bar 25 µm.

B. Deney Grubu

Doz: 0.5mg/fare/gün TAM enjeksiyonu

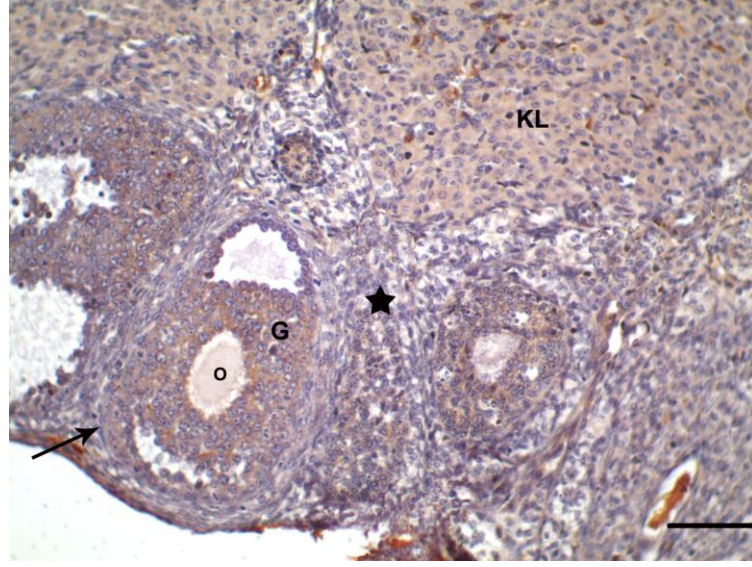
Tamoksifen'in günlük 0.5mg doz, 5 gün süreyle uygulanan fare deney gruplarında IGF-IR ekspresyonu incelendi.

Foliküllerin oositlerinde IGF-IR ekspresyonu; Foliküllerin oositlerinde IGF-IR immunreaksiyonu negatifle ile orta şiddetli arasında gözlemlendi. Primordiyal foliküllerin oositlerinde negatife daha yakın bir reaksiyon görülürken, primer foliküllerin oositlerinde zayıf ile orta arası şiddette reaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.12.). Sekonder foliküllerin oositlerinde primer folikül oositlerinden daha zayıf olmakla birlikte zayıf boyanma, preantral foliküllerin oositlerinde ise zayıfa yakın negatifle zayıf arasında bir immunreaksiyon gözlemlendi. Foliküler düzeyde oositlerde IGF-IR ekspresyonu en şiddetli

olarak (orta şiddette) antral folikül oositlerinde tespit edildi. Genel yapı itibariyle PO-PR; PR-S; S-PA; PA-A foliküllere doğru oositlerdeki reaksiyon şiddeti değerlendirildiğinde; primordiyal folikül oositlerinden primer folikül oositlerine geçişte reaksiyon artışı gözlemlenirken, hem primer folikül oositlerinden sekonder folikül oositlerine geçişte hem de sekonder foliküllerden preantral folikül oositlerine geçişte IGF-IR'nün ekspresyonunun azaldığı görülmüştür. Preantral foliküllerden antral folikül oositlerine geçerken immünreaksiyon şiddetine bakıldığında, negatifle zayıf arası bir şiddetten orta seviyede bir boyanma şiddetine doğru artış gözlenmiştir (Şekil 4.10.) (Çizelge 4.5.).

Granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu; Foliküllerde granuloza hücreleri açısından IGF-IR'nün ifade şiddetine bakıldığında, genel olarak orta şiddetle şiddetli arası bir reaksiyon gösterdiği tespit edildi. Foliküller üzerinde orta ile şiddetli arasında bir reaksiyon gösteren granuloza hücrelerinde, en şiddetli reaksiyon antral foliküllerde (+++) görüldü. Antral folikülün hemen ardından sırasıyla; Preantral, sekonder, primordiyal, primer folikül granuloza hücrelerinde orta ile şiddetli arası bir reaksiyon gözlemlendi (Şekil 4.10. ve Şekil 4.13.) (Çizelge 4.6.).

Korpus luteum, Teka ve İntersitisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu; Korpus Luteum kontrol grubunda olduğu kadar, 0.5 deney grubunda ovaryum dokusu içerisinde sık gözlenmesine de IGF-IR ekspresyonu açısından orta şiddette bir reaksiyon gösterdiği tespit edildi. Genel olarak teka hücreleri orta ile şiddetli arasında reaksiyon gösterirken, intersitisyel hücreler zayıf ile orta şiddette reaksiyon göstermiştir (Şekil 4.10. ve Şekil 4.14.) (Çizelge 4.7. ve Çizelge 4.8.).



Şekil 4.10. 0,5 TAM gurubu ovaryumunda oosit sitoplazmasında, granuloza hücrelerinde, korpus luteumda, teka ve intersitisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu. O: oosit sitoplazması, G: granuloza hücreleri, KL: korpus luteum, ok: teka hücreleri, yıldız: intersitisyel hücreler. Bar 25 µm.

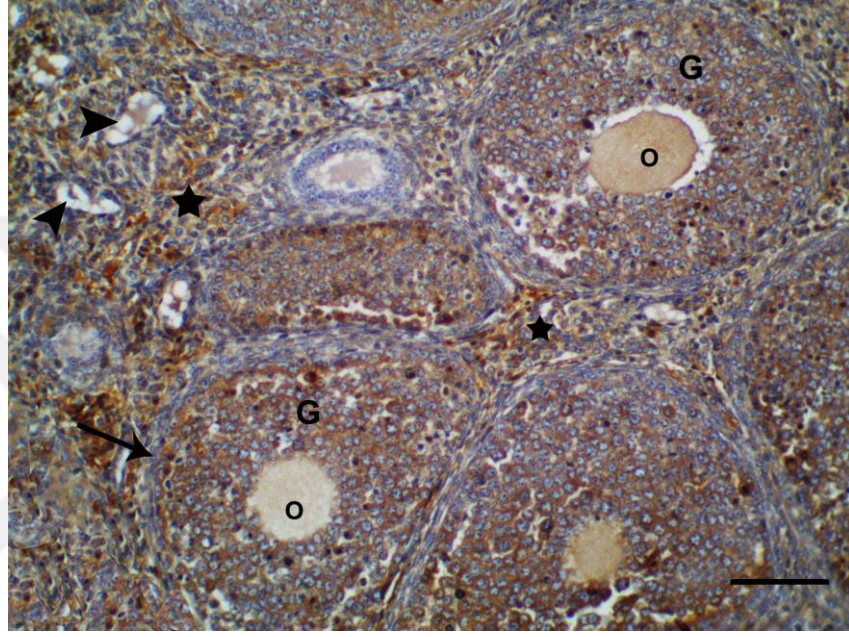
Doz: 1.5mg/fare/gün TAM Enjeksiyonu

Tamoksifen'in günlük 1.5mg doz, 5 gün süreyle uygulanan fare deney gruplarında IGF-IR ekspresyonu incelendi.

Foliküllerin oositlerinde IGF-IR ekspresyonu; Foliküllerin oositlerindeki IGF-IR ekspresyonu genel olarak negatif ile zayıf arasında bir boyanma gösterdi. Primordiyal foliküllerin oositlerinde ekspresyon negatifken, primer foliküllerin ve sekonder foliküllerin oositlerinde ekspresyon düzeyi negatif ile zayıf arasında değişti. Preantral foliküller zayıf ile orta şiddette boyanma gösterdi (Şekil 4.11. ve Şekil 4.12.) (Çizelge 4.5.).

Granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu; Foliküllerin granuloza hücrelerinde ekspresyon şiddeti ise, zayıf ile şiddetli arasında değişti. IGF-IR preantral foliküllerde oldukça şiddetli immunreaksiyon gösterirken, bu reaksiyon şiddetine eşit seviyede reaksiyon gösteren sekonder ve primer foliküller izledi (Şekil 4.11. ve Şekil 4.13.). Zayıf reaksiyon şiddetiyle en az boyanmayı primordiyal foliküllerdeki granuloza hücrelerinde tespit ettik (Çizelge 4.6.).

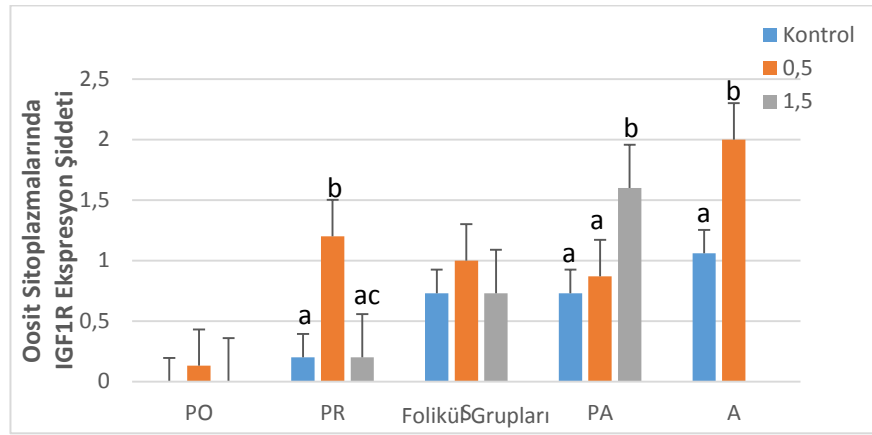
Teka ve İntersitisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu; İntersitisyel hücreler orta ile şiddetli arasında bir boyanma gösterirken, teka hücreleri genel olarak zayıf ile orta arasında reaksiyon gösterdi (Şekil 4.11 ve Şekil 4.14.). Yüksek doz TAM grubunun ovaryum dokularında değerlendirme yapacak düzey ve miktarda antral folikül ve korpus luteuma ise rastlanmadı (Çizelge 4.7. ve Çizelge 4.8.).



Şekil 4.11. 1,5 TAM gurubu ovaryumunda oosit sitoplazmasında, granuloza, teka ve intersitisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu. O: oosit sitoplazması, G: granuloza hücreleri, ok: teka hücreleri, yıldız: intersitisyel hücreler, ok başı: atretik foliküller. Bar 25 µm.

Çizelge 4.5. Kontrol ve deney gruplarındaki foliküllerin oositlerinde IGF-IR ekspresyonu. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir. PR foliküllerde; a ve b; b ve ac arasında **p<0,001, PA foliküllerde a ve b arasında *p<0,05, A foliküllerde a ve b arasında **p<0,001

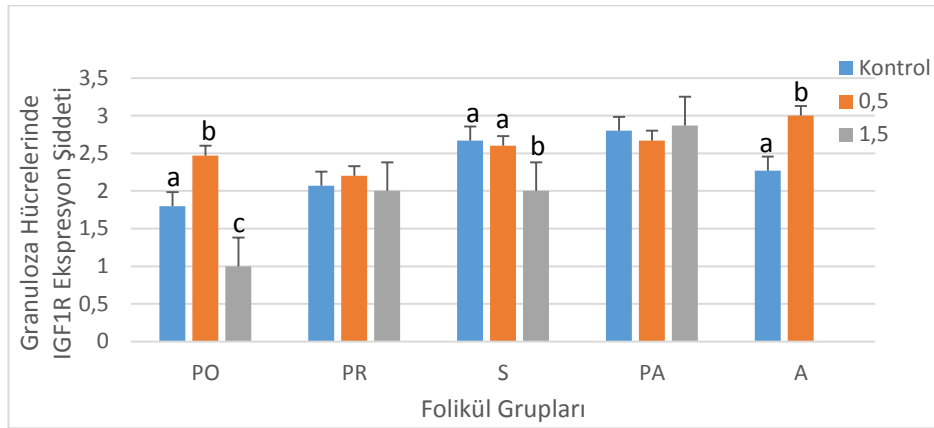
Değişken	Grup	N	Ortalama±SH	P
PO	<i>Kontrol Grubu</i>	20	0,00 ±0,00	0,129
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	0,13 ± 0,09	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	0,00 ± 0,00	
PR	<i>Kontrol Grubu</i>	20	0,20 ± 0,11 ^a	0,001**
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	1,20 ± 0,14 ^b	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	0,20 ±0,11 ^{ac}	
S	<i>Kontrol Grubu</i>	20	0,73 ± 0,12	0,268
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	1,00 ± 0,14	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	0,73 ± 0,12	
PA	<i>Kontrol Grubu</i>	20	0,73 ±0,12 ^a	0,003*
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	0,87 ± 0,16 ^a	
	<i>1,5 Deney Grubu</i>	20	1,60 ± 0,21 ^b	
A	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,06 ± 0,06 ^a	0,001**
	<i>0,5 Deney Grubu</i>	20	2,00 ± 0,21 ^b	



Şekil 4.12. Kontrol ve Deney gruplarında foliküler düzeyde oosit sitoplazmalarında IGF-IR'nün ekspresyon şiddetleri. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir.

Çizelge 4.6. Kontrol ve deney gruplarındaki foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir. PO foliküllerde; a ve b arasında * $p < 0,05$, a ve c; c ve b arasında ** $p < 0,001$. S foliküllerde a ve b arasında ** $p < 0,001$.

Değişken	Grup	N	Ortalama \pm SH	P
PO	Kontrol Grubu	20	1,80 \pm 0,11 ^a	0,001** ; 0,05*
	0,5 Deney Grubu	20	2,47 \pm 0,16 ^b	
	1,5 Deney Grubu	20	1,00 \pm 0,00 ^c	
PR	Kontrol Grubu	20	2,07 \pm 0,18	0,480
	0,5 Deney Grubu	20	2,20 \pm 0,11	
	1,5 Deney Grubu	20	2,00 \pm 0,00	
S	Kontrol Grubu	20	2,67 \pm 0,12 ^a	0,001**
	0,5 Deney Grubu	20	2,60 \pm 0,13 ^a	
	1,5 Deney Grubu	20	2,00 \pm 0,00 ^b	
PA	Kontrol Grubu	20	2,80 \pm 0,11	0,624
	0,5 Deney Grubu	20	2,67 \pm 0,16	
	1,5 Deney Grubu	20	2,87 \pm 0,09	
A	Kontrol Grubu	20	2,27 \pm 0,12 ^a	0,001**
	0,5 Deney Grubu	20	3,00 \pm 0,00 ^b	



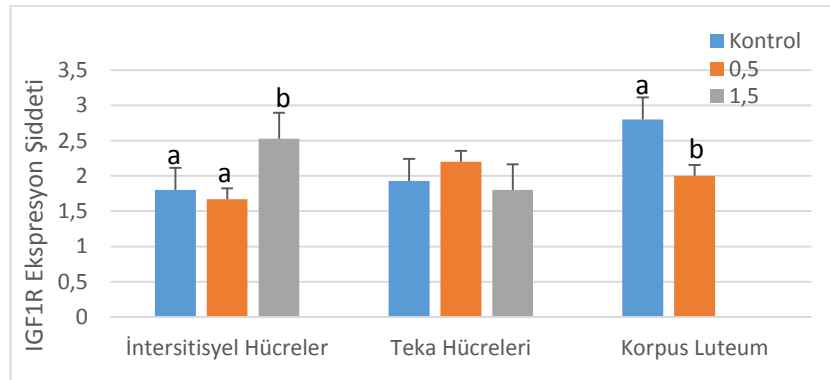
Şekil 4.13. Kontrol ve deney gruplarında foliküler düzeyde granuloza hücrelerinde IGF-IR'nün ekspresyon şiddetleri. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir.

Çizelge 4.7. Kontrol ve deney grupları arasında, Korpus Luteum hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir **p<0,001.

Değişken	Grup	N	Ortalama ±SH	P
Korpus Luteum	<i>Kontrol Grubu</i>	20	2,80 ± 0,11 ^a	0,001**
	<i>0,5 Grubu</i>	20	2,00 ± 0,00 ^b	

Çizelge 4.8. Kontrol ve deney grupları arasında, İntersitisyel ve teka hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir *p<0,05.

Değişken	Grup	N	Ortalama ±SH	P
İntersitisyel Hücreler	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,80 ± 0,20 ^a	0,002*
	<i>0,5 Grubu</i>	20	1,67 ± 0,19 ^a	
	<i>1,5 Grubu</i>	20	2,53 ± 0,13 ^b	
Teka Hücreleri	<i>Kontrol Grubu</i>	20	1,93 ± 0,12	0,173
	<i>0,5 Grubu</i>	20	2,20 ± 0,14	
	<i>1,5 Grubu</i>	20	1,80 ± 0,17	



Şekil 4.14. Kontrol ve deney gruplarında intersitisyel, teka ve korpusl luteumda IGF-IR ekspresyon şiddetleri. Farklı harfler taşıyan gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir.

Sonuç olarak;

- Primer foliküllerin oositlerinde kontrol ve yüksek doz TAM grubu arasında istatistiki bir önem gözlenmezken diğer gruplar arasında istatistiki önem belirlenmiştir (Şekil 4.12. ve Çizelge 4.5.).
- Preantral foliküllerin oositlerinde yüksek doz TAM grubu diğer gruplar ile istatistiki önem göstermiştir (Şekil 4.12. ve Çizelge 4.5.).
- Antral foliküllerin oositlerinde gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir (Şekil 4.12. ve Çizelge 4.5.).
- Primordiyal foliküllerin granuloza hücrelerinde gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir (Şekil 4.13. ve Çizelge 4.6.).
- Sekonder foliküllerin granuloza hücrelerinde yüksek doz TAM grubu diğer gruplar ile istatistiki önem göstermiştir (Şekil 4.13. ve Çizelge 4.6.).
- Antral foliküllerin granuloza hücrelerinde, gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir (Şekil 4.13. ve Çizelge 4.6.).
- Korpus luteumda gruplar arasında istatistiki önem gözlenmiştir (Şekil 4.14. ve Çizelge 4.7.).
- İntersitisyel hücrelerde, yüksek doz TAM uygulanan grup diğer gruplar ile istatistiki önem göstermiştir (Şekil 4.14. ve Çizelge 4.8.).
- Teka hücrelerinde gruplar arasında istatistiki bir önem saptanmamıştır (Şekil 4.14. ve Çizelge 4.8.).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Genel Morfolojik Yapı

Yapılan çalışmada kontrol grubunda, ovaryum foliküllerinin tüm ovaryum yüzeyinde yayıldığı, korteks medulla ayırımının yapılmadığı görülürken, TAM uygulanan gruplarda ovaryum yüzeyinde korteks ve medulla ayırımının belirgin olduğu, intersitisyel alanın oldukça geniş, özellikle korpus luteumun ve antral foliküllerin kontrol grubuna göre çok az olduğu üçlü boyama yöntemiyle belirlendi. Ayrıca TAM uygulanan deney grubunda, doza bağlı olarak atretik foliküllerin ovaryum yüzeyinde oldukça fazla olduğu gözlemlendi. Yapılan çalışmaya benzer olarak, Tsujioka ve ark. (2009) dişi farelerin fertilesitesiyle ilgili yaptıkları çalışmada, TAM'ın, büyük atretik foliküllere neden olduğunu, intersitisyel alanı arttırdığını bununla birlikte korpus luteumunda çoğunlukla gözlenemediğini belirtmişlerdir. Ayrıca Akduman ve ark. (2014) da TAM uygulamasından sonra, korpus luteum ve antral folikül sayısının kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde azaldığını ve deney grubunda atretik foliküllerin de oldukça arttığını, folikül rezervinin ise etkilenmediğini belirtmişlerdir. Zık ve ark. (2012) da TAM'ın follükül rezervi üzerine etkili olmadığını, fakat antral follükül sayısının ve korpus luteum sayısının kontrol grubuna göre az olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca Ting ve Petrof (2010) da bazı kemoterapatik ajanların ve çevresel toksik ajan olan DMBA'nın ovaryumda oluşturduğu folikül hasarına karşı, günlük 1mg/kg miktarında enjekte edilen TAM'ın, koruyucu rol oynadığını, ovaryumda primordiyal follükül rezervini koruduğunu belirtmişlerdir.

Sunulan çalışmada ayrıca, TAM uygulaması sonrasında ovaryumun medulla bölgesinde küçük kistik yapıların varlığını gözledik. Bizim çalışmamıza benzer olarak, Tucker ve ark. (1984) TAM onkojenitesi üzerine yaptıkları bir çalışmada, 5 ve 50 mg / kg TAM uygulanan iki grup dişi faredede granuloza hücre tümörlerinin ve kistik yapıların görülme sıklığının % 36 oranında arttığını göstermişlerdir. Kedar ve ark. (1994) premenopozal hastaların ovaryumlarında, TAM'ın hipotalamus-hipofiz-ovaryum geri bildirim mekanizmasını etkileyerek östrojen üretimini uyardığını belirtmişlerdir. Sherman ve ark. ise (1979) TAM tedavisi sırasında hiperöstrojenizmi tanımlayarak TAM'ın ovaryum foliküllerinde gonadotropin stimülasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir.

Chakravorty ve ark. (1991) da yaptığı çalışmada yüksek seviyede östrojenin ovulasyonu engellediğini belirtmişlerdir. Yapılan çalışmalardaki bulgular ışığında, çalışmamızda TAM uygulama sonrası fare ovaryum yüzeyinde oluşan kistlerin de TAM'ın östrojen seviyesini yükseltmesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir.

5.2. İmmunohistokimya

5.2.1. Oositte IGF-I Ekspresyonu

Sunulan çalışmada, kontrol ve deney grubuna ait ovaryum dokularında IGF-I ekspresyonu, foliküllerin oositlerinde genel olarak negatif ile orta şiddet arasında değişen bir immunreaksiyon gösterdi. Ayrıca folikül gelişim evreleri incelendiğinde sadece kontrol ve deney gruplarının preantral foliküllerinde istatistiki önem saptanmıştır. Özellikle yüksek doz TAM grubunda, diğer gruplara göre oositte IGF-I immunreaksiyonu oldukça şiddetliydi. Feng ve ark. (1988) IGF-I'in oosit maturasyonunda ve foliküllerin gelişiminde rol oynadığını, Silva ark. (2009) da IGF-I'in oositin olgunlaşması ve folikül farklılaşmasının uyarılmasında otokrin veya parakrin mekanizmanın etkili olduğunu belirtmişlerdir. Aynı zamanda Sherman ve ark. (1979) TAM uygulamasının östrojen üretimini uyardığını ve yüksek seviyedeki östrojenin folikülogenezis üzerinde olumsuz bir etki yaptığını bildirmişlerdir. Literatür bilgileri göz önüne alındığında, sunulan çalışmada yüksek doz TAM'ın, preantral foliküllerin oositlerinde ovaryum östrojen seviyesini etkileyerek IGF-I ekspresyonunu arttırdığı ve bunun sonucunda da antral folikül sayısının az olduğu da düşünülerek gelişmekte olan bu preantral foliküllerin atreziye olabileceği kanısına varılabilir.

5.2.2. Granuloza Hücrelerinde IGF-I'in Ekspresyonu

Yapılan çalışmada, pek çok araştırmada olduğu gibi (Monniaux ve Pisselet 1992, Wandji ve ark. 1998, Armstrong ve ark. 2000) kontrol ve deney gruplarında, bütün folikül gruplarının granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonunu gözledndi. Kontrol ve TAM enjeksiyonu yapılan gruplarda genel olarak zayıf bir immün reaksiyon gözlendi. Gruplar arasında IGF-I immunreaksiyon şiddeti bakımından istatistiki olarak önemli bir fark gözlenmezken, TAM gruplarında özellikle sekonder folikülden itibaren preantral ve antral foliküllerde IGF-I ekspresyonunun azaldığı belirlendi. Bizim çalışmamıza benzer olarak, Akkaya ve ark. (2017) endokrin bozucu bir pestisit olan metoksiklorürün de

sekonder, preantral ve antral folikül gruplarının granuloza hücrelerinde IGF-I ifadesini azalttığını belirtmişlerdir. IGF-I'in granuloza hücrelerinin çoğalmasını, folikülogenezisin uyarılmasını, ayrıca folikülleri apoptozisten koruyarak folikül atrezisini önlediği bilinmektedir (Guthrie ve ark. 1998, Hu ve ark. 2004, Quirk ve ark. 2004). Dolayısıyla çalışmamızda gelişimin ileri aşamasında bulunan foliküllerde IGF-I immunreaksiyonunun azalması, çalışmamızda gözlenen ovaryum morfolojisinde düşünüldüğünde bu foliküllerin atreziye olabileceğini düşündürmektedir.

5.2.3. Korpus Luteum, Teka ve İntersitisyel Hücrelerde IGF-I'in Ekspresyonu

Yapılan çalışmada, kontrol ve deney gruplarında IGF-I ekspresyonunu korpus luteumlarda, teka ve intersitisyel hücrelerde gözledik. Ancak yüksek doz TAM uygulamasından sonra ovaryum dokusunda değerlendirmeye alınacak yeterlilikte korpus luteum gözlenememiştir. Yapılan çalışmaya benzer olarak pek çok araştırmada da (Tusujioka ve ark. 2009, Akduman ve ark. 2014) TAM uygulaması sonrası benzer bir sonuç elde edilmiştir. Kontrol ve düşük doz TAM gruplarında IGF-I ekspresyonu bakımından herhangi bir istatistikî fark belirlenmemiştir. Dolayısıyla TAM'ın IGF-I'den bağımsız bir mekanizmayla progesteron üretimini etkilediğini düşünmekteyiz. Ovaryum, teka ve intersitisyel hücrelerde $E\alpha$ 'nın, granuloza hücrelerinde ise $E\beta$ 'nin ekspresyonunun varlığı bildirilmektedir (Han ve ark. 2013). Yapılan çalışmada, TAM dozuyla paralel olarak intersitisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonu artmıştır. Dolayısıyla TAM'ın $E\alpha$ 'yı intersitisyel hücrelerde stimüle edici bir etkisinin olabileceğini düşünmekteyiz. Rzepczynska ve ark. (2009) yaptıkları çalışmada intersitisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonunun artışının polikistik over sendromu ile doğrudan ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. Yaptığımız çalışmada intersitisyel hücrelerde TAM uygulaması sonrası IGF-I ifadesinin artışı ayrıca ovaryum morfolojisi de göz önüne alındığında deney gruplarında ovaryumda görülen kistik yapıların polikistik over sendromuyla ilişkili olabileceğini akla getirmektedir.

LH, teka hücresinde reseptörüne bağlandığında, kolesterol, P450_{scc}, P450_{c17} ve 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz ile androjen, androstenoidon ve testosterona dönüştürülür. Aynı zamanda teka hücreleri, teka lütein hücrelerine dönüşerek LH uyarısına yanıt olarak androstenoidon ve progesteron üretir (Han ve ark. 2013). Sunulan çalışmada

kontrol ve deney grupları arasında teka hücrelerinde IGF-I ekspresyonları bakımından istatistiki yönden bir önem saptanmamıştır. Çalışmada TAM'ın intersitisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonunu arttırması, bununla birlikte teka hücrelerinde kontrol grubuna benzer olarak zayıf şiddette immunreaksiyonun gözlenmesi, androstenoidonun östrodiyole çevrilmesini IGF-I'den bağımsız bir mekanizma ile sağladığı sonucunu akla getirmektedir.

5.2.4. Oositte IGF-IR'ün Ekspresyonu

Önceki çalışmalara (Zhou ve ark. 1991, Qu ve ark. 2000) benzer olarak yapılan çalışmada IGF-IR ekspresyonu tüm foliküllerin oositlerinde gözledik. Kontrol grubunun oosit sitoplazmalarında primordiyal folikülden antral foliküle doğru IGF-IR ekspresyonunda bir artış gözlenmiştir. Deney gruplarında da genel olarak folikül gelişimine paralel olarak IGF-IR ekspresyonunun arttığı gözlendi. Bu sonuçlarla uygulanan çalışmada, IGF-IR ekspresyonu bakımından kontrol ve deney grupları arasında primer, preantral ve antral folikül gruplarında, istatistiki bir önem saptanmıştır. Tsujioka ve ark.'ın (2009) belirttiği gibi yüksek doz TAM grubunda IGF-I de olduğu gibi değerlendirmeye alacak sayıda antral folikül bulunmamaktadır. Sonuçlar incelendiğinde yüksek doz TAM'ın folikül gelişimine paralel olarak antral foliküllerin oositlerinde de IGF-IR ekspresyonunu arttırabileceği düşünülmektedir.

Preantral folikül gruplarının oositlerinde yüksek doz TAM uygulamasından dolayı hem IGF-I hem de IGF-IR ekspresyonunda kontrol ve deney grupları arasında istatistiki açıdan bir önem saptanmıştır. Yapılan çalışmalarda (Mazerboug ve ark. 2003) farelerde büyük preantral foliküllerde IGF-I'in ekspresyonundaki artışın, fonksiyonel FSH reseptörlerinin sayısını arttırdığı ve bunun da IGF-IR'de artışa yol açtığı belirtilmektedir. Bunun da FSH'nın yüksek seviyesi, antrumun oluşumu ve folliküllerde aromataz ve LH reseptörlerinin ekspresyonu gibi pozitif geri besleme döngüsünden kaynaklandığını belirtmişlerdir (Mazerboug ve ark. 2003). Sunulan çalışmada diğer çalışmalara paralel olarak TAM'ın oositlerde hem IGF-I hemde IGF-IR ekspresyonunu arttırdığını gözlendi dolayısıyla TAM'ın oosit maturasyonunda etkili olduğu düşünülebilir.

5.2.5. Granuloza Hücrelerinde IGF-IR'in Ekspresyonu

Yapılan taramalarda IGF-IR ekspresyonu insan ve çeşitli hayvan türlerinin ovaryumunda foliküllerin granuloza hücrelerinde belirlenmiştir (Zhou ve ark. 1991, Toda ve ark. 2002, Kwintkiewicz ve Giudice 2009). Sunulan çalışmada kontrol ve deney gruplarının tüm folikül sınıflarının granuloza hücrelerinde, IGF-IR ekspresyonu zayıf ile şiddetli arasında değişen düzeyde gözlemlendi. Kontrol ve deney gruplarındaki foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonunun genel olarak folikül gelişimi ile doğru orantılı olarak primordiyal folikülden antral foliküle doğru arttığı belirlendi. Kontrol ve deney gruplarının aynı gelişim aşamasındaki primordiyal, sekonder ve antral foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonları bakımından istatistiksel bir önem saptanmıştır ($p < 0,001$). Yüksek doz TAM'ın primordiyal foliküllerin granuloza hücrelerinde zayıf IGF-IR immunreaksiyona sebep olurken, diğer tüm foliküllerde gerek düşük gerekse yüksek doz TAM'ın IGF-IR immunreaksiyonunu orta ile şiddetli arasında değiştirdiği belirlendi. Araştırmada, TAM'ın dozlarının, özellikle gelişmiş foliküllerin granuloza hücrelerinde zayıf immunreaksiyon göstermesiyle IGF-I ekspresyonunu baskıladığı, bununla birlikte bu foliküllerde IGF-IR ekspresyonunu ise arttırdığı belirlendi. Yapılan çalışmalarda (Werner ve ark. 1990, Thissen ve ark. 1994, Fu ve ark. 2001, Cruickshank ve ark. 2005) IGF-I ile IGF-IR düzeylerinde ters bir orantı olduğu ve IGF-I deki artışın IGF-IR de azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Sunulan çalışmada da granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonundaki zayıf immunreaksiyon, IGF-IR düzeyinde artışa sebep olarak granuloza hücrelerinde şiddetli immunreaksiyona sebep olmuş olabilir.

5.2.6. Korpus Luteum, Teka ve İnterstisyel Hücreler Üzerinde IGF-IR'nün Ekspresyonu

Sunulan çalışmada, IGF-IR ekspresyonunu diğer pek çok araştırmada olduğu gibi, korpus luteumlarda (Perks ve ark. 1999), teka hücrelerinde (Leon ve Chamberlain 1998) ve interstisyel hücrelerde (Zhou ve ark. 1991) gözlemlendi. Araştırmada diğer yapılan çalışmalara (Matsuda ve ark. 1997, Tusujioka ve ark. 2009, Akduman ve ark. 2014) benzer olarak, yüksek doz TAM uygulanan fare ovaryumlarında, değerlendirmeye alınacak sayıda korpus luteum gözlenememiştir. Kontrol ve düşük doz TAM uygulanan farelerin korpus luteumlarındaki IGF-IR ekspresyonu arasında

istatistiki önem gözlenirken, ekspresyon şiddeti kontrol grubunda orta ile şiddetli arası, düşük doz TAM uygulamasında ise orta şiddette bir ekspresyon gözlenmiştir. TAM'ın IGF-I ekspresyonunda etkili olmadığı bununla birlikte düşük doz TAM uygulamasında ise IGF-IR ekspresyonunu düşürerek korpus luteumun regresyonuna neden olabileceği bununda TAM'ın neden olduğu hiper östrojenik etkiden dolayı olabileceğini düşünülmektedir. Sonuç olarak TAM'ın steroidogenezis ve folikülogenezis üzerinde etkili olabileceği kanısına varılmıştır.

İntersitisyel hücrelerde ise yüksek doz TAM uygulamasıyla, IGF-IR'nün ifadesinde kontrol grubuyla istatistiki açıdan önemli olacak şekilde bir artış gözlenmiştir. Aynı zamanda çalışmada IGF-I'in de hem düşük hemde yüksek TAM dozunda ekspresyonun doza bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. Terada ve ark. (1993) TAM'ın ovaryum üzerine direkt etki ederek östradiol seviyesini yükselttiğini ve östrojen agonist etki gösterdiğini belirtmektedirler. İntersitisyel hücrelerin östrojen sentezinde aktif rolü göz önüne alındığında (Cara ve ark. 1988), Terada ve ark. (1993)'na benzer olarak, TAM'ın IGF-I ve IGF-IR ekspresyonunu arttırarak östrojen sentezinde stimule edici bir fonksiyon yaptığı düşünülmektedir.

Sonuç olarak;

- Yüksek doz TAM'ın antral folikül ve korpus luteum oluşumunu etkilediği ve çok sayıda kistik foliküle neden olduğu belirlendi.

-TAM'ın özellikle, foliküllerin oosit sitoplazmalarında ve intersitisyel alanda IGF-I ifadelerini, korpus luteum ve granuloza hücrelerinde ise doza bağlı olarak IGF-IR ifadesini değiştirdiği gözlemlendi.

-IGF'lerin östrojen ve progesteron üretimini ve aromataz aktivitesini aktive ettiği ve aynı zamanda FSH ve LH'nin etkisini modüle ettiği düşünüldüğünde, yüksek doz ve uzun süreli TAM uygulamalarının östrojeni arttırıcı bir etki göstererek farelerde polikistik over sendromuna neden olabileceği sonucuna varılabilir. Bunun da uzun vadede dişi bireylerde infertilite sorunlarına yol açabileceği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- Adashi, E. Y. 1995.** Insulin-like growth factors as determinants of follicular fate. *J. Soc. Gynecol. Invest.*, 2: 721–726.
- Ailen, E., Doisy, E.A. 1923.** An ovarian hormone: Preliminary report on its localisation, extraction and partial purification and action in test animals. *Jama*, 81: 819-821.
- Akduman, A.T., Özerkan, K., Zik, B., Peker, S., Avcı, B., Ata, B. 2014.** Effect of tamoxifen on ovarian reserve: A randomized controlled assessor-blind trial in a mouse model, *J. Turk Ger. Gynecol. Assoc.*, 15(4): 228–232.
- Akkaya, O.O., Altunbas, K., Yagcı, A. 2017.** Effects of methoxychlor on IGF-I signaling pathway in rat ovary. *Biotechnic & Histochemistry*, 92(3): 230-242.
- Armstrong, D.G., Gutierrez, C.G., Baxter, G., Glazyrin, A.L., Mann, G.E., Woad, K.J., Hogg, C.O., Webb R. 2000.** Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, 165: 101-113.
- Ando, Y., Jensen, P.J. 1993.** Epidermal growth factor and insulin-like growth factor I enhance keratinocyte migration. *J. Invest. Dermatol.*, 100: 633-639.
- Barakat, R.R, Gilewski, T.A., Saigo, P.E. 1995.** The effect of adjuvant tamoxifen on the endometrium in women with breast cancer: An interim analysis of a prospective study. *American Society of Clinical Oncology*, 12: 761-779.
- Balash, J., Miro, F., Burzaco, I. 1995.** The role of luteinizing hormone in human follicle development and oocyte fertility: evidence from in-vitro fertilization in a woman with long-standing hypogonadotrophic hypogonadism and using recombinant human FSH. *Hum. Reprod.*, 10: 1678– 1683.
- Balla, A., Danilovich, N., Yang, Y., Sairam, M. R. 2003.** Dynamics of ovarian development in the FORKO immature mouse: structural and functional implications for ovarian reserve. *Biol. Reprod.*, 69: 1281-1293.
- Barbieri, R.L., Ferracci, A.L., Drosch, J.N. 1993.** Ovarian torsion in a premenopausal woman treated with tamoksifen for breast cancer. *Fertil. Steril.*, 59: 459–460.
- Baserga, R. 1995.** The insulin-like growth factor I receptor: a key to tumor growth? *Cancer Res.*, 55: 249–252.
- Baserga, R. 2000.** The contradictions of the insulin like growth factor 1 receptor. *Oncogene*, 19: 5574-5581.
- Baxter, R.C. 2000.** Insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: interactions with IGFs and intrinsic bioactivities. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 278: 967–796.
- Bernstein,, L., Deapen, D., Cerhan,, J.R. 1999.** Tamoksifen Therapy for breast cancer and endometrial cancer risk, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91: 1654–1662.
- Bicsak, T.A., Tucker, E.M., Cappel, S., Vaughan, J., Rivier, J., Vale, W., Hsueh, A. J. 1986.** Hormonal regulation of granulosa cell inhibin biosynthesis. *Endocrinology*, 119: 2711–2719.
- Bley, M.A., Simon, J.C., Estevez, A.G., deAsua, L.J., Baranao, J.L. 1992.** Effect of follicle-stimulating hormone on insulin-like growth factorI-stimulated rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology*, 131: 1223-1229.
- Blumenfeld, Z., Dann, E., Avivi, R., Epelbaum, R., Rowe, J.M. 2002.** Fertility after treatment for hodgkin’s disease. *Ann Oncol.*, 13: 138-147.

- Blundell, T.L., Humbel, R.E. 1980.** Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors. *Nature*, 287: 781–787.
- Burger, A.M., Leyland-Jones, B., Benerjee, K., Spyropoulos, D.D., Seth, A.K. 2005.** Essential roles of IGFBP-3 and IGFBP-rP1 in breast cancer. *European Journal of Cancer*, 41: 1515–1527.
- Cara, J.F., Rosenfield, R.L., 1988.** Insulin-like growth factor I and insulin potentiate luteinizing hormone-induced androgen synthesis by rat ovarian thecal-interstitial cells. *Endocrinology*, 123: 2.
- Castro-Alamancos, M.A., Torres-Aleman, I. 1993.** Long-term depression of glutamate-induced gamma-aminobutyric acid release in cerebellum by insulin-like growth factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 7386-7390.
- Chakravorty, A., Mahesh, V.B., Mills, T.M. 1991.** Regulation of follicular development by diethylstilboestrol in ovaries of immature rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 92: 307-321.
- Chen, K., Nezu, R., Wasa, M., Sando, K., Kamata ,S., Takagi, Y., Okada, A. 2000.** Insulin like growth factor-1 modulation of intestinal epithelial cell restitution. *J. Parenter Enteral. Nutr.*, 23: 89-92.
- Chin, E., Zhou, J., Bondy, C. 1992.** Anatomical relationships in the patterns of insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein- 1, and IGF-I receptor gene expression in the rat kidney. *Endocrinology*, 130: 3237-3245.
- Choi, Y., Rajkovic, A. 2006.** Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.*, 63: 579-590.
- Clarke, M., Cillins, R., Davies, C. 1998.** Tamoksifen for early breast cancer: An overview of the randomized trials. *Lancet*, 351: 1451–1467.
- Cohen, I., Rosen, D.J.D., Altaras, M. 1994.** Tamoksifen treatment in premenopausal breast cancer patients may be associated with ovarian overstimulation, cystic formations and fibroid over growth. *Br. J. Cancer*, 69: 620–621.
- Cohen, I., Beyth, Y., Tepper, R. 1995.** Adenomyosis in postmenopausal breast cancer patients treated with tamoksifen: a new entity? *Gynecol. Onco.*, 58: 86–91.
- Cohen, I., Figer, A., Tepper, R., Shapira, J., Altaras, M.M., Yigael, D., Beyth, Y. 1999.** Ovarian overstimulation and cystic formation in premenopausal tamoksifen exposure: comparison between tamoksifen-treated and nontreated breast cancer patients. *Gynecol. Oncol.*, 72: 202-207.
- Cole, M.P., Jones, C.T.A., Todd, I.D.H. 1971.** A new antiestrogenic agent in last breast cancer: An early clinical appraisal of ICI46474. *British Journal of Cancer*, 25: 270-275.
- Corley, D., Rowe, J., Curtis, M.T. 1992.** Postmenopausal bleeding from unusual endometrial polyps in women on chronic tamoksifen therapy. *Obstet Gynecol.*, 79: 111–116.
- Crossman, G., 1937.** A modification of Mallory’s connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat. Rec.*, 69: 33-38.
- Cruickshank, J., Grossman, D.I., Peng, R.K., Famula, T.R., Oberbauer, A.M. 2005.** Spatial distribution of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I receptor and apoptotic chondrocytes during growth plate development. *J. Endocrinol.*, 184: 543-553.
- Daughaday, W.H., Hall, K., Raben, M.S. 1972.** Somatomedin: a proposed designation for the sulfation factor. *Nature*, 107: 235:107.

- Daughaday, W.H, Rotwein, P. 1989.** Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocr. Rev.*, 10: 68-91.
- Davis, S.R., Hodgkinson, S.C, Prosser, C.G., Gluckman, P.D., Buonomo, F.C., Collier, R.J. 1992.** Effect of growth hormone treatment on the distribution of insulin-like growth factor-I between plasma and lymph of lactating sheep. *J. Endocrinol.*, 132: 339-344.
- Decensi, A., Fontana, V., Bruno, S., Gustavino, C., Gatteschi, B., Costa, A. 1996.** Effect of tamoxifen on endometrial proliferation. *Journal of Clinical Oncology*, 14: 434-440.
- Dilts, P.V., Hopkins, M.P., Chang, A.E. 1992.** Rapid growth of leiomyoma in patient receiving tamoksifen. *Am. J. Obstet Gynecol.*, 166: 167-168.
- Dimitriadis, G., Parry, B.M., Bevan, S., Dunger, D., Piva, T., Krause, U., Wegener, G., Newsholme, E.A., 1992.** Effects of insulin-like growth factor I on the rates of glucose transport and utilization in rat skeletal muscle in vitro. *Biochem J.*, 285: 269-274.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R., Grenberg, M.E. 1997.** Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase AKT. *Science*, 275: 661-665.
- Duncan, M.D., Korman, L.Y., Bass, B.L. 1994.** Epidermal growth factor primes intestinal epithelial cells for proliferative effect of insulin-like growth factor I. *Dig. Dis. Sci.*, 39: 2197-201.
- Ergin, K., GURSOY, E., BAĞIMOĞLU Koca, Y., BAĞALOĞLU, H., Seyrek, K. 2008.** Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I, transforming growth factor-b2, basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in developing rat ovary. *Cytokine*, 43: 209-214.
- Erickson, G.F., Danforth, D.R. 1995.** Ovarian control of follicle development. *Am. J. Obstet Gynecol.*, 172: 736-747.
- Erickson, G.F. 1993.** Normal regulation of ovarian androgen production. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 11: 307-312.
- Feng, P., Catt, K.J., Knecht, M. 1988.** Transforming growth factor-beta stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology*, 122(1): 181-186.
- Fentiman, I.S., Powles T.J. 1987. Tamoxifen and benign breast problems. *The Lancet*, 2: 1010-1017.
- Fisher, B., Constantino, J., Redmond, C.K. 1994.** Endometrial cancer in tamoksifen-treated breast cancer patients: findings from the national surgical adjuvant breast and bowel project (NSABP). *J. Natl. Cancer Inst.*, 86: 527-537.
- Fisher, B., Constantino, J.P., Wickerman, D.L. 1998.** Tamoksifen for prevention of breast cancer: report of the national surgical adjuvant breast and bowel project P-1 study. *J. Natl. Cancer Inst.*, 90: 1371-1388.
- Fong, S.L., Lugtenburg, P.J., Schipper, I., Themmen, A.P.N., Jong, F.H., Sonneveld, P. 2008.** Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian function in women after chemotherapy and radiotherapy for haematological malignancies. *Hum. Reprod.*, 23: 674-678.
- Frattali. A.L., Pessin, J.E. 1993.** Relationship between alpha subunit ligand occupancy and beta subunit autophosphorylation in insulin/insulin-like growth factor-1 hybrid receptors. *J. Biol. Chem.*, 268: 7393-7400.

- Frigo, D.E., Tang, Y., Beckman, B.S., Scandurro, A.B., Alam, J., Burow, M.E., Mclachlan, J.A. 2004.** Mechanism of AP-1-mediated gene expression by select organochlorines through the p38 MAPK pathway. *Carcinogenesis* 25: 249-261.
- Froesch, E.R., Burgi, H., Ramseier, E.B. 1963.** Antibody-suppressible and non-suppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. An insulin assay with adipose tissue of increased precision and specificity. *J. Clin. Invest.*, 42: 1816-1834.
- Fromowitz, F.B., Viola, M.V., Chao, S., Oravez, S., Mishriki, Y., Finkel, G., Grimson, R., Lundy, J. 1987.** Ras 21 expression in the progression of breast cancer. *Hum. Pathol.*, 18: 1268-1275.
- Fu, Z., Noguchi, T., Kato, H. 2001.** Vitamin A deficiency reduces insulin-like growth factor (IGF)-I gene expression and increases IGF-I receptor and insulin receptor gene expression in tissues of Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *J. Nutr.*, 131: 1189-1194.
- Ganong, W.F. 2002.** The gonads development & Function of the reproductive system: Review of medical physiology, Ed.: Ganong, W.F., New York, United States, pp: 391-427.
- Garner, L.P., Hiatt, J.L. 2001.** Female reproductive system: Color Textbook of Histology, Ed.: Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, M.D., pp: 405-430.
- Gilman, A.G. 1996.** Estrogens, progestins and the female reproductive track: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, Ed.: Brunton, L.L, New York, USA, pp: 1275-1291.
- Giudice, L.C. 1992.** Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. *Endocr. Rev.*, 13: 641-669.
- Giuseppe, L., Attilio, G., Edoardo, D.N., Loredana, G., Cristina, L., Vincenzo, L. 2007.** Ovarian function after cancer treatment in young women affected Hodgkin disease. *Hematology*, 12: 141-147.
- Girgin, A., Alabay, B., Liman, N., Özfiliz, N., Gülmez, N., Özcan, Z., Yörük, M., Erdost, H., Aslan, Ş., Ergün, L., Zık, B. 2010.** Dişi Genital Sistemi: Veteriner Özel Histoloji, Editör: Özer, A, Ankara, Türkiye, pp: 219-231.
- Greenlee, R.T., Murray, T., Bolden, S., Wingo, P.A. 2000.** Cancer statistics 2000. *CA Cancer Journal for Clinicals*, 50(1): 7-33.
- Grant, M., Jerdan, J., Merimee, T.J. 1987.** Insulin-like growth factor-I modulates endothelial cell chemotaxis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 65: 370-371.
- Grant, M.B., Guay, C., Marsh, R. 1990.** Insulin-like growth factor I stimulates proliferation, migration, and plasminogen activator release by human retinal pigment epithelial cells. *Current Eye Res.*, 9: 323-335.
- Goldrisc, A., Gelber, R.D., Castiglione, M. 1991.** For the international breast cancer study group. Adjuvant therapy of breast cancer. *European Journal of Cancer*, 27: 399-402.
- Guthrie, H.D., Garrett, W.M., Cooper, B.S. 1998.** Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biol. Reprod.*, 58(2): 390-396.
- Han, V.K.M., Hill, D.J. 1992.** The involvement of insulin-like growth factors in embryonic and fetal development: Structure and Biological Functions, Oxford, New York, pp: 178-220.

- Han, K.H., Kim, M.K., Kim, H.S., Chung, H.H., Song, Y.S. 2013.** Protective effect of progesterone during pregnancy against ovarian cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 18: 113-22.
- Hernandez-Sanchez, C., Werner, H., Roberts, C.T., Woo, E.J, Hum, D.W., Rosenthal, S.M., 1997.** Differential regulation of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor gene expression by IGF-I and basic fibroblastic growth factor. *J. Biol. Chem.*, 272: 4663–4670.
- Hsueh, A.J, Billig, H., Tsafiriri, A. 1994.** Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocr. Rev.*, 15: 707–724.
- Hill, D.J., Logan, A., McGarry, M., deSousa, D. 1992.** Control of protein and matrix-molecule synthesis in isolated ovine fetal growth-plate chondrocytes by the interactions of basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factors-I and -II, insulin and transforming growth factor-beta 1. *J. Endocrinol.* 133: 363-373.
- Hirshfield, A.N., DeSanti, A.M. 1995.** Patterns of ovarian cell proliferation in rats during the embryonic period and the first three weeks postpartum. *Biol. Reprod.*, 53: 1208-1221.
- Hirshfield, A.N. 1997.** Overview of ovarian follicular development: Considerations for the toxicologist. *Environ. Mol. Mutagen*, 29: 10-15.
- Hu, C.L., Cowan, R.G., Harman, R.M., Quirk, S.M. 2004.** Cell cycle progression and activation of akt kinase are required for insulin-like growth factor I-mediated suppression of apoptosis in granulosa cells. *Mol. Endocrinol.*, 18(2): 326-338.
- Hyttel, P., Sinowatz, F., Vejlsted, M., Betteridge, K. 2010.** Gametogenesis: Essentials of Domestic Animal Embryology, Ed.:Betteridge, K., London, England, pp: 32-47.
- Izadyar, F., Zeinstra, E.B., Bevers, M.M., Bevers, M.M. 1998.** Follicle stimulating hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance developmental competence of in vitro matured bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, 51: 339–345.
- Jennische, E., Isgaard, J., Isaksson, O.G.P. 1992.** Local expression of insulin-like growth factors during tissue growth and regeneration. In: Schofield PN (eds) *The Insulin-like Growth Factors. Structure and Biological Functions.* Oxford, New York, pp 221-239.
- Jensen, E.,V., Block, G.E., Smith, S., Kyser, K., Desombre, E.R. 1971.** Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Journal of The National Cancer Institute Monographs*, 34: 55-70.
- Jones, J.I., Clemmons, D.R. 1995.** Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr. Rev.*, 16: 33–34.
- Jordan, V.C. 1978.** 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.
- Jordan, V.C., Dix, C.J., Allen, K.E. 1979.** The effectiveness of long term treatment in laboratory model for adjuvant hormone therapy of breast cancer. *Adjuvant Therapy of Cancer*, 2: 19-24.
- Jordan, V.C. 1983.** 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.

- Jordan, V.C., O'Malley, B.W. 2007.** Selective Estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 25: 5815-5824.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2003.** The female reproductive system: Junqueira's Basic Histology Text And Atlas, Ed.: McGraw-Hill, New York, USA, pp: 449-478.
- Kaiser, G.G., Sinowatz, F., Palma, G.A. 2001.** Effects of growth hormone on female reproductive organs. *Anat. Histol. Embryol.*, 30: 265–271.
- Kang, J., Baxi, L., Heller, D. 1996.** Tamoksifen induced growth of leiomyomas a case report. *J. Reprod Med.*, 41: 119–120.
- Kedar, R.P., Bourne, T.H., Powles, T. J. 1994.** Effects of tamoksifen on uterus and ovaries of postmenopausal women in a randomized breast cancer prevention trial. *Lancet*, 343: 1318–1321.
- Kennel, P., Pallen, C., Barale-Thomas, E., Espuna, G., Bars, R.2003.** Tamoksifen: 28-day oral toxicity study in the rat based on enhanced OECD test guideline 407 to detect endocrine effects. *Arch. Toxicol.*, 77: 487-99.
- Kezele, P., Nilsson, E., Skinner, M.K. 2002.** Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Front Biosci.*, 7: 1990-1996.
- Kezele, P., Skinner, M.K. 2003.** Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*, 144: 3329-3337.
- Kierszenbaum, A.L. 2006.** Folikül gelişimi ve Menstrual Döngü: Histoloji ve hücre biyolojisi patolojiye giriş, Çeviri Ed.: Demir, R., Ankara, Türkiye, pp: 565-584.
- Killackey, M., Hakes, T.B., Pierce, V.K. 1985.** Endometrial adenocarcinoma in breast cancer patients receiving antiestrogens. *Cancer Treat Rep.*, 69: 237–238.
- Klotz D.M., Hewitt S.C., Korach K.S., Diaugustine R.P. 2000.** Activation of a uterine insulin-like growth factor I signaling pathway by clinical and environmental estrogens: requirement of estrogen receptor- α . *Endocrinology*, 141(9): 3430-3439.
- Krause, W., Holland-Moritz, H., Schramm, P. 1992.** Treatment of idiopathic oligozoospermia with tamoksifen – a randomized controlled study. *Int. J. Androl.*, 15: 14–18.
- Kritsch, K.R. 2000.** Insulin-like growth factor-I system by nutrition and dexamethasone. *University of Wisconsin-Madison 2*: 40.
- Koshino, T., Takaishi, T., Morita, Y., Ito, K. 1993** Modulation of human basophil histamine release by insulin-like growth factors. *J. Immunol.*, 150: 1503-1508.
- Kwintkiewicz, J., Giudice, L.C. 2009.** The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. *Semin. Reprod. Med.*, 27(1): 43-51.
- Lahti, E., Vuopala, S., Kaappila, A. 1994.** Maturation of vaginal and endometrial epithelium in postmenopausal breast cancer patients receiving long-term tamoksifen. *Gynecol. Oncol.*, 55: 410–414.
- Laron, Z., Pertzalan, A., Karp, M. 1971.** Administration of growth hormone to patients with familial dwarfism with high plasma immunoreactive growth hormone. Measurement of sulfation factor, metabolic and linear growth responses. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 33: 332–342.
- Laron, Z. 1999.** Somatomedin-1 (recombinant insulin-like growth factor-I). Clinical pharmacology and potential treatment of endocrine and metabolic disorders. *Biodrugs*, 11: 55– 70.

- Laron, Z. 2001.** Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone *Molecular Pathology*, 54: 311-316.
- Lee, W.S., Otsuka, F., Moore, R.K., Shimasaki, S. 2001.** Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biol. Reprod.*, 65: 994-999.
- Lemer, L.I., Holthaus, F.J., Thompson, C.R. 1958.** A nonsteroidal estrogen antagonist 1-p-2 diethylaminoethoxyphenyl -1-phenyl 2-p- methoxy phenyethanol. *Endocrinology*, 63: 215-318.
- Leo, L., Lanza, A., Re, A. 1994.** Leiomyomas in patients receiving tamoksifen. *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.*, 21: 94-98.
- Leon, J.S., Chamberlain, C.S. 1998.** Influence of cortisol on insulin- and insulin-like growth factor 1 (IGF-1)-induced steroid production and on IGF-1 receptors in cultured bovine granulosa cells and thecal cells. *Endocrine*, 9(2): 153-161.
- LeRoith, D., Werner, H., Beitner-Johnson, D., Roberts, C.T.J. 1995.** Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr. Rev.*, 16: 143-163.
- Li, D., Kubo, T., Kim, H., Shimasaki, S., Erickson, G.F. 1998.** Endogenous insulin-like growth factor-I is obligatory for stimulation of rat inhibin a-subunit expression by follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.*, 58: 219-225.
- Lippman, M.E., Bolan, G. 1975.** Oestrogen responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Nature*, 256: 592-593.
- Liu, J.H., Baker, J., Perkins, A., Robertson, E., Efstratiadis, A. 1993.** Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor (Igf-1) and Type I IGF receptor (IGF1R). *Cell*, 75: 59-72.
- Lopaczynski, W. 1999.** Different regulation of signaling pathways for insulin and insulin-like growth factor I. *Acta. Biochim. Pol*, 46: 51-60.
- Long, G.G., Cohen, I.R., Gries, C.L., Young, J.K., Francis, P.C. Capen, C.C. 2001.** Proliferative lesions of ovarian granulosa cells and reversible hormonal changes induced in rats by a selective estrogen receptor modulator. *Toxicol. Pathol.*, 29: 719-26.
- Love, R.R., Barden, H.S., Mazess, R.B., Epstein, S., Chappell, R.J. 1994.** Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women after 5 years. *Archives of Internal Medicine*, 154: 2585-2588.
- Luciano, A.M., Modina, S., Gandolfi, F., Lauria, A., Armstrong, D.T. 2000.** Effect of cell-to-cell contact on in vitro deoxyribonucleic acid synthesis and apoptosis responses of bovine granulosa cells to insulin-like growth factor-I and epidermal growth factor. *Biol. Reprod.*, 63: 1580-1585.
- Luigi, L.D., Conti, F.G., Casini, A. 1997.** Growth hormone and insulin-like growth factor I responses to moderate submaximal acute physical exercise in man: effects of octreotide, a somatostatin analogue, administration. *J. Sports Med.*, 18: 257-263.
- Lowe, W.L. 1991.** Biologic actions of the insulin-like growth factors: Molecular and Cellular Aspects, Ed.: CRC Press, Florida, USA, pp: 49-85.
- Madisen, L., Zwingman, T.A., Sunkin, S.M., Oh, W.S., Zariwala, H.A., Gu, H., Lydia, L.N, Palmiter, R.D., Hawrylycz, J.M., Jones, R.A., Lein, S.E., Zeng, H.A. 2010.** A robust and high-throughput cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.*, 13(1): 133-140.

- Magoffin, D.A., Weitsman S.R. 1994.** Insulin-like growth factor-I regulation of luteinizing hormone (LH) receptor Messenger ribonucleic acid expression and LH-stimulated signal transduction in rat ovarian theca-interstitial cells. *Biol. Reprod.*, 51: 766–775.
- Matsuda, A., Higuchi, K., Karasawa, M., Yoneyama, S., Deguchi, J., Miyamoto, M. 1997.** Fourteen-day oral combination dose toxicity study of CGS 16949 A (aromatase inhibitor) with 5-fluorouracil or tamoxifen in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 22: 1–24.
- Mazerbourg, S., Bondy, C.A., Zhou, J., Monget, P. 2003.** The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? a comparative species study. *Reprod. Domest. Anim.*, 38: 247–258.
- McClain, D.A., Maegawa, H., Thies, R.S., Olefsky, J.M. 1990.** Dissection of the growth vs. metabolic effects of insulin and insulin-like growth factor-I in transfected cells expressing kinase-defective human insulin receptors. *J. Biol. Chem.*, 265: 1678-1682.
- Mcgee, E.A., Hsueh, A.J.W. 2000.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr. Rev.*, 21(2): 200-214.
- Meirow, D., Nugent, D. 2001.** The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum. Reprod. Update*, 7: 535–543.
- Metindir, J., Aslan, S., Bilir, G. 2005.** Ovarian cyst formation in patients using tamoksifen for breast cancer. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 35: 607-611.
- Monget, P., Fabre, S., Mulsant, P., Lecerf, F., Elsen, J.M., Mazerbourg, S. 2002.** Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 23: 139–154.
- Monniaux, D., Pisselet, C. 1992.** Control of proliferation and differentiation of ovine granulosa cells by insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone in vitro. *Biol. Reprod.*, 46: 109–119.
- Minniti, C.P., Kohn, E.C., Grubb, J.H., Sly, W.S., Oh, Y., Muller, H.L., Rosenfeld, R.G., Helman, L.J. 1992** The insulin-like growth factor II (IGF-II)/mannose 6-phosphate receptor mediates IGF-II-induced motility in human rhabdomyosarcoma cells. *J. Biol. Chem.*, 267: 9000-9004.
- Murphy, L.J., Murphy, L.C., Friesen, H.G. 1987** Estrogen induces insulin- like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol. Endocrinol.*, 1: 445-450.
- Nasu, K., Arima, K., Yoshimatsu, J. 1997.** Adenomyomatous polyp of the uterus in a patient receiving tamoksifen. *Jpn. J. Clin. Oncol.*, 27: 350–352.
- Nasu, K., Ueda, T., Kiyonaga, Y. 1999.** Torsion of a functional ovarian cyst in a premenopausal patient receiving tamoksifen. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 48: 200–202.
- Nathan, L., Chaudhuri, G. 1998.** Antioxidant and prooxidant actions of estrogens: potential physiological and clinical implications. *Semin. Reprod. Endocrinol.*, 16: 309–314.
- Nelson, J.F., Gosden, R.G., Felicio, L.S. 1985.** Effect of dietary restriction on estrus cyclicity and follicular reserve in aging C57BL/6J mice. *Biol. Reprod.*, 32: 515-522.
- Nicolini, A., Anselmi, L., Michelassi, C. 1997.** Prolonged survival by “early” salvage treatment of breast cancer patients: A retrospective 6-year study. *Br. J. Cancer*, 76: 1106–1111.
- Oktay, K., Buyuk, E., Davis, O., Yermakova, I., Veeck, L., Rosenwaks, Z. 2003.** Fertility preservation in breast cancer patients: ivf and embryo

cryopreservation after ovarian stimulation with tamoksifen. *Hum. Reprod.*, 18: 90–95.

Osborne, C.K., Boldt, D.H., Clark, G.H., Trent, J.M. 1983. Effects of tamoxifen on human breast cancer cell cycle kinetics: accumulation of cells in early G1 phase. *Cancer*, 43: 3583-3585.

Özer, A., 2010. Dişi genital sitem: Veteriner Özel Histoloji, Ed.: Özer, A., Bursa, Türkiye, pp: 219-221.

Penhoat, A., Jaillard, C., Saez, J.M. 1989. Synergistic effects of corticotropin and insulin-like growth factor I on corticotropin receptors and corticotropin responsiveness in cultured bovine adrenocortical cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 165: 355-359.

Pepling, M.E. 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*, 44: 622-632.

Pepling, M.E., Spradling, A.C. 2001. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev. Biol.*, 234: 339-351.

Perks, C.M., Peters, A.R., Wathes, D.C. 1999. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.*, 116(1): 157-165.

Peterson, W.F., Novak, E.R. 1956. Endometrial polyps. *Obstet. Gynecol.*, 8: 40–49.

Poretsky, L., Cataldo, N.A., Rosenwaks, Z., Giudice, L.C. 1999. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr. Rev.*, 20: 535-582.

Powles, T.J., Tillyer, C.R., Jones, A.L. 1990. Prevention of breast cancer with tamoxifen-an update on the royal marsden hospital pilot programme. *European Journal of Cancer*, 26: 680-684.

Qu, J., Godin, P.A., Nisolle, M., Donnez, J. 2000. Expression of receptors for insulin-like growth factor-I and transforming growth factor- β in human follicles. *Mol. Hum. Reprod.*, 6(2): 137-145.

Quirk, S.M., Cowan, R.G., Harman, R.M., Hu, C.L., Porter, D.A. 2004. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J. Anim. Sci.*, 82: 40–52.

Riggs, B.L., Hartmann, L.C. 2003. Selective estrogen-receptor modulators-mechanisms of action and application to clinical practice. *N. Engl. J. Med.*, 348: 618-629.

Rinderknecht, E., Humbel, R.E. 1976. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 73: 2365–2369.

Roberts, J.C.T., Lasky, S.R., Lowe, J.W.L., Seaman, W.T., LeRoith, D. 1987. Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acids: differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol. Endocrinol.*, 1: 243-248.

Rosenthal, S.M., Brown, E.J., Brunetti, A., Goldfine, I.D. 1991. Fibroblast growth factor inhibits insulin-like growth II (IGF-II) gene expression and increases IGF-I receptor abundance in BC3H-1 muscle cells. *Mol. Endocrinol.*, 5: 678–684.

- Roshangar, L., Rad, J.S., Afsordeh, K. 2010.** Maternal tamoksifen treatment alters oocyte differentiation in the neonatal mice: Inhibition of oocyte development and decreased folliculogenesis. *J. Obstet. Gynaecol. Res.*, 36: 224-231.
- Ross, H.M., Kaye, G.L., Pawlina, W. 2003.** Female reproductive system: Histology: A Text and Atlas, Ed.: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp: 831-877.
- Rubini, M., Werner, H., Gandini, E., Roberts, C.T.J., LeRoith, D., Baserga, R. 1994.** Platelet-derived growth factor increases the activity of the promoter of the insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor gene. *Exp. Cell Res.*, 211: 374-379.
- Rzeczynska, I.J., Piotrowski, P.C., Wong, D.H., Cress, A.B., Villanueva, J., Duleba, A.J. 2009.** Role of Isoprenylation in simvastatin-induced inhibition of ovarian theca-interstitial growth in the rat. *Biology Of Reproduction*, 81: 850-855.
- Saarto, T., Blomqvist, C., Ehnholm, C. 1996.** 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.
- Sadler, T.W. 2012.** Genital system: Langman's medical embryology, Ed.: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, pp: 243-257.
- Saetrum, O.O., Wang, P.H. 2005.** IGF-I is a matter of heart. *Growth Hormone-IGF Research*. 15: 89-94.
- Salmon, W.D.J., Daughaday, W. 1957.** A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. *J. Lab. Clin. Med.*, 49: 825-36.
- Sawka, C.A., Pritchard, K.I., Paterson, A.H. 1986.** Role and mechanism of action of tamoksifen in premenopausal women with metastatic breast carcinoma. *Cancer Res.*, 46: 3152-3156.
- Sepp-Lorenzino, L. 1998.** Structure and function of the insulin-like growth factor I receptor. *Breast Cancer Res. Treat.* 47: 235-253.
- Seymen, C.M. 2010.** Ehrlich Ascites Tümör Olgularında Antioksidan Uygulamasını Testis Dokusuna Etkisi. *Yüksek Lisans Tezi*, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.
- Shang, Y., Brown, M. 2002.** Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science*, 29:, 2465-2468.
- Sharma, K., Mehra, R.D. 2008.** Long-term administration of estrogen or tamoksifen to ovariectomized rats affords neuroprotection to hippocampal neurons by modulating the expression of Bcl-2 and Bax. *Brain Research*, 1204: 1-15.
- Sherman, B.M., Chapler, F.K., Crickard, K. 1979.** Endocrine consequences of continuous antiestrogen therapy with tamoksifen in premenopausal women. *J. Clin. Invest.*, 64: 398-404.
- Shoji, S, Ertl, R.F, Linder, J., Koizumi, S., Duckworth, W.C., Rennard, S.I. 1990.** Bronchial epithelial cells respond to insulin and insulin-like growth factor-I as a chemoattractant. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2: 553-557.
- Shushan, A., Peretz, T., Uziely, B. 1996.** Ovarian cysts in premenopausal and postmenopausal tamoksifen-treated women with breast cancer. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 174: 141-144.
- Silva, J.R.V., Figueiredo, J.R., VandenHurk, R. 2009.** Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, 71: 1193-1208.

- Skinner, M.K. 2005.** Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum. Reprod. Update.*, 11(5): 461-471.
- Sunderland, M.C., Osborne, C.K. 1991.** Tamoxifen in premenopausal patients with metastatic breast cancer: A review. *Journal of Clinical Oncology*, 9: 1283-1297.
- Surani, M.A. 2001.** Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*, 414: 122-128.
- Sutherland, R.L., Reddel, R.R., Green, M.D. 1983.** 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.
- Socie, G., Salooja, N., Cohen, A., Rovelli, A., Carreras, E., Locasciulli, A. 2003.** Nonmalignant late effects after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 101: 3373-3385.
- Souza, U.J. 2004.** Effect of tamoksifen on spermatogenesis and tubular morphology in rats. *Asian J. Androl.*, 6: 223-236.
- Spicer, L.J. 2004.** Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol. Reprod.*, 70: 1223-1230.
- Stracke, M.L., Engel, J.D., Wilson, L.W., Rechler, M.M., Liotta, L.A., Schiffmann, E. 1989.** The type I insulin-like growth factor receptor is a motility receptor in human melanoma cells. *J. Biol. Chem.*, 264: 21544-21549.
- Steele-Perkins, G., Turner, J., Edman, J.C., Hari, J., Pierce, S.B., Stover, C. 1988.** Expression and characterization of a functional human insulin-like growth factor I receptor. *J. Biol. Chem.*, 263: 11486-11492.
- Stewart, C.E., Rotwein, P. 1996.** Growth, differentiation, and survival: multiple physiological functions for insulin-like growth factors. *Physiol. Rev.*, 76: 1005-1026.
- Tanyolaç, A. 1999.** Dişi genital sistem: Özel Histoloji, Ed.: Tanyolaç, A., Ankara, Türkiye, pp: 144-157.
- Tapson, V.F., Boni, Schnetzler, M., Pilch, P.F., Center, D.M., Berman, J.S. 1988.** Structural and functional characterization of the human T lymphocyte receptor for insulin-like growth factor I in vitro. *J. Clin. Invest.*, 82: 950-957.
- Terada, S., Uchide, K., Suzuki, N. 1993.** A follicular cyst during tamoksifen therapy in a premenopausal breast cancer woman. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 35: 62-64.
- Thissen, J. P., Ketelslegers, J.M., Underwood, L.E. 1994.** Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev.*, 15: 80-163.
- Tilly, J.L., Kowalski, K.I., Schomberg, D.W., Hsueh, A.J. 1992.** Apoptosis in atretic ovarian follicles is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology*, 131: 1670-1676.
- Timsit, J., Savino, W., Safieh, B., Chanson, P., Gagnerault, M.C., Bach, J.F., Dardenne, M. 1992.** Growth hormone and insulin-like growth factor-I stimulate hormonal function and proliferation of thymic epithelial cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 75: 183-188.
- Ting, A.Y., Kimler, B.F., Fabian, C.J., Petroff, B.K. 2008.** Tamoksifen prevents premalignant changes of breast, but not ovarian, cancer in rats at high risk for both diseases. *Cancer Prev. Res.*, 1: 546-553.

- Ting, A.Y., Petroff, B.K., 2010.** 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.
- Toda, K., Miyaura, C., Okada, T., Shizuta, Y., 2002.** Dietary bisphenol A prevents ovarian degeneration and bone loss in female mice lacking the aromatase gene (Cyp19). *Eur. J. Biochem.* 269: 2214–2222.
- Trichopoulos, D., Hsieh, C., MacMahon, B., 1983.** Age at first birth and breast cancer risk. *International Journal of Cancer*, 31: 701-704.
- Trippel, S.B., Corvol, M.T., Dumontier, M.F., Rappaport, R., Hung, H.H., Mankin, H.J., 1989.** Effect of somatomedin-C/insulin-like growth factor I and growth hormone on cultured growth plate and articular chondrocytes. *Pediatr. Res.*, 25: 76-82.
- Tsujioka, S., Ban, Y., Wise, L.D., Tsuchiya, T., Sato, T., Matsue, K., Ikeda, T., Sasaki, M., Nishikibe, M., 2009.** 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. *J. Toxicol.*, 34: 43- 51.
- Tucker, M.J., Adam, H.K., Patterson, H.S., Laurence, D.R., McLean, A.E.H., Weatherall, M., 1984.** Tamoxifen safety testing of new drugs: Laboratory predictions and clinical performance, Ed.: Harcourt, Brace, Jovanovich, New York, pp: 125–161.
- Ulug, U., Turan, E., Tosun, S.B., Erden, H.F., Bahceci, M., 2007.** Comparison of preovulatory follicular concentrations of epidermal growth factor, insulin-like growth factor-I, and inhibins A and B in women undergoing assisted conception treatment with gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists and GnRH antagonists. *Fertil. Steril.*, 87: 995–998.
- Uzumcu, M., Kuhn, P.E., Marano, J.E., Armenti, A.E., Passantino, L., 2006.** Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *J. Endocrinol.*, 191: 549-558.
- Uzumcu, M., Zachow, R., 2007.** Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: Consequences within the ovary and on female reproductive function. *Reprod. Toxicol.*, 23: 337-352.
- Wandji, S.A., Wood, T.L., Crawford, J., Levison, S.W., Hammond, J.M., 1998.** Expression of mouse ovarian insulin growth factor system components during follicular development and atresia. *Endocrinology* 139: 5205–5214.
- Ward, H.W.C., 1973.** Antiestrogen therapy for breast cancer- A trial of tamoxifen at two dose levels. *British Medical Journal*, 1: 13-14.
- Werner, H., Shen-Orr, Z., Stannard, B., Burguera, B., Roberts, C.T.J., Leroith, D., 1990.** Experimental diabetes increases insulinlike growth factor I and II receptor concentration and gene expression in kidney. *Diabetes*, 39: 1490-1497.
- Wesley, A.C., Melnick, H., 1987.** Tamoxifen in clomiphene-resistant hypothalamic anovulation. *International Journal of Fertility*, 32: 226-228.
- Wolf, D.M., Jordan, V.C., 1992.** Gynecologic complications associated with long-term adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer. *Gynecol. Oncol.*, 45: 118–128.
- Wyld, D.K., Chester, J.D., Perren, T.J., 1998.** Endocrine aspects of the clinical management of breast cancer-current issues. *Endocrine- Related Cancer*, 5(2) : 97-110.

- Yamasaki, H., Prager, D., Gebremedhin, S., Moise, L., Melmed, S. 1991.** Binding and action of insulin-like growth factor I in pituitary tumor cells. *Endocrinology*, 128: 857-862.
- Yang, Y., Hoeflich, A., Butenandt, O., Kiess, W., 1996,** Opposite regulation of IGF-I and IGF-I receptor mRNA and concomitant changes of GH receptor and IGF-II/M6P receptor mRNA in human IM-9 lymphoblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 1310: 317–324.
- Yılmaz, B. 1999.** Hormonlar ve Üreme Fizyolojisi, Ankara Üniversitesi Veteriner Fak., Ankara, Türkiye, 90 pp.
- Zama, A.M., Uzumcu, M. 2010.** Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: An ovarian perspective. *Front Neuroendocrinol.*, 31: 420-439.
- Zhang, H., McElrath, T., Tong, W., Pollard, J.W. 2005.** The molecular basis of tamoxifen induction of mouse uterine epithelial cell proliferation. *Journal of Endocrinology*, 184: 129–140.
- Zhou, J., Chin, E., Bondy, C. 1991.** Cellular Pattern of insulin-like factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology*, 129: 3281-3288.
- Zık, B., Peker, S., Kurnaz, H. 2012.** Tamoksifen'in Ovaryum Follikülleri Ve Notch Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi. TÜBİTAK-TOVAG -112 O 574 nolu Proje Kesin Raporu, Bursa.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Ender Deniz Asmaz
Doğum Yeri ve Tarihi :ÇANKAYA/11.09.1089
Yabancı Dil :İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum veYıl)
Lise : 50. Yıl Sabancı İnsa Lisesi /2007
Lisans : Uludağ Üniversitesi/Biyoloji Anabilim Dalı/2015
Yüksek Lisans : Uludağ Üniversitesi/Biyoloji Anabilim Dalı/2017

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl :
İletişim (e-posta) : dnz.smz@gmail.com