

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

Doksorubisin ile İndüklenmiş Ovaryan Toksikitede Visnagin Koruyucu Etkisi*

Aysun ÖZBAY, Berrin AVCI

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bursa.

ÖZET

Doksorubisine bağlı ovaryan toksisitede ovaryan rezervi korumak amacıyla farklı tedavi yaklaşımları uygulanmaktadır. Visnagin doksorubisine bağlı kardiyotoksisitede tedavi edici etkinliği gösterilmiş organik bir kimyasaldır. Bununla birlikte doksorubisine bağlı ovaryan toksisitede visnagin etkinliği bilinmemektedir. Doksorubisine bağlı ovaryan toksisitenin oluşturulduğu sıçanlarda visnagin tedavi edici etkinliğini değerlendiren bu çalışmada; doksorubisinin ovaryan rezervi belirleyen primordiyal follikül sayısını, bunun yanında preantral ve antral follikül sayısını azalttığı saptandı. İntraperitoneal 30 mg/kg visnagin tedavisinin primordiyal follikül rezervini, gelişmekte olan ve olgun follikül sayılarını koruduğu, atretik follikül sayısını azalttığı görüldü. Doksorubisin ile indüklenmiş ovaryan toksisitenin visnagin tedavisi ile azaltıldığı ve ovaryan follikül rezervini koruduğu sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Doksorubisin. Visnagin. Ovaryan toksisite. Sıçan.

Protective Effect of Visnagin on Doxorubicin-Induced Ovarian Toxicity

ABSTRACT

Different treatment approaches are used to for preserve ovarian reserve in ovarian toxicity due to doxorubicin. Visnagin is an organic chemical that shows therapeutic activity on doxorubicin-induced cardiotoxicity. However, the efficacy of visnagin on ovarian toxicity due to doxorubicin is unknown. In this study evaluating the therapeutic effect of visnagin in rats with ovarian toxicity induced by doxorubicin, it was determined that doxorubicin decreased the number of primordial follicles that determined ovarian reserve, as well as the number of preantral and antral follicles. Intraperitoneal administration of 30 mg/kg of visnagin treatment decreased the number of atretic follicles and preserved primordial, developing and mature follicle counts. As a result, it was concluded that ovarian toxicity induced by doxorubicin was reduced with visnagin treatment and the visnagin treatment preserved of ovarian follicle reserve.

Key Words: Doxorubicin. Visnagin. Ovarian toxicity. Rat.

Doksorubisin, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde kullanılan antrasiklin türevi bir kemoterapötik ajandır. Aktif olarak bölünen hücrelerde topoizomerez-II enziminin inhibisyonuna neden olur ve DNA hasarını indükleyerek antikanser tedavide etkinliğini gösterir¹. Doksorubisin proteazom aracılı transport vasıtasıyla hücrelere penetre olur ve nukleus içerisine girer. Çok halkalı yapısından dolayı DNA'ya interkale olur ve

transkripsiyon ile hücre replikasyonuna müdahale eder. Doksorubisin topoizomerez-II'nin inhibisyonu nedeniyle demir aracılı reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olup, DNA hasarına yol açar. Ayrıca p53 ve pro-apoptotik Bax'ın aktivasyonuna yol açarak hücrelerin apoptoza girmesine neden olur².

Doksorubisinin ovaryan dokuda oositlerin apoptozunu indüklediği gösterilmekle birlikte, oosit ve follikül hücrelerinin ölümü üzerindeki rolü tam olarak anlaşılmış değildir. İn vitro olarak doksorubisine maruz kalan oositlerin doksorubisin kaynaklı kromozom kondensasyonu, değişmiş gen ekspresyonu ve oksidatif stres sergilediği mevcut çalışmalarda gösterilmiştir³. Doksorubisinin fare metafaz II oositlerinde zararlı etkisi mevcut olup, germinal vezikül aşamasında henüz matürasyonunu tamamlamamış oositlerde mitokondriyal aktivasyon, endoplazmik retikulum stresinin uyarılması ve hücre içi kalsiyum oranının artması ile apoptozu indüklediği rapor edilmiştir³.

* 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi'nde (10-13 Mayıs 2018, Antalya) sözlü bildiri olarak sunulmuştur.

Geliş Tarihi: 18 Temmuz 2018

Kabul Tarihi: 13 Eylül 2018

Doktora Öğr. Aysun ÖZBAY
BUÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji
Anabilim Dalı 16059 Görükle/Bursa
Tel.: 0531 212 83 82
E-posta: ozbaysun@gmail.com

Visnagin ana kaynağı furanokromon olan bir organik kimyasaldır. Mitokondriyal malat dehidrogenaz modülasyonu ile doksorubisine bağlı kardiyomiyopatide vazodilatasyon, kan basıncını düşürme ve hücre içine kalsiyum girişini engelleme yoluyla koruyucu etki gösterdiği rapor edilmiştir⁴. Visnagin hücre içerisine kalsiyum akışını inhibe ederek kan basıncını düşürdüğü, kan damarlarında kontraksiyonu bloke ettiği bildirilmiştir⁵. Renal epitel hücrelerinde oksalat kaynaklı hücre hasarını da önlediği rapor edilmiştir⁶.

Bu çalışmada, gelişmekte olan ovaryan folliküllerde granüloza hücrelerinde ve stromal hücrelerde apoptotik aktivasyonu artırarak hasar oluşturan ve follikül kaybına neden olan doksorubisin toksisitesinde visnagin tedavisi edici etki gösterdiği hipotezinden yola çıkılarak, doksorubisinin ovaryum üzerindeki toksisitesini oluşturmak ve oluşan ovaryan doku hasarını azaltmada visnagin tedavisinin etkinliğini morfolojik ve immünohistokimyasal düzeyde değerlendirmek amaçlandı.

Gereç ve Yöntem

Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Merkezi'nden 6 aylık (170-250 gr) Wistar Albino cinsi dişi sıçanlar temin edildi. Yetişkin dişi sıçanlar 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda 20 ± 1 °C'de tutuldu ve *ad libitum* olarak yem ve suyla beslendi. Çalışma Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 10.08.2016 tarihli ve Karar No:3 sayılı onay ile gerçekleştirildi. Tüm sıçanlara ilaç uygulaması ve ovaryum diseksiyonundan önce vaginal smear uygulanarak ovaryan sikluslarının periyodu belirlendi. Standardizasyonu sağlamak amacıyla enjeksiyon ve hayvan diseksiyonu işlemleri sıçanlar östrus periyodunda iken uygulandı. İlaç dozlarını belirlemek için sıçanların vücut ağırlıklarına bakıldı. Çalışma grupları:

- Grup I (n=6); i.p serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu, 7 gün
- Grup II (n=6); i.p doksorubisin enjeksiyonu (3mg/kg/gün, 0,008mM total doz), 7 gün
- Grup III (n=6); i.p visnagin enjeksiyonu (30 mg/kg/gün, 0,02 mM total doz), 7 gün
- Grup IV(n=6); i.p doksorubisin (3 mg/kg/gün) + 2 saat içerisinde i.p visnagin enjeksiyonu (30 mg/kg/gün), 7 gün olacak şekilde düzenlendi.

Sıçanlara 7 gün ilaç uygulaması sonrasında ovaryan sikluslarının östrus periyodunda %4'lük paraformaldehit (fosfat tamponu ile tamponlanan pH=7.2) ile perfüzyon fiksasyonu uygulandı. Ovaryan diseksiyon sonrasında, dokulara 48 saat aynı fiksatif içerisinde (+4 °C) immersiyon fiksasyon uygulandı. Fiksasyon

sonrasında ovaryum dokuları morfolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme için doku takibine alındı.

Kimyasalların Temini

Dokсорubisin tedavisi için Saba ilaç firmasına, ait piyasa adı Adrimisin olan preparat kullanıldı. Visnagin (SIGMA-ALDRICH) ve diğer tüm kimyasallar Sigma-Aldrich'den temin edildi. Dokсорubisin ve Visnagin solüsyonları SF (sırasıyla 10 mg/kg -5 ml SF ve 21 ug/ml SF) içinde çözülerek hazırlandı.

Morfolojik Değerlendirme

Dokulara uygulanan doku takibinin ardından, oluşturulan parafin bloklardan mikrotom yardımıyla 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Sağ ve sol over doku bloklarının herbirinden rastgele örnekleme yöntemiyle seçilen 5 farklı seviyeden 2 seri kesit olmak üzere toplam 10 kesit alındı. Seri kesitlerin biri morfolojik değerlendirme için H&E ile, diğeri apoptotik aktivasyonu değerlendirmek için TUNEL yöntemi ile boyandı. Farklı gelişim aşamalarındaki ovaryan folliküller sınıflandırıldı, sağ ve sol ovaryum dokularında ayrı ayrı sayıldı. Follikül sayımı Olympus BX50 fotomikroskop (20x objektif) ile gerçekleştirildi. Ovaryan folliküllerin sınıflandırması aşağıdaki kriterler dikkate alınarak gerçekleştirildi⁷.

- **Primordiyal follikül:** Primer oosit ve etrafını çevreleyen tek sıra yassı follikül hücre tabakasının görülmesi
- **Unilaminar primer follikül:** Primer oosit, zona pellusida ve etrafını çevreleyen tek sıra kübik follikül hücre tabakasının görülmesi
- **Multilaminar primer follikül:** Primer oosit, zona pellusida ve etrafını çevreleyen çok katlı kübik follikül hücre tabakasının (granüloza hücre tabakası) görülmesi
- **Sekonder follikül:** Granüloza tabakasında, hücrelerin arasında follikül sıvısının birikimi ile oluşan boşlukların varlığı, teka interna ve teka eksterna tabakalarının ayırt edilebilir olması
- **Graaf follikül:** Granüloza tabakasının içinde follikül sıvısını içeren boşlukların birleşmesi ile tek bir antral boşluğun oluşumu, antral boşluk içinde kenara itilmiş eksantrik yerleşimli primer oositin, primer oositi çevreleyen korona radiata hücrelerinin ve oositi granüloza hücre tabakasına bağlayan kumulus ooforusun ayırt edilebilir olması

Ovaryan Folliküllerde Apoptotik Aktivasyonun Değerlendirmesi

Apoptotik aktivasyon gösteren folliküller TUNEL yöntemi kullanılarak değerlendirildi. TUNEL boyamada In Situ Hücre Ölüm Tespit Kiti (Roche Molecular Biochemicals, Ref: 11684817910, ABD) kullanıldı ve boyama protokolü üreticinin talimatlarına göre gerçekleştirildi. Sağ (n=6) ve sol (n=6) ovaryum doku bloklarından rastgele örnekleme yöntemiyle 5 farklı

Ovaryan Toksikitede Visnagin

seviyeden alınan 2 seri kesitten biri (n=5) TUNEL yöntemiyle boyandı. Apoptotik aktivasyon gösteren folliküllerin sayısı ve yüzdesi yukarıda belirtilen follikül gruplarında ayrı ayrı sayıldı ve hesaplandı. Follikül sayımı Olympus BX50 fotomikroskop (20x objektif) ile gerçekleştirildi. Ovaryan folliküllerin apoptotik aktivasyonu semikantitatif olarak 0-2 arasında skorlandı.

Skor 0: Granüloza hücre tabakasında en fazla 3-5 adet TUNEL pozitif follikül hücresinin bulunması, primer oositte boyanmanın olmaması

Skor 1: Granüloza hücre tabakasında TUNEL pozitif boyanmanın %50'den az olması, primer oositte boyanmanın olmaması

Skor 2: Granüloza hücre tabakasının yarısından fazlasını kapsayan, yoğun TUNEL pozitif boyanma ve primer oositinin TUNEL pozitif boyanması

TUNEL 2 skor değerine sahip folliküller atretik follikül olarak kabul edildi ve farklı gelişim aşamalarındaki folliküller için apoptotik follikül indeksi aşağıda verilen formül üzerinden hesaplandı⁸.

%Apoptotik indeks = (pozitif boyanmış apoptotik follikül sayısı / toplam follikül sayısı) x 100

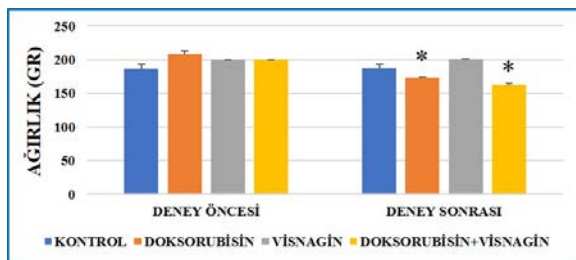
İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS Version 20.0 programı ile yapıldı. Morfolojik değerlendirmede ve TUNEL boyanmasının sonuçlarının değerlendirmesinde gruplar arasındaki karşılaştırma için Kruskal Wallis testi uygulandı. İkili grup karşılaştırmalarında Bonferroni düzeltilmeli Mann Whitney U testi uygulandı. Kemoterapi öncesi ve sonrası hayvan ağırlıkları Wilcoxon testi ile değerlendirildi. Anlamlılık düzeyi p<0.05 olarak kabul edildi.

Bulgular

Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Gruplara ait deney öncesi ve deney sonrası sıçan vücut ağırlıklarının ortalama (Ort), standart sapma (SS) ve p değerleri Tablo I'de verildi. Kontrol ve visnagin gruplarında deney öncesi ve sonrası vücut ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (sırasıyla p=0.11 ve p=0.18) (Tablo I, Şekil 1).



Şekil 1.

Deney öncesi ve deney sonrası deneklerin ağırlıkları

Tablo I. Deney öncesi ve sonrası deneklerin vücut ağırlıkları

		Deney Öncesi Ağırlık	Deney Sonrası Ağırlık	p değeri
Grup I Kontrol	ORT ±SS	186,67±14,72	187,67±13,57	0,11
	ORTANCA (Min/Max)	187,50 (170/200)	188,50 (173/200)	
Grup II Doksorubisin	ORT ±SS	208,33±12,91	173,33±2,58	0,03
	ORTANCA (Min/Max)	200,00 (200/225)	175 (170/175)	
Grup III Visnagin	ORT ±SS	200,00±0	200,5±0,84	0,18
	ORTANCA (Min/Max)	0	200 (200/202)	
Grup IV Doksorubisin+Visnagin	ORT ±SS	200,00±0	162,5±5,24	0,001
	ORTANCA (Min/Max)	0	162,50 (155/170)	

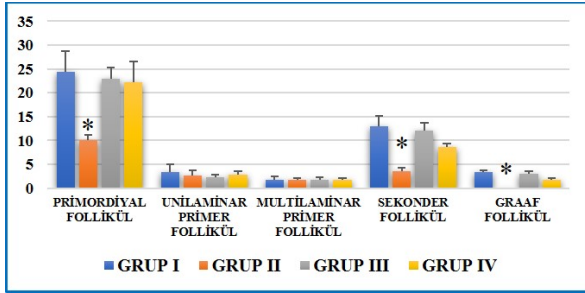
Sıçanlara uygulanan total 21 mg/kg doksorubisin etkisiyle deneklerde anlamlı kilo kaybı saptandı. Aynı doz doksorubisin sonrası total 30 mg/kg Visnagin tedavisi uygulanan deneklerde de anlamlı kilo kaybı gerçekleşti. Doksorubisin tedavisi (Grup II) ve doksorubisin+visnagin (Grup IV) tedavisi uygulanan sıçanlarda deney öncesi ağırlıkları lehine istatistiksel olarak anlamlılık bulundu (sırasıyla p=0,03 ve p=0,001) (Tablo I, Şekil 1).

Ovaryan Follikül Sayılarının Değerlendirilmesi

Çalışmaya ait 4 grubun sağ ve sol overlere ait normal follikül sayılarının Ort, SS, ortanca, minimum, maksimum ve p değerleri Tablo II'de verildi. Ovaryan rezervi belirleyen primordiyal follikül sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gerçekleşti. Gelişmekte olan folliküllerden unilaminar ve multilaminar primer folliküllerde anlamlı bir farklılık olmamakla birlikte, sekonder ve graaf follikül sayılarında anlamlı oranda azalma görüldü. Gruplar arasında her iki ovaryumda primordiyal, unilaminar primer ve graaf follikül sayılarında anlamlı fark görüldü (sırasıyla sağ ovaryumda p=0.004, p=0.004 ve p=0.008, sol ovaryumda p=0.002, p=0.004 ve p=0.002). Primordiyal, sekonder ve graaf follikül sayıları açısından grupların ikili karşılaştırmaları yapıldığında; sağ ve sol ovaryumlar arasında benzer olmak üzere anlamlı farklılıklar elde edildi. Primordiyal follikül sayıları açısından grupların ikili karşılaştırmaları yapıldığında her iki ovaryumda Grup I-Grup II, Grup II-Grup III ve Grup II-Grup IV arasında anlamlı fark bulundu (tüm ikili karşılaştırmalarda p=0.002). Sekonder follikül sayıları açısından grupların ikili karşılaştırmaları yapıldığında, her iki ovaryumda Grup I-Grup II, Grup II-Grup III ve Grup II-Grup IV arasında anlamlı fark bulundu (tüm ikili karşılaştırmalarda p=0.002). Graaf follikül sayıları açısından grupların ikili karşılaştırmaları yapıldığında her iki ovaryumda Grup I-Grup II (sağ ovaryumda p=0.004, sol ovaryumda p=0.002), Grup II-Grup III (sağ ve sol ovaryumda p=0.002) ve Grup II-Grup IV (sağ ovaryumda p=0.004, sol ovaryumda p=0.002) arasında anlamlı fark bulundu (Şekil 2 ve Şekil 3).

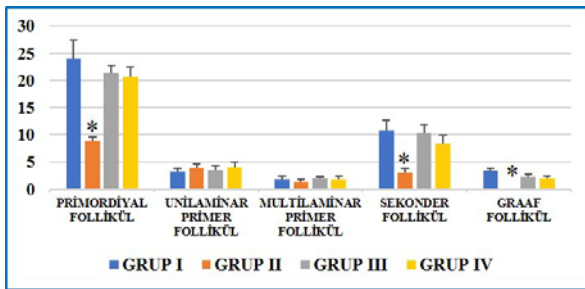
Tablo II. H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait sağ ve sol ovaryan follükül sayıları

		Sağ ovaryum					Sol ovaryum				
		Primordiyal Follükül	Unilaminar Primer Follükül	Multilaminar Primer Follükül	Sekonder Follükül	Graaf Follükül	Primordiyal Follükül	Unilaminar Primer Follükül	Multilaminar Primer Follükül	Sekonder Follükül	Graaf Follükül
Grup I Kontrol	ORT ±SS	24,0±8,6	3,2±1,7	1,8±1,6	10,8±4,6	3,3±1,4	24,3±10,8	3,3±4,1	1,8±1,5	13,0±5,5	3,3±1,2
	ORTANCA (Min/Max)	24,5 (13,0/35,0)	3,0 (1,0/6,0)	1,0 (1,0/5,0)	10,0 (5,0/19,0)	3,0 (2,0/5,0)	20,5 (14,0/42,0)	1,5 (0,0/11,0)	1,5 (0,0/4,0)	12,0 (7,0/20,0)	3,5 (2,0/5,0)
Grup II Doksorubisin	ORT ±SS	8,8±1,7	3,8±1,9	1,3±1,4	3,0±1,9	-	10,2±2,5	2,7±2,7	2,3±2,0	3,5±1,8	-
	ORTANCA (Min/Max)	9,0 (6,0/11,0)	3,5 (2,0/7,0)	1,0 (0,0/4,0)	3,0 (1,0/6,0)	-	10,5 (6,0/13,0)	2,0 (0,0/6,0)	2,0 (1,0/4,0)	4,0 (0,0/5,0)	-
Grup III Visnagin	ORT ±SS	21,3±3,4	3,5±2,1	2,0±0,6	10,3±3,7	2,3±1,1	23,0±5,6	2,3±1,4	1,8±1,2	12,2±3,9	3,0±1,3
	ORTANCA (Min/Max)	20,5 (19,0/33,0)	2,0 (1,0/5,0)	2,0 (0,0/3,0)	10,0 (6,0/16,0)	2,0 (1,0/4,0)	20,5 (19,0/33,0)	2,0 (1,0/5,0)	2,0 (0,0/3,0)	12,0 (8,0/17,0)	3,5 (1,0/4,0)
Grup IV Doksorubisin + Visnagin	ORT ±SS	20,7±4,4	4,0±2,1	1,8±1,5	8,7±2,5	2,0±1,3	22,2±11,0	2,8±1,7	2,3±2,5	8,5±1,5	1,8±0,8
	ORTANCA (Min/Max)	22,0 (14,0/26,0)	4,0 (1,0/8,0)	1,5 (0,0/4,0)	9,0 (5,0/12,0)	1,5 (1,0/4,0)	19,0 (14,0/44,0)	2,5 (1,0/6,0)	1,5 (0,0/7,0)	8,5 (7,0/11,0)	2,0 (1,0/3,0)
p değeri		0,004	0,004	0,9	0,42	0,008	0,002	0,004	0,88	0,99	0,002



Şekil 2.

Gruplara ait sol ovaryum follükül sayıları



Şekil 3.

Gruplara ait sağ ovaryum follükül sayıları

Doksozobisin uygulanan deneklerde atretik follükül sayılarında anlamlı artış saptandı. Sağ ve sol ovaryumlara ait atretik sekonder ve graaf follüküllerin istatistiksel verileri Tablo III'te görülmektedir. Gruplar arasında her iki ovaryumda sekonder atretik follükül ve Graaf atretik follükül sayılarında anlamlı fark görüldü (sırasıyla sağ ovaryumda $p=0.001$ ve $p=0.004$, sol ovaryumda $p=0.003$ ve $p=0.001$).

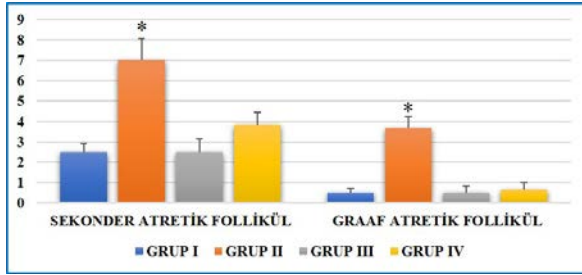
Tablo III. H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait sekonder ve graaf atretik follükül sayıları

		Sağ ovaryum		Sol ovaryum	
		Sekonder Atretik Follükül	Graaf Atretik Follükül	Sekonder Atretik Follükül	Graaf Atretik Follükül
Grup I Kontrol	ORT ±SS	3,0±1,4	0,8±0,8	2,5±1,1	0,5±0,6
	ORTANCA (Min/Max)	3,0 (1,0/5,0)	1,0 (0,0/2,0)	2,5 (1,0/4,0)	0,5 (0,0/1,0)
Grup II Doksozobisin	ORT ±SS	8,0±2,3	3,7±2,1	7,0±2,6	3,7±1,4
	ORTANCA (Min/Max)	7,5 (6,0/11,0)	3,0 (2,0/7,0)	6,5 (4,0/11,0)	3,5 (2,0/6,0)
Grup III Visnagin	ORT ±SS	3,2±1,7	0,5±0,6	2,5±1,5	0,5±0,8
	ORTANCA (Min/Max)	3,0 (1,0/5,0)	0,5 (0,0/1,0)	2,5 (0,0/4,0)	0,00 (0,00/2,00)
Grup IV Doksozobisin + Visnagin	ORT ±SS	3,5±1,1	1,0±0,6	3,8±1,5	0,7±0,8
	ORTANCA (Min/Max)	3,5 (2,0/5,0)	1,0 (0,0/2,0)	3,5 (2,0/6,0)	0,5 (0,0/2,0)
p değeri		0,001	0,004	0,003	0,001

Sekonder atretik follükül sayıları açısından grupların ikili karşılaştırmaları yapıldığında sağ ve sol ovaryumlar benzer olmak üzere anlamlı farklılıklar elde edildi. Her iki overde Grup I-Grup II (sağ ve sol ovaryumda $p=0.002$), Grup II-Grup III (sağ ve sol ovaryumda $p=0.002$) ve Grup II-Grup IV (sağ ovaryumda $p=0.002$, sol ovaryumda $p=0.032$) arasında anlamlı fark bulundu.

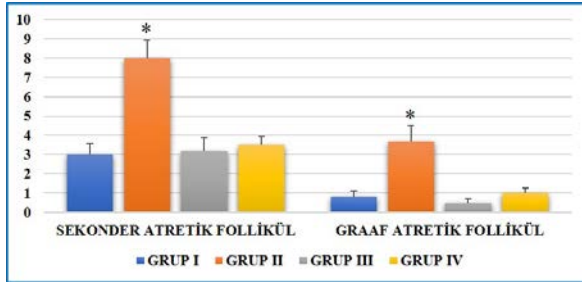
Graaf atretik follükül sayıları açısından grupların ikili karşılaştırmaları yapıldığında sağ ve sol ovaryumlar benzer olmak üzere anlamlı farklılıklar elde edildi. Her iki overde Grup I-Grup II (sağ ve sol ovaryumda $p=0.002$), Grup II-Grup III (sağ ve sol ovaryumda $p=0.002$) ve Grup II-Grup IV (sağ ovaryumda $p=0.004$, sol ovaryumda $p=0.002$) arasında anlamlı fark bulundu (Şekil 4, Şekil 5).

Ovaryan Toksikitede Visnagin



Şekil 4.

Gruplara ait sol ovaryum atretik follikül sayıları



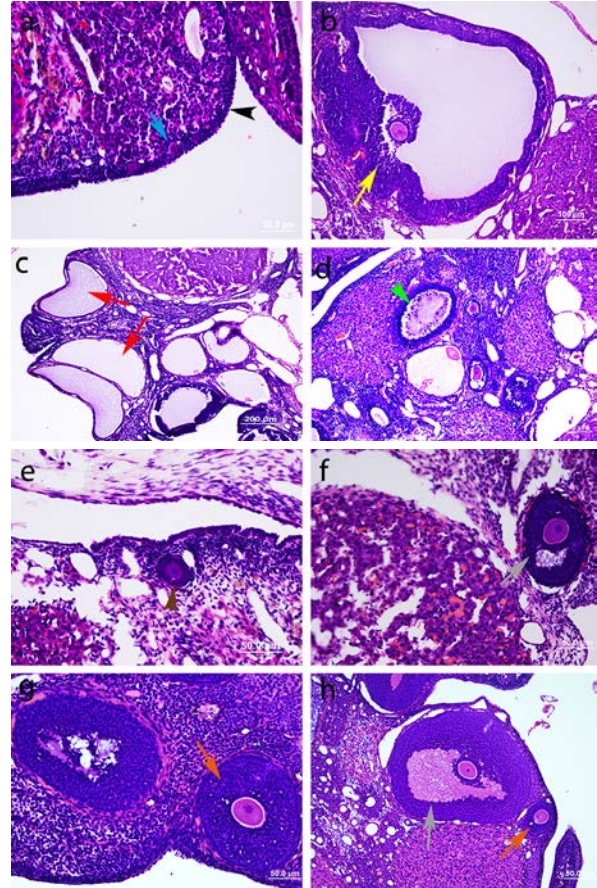
Şekil 5.

Gruplara ait sağ ovaryum atretik follikül sayıları

Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol ve deney gruplarına ait H&E ile boyanan ovaryum doku kesitlerinde morfolojik değerlendirme yapıldı. Kontrol grubunda (Grup I) ovaryum yüzeyinde germinal epitel gözlemlendi. Germinal epitelin altında tunika albuginea mevcut olup, korteks tabakasında gelişimin farklı aşamasındaki pek çok ovaryan folliküller (primordiyal, primer, sekonder ve graaf folliküller) ve daha önceki sıklusa ait atretik folliküller izlendi. Gelişmekte olan folliküllerde, granüloza hücre tabakasının bütünlüğünün korunduğu görüldü, antral boşluklar içinde dökülmüş granüloza hücrelerine rastlanmadı. Primordiyal folliküller normal morfolojik görünümündeydi. Multilaminar primer folliküllerde teka tabakasının oluşmaya başladığı, sekonder ve graaf folliküllerde ise teka interna tabakası ile teka eksterna tabakası görüldü (Şekil 6a-b).

Doksorubisin grubunda (Grup II) primordiyal follikül sayısının azalmış olduğu ve morfolojilerinde bozulmalar görüldü. Sekonder ve graaf folliküllerin granüloza hücrelerinde piknotik görünümlü nükleuslar görüldü. Sekonder ve graaf folliküllerin antral boşluklarında ölü granüloza hücre artıkları ile apoptotik cisimlerden oluşan debrisler gözlemlendi. Granüloza hücreleriyle oosit arasındaki bağlantıların bozulduğu ve follikül hücrelerinde inklüzyonların oluştuğu gözlemlendi. Sekonder ve graaf folliküllerin granüloza hücrelerinde piknotik görünümlü nükleuslar, sekonder folliküllerde daha belirgin olmak üzere, tüm folliküllerde dejenerasyon bulguları görüldü. Folliküllerin teka tabakalarında yer yer piknotik nükleuslu teka hücrelerine rastlandı (Şekil 6c-d).



Şekil 6.

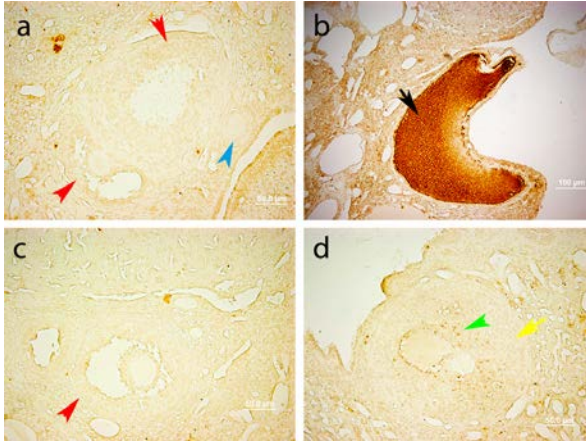
Gruplara ait ovaryum dokusunun histolojik görünümü: Grup I (a-b) primordiyal follikül (mavi ok), graaf follikül (sarı ok). Grup II (c-d) atretik graaf follikül (kırmızı ok), atretik sekonder follikül (yeşil ok başı). Grup III (e-f) unilaminar primer follikül (kahverengi ok başı), sekonder follikül (gri ok). Grup IV (g-h) multilaminar primer follikül (turuncu ok).

Visnagin grubunda (Grup III) kontrol grubuna benzer şekilde follikül sayılarının azalmadığı, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder ve graaf folliküllerin normal morfolojilerinin korunduğu, primer oosit morfolojilerinin bozulmadığı görüldü (Şekil 6e-f).

Doksorubisin+Visnagin grubunda (Grup IV) tüm follikül tiplerinde apoptotik görünümlü hücre sayısında azalma olduğu, primordiyal ve gelişmekte olan folliküller ile total follikül sayısında artış olduğu gözlemlendi. Ovaryan folliküllerin normal morfolojisinin korunduğu görüldü (Şekil 6g-h).

TUNEL Bulguları

TUNEL boyama sonrası ovaryan folliküllerin apoptotik aktivasyonuna göre skorlamasına (0-2) ait follikül örnekleri Şekil 7'de gösterilmiştir. Sağ ve sol ovaryum kesitlerinde TUNEL boyaması sonrası skorlanan folliküllerde atretik follikül olarak kabul edilen skor 2 sekonder ve graaf folliküllerin istatistiksel verileri Tablo IV, Şekil 8 ve 9'da verilmiştir.

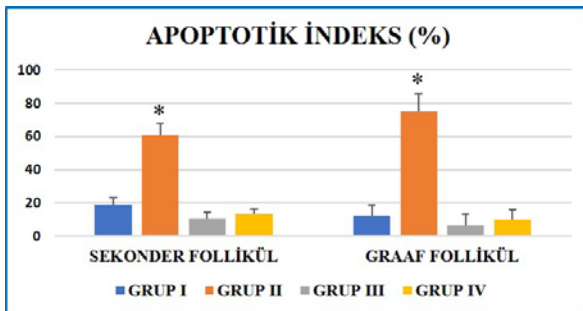


Şekil 7.

Ovaryum dokusu TUNEL boyama sonrası skorlama: Kontrol grubu (a) skor 0 sekonder follikül (kırmızı ok başı), skor 0 multilaminar primer follikül (mavi ok başı). Doksorubisin grubu (b) skor 2 graaf follikül (siyah ok). Visnagin grubu (c) skor 0 sekonder follikül (kırmızı ok başı). Doksorubisin+visnagin grubu (d) skor 1 sekonder follikül (sarı ok), TUNEL pozitif hücre (yeşil ok başı).

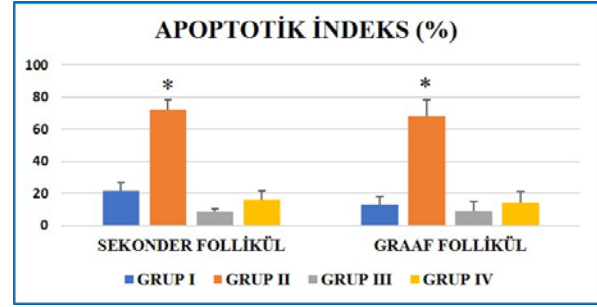
Tablo IV. TUNEL boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait atretik folliküllerin sonuçları

		Sağ ovaryum		Sol ovaryum	
		Sekonder Atretik Follikül	Graaf Atretik Follikül	Sekonder Atretik Follikül	Graaf Atretik Follikül
Grup I Kontrol	ORT ±SS	21,8±11,7	12,8±12,7	19,1±10,2	12,6±15,5
	ORTANCA (Min/Max)	21,5 (3,7/35)	11,8 (0,0/33,3)	22,2 (5,6/28,6)	7,1 (0,0/36,4)
Grup II Doksorubisin	ORT ±SS	72,2±14,5	68,3±24,8	61,0±17,1	75,0±27,4
	ORTANCA (Min/Max)	72,9 (50,0/87,5)	55,0 (50,0/100,0)	56,4 (50/95)	75,0 (50,0/100,0)
Grup III Visnagin	ORT ±SS	8,3±5,9	8,9±14,4	10,4±9,2	6,7±16,3
	ORTANCA (Min/Max)	7,0 (0,0/15,8)	0,0 (0,0/33,3)	10,8 (0,0/22,2)	0,0 (0,0/40,0)
Grup IV Doksorubisin+ Visnagin	ORT ±SS	15,8±13,9	13,9±17,4	13,2±7,2	9,7±15,3
	ORTANCA (Min/Max)	12,9 (0,0/39,0)	6,3 (0,0/37,5)	16,2 (0,0/18,8)	0,0 (0,0/33,3)
p değeri		0,001	0,003	0,003	0,002



Şekil 8.

Gruplara ait sol ovaryum Aİ grafiği



Şekil 9.

Gruplara ait sağ ovaryum Aİ grafiği

Sağ ve sol ovaryumdaki atretik sekonder follikül sayılarının, doksorubisin grubunda (Grup II) diğer gruplara kıyasla ciddi oranda arttığı, atretik indeks oranının anlamlı şekilde yükseldiği görüldü ($p=0,001$ ve $p=0,003$). Benzer şekilde atretik graaf follikül sayılarının da diğer gruplara kıyasla arttığı, atretik indeks oranının yükseldiği görüldü (sağ ovaryumda $p=0,003$, sol ovaryumda $p=0,002$).

Doksorubisin grubunda ovaryum korteks ve medulla stromasında ve gelişmekte olan folliküllerin granuloza hücrelerinde apoptotik aktivasyonun ve atretik follikül sayılarının diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak arttığı görüldü. Doksorubisin uygulaması sonrasında visnagin verilen hayvanların ovaryum dokularında korteks ve medullada apoptotik aktivasyonun azaldığı, follikül sayılarında artış ile birlikte atretik follikül sayılarında azalma olduğu görüldü.

Tartışma ve Sonuç

Bu çalışmada doksorubisinin neden olduğu ovaryan doku hasarını azaltmada, ana kaynağı furanokromon olan visnagin etkinliği değerlendirildi. Doksorubisin ile indüklenmiş ovaryan hasar üzerine visnagin koruyucu etkileri histokimyasal ve immünohistokimyasal düzeyde değerlendirilerek, gerek ovaryan rezervi belirleyen primordiyal follikül sayılarının korunması açısından, gerekse gelişmekte olan follikül sayıları açısından tedavi edici etkinliği gösterildi. Visnagin 30 mg/kg dozda *in vivo* olarak uygulandığında, doksorubisinin gonadotoksik etkisine karşı koruyucu etki sağladı. Bu etkiyi vücut ağırlığında azalma haricinde, primordiyal ve gelişmekte olan follikül sayısında korunma ve atretik follikül sayısında azalma şeklinde gösterdi. Bu çalışma literatürde visnagin doksorubisinin oluşturduğu gonadotoksisteye karşı koruyucu etkisinin gösterildiği ilk çalışmadır.

Doksorubisinin gonadotoksik etkisini araştıran çalışmaların sonuçlarına bakıldığında; Ben-Aharon ve arkadaşları doksorubisin uygulamasının ovaryumlarda atretik follikül sayısının artışına neden olduğu ve bu etkinin ovulasyon hızında belirgin azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir⁹. Doksorubisin uygulanan

Ovaryan Toksikitede Visnagin

farelerin ovaryumunda korteks damarlarında fibrozis olduğu⁹, germinal vezikül (GV) ve metafaz II (MII) aşamasındaki oositlerde in vitro olarak apoptozu indüklediği gösterilmiştir³. Kombine vinkristin, etoposid, prednizon, doksorubisin ve siklofosamid, vinkristin, prednizon, dakarbazin kemoterapisi alan hastalarda yoğun follikül dejenerasyonu olduğu gözlemlenmiştir¹⁰. Bu çalışmada reproduktif olarak aktif sıçanlara uygulanan doksorubisin tedavisi ile ovaryan doku üzerine literatürü destekler nitelikte toksisite bulguları elde edildi.

Folliküler atrezi ovaryumların fizyolojik bir fonksiyonu olmakla birlikte, folliküllerde oosit ve granüloza hücreleri düzeyinde oluşan hasarlar aşırı follikül atrezisine yol açabilir, bu da ovaryan disfonksiyonu indükleyebilir. Follikülde oosit ve granüloza hücreleri karşılıklı olarak etkileşim halindedir. Granüloza hücrelerinde gelişen hasar oosit gelişimi ve matürasyonunu da olumsuz yönde etkilemektedir. Granüloza hücre aktivitesinin kaybı follikül hasarına neden olabilmektedir. Dolayısıyla, doksorubisin ile indüklenen ovaryan toksisitede büyümekte olan folliküllerde granüloza hücrelerinde apoptotik aktivasyonun artışı, granüloza hücreleri ile oositler arasındaki bilgi ve besin alışverişini etkileyerek follikülün atreziye gitmesine neden olması muhtemeldir. Granüloza hücreleri embriyonun implantasyonu için endometriyal proliferasyonu arttıran östrojen üretir. Aynı şekilde stroma/teka hücrelerinin, ovaryum yapısını ve fonksiyonunu korumanın yanısıra, steroidogenez ve hormon sentezinde önemli rolü bulunmaktadır. Kemoterapi alan kadınların ovaryum biyopsilerinin histolojik olarak incelenmesi sonucunda estradiol üretiminin daha düşük olmasına bağlı olarak germ hücre hasarının ortaya çıktığı görülmüştür¹¹. Dolayısıyla, kemoterapiye bağlı gonadotoksisitede granüloza hücreleri-oosit arasındaki etkileşimler dışında, granüloza ve teka hücrelerindeki kayıplara bağlı steroidogenez mekanizmasındaki aksamalar follikül kaybına neden olmaktadır. Sağlıklı bir vücutta serbest oksijen radikalleri (ROS) ve antioksidanlar dengede bulunmaktadır. Dengenin bozulduğu durumlarda oksidatif stres oluşur. ROS oositin olgunlaşmasından fertilizasyona, embriyo gelişimine ve gebeliğe kadar pek çok fizyolojik süreci etkilemektedir. ROS antral folliküllerde apoptozun başlatılmasında önemli rol oynamaktadır¹². Doksorubisinin serbest oksijen radikallerini indükleyerek ve endotel hücrelerinde apoptoza neden olarak endotel fonksiyonunda bozulmaya neden olduğu bildirilmiştir^{13,14}. Doksorubisin uygulaması sonrasında doza bağımlı olarak granüloza hücrelerinde ROS üretiminin arttığı, mitokondriyal membran potansiyelini azalttığı, Bax, Bcl-2 ve p-53 mRNA ekspresyonunda artış olduğu ve bununla apoptozise yol açtığı rapor edilmiştir¹⁵. Bu çalışmada doksorubisin uygulamasının ovaryan folliküllerde apoptotik aktivasyonu arttırarak follikül kaybına neden olduğu gösterilmiştir.

Yapılan çalışmalarda ovaryumda atretik folliküllerde TUNEL pozitif hücre boyanmasının granüloza ve teka hücrelerinde daha fazla olduğu bildirilmiştir¹⁶. Slot ve arkadaşları atretik folliküllerle sağlıklı follikülleri karşılaştırdıklarında, Fas ligand, Bax, TUNEL ve kaspaz-3 salınımının atretik folliküllerde daha yoğun olduğunu gözlemlemişlerdir¹⁷. Vaskivuo ve arkadaşları insan ovaryumunda granüloza hücrelerinde TUNEL pozitif boyanmayı sekonder ve graaf follikül seviyesinde rapor etmişlerdir¹⁸. Farklı bir çalışmada, insan ovaryumlarında TUNEL boyanması ve kaspaz-3 immünohistokimyası sonrasında erken follikül aşamasında atretik follikül sayılarının seyrek olduğu, erken matürasyon aşamasındaki folliküllerde kaspaz-3 ve TUNEL yöntemiyle apoptozisin gösterilemeyeceği belirtilmiştir¹⁹. Bu çalışmada da gelişmekte olan ve graaf folliküllerde TUNEL pozitifliği elde edilmiştir. Primordiyal ve unilaminar primer folliküllerdeki apoptotik aktivasyonun, az sayıda olan follikül hücrelerinin hızla ölümü ve primer oositin dejenerasyonu nedeniyle, follikülün direkt kaybı ile sonuçlandığı şeklinde yorumlanabilir. Bu yorumu gruplar arasındaki primordiyal follikül sayısı farklılıkları da desteklemektedir.

Doksohubisin kaynaklı ovaryan toksisitenin tedavisinde, başta antioksidanlar olmak üzere, pek çok ajan kullanılmaktadır. Hücresel düzeyde oksidatif stres DNA hasarına neden olmaktadır²⁰. Doksohubisin ile indüklenen oksidatif stres ve p53 aracılı mitokondriyal apoptozun baskılanması ile doksohubisin kaynaklı mutajenitenin belirgin bir şekilde zayıflatılması amacıyla bazı antioksidanların kullanımının etkinliği literatürde kanıtlanmıştır^{21,22}. Kemirgen ve primat ovaryumunda oosit, granüloza ve stromal hücrelerinde deksrazoksan ve bortezomib'in doksohubisin kaynaklı DNA hasarını azalttığı bildirilmiştir^{23,24}. Yapılan bir in vitro çalışmada, fare modeli granüloza hücre hattında deksrazoksan'ın doksohubisine yanıt olarak oluşan DNA hasarı ile oluşan H2AFX aktivasyonunu ortadan kaldırdığı ve hücre canlılığını önemli ölçüde arttırdığı rapor edilmiştir²⁵.

Visnagin biyolojik fonksiyonu ve hedefi hakkındaki bilgilerin oldukça kısıtlı olduğu bir ajandır. Literatürde ovaryan toksisiteyi önlediğine dair literatür bulunmamakla birlikte, visnagin doksohubisinin oluşturduğu kardiyotoksisitede etkinliğini değerlendiren bir çalışmada; visnagin vazodilatasyon ve hücre içerisine kalsiyum girişini engelleme ve kan basıncını düşürücü etkisiyle doksohubisin ile indüklenmiş kardiyomyopatiye koruyucu etkisinin olduğu rapor edilmiştir⁴. Visnagin doksohubisin toksisitesini tedavi edici etkisinin yanısıra mikrogial hücreler üzerinden lipopolisakkarid ile indüklenen inflamasyonda anti-inflamatuar etkisini^{26,27}, oksalat maruziyeti ile indüklenen renal epitel hücre hasarını baskıladığını⁶, portal damarların spontan miyojenik kasılmaları ve sıçan aortik halkalarında indüklenen kontraktıl yanıtları

inhibe ettiğini gösteren çalışmalar mevcuttur²⁸. Visnagin ve kellin ile yapılan bir diğer çalışmada, oksalatüriner atılımının hızla arttığı, sitrat atılımının eş zamanlı olarak azalarak hiperokzalürinin başarılı bir şekilde indüklendiği bildirilmiştir²⁹. Literatürde psoralen grubu ajanların (psoralen, 5-methoksipsoralen, 8-methoksipsoralen, kellin ve visnagin) reaktif oksijen türlerini arttırdığı spektrofotometre yöntemiyle gösterilmiştir³⁰. Fakat bu ajanlardan 8-methoksipsoralen ve kellinin 0,2 mM dozda antioksidan etkisi olduğu, visnagin ise antioksidan etkiyi düşük konsantrasyonlarda (0,05 mM) gösterdiği, yüksek doz (1mM) uygulamanın prooksidatif etkiye neden olduğu rapor edilmiştir. Bu çalışmada visnagin tedavisi 7 günlük periyotta total 0,02 mM dozda uygulandı. Tedavinin sonucunda visnagin doksorubisine bağlı gonadotoksitesi hem primordiyal follikül seviyesinde hemde gelişmekte olan folliküller seviyesinde bir etki gösterdi. Çalışmada uygulanan visnagin dozunun literatürde belirtilen prooksidatif etkinliğin gösterildiği dozun altında, güvenli sınırlarda bir doz olması, antioksidatif etkisini gösterebilecek bir doz aralığında uygulanması visnagin tedavisi edici etkinliğini antioksidatif mekanizma üzerinden göstermiş olabileceği yönünde yorumlanabilir. Doku düzeyinde visnagin tedavisi edici etkisinde antioksidatif mekanizmanın desteklenmesi için *in vivo* ya da *in vitro* toksisite çalışmalarının yapılması gerekmektedir.

Literatürde doksorubisin ile benzer şekilde gastrointestinal sistemde toksik etkiye sahip geniş spektrumlu platin türevi bir antineoplastik ajan olan sisplatin'in oluşturduğu nefrotoksitenin tedavisi amacıyla tiopronin veya kannabinoidlerin etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda, benzer şekilde tedavi edici ajanların kilo kaybını engellemede etkin olmadığı rapor edilmiştir^{31,32}. Bu sonucu tedavi amacıyla kullanılan ajanların gastrointestinal sistem üzerinde etkinliğinin olmaması şeklinde yorumlamışlardır. Bu çalışmada da doksorubisinin gastrointestinal sistem üzerinde toksik etkisine bağlı olarak sıçanlarda gelişen anoreksiya ve buna bağlı kilo kaybına visnagin tedavisi edici etkisi görülmedi. Visnagin de benzer şekilde gastrointestinal sistem üzerine tedavi edici etkisinin olmaması nedeniyle kilo kaybında azalma oluşturmaması muhtemeldir.

Kemoterapi hızlı bir hücresel döngüye sahip olan ovaryumlar üzerinde son derece zararlı etkiler oluşturmaktadır. Günümüzde kansere yakalanan çoğu kadın hasta kemoterapi veya radyoterapi ile tedavi edilmesine karşın tedavi sonrasında kullanılan ajanların toksik etkilerinden dolayı infertilite ve gonadal yetmezlik ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu hastalarda üreme yeteneklerini korumak amacıyla, tedavi öncesi ve/veya sonrası embriyo, oosit ve ovaryum dokusu dondurma gibi birtakım yardımcı üreme yöntemlerine başvurulmaktadır. Bu yöntemlere ek olarak antioksidanlar ve alternatif tedavilerin kullanılmasıyla kemo-

terapötik ajanların toksik etkilerinin önlenmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışmada gonadotoksik etkisi bilinen doksorubisinin, ovaryumda doku hasarını ve folliküler kaybı azaltmak, ovaryan rezervi korumak amacıyla visnagin tedavisinin olumlu sonuçlar verdiği laboratuvar ortamında gösterilmiştir. Kemoterapi sonrası uygulanacak visnagin tedavisinin hem gelişmekte olan follikülleri hemde primordiyal follikül havuzunu korumada etkili olduğu görülmüştür. Doksorubisinin hücre içerisinde kalsiyum birikimine yol açıp, ROS birikimi ile birlikte DNA hasarına neden olarak follikül granüloza hücrelerinde ve stromal hücrelerde oluşturduğu apoptotik aktivasyonun, visnagin hücre içerisine kalsiyum girişini engelleyici etkisi ve serbest oksijen radikallerini minimum düzeye indirerek normal ovaryum dokusundaki gelişmekte olan follikülleri kemoterapötik ajanların toksik etkisinden koruyabileceği düşünülmektedir. Bu görüşü destekleyecek ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Sonuç olarak, bu çalışma doksorubisin kemoterapisi sonrasında oluşan ovaryan toksisitede visnagin koruyucu etkisinin olduğunu gösteren ilk çalışma olup, fertilitiyi korumaya yönelik yaklaşımlara alternatif bir tedavi seçeneği olarak yönlendirici olacaktır.

Referanslar

1. Monsuez J.-J, Charniot J.-C, Vignat N, & Artigou J.-Y Cardiac side-effects of cancer chemotherapy. *International Journal of Cardiology* 2010; 144(1), 3–15.
2. Van Dyke T. p53 and tumor suppression. *The New England Journal of Medicine*, 2007; 356(1), 79–81.
3. Bar-Joseph H, Ben-Aharon I, Rizel S, Stemmer SM, Tzabari M, et al. Doxorubicin-induced apoptosis in germinal vesicle (GV) oocytes. *Reproductive Toxicology* 2010;30: 566–572.
4. Liu Y, Asnani A, Zou L, Bentley V. L, Yu M, Wang Y, Peterson R. T Visnagin protects against doxorubicin-induced cardiomyopathy through inhibition of mitochondrial malate dehydrogenase. 2014; 6(266): 266ra170.
5. Duarte J, Torres A. I, Zarzuelo A Cardiovascular effects of visnagin on rats. *Planta Med.* 2000; 66, 35-39.
6. Vanachayangkul P, Byer K, Khan S, Butterweck V. An aqueous extract of Ammi visnaga fruits and its constituents khellin and visnagin prevent cell damage caused by oxalate in renal epithelial cells. *Phytomedicine*, 2010;17, 653-658.
7. Ross MH, Pawlina W. *Histology A Text And Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*. 6th edition ed. Vol. LWV. 833-837, 2011.
8. Garrett W M, Guthrie H. D Expression of Androgen Receptors and Steroidogenic Enzymes in Relation to Follicular Growth and Atresia Following Ovulation in Pigs, *Biology of Reproduction*, 1996; 55, 949-55.
9. Ben-Aharon I, Bar-Joseph H, Tzarfaty G, Kuchinsky L, Rizel S, Stemmer SM, Shalgi R Doxorubicin-induced ovarian toxicity. *Reprod Biol Endocrinol.* 2010; 8:20.
10. McLaughlin M, Kelsey T.W, Wallace W.H.B, Anderson R.A, Telfer E.E Non-growing follicle density is increased following adriamycin, bleomycin, vinblastine and dacarbazine (ABVD) chemotherapy in the adult human ovary. *Human Reproduction*. Vol.32, No. I pp. 2017; 165-174.

Ovaryan Toksisitede Visnagin

11. Oktay K, Oktem O, Reh A, Vahdat L Measuring the impact of chemotherapy on fertility in women with breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006; 24:4044-4046.
12. Agarwal A, Gupta, S, Sharma R.K, Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2005; 3, 28.
13. Chow AY, Chin C, Dahl G, Rosenthal DN Anthracyclines cause endothelial injury in pediatric cancer patients: a pilot study. *J Clin Oncol.* 2006; 24:925-928.
14. Wu S, Ko YS, Teng MS, Ko YL, Hsu LA, Hsueh C, Chou YY, Liew CC, Lee YS Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: in vitro and in vivo studies. *J Mol Cell Cardiol.* 2002; 34:1595-1607.
15. Zhang T, He W.N, Feng L.L, Huang H.G Effect Of Doxorubicin-Induced Ovarian Toxicity On Mouse Ovarian Granulosa Cells. *Regulatory Toxicology And Pharmacology* 2017; 86 1e10.
16. Isobe N, Yoshimura Y Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: a DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology.* 2000; 53, 897-904.
17. Slot K, Voorendt M, Boer-Brouwer M, Vugt H, Teerds K Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary. *Journal of Endocrinology.* 2006; 188:179-192.
18. Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, Te Velde ER, Stenback H, Heikinheimo M, Tapanainen JS Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86:3421-3429.
19. Glamoclija V, Vilovic K, Saraga-Babic M, Baranovic A, Sapunar D Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2005; 83:426-431.
20. Gewirtz D.A, A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 57, 727e741.
21. Attia, S.M, Al-Bakheet, S.A, Al-Rasheed, N.M Proanthocyanidins produce significant attenuation of doxorubicin-induced mutagenicity via suppression of oxidative stress. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2010; 3, 404e413.
22. Yeh Y.C, Liu T.J, Wang L.C, Lee H.W, Ting C.T, Lee W.L, Hung C.J, Wang K.Y, Lai H.C, Lai H.C, A standardized extract of Ginkgo biloba suppresses doxorubicin-induced oxidative stress and p53-mediated mitochondrial apoptosis in rat testes. *Br. J. Pharmacol.* 2009; 156, 48e61.
23. Roti Roti, E.C, Salih, S.M, Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced injury in mouse ovarian cells. *Biol. Reprod.* 2012; 86, 96.
24. Roti Roti EC, Ringelstetter AK, Kropp J, Abbott DH, Salih SM Bortezomib Prevents Acute Doxorubicin Ovarian Insult and Follicle Demise, Improving the Fertility Window and Pup Birth Weight in Mice. *PLoS ONE* 2014; (9): e 108174.
25. Elon C, Roti Roti, M. Salih Dexrazoxane Ameliorates Doxorubicin-Induced Injury in Mouse Ovarian Cells. *Biology Of Reproduction* 2012; 86(3):96,1-11.
26. Lee J.K, Jung J.S, Park S.H, Park S.H, Sim Y.B, Kim S.M, Han T.S, Suh H.W Anti-inflammatory Effect of Visnagin in Lipopolysaccharide-stimulated BV-2 Microglial Cells. *Arch Pharm Res Vol 33, No: 11, 2010; 1843-1850.*
27. Kwon M.S, Lee J.K, Park S.H, Sim Y.B, Jung J.S, Won M.H, Kim S.M, Suh H.W Neuroprotective Effect of Visnagin on Kainic Acid-induced Neuronal Cell Death in the Mice Hippocampus *Korean J Physiol Pharmacol Vol 14. 2010; 257 - 263.*
28. Duarte J, Perez-Vizcaino F, Torres AI, Zarzuelo A, Jimenez J, Tamargo J Vasodilator effects of visnagin in isolated rat vascular smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 1995; 286:115-122.
29. Vanachayangkul P, Chow N, Khan SR, Butterweck V Prevention of renal crystal deposition by an extract of Ammi visnaga L. and its constituents khellin and visnagin in hyperoxaluric rats. *Urol Res* 39: 2011;189-195.
30. Hassan Y, Aboul-Enem, Kladna A, Kruk I, Lichszeld K, Michalska T Effect of Psoralens on Fenton-Like Reaction Generating Reactive Oxygen Species. *Biopolymers (Biospectroscopy), 2003; Vol. 72, 59-68.*
31. Zhang JG, Viale M, Esposito M, Lindup WE Tiopronin protects against the nephrotoxicity of cisplatin in the rat. *Hum Exp Toxicol.* 1999; 18(12):713-7.
32. Abalo R, Cabezos PA, Vera G, López-Pérez AE, Martín MI Cannabinoids may worsen gastric dysmotility induced by chronic cisplatin in the rat. *Neurogastroenterol Motil.* 2013; 25(5):373-82.

