

ÖZGÜN ARAŞTIRMA

# Sıçan Ovaryum Dokusunda Doksorubisin ile İndüklenmiş Folliküler Apoptotik Aktivasyonda Dialil Disülfid'in Koruyucu Etkisi

Esra ŞEN<sup>1</sup>, Seda SARIBAL SAYGI<sup>1</sup>, Aysun ÖNAL<sup>2</sup>, Ayşe AKBAŞ<sup>1</sup>, Berrin AVCI<sup>1</sup>, Zeynep KAHVECİ<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü, Bursa, Türkiye.

<sup>2</sup> İstanbul Aydın Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Florya Yerleşkesi, İstanbul, Türkiye.

## ÖZET

Bu çalışmada önemli bir kemoterapötik ajan olan doksorubisinin ovarium üzerindeki toksisitesini belirlemek ve ovarian toksite üzerine yüksek antioksidan kapasiteye sahip olan dialil disülfidin etkinliğini değerlendirmek amaçlandı. Çalışma kapsamında 35 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan 5 alt gruba ayrıldı: Grup I: Kontrol-Doksorubisin Grubu, Grup II: Kontrol-Dialil disülfid Grubu, Grup III: Doksorubisin Uygulanan Grup, Grup IV: Dialil disülfid Uygulanan Grup, Grup V: Doksorubisin + Dialil disülfid Uygulanan Grup. Morfolojik değerlendirme hematoxylin-eozin boyaması ile gerçekleştirildi. Apoptotik aktivasyon TUNEL yöntemi ile değerlendirildi. Doksorubisin uygulamasının primordiyal, sekonder ve graaf follikül sayılarında azalmaya sebep olduğu gözlemlenirken, atretik follikül sayılarını ise arttırdığı saptandı. Dialil disülfid tedavisinin doksorubisin ile indüklenmiş ovarian toksisiteyi azaltabileceği ve ovarian follikül rezervinin korunmasında etkili olabileceği sonucuna varıldı.

**Anahtar Kelimeler:** Apoptoz. Dialil disülfid. Doksorubisin.

## Effect of Diallyl Disulfide on Doxorubicin-induced Follicular Apoptotic Activation in Rat Ovarian Tissue

### ABSTRACT

The aim of this study was to determine the toxicity of doxorubicin, an important chemotherapeutic agent, on the ovary and to evaluate the efficacy of diallyl disulfide which has high antioxidant capacity on ovarian toxicity. In this study, 35 female Wistar albino rats were divided into 5 subgroups: Group I: Control-Doxorubicin Group, Group II: Control-Diallyl disulfide Group, Group III: Doxorubicin Applied Group, Group IV: Diallyl disulfide Applied Group, Group V: Doxorubicin + Diallyl disulfide Group. Morphological evaluation was performed with hematoxylin-eosin staining. Apoptotic activation was evaluated by TUNEL method. Doxorubicin caused a decrease in the number of primordial, secondary and graaf follicles, and increased atretic follicle counts. It was concluded that diallyl disulfide treatment may reduce doxorubicin-induced ovarian toxicity and may be effective in maintaining ovarian follicular reserve.

**Key Words:** Apoptosis. Diallyl disulfide. Doxorubicin.

Doksorubisin (DOX), çeşitli kanser türlerinin tedavisi için güçlü ve yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir.<sup>1</sup> Bu ilaç, daunorubisin, epirubisin, idarubisin ile birlikte antrasiklin antibiyotik ailesine aittir.<sup>2</sup>

Çoklu organ toksisitesi anti-kanser ajanların aktivitesi ile reaktif oksijen türleri (ROS), oksidatif stres ve hücrel değişimlerin sonucu olarak meydana gelmektedir.<sup>3,4</sup> Kemoterapinin gonadal etkileri uzun sürmektedir.<sup>5</sup> Gonadotoksik ilaçlar folliküler büyümeyi inhibe edebilir; özellikle alkilleyici ajanlar, küçük folliküllerde lethal lezyonları indüklemektedir. Gonadotoksik bir tedaviden sonra gözlenebilecek değişiklikler; maturasyon yetersizliği, kılcal malformasyon, kortikal fibrozis, görülen ovarium ve follikül sayısında azalmadır. Sitotoksik ajanların gonadal toksite oluşturma mekanizmaları, hızla bölünen hücreleri durdurarak folliküler maturasyonun bozulmasını, durgun primordiyal folliküller üzerindeki doğrudan toksik etkiyi

Geliş Tarihi: 14.Kasım.2019

Kabul Tarihi: 30.Aralık.2019

Dr. Esra ŞEN  
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Görükle Kampüsü, Bursa, Türkiye.  
Tel.: 0537 703 35 45  
E-posta: [esra89sen@gmail.com.tr](mailto:esra89sen@gmail.com.tr)

veya ikisinin kombinasyonunu içermektedir.<sup>6</sup> Follikül sayısındaki azalma, 41 yaşından önce menopoz olarak tanımlanan prematür ovaryan yetmezliğe yol açabilir ve östrojen üretimini azaltır. Her ne kadar sitotoksik kaynaklı hasar, hızla bölünen hücrelere sahip diğer dokularda (kemik iliği, gastrointestinal sistem ve timüs gibi) geri dönüşümlü olabilese de, reproduktif periyodun başlangıcında sabit olan germ hücre sayısında azalmaya neden olarak ovaryumda geri dönüşümsüz toksik etki oluşturmaktadır.<sup>7</sup> Ovaryum folliküllerinin atrezisi, her biri farklı başlangıç ve regülasyon mekanizmalarına sahip olan, ancak tümü granüloza hücre apoptozunu içeren üç fenotipe (antral, bazal, terminal farklılaşma) ayrılabilir.<sup>8</sup>

Olgun, fakat taze olmayan sarımsak antioksidan etkiye sahiptir. Serbest radikalleri temizleyerek, süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidazı ve hücrenel glutatyonu artırarak antioksidan etkiler gösterir. Antioksidanlar, serbest radikallerin zararlı etkilerini etkisiz hale getirebilir ve zamanla ortaya çıkardıkları zararın en aza indirilmesine veya ortadan kaldırılmasına yardımcı olabilir.<sup>9</sup>

Çalışma kapsamında, kemoterapötik ajan toksisitesinin kadın fertilitesi üzerine oluşturduğu hasarın önlenmesi ya da bu toksisitenin etkilerinin en aza indirgenmesi için bir koruma yöntemi bulmak amaçlandı. Bu amaçla önemli bir antioksidan madde olan dialil disülfitin sıçan ovaryumunda oluşturulan doksorubisin toksisitesi üzerindeki hasar önleyici etkisi incelendi.

## Gereç ve Yöntem

Çalışma Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 16.01.2018 tarihinde 2018-01/05 no'lu kararı ile onaylanmıştır. Çalışmada denek olarak Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme Merkezi'nden temin edilen 2,5-3 aylık 200-250 gr ağırlığında 35 adet Wistar Albino cinsi erişkin dişi sıçan kullanıldı. Denekler standart kafeslerde tutulup, 12 saat aydınlık 12 saat karanlık ortamda barındırıldı. Hayvanların beslenmesi için standart yem ve musluk suyu verildi. Doksorubisin toksisitesi oluşturmak amacıyla serum fizyolojikte çözülen formu (Adrimisin) kullanıldı. Doksorubisin serum fizyolojik (SF) içerisinde çözülerek intraperitoneal (i.p) enjeksiyon<sup>10</sup> ile DDS ise mısır yağı içerisinde çözülerek i.p enjeksiyon<sup>11</sup> ile uygulandı.

35 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan her grupta 7 adet sıçan olmak üzere 5 alt gruba ayrıldı. Tüm sıçanlardan ilaç uygulaması (doksorubisin ve dialil disülfid) ve ovaryum diseksiyonunun, ovaryan siklusun aynı periyodunda yapılabilmesi için, her iki uygulama öncesi deneklerden vaginal smear alınarak östrus evreleri belirlendi. İlaç dozlarını belirlemek için değerlendirilen sıçan vücut ağırlıkları ortalamaları (ORT) ve standart sapmaları (SS); Grup I için 200±4,11 gr, Grup II

için 208±8,25 gr, Grup III için 214±4,41 gr, Grup IV için 207±7,18 gr, Grup V için 209±6,74 gr olarak belirlendi. Çalışma 5 gruptan oluştu.

**Grup I (Kontrol-Doksorubisin Grubu):** Bu gruptaki 7 adet sıçana hayvanın ağırlığına göre 7 gün boyunca i.p olarak serum fizyolojik (SF) uygulandı. SF volümü deney gruplarında ilaçları dilüe etmek amacıyla kullanılan SF miktarı dikkate alınarak belirlendi.

**Grup II (Kontrol-Dialil disülfid Grubu):** Bu gruptaki 7 adet sıçana 7 gün boyunca i.p olarak 0,5 ml mısır yağı uygulandı.

**Grup III (Doksorubisin Uygulanan Grup):** Bu gruptaki 7 adet sıçana 7 gün boyunca 3 mg/kg/gün (0,008 mM/7 gün) doksorubisin (Adrimisin/Saba İlaç) (10 mg/kg- 5 ml enjeksiyonluk su) i.p olarak uygulandı.

**Grup IV (Dialil disülfid Uygulanan Grup):** Bu gruptaki 7 adet sıçana 7 gün boyunca i.p olarak 0,5 ml mısır yağı içerisinde 50 mg/kg/gün dialil disülfid (Sigma) uygulandı.

**Grup V (Doksorubisin + Dialil disülfid Grubu):** Bu gruptaki 7 adet sıçana 3 mg/kg/gün (0,08 mM/7 gün) doksorubisin (10 mg/kg- 5 ml enjeksiyonluk su) i.p uygulandıktan, 2 saat sonra 0,5 ml mısır yağı içerisinde 50 mg/kg/gün dialil disülfid 7 gün boyunca i.p olarak uygulandı.

## Doku Diseksiyonu

Sıçanlara 7 gün ilaç uygulandıktan sonra, 8. gün ovaryan sikluslarının östrus periyodunda eter anestezisi altında perfüzyon fiksasyon uygulandı. Fiksatif olarak fosfat tamponuyla hazırlanan %4'lük paraformaldehit kullanıldı. Ovaryum diseksiyonu sonrası aynı fiksatif içerisinde 48 saat boyunca sağ ve sol ovaryum dokularına immersiyon fiksasyon uygulandı. Fiksasyon sonrası ovaryum dokuları ışık mikroskopik ve immünohistokimyasal inceleme için doku takibine alındı.

## Işık Mikroskopik İnceleme

Parafin bloklardan Leica RM2245 mikrotom ile alınan 5 µm kalınlığında seri kesitler rastgele örnekleme yöntemiyle seçilerek lamlara alındı. En az 4 sekonder follikülün bulunduğu kesit başlangıç kesiti olarak kabul edildi. Rastgele örnekleme yöntemiyle hematoksilen eozin (H&E) boyaması için 5 kesit, TUNEL boyaması için 2 kesit belirlendi. Seri kesitlerin biri morfolojik değerlendirme için H&E ile diğeri apoptotik aktivasyonu değerlendirmek için TUNEL yöntemi ile boyandı. Follikül sayımı Olympus BX50 fotomikroskop ile gerçekleştirildi.

## Hematoksilen-Eozin Boyama ve Morfolojik Değerlendirme

H&E ile boyanan rastgele seçilen 5 kesitte folliküllerin morfolojik sınıflandırılması yapıldı. Folliküller granüloza hücre şekli ve hücre katman sayısı (Tablo I) göz önüne alınarak sınıflandırıldı.<sup>12</sup>

## Doksorubisin Toksisitesinde Dialil Disülfitin Etkisi

**Tablo I.** Folliküllerin morfolojik sınıflandırması

FOLLİKÜL SINIFLARI	TANIM
Primordiyal Follikül	tek katlı yassı folliküler hücre katmanı
Unilaminar Primer Follikül	tek katlı kübik folliküler hücre katmanı
Multilaminar Primer Follikül	çok katlı granüloza hücre (follikül hücrelerinden farklılaşan) katmanı
Sekonder Follikül	çok katlı granüloza hücre katmanlı, antral boşluklu, belirgin teka tabakalı
Graaf Follikül	kumulus-oosit kompleksi, antral boşluk ve belirgin teka tabakalı

### TUNEL Yöntemi

Apoptotik hücreleri belirlemek için DNA kırık uç işaretleme yöntemi ile in situ apoptozis belirleme kiti kullanıldı (Roche, In Situ Cell Death Detection Kit, POD, Ref: 11684817910, USA). Boyama protokolü üretici firmanın talimatlarına göre gerçekleştirildi.

Ovaryum kesitlerine uygulanan TUNEL boyama 2 bağımsız gözlemci tarafından değerlendirildi. Ovaryan folliküllerde TUNEL pozitif boyanma 0-2 arasında skorlandı. Bu skorlamaya göre; pozitif işaretlenen granüloza hücrelerinin oranı folliküldeki tüm granüloza hücrelerinin %5'inden az olanlar skor 0, %5-10 arasında olanlar skor 1, %10'undan fazla olanlar skor 2 olarak değerlendirildi. Gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak karşılaştırıldı. Elde edilen TUNEL skor değerleri ile gruplar arasında folliküllerin apoptotik indeksi (AI) belirlendi.<sup>13</sup> TUNEL 2 skor değerine sahip folliküller atretik follikül olarak kabul edilip, her bir dokunun atretik follikül yüzdesi hesaplandı.<sup>13</sup>

(%Atretik follikül= Atretik follikül/total follikül X100)

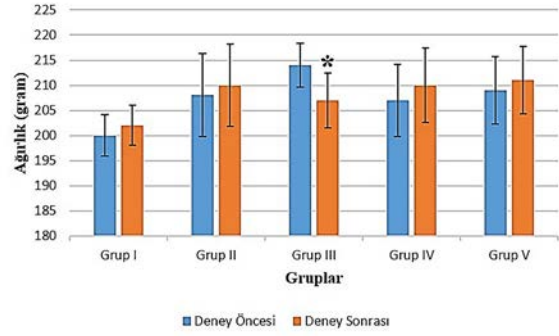
### İstatistiksel Analiz

Gruplar arası karşılaştırma ANOVA ve Kruskal Wallis testleriyle yapıldı. Gruplar arası ikili karşılaştırmalar bağımsız t test ve Mann Whitney U testi ile gerçekleştirildi. Ortalama (ORT), standart sapma (SS) ve p değerleri verildi. p<0,05 anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

#### Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney öncesi ve deney sonrası sıçanların ağırlık ortalamaları istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendirme sonucunda Grup III'teki deneklerde kilo kaybı olurken, Grup I, Grup II, Grup IV ve Grup V'teki deneklerde kilo artışı saptandı (Şekil 1). Gruplara ait vücut ağırlıklarının ortalama, standart sapma ve p değerleri Tablo II'de verildi.



**Şekil 1.**

Deney öncesi ve deney sonrası deneklerin vücut ağırlıkları

**Tablo II.** Deney öncesi ve deney sonrası deneklerin vücut ağırlıkları (gr)

		Deney Öncesi Ağırlık (gr)	Deney Sonrası Ağırlık (gr)	p değeri
Grup I	ORT ±SS	200±4,11	202±3,99	0,004
Grup II	ORT ±SS	208±8,25	210±8,23	0,001
Grup III	ORT ±SS	214±4,41	207±5,48	0,002
Grup IV	ORT ±SS	207±7,18	210±7,41	0,001
Grup V	ORT ±SS	209±6,74	211±6,74	0,012

#### Follikül Sayılarının Değerlendirilmesi

Deney sonrası her gruptaki deneklerin sol ve sağ ovaryumlarından alınan ve H&E ile boyanan 5'er kesitte primordiyal, unilaminar ve multilaminar primer, sekonder, graaf, sekonder atretik ve graaf atretik folliküllerin sayımları yapıldı. Deney sonrası gruplarda ovaryumlara ait normal folliküllerin sayılarının ortalama, standart sapma ve p değerleri sol ovaryum için Tablo III ve sağ ovaryum için Tablo IV'de verildi. Sol ve sağ ovaryumlara ait sekonder ve graaf atretik folliküllerin istatistiksel verileri Tablo V'de belirtildi.

**Tablo III.** H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait sol ovaryum follikül sayıları

		Primordiyal Follikül	Unilaminar Primer Follikül	Multilaminar Primer Follikül	Sekonder Follikül	Graaf Follikül
Grup I	ORT ±SS	18,86±2,54	4,57±1,71	2,28±0,49	6,71±1,25	2,57±1,71
Grup II	ORT ±SS	20,29±3,10	4,28±2,06	2,28±0,49	7,43±2,22	3,28±1,25
Grup III	ORT ±SS	8,86±1,68	4,86±3,13	2,57±1,27	2,14±0,81	0,57±0,52
Grup IV	ORT ±SS	21,57±6,90	4,28±2,28	1,43±1,27	6,00±1,73	1,71±0,95
Grup V	ORT ±SS	12,28±3,10	5,00±1,00	1,48±0,53	3,43±0,98	1,28±0,49
p değeri		0,001	0,777	0,72	0,001	0,003

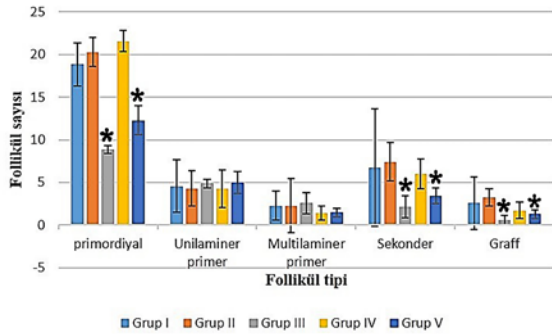
Ortalama (ORT), standart sapma (SS).

**Tablo IV.** H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait sağ ovaryum follikül sayıları

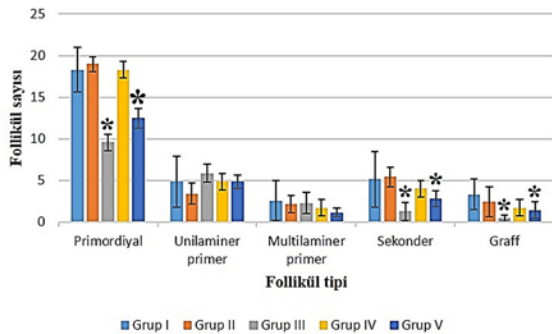
		Primordiyal Follikül	Unilaminar Primer Follikül	Multilaminar Primer Follikül	Sekonder Follikül	Graaf Follikül
Grup I	ORT ±SS	18,28 ±2,69	4,85 ±0,89	2,57 ± 0,98	5,14 ±1,77	3,33± 1,21
Grup II	ORT ±SS	19,00 ±3,05	3,42 ±1,27	2,14 ± 1,07	5,42 ±1,72	2,43± 0,79
Grup III	ORT ±SS	9,57 ±2,37	5,85 ±1,06	2,29 ± 1,25	1,28 ±0,95	0,43 ±0,53
Grup IV	ORT ±SS	18,28± 3,35	4,85 ±1,21	1,71± 1,11	4,00 ±2,38	1,71± ,95
Grup V	ORT ±SS	12,48 ±1,81	4,85 ±1,77	1,14 ± 0,38	2,85 ±1,07	1,43 ±0,98
<b>p değeri</b>		0,001	0,54	0,078	0,001	0,001

Ortalama (ORT), standart sapma (SS).

Beş grup arasında primordiyal follikül, unilaminar primer follikül, multilaminar primer follikül, sekonder follikül, graaf follikül sayıları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık gözlemlendi (Şekil 2 ve Şekil 3). Sol ve sağ ovaryum primordiyal follikül sayılarının gruplar arası karşılaştırmalarında anlamlı farklılık görülürken, unilaminar ve multilaminar follikül sayıları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi. Sol ve sağ ovaryum sekonder ve graaf follikül sayılarının gruplar arası karşılaştırmalarında anlamlı farklılık görülmemiştir (Şekil 2 ve Şekil 3'de belirtildi).

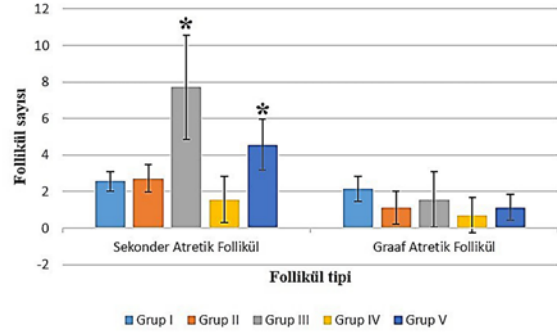
**Şekil 2.**

Gruplara ait sol ovaryum follikül sayıları

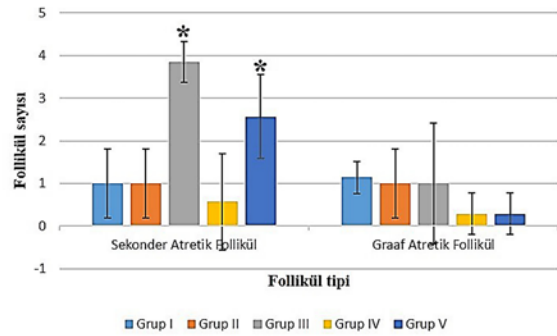
**Şekil 3.**

Gruplara ait sağ ovaryum follikül sayıları

Sol ve sağ ovaryum sekonder atretik follikül sayılarının gruplar arası karşılaştırmalarında anlamlı farklılık görülürken, graaf atretik follikül sayıları değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi (Şekil 4 ve Şekil 5).

**Şekil 4.**

Gruplara ait sol atretik follikül sayıları

**Şekil 5.**

Gruplara ait sağ atretik follikül sayıları

**Tablo V.** H&E boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait atretik follikül sayıları

	Sol ovaryum		Sağ ovaryum		
	Sekonder Atretik Follikül	Graaf Atretik Follikül	Sekonder Atretik Follikül	Graaf Atretik Follikül	
Grup I	ORT ±SS	2,57±0,53	2,14±0,69	1,00±0,81	1,14±0,38
Grup II	ORT ±SS	2,71±0,75	1,14±0,90	1,00±0,81	1,00±0,81
Grup III	ORT ±SS	7,71±2,87	1,57±1,51	3,85±0,48	1,00±1,41
Grup IV	ORT ±SS	1,57±1,27	0,71±0,95	0,57±1,13	0,29±0,49
Grup V	ORT ±SS	4,57±1,40	1,14±0,69	2,57±0,98	0,29±0,49
<b>p değeri</b>		0,001	0,108	0,001	0,128

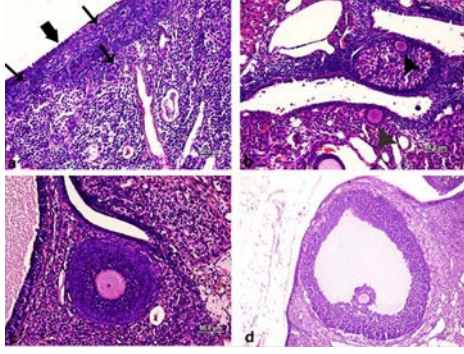
Ortalama (ORT), standart sapma (SS).

### Işık Mikroskopik Bulgular

Kontrol (Grup I ve Grup II) ve deney (Grup III, Grup IV, Grup V) gruplarına ait morfolojik değerlendirme H&E boyaması yapılmış ovaryum dokusu preparatlarında gerçekleştirildi. Grup I, Grup II ve Grup IV'teki ovaryumların yüzeyi germinatif epitel olarak adlandırılan tek katlı kübik ya da yassı epitel ile döşeliydi.

## Doksorubisin Toksikitesinde Dialil Disülfidin Etkisi

Germinatif epitel ile korteks arasında sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea yer almaktaydı. Farklı büyüklükte olan primordiyal, primer, sekonder, graaf ve daha önceki siklusa ait atretik follikülleri korteks stromasına dağılmış olarak görüldü. Grup II ve Grup IV'te Grup I'e benzer olarak follikül sayısında bir kayıp olmadığı, primordiyal follikül sayısı ve morfolojilerinin korunduğu, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder ve graaf folliküllerin normal morfolojiye sahip oldukları görüldü (Şekil 6).

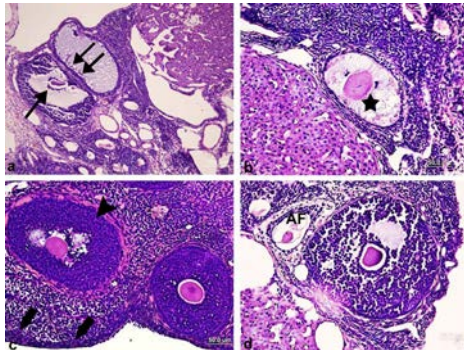


Şekil 6.

Kontrol (Grup I ve Grup II) ve deney (Grup IV) gruplarına ait ovaryum dokusunun histolojik görünümü. a) Germinatif epitel (kalın ok), primordiyal follikül (ince ok). b) Unilaminar primer follikül (ok başı). c) Multilaminar primer follikül. d) Graaf follikül.

Grup III ve Grup V'de farklı matürasyon aşamalarındaki folliküllerin hepsinin sayılarında belirgin azalma görülürken, atretik follikül sayılarında artış gözlemlendi (Şekil 7). Sekonder ve graaf folliküllerin antral boşluklarında ölü granuloza hücre artıkları ile debrisler görüldü. Grup III'de farklı gelişim aşamasında olan follikül sayılarının Grup I'e göre azaldığı ve morfolojilerinin bozulduğu gözlemlendi (Şekil 7a-7b).

Grup V'de dialil disülfid uygulanması ile folliküllerde Grup III'e kıyasla gelişmekte olan primordiyal folliküller ile total follikül sayısında artış olduğu ve apoptotik görünümlü hücre sayısında azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 7c-7d).

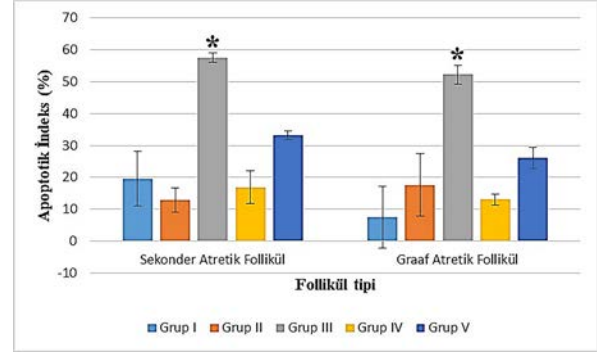


Şekil 7.

Deney (Grup III ve Grup V) gruplarına ait ovaryum dokusunun histolojik görünümü a) Apoptotik hücre (ince ok). b) Dejenere oosit (yıldız). c) Sekonder follikül (ok başı), primordiyal folliküller (kalın ok). d) Atretik follikül (AF).

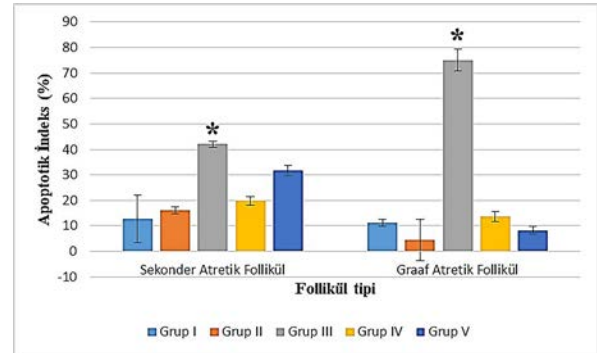
## TUNEL Bulguları

Tüm gruplara ait sol ve sağ ovaryumda TUNEL yöntemi ile değerlendirilen apoptotik indeks (Aİ)'e ait ortalama, standart sapma değerleri Tablo VI'da verildi. Beş gruba ait sol ve sağ ovaryumdan alınan doku kesitlerinde sekonder atretik ve graaf atretik folliküllerde gruplar arası Aİ'de istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (Şekil 8 ve Şekil 9).



Şekil 8.

Gruplara ait sol ovaryum apoptotik indeks (Aİ) grafiği



Şekil 9.

Gruplara ait sağ ovaryum apoptotik indeks (Aİ) grafiği

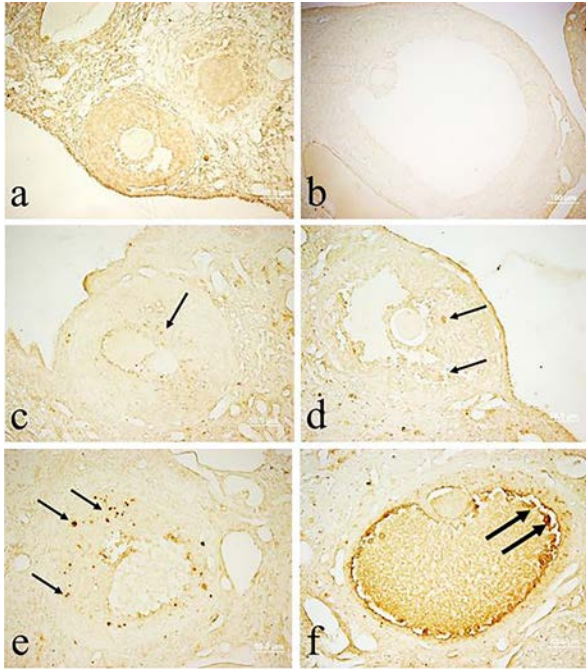
Tablo VI. TUNEL boyaması sonrası değerlendirilen kesitlerde, gruplara ait apoptotik indeks yüzdesi

		Sol ovaryum		Sağ ovaryum	
		Sekonder Atretik Follikül	Graaf Atretik Follikül	Sekonder Atretik Follikül	Graaf Atretik Follikül
Grup I	ORT ±SS	19,57±8,54	7,42±9,64	12,71±9,39	11,14±1,44
Grup II	ORT ±SS	12,85±3,76	17,57±9,82	16,00±1,38	4,57±8,14
Grup III	ORT ±SS	57,57±1,52	52,28±2,95	42,00±1,16	75,00±4,33
Grup IV	ORT ±SS	16,86±5,21	13,00±1,64	19,71±1,73	13,57±2,02
Grup V	ORT ±SS	33,14±1,28	26,00±3,28	31,71±1,88	8,28±1,43
p değeri		0,001	0,049	0,004	0,019

Ortalama (ORT), standart sapma (SS).

Sonuç olarak, doksorubisin uygulanan hayvanların ovaryum doku korteks ve medulla stromasında ve gelişmekte olan folliküllerin granüloza hücrelerinde apoptotik aktivasyona neden olduğu ve diğer gruplara göre atretik follikül sayılarında istatistiksel olarak artış olduğu görüldü. Doksorubisin sonrasında dialil disülfid uygulanan hayvanların ovaryum doku korteksinde, medulla stromasında ve gelişmekte olan folliküllerin granüloza hücrelerinde apoptotik aktivasyonun ve atretik follikül sayılarının istatistiksel olarak azaldığı gözlemlendi.

TUNEL boyama sonrası ovaryan folliküllerin apoptotik aktivasyonuna göre 0-2 arasında skorlamasına örnek olarak, sekonder follikül ve graaf follikül örneği verildi (Şekil 10).



Şekil 10.

Ovaryum dokusu TUNEL boyama sonrası skorlama a) Skor 0 sekonder follikül. b) Skor 0 graaf follikül. c) Skor 1 sekonder follikül. d) Skor 1 graaf follikül. e) Skor 2 sekonder follikül. f) Skor 2 graaf follikül. TUNEL pozitif hücre (siyah ok).

## Tartışma

Kemoterapötik ilaçların ve radyoterapi tedavilerinin üreme sistemi üzerine önemli olumsuz etkileri olduğu bildirilmiştir. Tedavi sonrası karşılaşılan bu olumsuz etkinin boyutu kemoterapötik ilaçların sitotoksik potansiyeline, dozuna, süresine ve hastanın yaşına bağlı olarak değişebilmektedir.<sup>14</sup> Primordiyal follikül sayısı ovaryan rezervin en önemli belirteçidir.<sup>15,16</sup> Primordiyal follikülleri etkileyen herhangi bir toksik ajan infertiliteye neden olabilmektedir.<sup>14</sup> Kemoterapötik ilaçlar ve radyoterapi tedavilerinin prematür ovaryan yetmezlik oluşumunu tetikleme oranı yüksektir. Bu ilaçlar

tüm vücudu etkilediği gibi ovaryumun da apoptozis ile uyarılmasına ve gelişmekte olan oosit hücrelerinin hasarlanmasına neden olur.<sup>15</sup> Yaygın follikül kaybı ve ovaryan fibrozis kemoterapi sonrası meydana gelen ovaryan hasarın en belirleyici göstergesidir. Bununla birlikte kemoterapi uygulamalarının ovaryan stromal hücrelere, özellikle teka ve granüloza hücrelerine verdiği hasar da göz ardı edilemez.<sup>15,16</sup> Doksorubisin, en önemli ve en sık kullanılan kemoterapötik ajanlardan birisidir. Sarkomların, karsinomların, akut lenfositik lösemilerin ve lenfomaların tedavisinde uygulanmaktadır.<sup>16,17</sup> Doksorubisin, hücre tipine göre farklı etki gösteren antrasiklin grubu antibiyotikler sınıfındadır. Bu etkiler, hücre siklusunun S ve G2 evrelerinde belirgin olarak görülmektedir. Bu ilaçlar birbirine yakın baz çiftleri arasına girerek DNA ve RNA sentezini inhibe ederler, böylece apoptozis yolu ile hücre ölümünü uyarırlar.<sup>18,19</sup>

Doksorubisin ovaryum korteksinde daha fazla birikmekte, ovaryumda stromal ve kollajen yapısını etkilemektedir.<sup>20</sup> Folliküllerde oosit ve granüloza hücrelerinde meydana gelen hasarlar follikül atrezisine yol açabilir. Primordiyal folliküllerde teka hücre tabakası olmadığı için ovaryumdaki hasardan daha fazla etkilenmektedir.<sup>21</sup> Bu çalışma kapsamında da, sıçanlarda doksorubisinin gonadotoksisiteyi uyardığı ve her iki ovaryum dokusunun follikülleri değerlendirildiğinde; primordiyal follikül sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğu görüldü. Primordiyal follikül sayısındaki bu azalmanın bazal atrezi nedeni ile meydana gelen follikül kaybı kaynaklı olabileceği düşünüldü.

Teka hücrelerinde daha fazla Doksorubisin birikimi nedeniyle çift iplikli DNA'da kopma meydana gelir. Teka hücrelerinin granüloza hücrelerini etkilemesi nedeniyle granüloza hücrelerinde de çift iplikli DNA'da kopma meydana gelmektedir.<sup>22</sup> Bu çalışma kapsamında gelişmekte olan folliküller arasında, unilaminar ve multilaminar primer folliküllerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen, sekonder ve graaf follikül sayılarında anlamlı oranda azalma saptandı. Sekonder ve graaf folliküllerdeki sayısal azalmaların granüloza hücre apoptozisinde aktarılan yollardan antral atrezi ve terminal farklılaşma apoptozisi nedeni ile olabileceği düşünüldü. Bu azalmanın bir nedeninin de apoptoziste etkili ROS yolağının sekonder ve graaf follikül hücrelerinde sayı fazlası olması nedeniyle oosit ve granüloza hücre etkileşimini, besin alışverişini ve steroidogenez mekanizmasını bozarak follikül kaybında daha etkili olduğunu düşündürdü.

Ayrıca bu çalışmada, doksorubisinin gastrointestinal sistem üzerinde toksik etkisine bağlı olarak deney hayvanlarında gelişen anoreksiya ve buna bağlı vücut ağırlığında anlamlı bir azalma saptandı.

Bu çalışmada olduğu gibi Maltaris ve ark.<sup>14</sup> tarafından doksorubisinin ovaryum rezervi üzerine olumsuz

## Doksorubisin Toksisitesinde Dialil Disülfitin Etkisi

etkileri bulunduğu, doksorubisin verilen fare grubunda, ovaryum follikül sayılarında azalma ve dejenere follikül sayılarında anlamlı artış ile gösterilmiş ve bu çalışmada olduğu gibi TUNEL yöntemi ile folliküler apoptozis belirlenmiştir. Doksorubisinin fare ovaryan toksisitesinin granüloza hücreleri üzerindeki etkisi immünohistokimyasal, RT-PCR analizleriyle de desteklenmiştir.<sup>14</sup> Bir diğer araştırmacı grubu tarafından doksorubisinin kadının üreme ve endokrin fonksiyonlarını destekleyen üç önemli faktör olan folliküler gelişim, hormon salgılanması ve oosit matürasyonu üzerinde doza bağlı toksisiteye sebep olduğu bildirilmiştir.<sup>20</sup>

Bu çalışmada da, doksorubisin uygulanan sıçanların ovaryum doku korteks ve medulla stromasında ve gelişmekte olan folliküllerin granüloza hücrelerinde TUNEL pozitifliği elde edildi. Böylece doksorubisinin apoptotik aktivasyona neden olduğu ve diğer gruplarla karşılaştırıldığında atretik follikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı artış olduğu görüldü.

Kanser tedavisi öncesinde ve sonrasında fertilitenin korunması amacıyla çeşitli medikal ve cerrahi yöntemler kullanılmakta ve bu yöntemlerin koruyucu etkileri net olmamakla birlikte, uzun etkili gonadotropin analogları, GnRH antagonistleri, antioksidanlar ovaryum rezervini korumak amaçlı kullanılmaktadır.<sup>23</sup>

Hücrelerin zarar görmesini önlemek için ROS düzeylerinin antioksidanlar ile dengede tutulması gerekir. Bu denge bozulduğu zaman vücut antioksidan savunma sistemini devreye sokar. Antioksidanlar ROS'un neden olacağı hasarı önleyebilme ve hasarın onarılmasını sağlayabilmektedir. Alliin kokusuz organosülfür (OSC) prekürsörüdür ve *Allium* sebzelerinin depolanması sırasında doğal olarak birikir. OSC'ler alliin allicine ve *Allium* sebzelerini ezme, çiğneme veya kesme aracılığıyla vakuollerden salınan alliaz aracılığıyla alkil alken-thiosulfınatlarla dönüşmesiyle oluşmaktadır. Allisin ve ilgili tiyosülfinatlar, oldukça dengesizdir ve anında dialil sülfid (DAS), dialil disülfit (DADS), dialil trisülfit (DATS), diditinler ve ajoen dâhil olmak üzere çeşitli sülfür bileşikleri elde etmek için ayrıştırılır. Bunlardan dialil disülfit yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir.<sup>24</sup> Bu çalışmada dialil disülfit uygulandığında, doksorubisinin gonadotoksik etkisine karşı koruyucu etki sağladığı hem ışık mikroskopik hem de istatistiksel olarak görüldü. Bu etki vücut ağırlığındaki artışla birlikte, primordiyal ve gelişmekte olan follikül sayısında korunma ve atretik follikül sayısında azalma şeklinde görülmektedir. Doksorubisin ile birlikte verilen dialil disülfitin ovaryumda oluşan bu hasarı yukarıda tanımlanan antioksidan etkisi ile azaltabileceği ve ovaryan follikül rezervini korumakta kullandığı yollardan birinin ROS/antioksidan dengesine yaptığı etki olduğu sonucuna varıldı.

Dolayısıyla dialil disülfitin doksorubisine bağlı gonadotoksistide primordiyal follikül ve gelişmekte olan folliküller seviyesinde tedavi edici bir etki gösterdiği,

gonadotoksik etkisi bilinen doksorubisinin meydana getirdiği ovaryum doku hasarını ve folliküler kaybı azalttığı, ovaryan rezervi korumak amacıyla dialil disülfit tedavisinin olumlu sonuçlar verdiği bu çalışma kapsamında gösterilmiştir. Dialil disülfitin bu olumlu etkisinin; doksorubisinin hücre içerisinde ROS birikimi ile birlikte DNA hasarına neden olarak follikül granüloza hücrelerinde ve stromal hücrelerde oluşturduğu apoptotik aktivasyonun, dialil disülfitin hücre içerisindeki serbest oksijen radikallerini minimum düzeye indirerek normal ovaryum dokusundaki gelişmekte olan follikülleri kemoterapötik ajanların toksik etkisinden koruyabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışma doksorubisin kemoterapisi sonrasında oluşan ovaryan toksistide dialil disülfitin koruyucu etkisinin olduğunu göstermektedir. Kemoterapi sonrası uygulanacak dialil disülfit tedavisinin hem gelişmekte olan follikülleri hem de primordiyal follikül havuzunu korumada etkili olabileceği gösterilmekle birlikte, fertilitiyi korumaya yönelik yaklaşımlara alternatif bir tedavi olarak literatürde yer alması için ek çalışmalara gerek vardır.

## Kaynaklar

1. Mohan P, Rapoport N. Doxorubicin as a Molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking. *Mol Pharm*. 2010;7(6):1959-73.
2. Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G et al. Adriamycin, 14-Hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peuceetius* var. *caesius*. *Biotechnol Bioeng*. 2000;67(6):704-13.
3. Bendale Y, Bendale V, Paul S. Evaluation of cytotoxic activity of platinum nanoparticles against normal and cancer cells and its anticancer potential through induction of apoptosis. *Integr Med Res*. 2017;6(2):141-48.
4. Vallejo MJ, Salazar L, Grijalva M. Oxidative Stress Modulation and ROS-Mediated Toxicity in Cancer: A Review on In Vitro Models for Plant-Derived Compounds. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;doi:10.1155/2017/4586068.
5. Louis J, Limarzi LR, Best WR. Treatment of Chronic Granulocytic Leukemia with Myleran. *A.M.A Archives of Internal Medicine*. 1957;97(3):299-08.
6. Falcone T, Attaran M, Bedaiwy MA, Goldberg JM. Ovarian Function Preservation in the Cancer Patient. *Fertil Steril*. 2004;81(2):243-57.
7. Blumenfeld Zeev. Chemotherapy and Fertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2012;26(3):379-90.
8. Irving-Rodgers HF, Krupa M, Rodgers RJ. Cholesterol Side-Chain Cleavage Cytochrome P450 and 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase Expression and the Concentrations of Steroid Hormones in the Follicular Fluids of Different Phenotypes of Healthy and Atretic Bovine Ovarian Follicles. *Biol Reprod*. 2004;69(6):2022-28.
9. Adaki S, R Adaki, K Shah, Karagir A. Garlic: Review of Literature. *Indian J Cancer*. 2014;51(4):577-81.
10. Xiao S, Zhang J, Liu M, Iwahata H, Rogers HB, Woodruff TK. Doxorubicin Has Dose-Dependent Toxicity on Mouse Ovarian Follicle Development, Hormone Secretion, and Oocyte Maturation. *Toxicol Sci*. 2017;157(2):320-29.

11. Pedraza-Chaverrí J, González-Orozco AE, Maldonado PD, Barrera D, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R. Diallyl Disulfide Ameliorates Gentamicin-Induced Oxidative Stress and Nephropathy in Rats. *Eur J Pharmacol.* 2003;473(1):71-78.
12. Ross MH, Pawlina W. *Histology A Text And Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology.* 6th edition. LWW. 2011. 833-837.
13. Losa M, Barzaghi RL, Mortini P, Franzin A, Mangili F, Terreni MR, Giovanelli M. Determination of the Proliferation and Apoptotic Index in Adrenocorticotropin-Secreting Pituitary Tumors Comparison between Micro- and Macroadenomas. *Am J Pathol.* 2000;156(1):245-51.
14. Maltaris T, Seufert R, Fischl F et al. The Effect of Cancer Treatment on Female Fertility and Strategies for Preserving Fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2007; 130(2):148-55.
15. Oktem O, Oktay K. A Novel Ovarian Xenografting Model to Characterize the Impact of Chemotherapy Agents on Human Primordial Follicle Reserve. *Cancer Res.* 2007;67(21):10159-62.
16. Oktay K, Sönmez M. Chemotherapy and Amenorrhea: Risks and Treatment Options. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008;20(4):408-15.
17. Lass A. Assessment of Ovarian Reserve. Is There Still a Role for Ovarian Biopsy in the Light of New Data?. *Hum Reprod.* 2004;19(3):467-69.
18. La Ferla B, Airoidi C, Zona C et al. Natural Glycoconjugates with Antitumor Activity. *Nat. Prod. Rep.* 2011; 28(3):630-48.
19. Thorn CF, Oshiro C, Marsh S et al. (2011) Doxorubicin Pathways: Pharmacodynamics and Adverse Effects. *Pharmacogenet Genom.* 2011;21(7):440-46.
20. Xiao S, Zhang J, Liu M, Iwahata H, Rogers HB, Woodruff TK. Doxorubicin Has Dose-Dependent Toxicity on Mouse Ovarian Follicle Development, Hormone Secretion, and Oocyte Maturation. *Toxicol Sci.* 2017;157(2):320-29.
21. Yuçebilgin MS, Terek MC, Ozsaran A et al. Effect of Chemotherapy on Primordial Follicular Reserve of Rat: An Animal Model of Premature Ovarian Failure and Infertility. *Aust Nz J Obstet Gyn.* 2004;44(1):6-9.
22. Roti Roti, E.C, Salih, S.M. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced injury in mouse ovarian cells. *Biol Reprod.* 2012;86(3):96.
23. Blumenfeld Z. How to Preserve Fertility in Young Women Exposed to Chemotherapy? The Role of GnRH Agonist Cotreatment in Addition to Cryopreservation of Embrya, Oocytes, or Ovaries. *Oncologist.* 2007;12(9):1044-54.
24. Block E. The Chemistry of Garlic and Onions. *Sci Am.* 1985;252(3):114-19.