

Şilajitin yumurtalıklarda radyasyona bağlı apoptozu önleyici etkisinin değerlendirilmesi

Mete Kececi1 • Meryem Akpolat1 • Kanat Gulle1 • Ercan Gencer2 • Ahmet Sahbaz3

Geliş Tarihi: 4 Ağustos 2015 / Kabul Tarihi: 13 Ekim 2015 / Online Yayın Tarihi: 3 Kasım 2015
Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Soyut

Amaç Kanser, gelişmiş ülkelerde çocuklarda ikinci önde gelen ölüm nedenidir ve çocukluk çağı malignitelerinin çoğu kemo-radyoterapi ile tedavi edilebilir.

Radyasyon tedavisi kanser hastalarında başarılı bir tedavi yöntemi olmasına rağmen çeşitli yan etkileri vardır.

Özellikle gonadlar çok hassastır ve radyasyona bağlı hasara eğilimlidir. Radyasyon, foliküler hücrelerin apoptozunu ve kromozomal hasarı ve oksidatif stresi tetikleyerek yumurtalıkları bozar. Hindistan, Rusya ve dünyanın diğer bölgelerinde geleneksel bir tıbbi ilaç olan Shilajit, çeşitli antioksidan maddeler içerir ve ovoidenik etkilere sahiptir. Şilajitin radyasyona bağlı yumurtalık hasarını önleme yeteneğini değerlendirmek.

Yöntemler Kırk adet Wistar albino dişi rat kontrol grubu, shilajit grubu, sadece radyasyon grubu ve radyasyon ? shilajit grubu. Radyasyona maruz kaldıktan dört gün sonra sıçanlar sakrifiye edildi ve yumurtalıklar çıkarıldı ve immüno-histopatolojik olarak değerlendirildi.

Bulgular Gruplar arasında folikül sayılarında (primordial, primer, preantral, antral ve atretik foliküller) istatistiksel olarak anlamlı fark vardı (p<0.001). Sadece radyasyon uygulanan grupta tüm evrelerdeki hemen hemen tüm foliküller atretik iken, normal görünümlü primordial foliküller

radyasyonda algılandı mı? shilajit grubu. Radyasyonda mı? Shilajit grubu, p53, Bax ve caspase 3 ekspresyonu sadece radyasyon uygulanan grup foliküllere göre daha az yoğundu.

Sonuç Bu, shilajitin radyasyona bağlı yumurtalık hasarını önleme üzerindeki etkilerini değerlendiren ilk bildirilen çalışmadır. Shilajit, p53, Bax ve kaspa 3'ün ekspresyonunu azaltarak apoptotik yolları bloke eder.

Shilajit'in özellikle ilkel folikülleri koruduğu bulundu.

Anahtar Sözcükler Apoptoz Folikülogenez İyonlaştırıcı radyasyon Oksidatif stres Sıçan yumurtalığı Shilajit

Giriş

Kanser, gelişmiş ülkelerdeki çocuklarda ikinci önde gelen ölüm nedenidir [1]. Lösemi, lenfoma, Wilms tümörü, rabdomiyosarkom, merkezi sinir sistemi tümörleri ve germ hücreli tümörler, çocukluk çağı malignitelerinin çoğunluğunu oluşturur ve çoğu kemo-radyo tedavisi ile tedavi edilebilir [2, 3]. Radyoterapi, kanser yönetiminde en yaygın tedavi yöntemlerinden biridir ve kanserli hastaların %50'sinden fazlası, tedavileri sırasında radyoterapiye ihtiyaç duyar [4]. Radyasyon tedavisi kanser hastalarında başarılı bir tedavi yöntemi olmasına rağmen, pulmoner, hepatik, kardiyak ve üreme sistemleri (testisler ve yumurtalıklar) gibi sağlıklı dokular üzerinde de uzun vadeli birçok yan etkisi vardır [5-7]. Yumurtalıklar çok hassastır ve radyasyona bağlı hasara yatkındır, bu da erken menopoza, osteoporoz, kısırlığa, psikolojik sorunlara ve yaşam kalitesinin bozulmasına neden olarak hastanın hayatını olumsuz etkileyebilir.

Radyasyon, iyonlaşma ve reaktif oksijen türevlerinin oluşumu yoluyla hasara neden olur. Radyasyon sadece zarar vermez

& Ahmet Sahbaz

drsahbazahmet@yahoo.com

- 1 Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Bülent Ecevit Üniversite Tıp Fakültesi, Zonguldak, Türkiye
- 2 Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, Zonguldak, Türkiye
- 3 Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı ve Histoloji ve Embriyoloji, Bülent Ecevit Üniversitesi Tıp Fakültesi, Zonguldak, Türkiye

dokuları oksidatif strese maruz bırakır, ancak sitokrom c ve kaspaz yolunun aktivasyonu yoluyla apoptozu indükleyerek de hasara neden olur [8-10]. 2 Gy radyasyonun yumurtalık rezervinin yarısını tükettiği ve çocuklarda 10-20 Gy, erişkinlerde 4-6 Gy radyasyon dozlarının yumurtalık fonksiyonunun kalıcı olarak durmasına neden olabileceği bildirilmiştir [11, 12]. Radyasyonun foliküler hücrelerin apoptozunu ve kromozomal hasarı tetikleyerek yumurtalıkları bozduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir [13-15]. Birçok çalışma, çeşitli antioksidanların etkilerini değerlendirmiştir.

yumurtalıklarda radyasyon hasarının önlenmesinde melatonin, selenyum, sfingosin ve resveratrol gibi ajanlar [16-19].

Shilajit (silaras adrija, girija, asfalt ve mineral zifti olarak da bilinir) Hindistan, Rusya ve dünyanın diğer bölgelerinde geleneksel tıpta tıbbi bir ajan olarak kullanılmıştır. Shilajit, kaya köklerinden sızan organik maddeler, bitkisel ve mikrobiyal metabolitlerin bir karışımından oluşur [20]. Shilajit, benzoik asit, yağ asitleri ve B1 ve B12 gibi vitaminleri ve diğer çeşitli antioksidan ajanları içerir [21-23]. Shilajit, binlerce yıldır hipertansiyon, anemi, kusma ve çeşitli nörolojik hastalıklar gibi çok çeşitli hastalıkları tedavi etmek için ve bir immün modülatör olarak kullanılmıştır ve ayrıca antioksidatif, spermatojenik ve ovojenik etkilere sahiptir [24]. -26]. Shilajitin güvenliği iyi çalışılmıştır ve genellikle güvenli bir madde olarak kabul edilir [27, 28]. Shilajit çeşitli antioksidan ajanlar içerdiğinden ve ovojenik etkiler bildirdiğinden, shilajitin radyasyon kaynaklı yumurtalık hasarını iyileştirme yeteneğini değerlendirdik.

Malzemeler ve yöntemler

Hayvanlar

Bülent Ecevit Üniversitesi Hayvan Bakım ve Araştırma Birimi'nden (Zonguldak, Türkiye) Wistar albino ratlar (prepubertal, dişi, 90 ± 10 g) temin edildi. Hayvanlar standart koşullarda (20 ± 1 C oda sıcaklığı, % 60 ± 10 nem ve 12/12 saat aydınlık/karanlık döngüsü) düzenli kafeslerde barındırıldı ve yiyeceklere serbest erişimleri sağlandı (Gebze Gıda Fabrikası, Kocaeli, Türkiye) ve su. Tüm deneyler, ABD Halk Sağlığı Servisi tarafından yayınlanan Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzuna uygun olarak yapılmıştır. Çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Kurumsal Hayvan Etik Kurulu tarafından onaylandı (Zonguldak, Türkiye; 2012-20-00-33).

DeneySEL tasarım

Kırk Wistar albino dişi sıçan aşağıdaki gibi dört gruba ayrıldı:

Kontrol grubu (n=10): çalışma boyunca herhangi bir tedavi uygulanmadı.

Shilajit grubu (n=10): 100 mg/kg/gün Shilajit çalışma boyunca oral olarak uygulandı.

Sadece radyasyon grubu (n=10): Tek doz 8.3 Gy tüm vücut radyasyonu uygulandı.

Radyasyon mu? Shilajit grubu (n=10): 100 mg/kg/gün Shilajit radyasyondan (8.3 Gy tüm vücut radyasyonu) önce 10 gün (gün aşırı) uygulandı ve radyasyondan sonra 4 gün (gün aşırı) devam edildi.

Tüm vücut ışınlanması

Radyasyon işlemi Bülent Ecevit Üniversitesi Radyasyon Onkolojisi Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. 1 mm dilimli bilgisayarlı tomografi (CT) taraması kullanılarak bir sıçan simülasyonu yapıldı ve Eclipse tedavi planlama sistemi (ver. 8.9; Varian Medical Systems, Palo Alto, CA, ABD) kullanılarak doz hesaplaması yapıldı. Çalışmanın 10. gününde tüm vücut radyasyonu için hayvanlara 10 mg/kg ksilazin ve 90 mg/kg ketamin ile anestezi uygulandı. Hayvanlar sırtüstü pozisyonda sabitlendi ve lineer bir hızlandırıcı (Clinac, Varian Medical Systems) kullanılarak 8.3 Gy'lik toplam vücut ışınlamasına maruz bırakıldı.

Radyasyona maruz kaldıktan dört gün sonra, sıçanlar öldürüldü ve yumurtalıklar disseke edildi ve sıçanlardan çıkarıldı.

çevreleyen dokular. Yumurtalıklar tartıldı ve her hayvan için mg/100 g cinsinden kaydedildi. Sağ overler biyokimyasal değerlendirme için -80 C'de saklandı ve sol overler histopatolojik değerlendirme için işleme alındı.

Işık mikroskopik prosedürler

Işık mikroskopik analiz için, yumurtalık numuneleri gece boyunca %10 formalinde sabitlendi ve parafin mumu bloklarına gömüldü, bunlardan 4-5 lm'lik kesitler kesildi ve hematoksilin ve eozin (H-E) ve periyodik asit-Schiff (PAS) ile boyandı. Preparasyonlar bir ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi (Carl Zeiss Axio Lab A1, Almanya).

Folikül sayımı

Yumurtalık folikül sınıflandırması Devine ve ark. [29]. Parafin mum bloklarından seri kesitler alındı. Tüm yumurtalık boyunca her beşinci bölüm H - E ile boyandı ve oositte bulunan çekirdeği olan foliküller kör bir şekilde sayıldı. Tüm bölümler tek yazar (MK) tarafından hazırlandı ve okuyucuya (MA) kör edildi. Yumurtalık başına folikül sayısı, daha önce açıklandığı gibi, beş düzeltme faktörü ile çarpılarak ve her bir yumurtalık için toplam kesit sayısına bölünerek tahmin edildi [30].

İmmünohistokimyasal değerlendirme

p53, Bax ve anti-caspase 3 (aktif) aktivitelerini araştırmak için kesitlere avidin-biotin kompleksi uygulandı. Parafin kesitleri, gece boyunca 55°C'de inkübe edildi, ksilen içinde deparafinize edildi ve bir dizi dereceli alkolle yeniden hidratlandı. Antijen geri kazanımı, kesitlerin 0.1 M sodyum sitrat içinde kaynatılmasıyla gerçekleştirildi. Kesitler, endojen per oksidaz aktivitesini inhibe etmek için %3 H2O2'ye daldırıldı. Kesitler daha sonra antikorların spesifik olmayan bağlanmasını bloke etmek için oda sıcaklığında 1 saat boyunca %10 normal keçi serumu ile inkübe edildi, ardından p53'ü hedefleyen birincil antikorlarla (Abcam, tavşan poliklonal IgG, Kat. #ab8105) inkübe edildi. aktif kaspaz 3 (Novus, tavşan poliklonal IgG, Kat. #NB100-56113) veya Bax (Chemicon, tavşan poliklonal IgG Kat.

#AB2915) 1 saat. Biotinlenmiş anti-tavşan antikor (Vector Laboratories, Burlingame, CA, ABD) oda sıcaklığında 30 dakika süreyle ilave edildi. Negatif kontroller, birincil antikor olmadan boyanmış doku kesitlerinden oluşuyordu. Antijen-antikor kompleksi, bir streptavidin-biotin-peroksidaz kiti (Vector Laboratories) kullanılarak saptandı. Son olarak, kesitler, immün etiketlemeyi görselleştirmek için bir 3,3-diaminobenzidin substrat kiti (DAB, Vector Laboratuvarları) kullanılarak geliştirildi ve Mayer'in hematoksileniyle karşıt boyama yapıldı. Preparasyonlar bir ışık mikroskobu kullanılarak değerlendirildi ve fotoğrafları çekildi (Carl Zeiss Axio Lab A1).

istatistiksel analiz

İstatistiksel analizler SPSS yazılımı (ver. 18.0; SPSS Inc., Chicago, IL, ABD) kullanılarak yapıldı. Değişkenler medyan (minimum-maksimum) olarak ifade edilir. Gruplar arasındaki farklılıklar Kruskal-Wallis testi kullanılarak analiz edildi. Anlamlı değerlere sahip gruplar arasındaki ikili karşılaştırmalar, Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanılarak değerlendirildi. P değerleri < 0.05, tüm testlerde istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sonuçlar

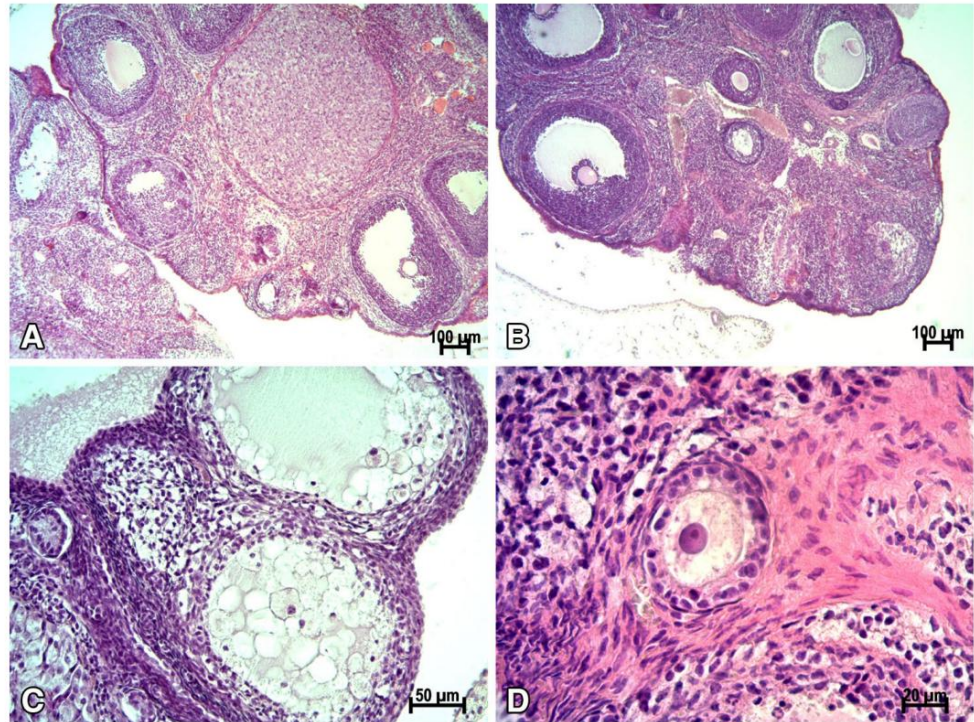
Deney boyunca, shilajit uygulaması nedeniyle hiçbir hayvan kaybedilmedi. Gruplar arasında vücut ağırlıkları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu (p[0.05).

histopatolojik bulgular

Kontrol ve shilajit grupları normal over morfolojik bulguları gösterdi (Şekil 1a, b). Ancak radyasyon grubunda foliküllerin tamamına yakını atretikti (Şekil 1c). Atretik foliküllerdeki granüloza tabakasının genel olarak gevşediği saptandı ve granüloza tabakasında çok sayıda piknotik çekirdek tespit edildi. Apoptotik cisimler hem antral hem de granüloza tabakasında bulundu. Primordial ve primer foliküllerin çoğunun eksik olduğu bulundu.

Şekil 1 Hematoksilen ve eozin boyama. a A Kontrol grubunda, normal görünümli foliküller, korpus luteum ve birkaç atretik folikül ile folikül gelişiminin farklı aşamaları görülebilir. b

kontrol grubu, shilajit grubunda normal görünümli foliküller görülebilmektedir. c Sadece radyasyon uygulanan grupta apoptotik cisimcikli birçok atretik folikül görülebilir. d Radyasyonda erken apoptotik değişiklikler görülebilse de? Shilajit grubu, özellikle ileri evre foliküllere sahip preantral foliküller, normal morfoloji gösterdi.



Tablo 1 Her gruptaki folikül sayıları

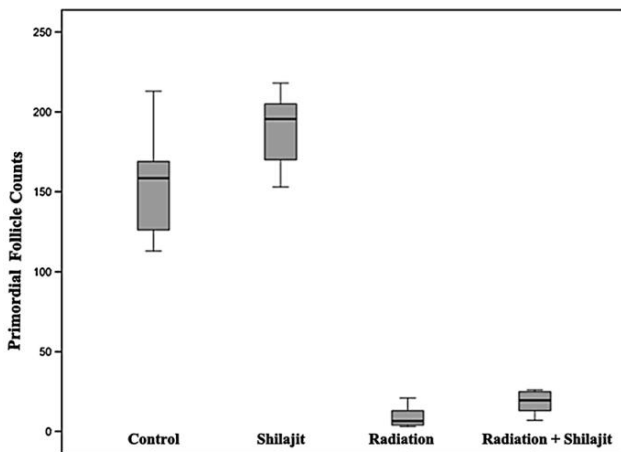
	Kontrol (n = 10) Medyan (min-maks)	Shilajit (n = 10) Medyan (min-maks)	Yalnızca radyasyon (n = 10) Medyan (min-maks)	Radyasyon mu Shilajit (n = 10) Medyan (min-maks)
ilkel foliküller	158,50 (113–213)a	195,50 (153–218)b	6,50 (3–21)c	19,50 (7–26)d
Birincil foliküller	34,50 (26–63)a 10,50	41,00 (30–57)a 12,50	2,50 (0–5)b	2,00 (0–5)b 3,00
ebeveyn	(6–18)a 5,00 (1–10)a	(7–19)a 6,00 (2–19)a	3,00 (1–5)b	(0–7)b 0,00 (0–
Antral	29,00 (21–35)a	28,00 (18–32)a	0,00 (0–3)b	1)b 92,50 (78–
Atretik			86,50 (56–95)b	105)b

Aynı harfler benzer grupları ifade eder. Min (minimum), maks (maksimum)

oositler. Sadece radyasyon uygulanan grupta tüm evrelerdeki hemen hemen tüm foliküller atretikti ve primordiyal folikül gözlenmedi. Radyasyon grubunun aksine preantral evredeki foliküller atrezinin erken evrelerindeydi ve radyasyonda da normal görünümü primordiyal foliküller saptandı? shilajit grubu (Şekil 1d).

Her grubun folikül sayıları Tablo 1'de verilmiştir ve primordiyal folikül sayıları Şekil 2'de gösterilmiştir. Gruplar arasında folikül sayılarında (primordiyal, primer, preantral, antral ve atretik foliküller) istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardı ($p < 0,001$). Primordiyal folikül sayısı sadece radyasyon ile radyasyon arasında istatistiksel olarak farklıydı? shilajit grupları ($p < 0,001$). Sadece radyasyon ile radyasyon arasında primer veya antral foliküllerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu? shilajit grupları ($p < 0,05$).

PAS boyama kullanılarak, kontrol ve sadece shilajit grubunda zona pellucida'nın bütünlüğü bozulmamışken, radyasyon grubunda zona pellucida'nın bütünlüğü kaybolmuştur. Radyasyonda mı? Shilajit grubunda, zona pellucida'nın bütünlüğü, sadece radyasyon grubuna kıyasla önemli ölçüde korunmuştur. Örneklerin PAS boyaması Şekil 3a-d'de gösterilmiştir.



Şekil 2 Her gruptaki primordiyal folikül sayısı

İmmünohistokimyasal bulgular

Numunelerin p53 boyaması, Şekil 4a-d'de gösterilmiştir. Kontrol ve shilajit gruplarında primordiyal veya primer folliküllerde p53 ekspresyonu saptanmadı. Yalnızca radyasyon uygulanan grupta primer foliküllerde güçlü p53, Bax ve kaspaz-3 ekspresyonu mevcuttu. Antral foliküllerde, özellikle antral bölge boyunca uzanan granüloza hücrelerinde yoğun p53, Bax ve kaspaz-3 ekspresyonu mevcuttu. Tekal katmanda sadece Bax ifadesi gözlemlendi. Örneklerin Bax ve kaspaz-3 boyamaları Şekil 1'de gösterilmiştir. 5 ve 6a-d.

Radyasyonda mı? Shilajit grubunda ekspresyon radyasyon grubuna göre daha zayıftı ve kısmen normal görünümü foliküllerin olması dikkat çekiciydi. Tekal tabakada ifade gözlenmedi. Bax ve kaspaz 3 ekspresyonu foliküllerde belirgin olmasına rağmen sadece radyasyon uygulanan grup foliküllere göre daha az yoğundu.

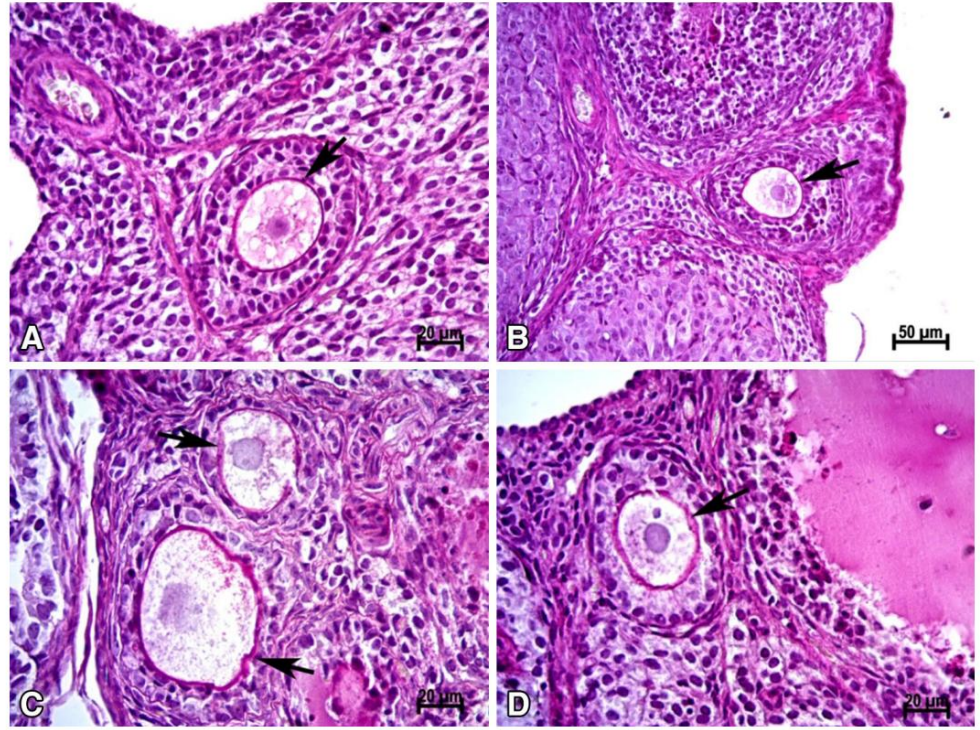
Tartışma

Radyasyon doğrudan veya iyonizasyon yoluyla oksidatif strese neden olarak apoptotik yolu tetikler. İyonlaştırıcı radyasyon tarafından oluşturulan serbest radikaller, mitokondriyal membran bütünlüğünü bozarak sitokrom c'yi iç mitokondriyal membrandan sizoze serbest bırakır ve ardından kaspaz aktivasyonu ile apoptozu tetikler.

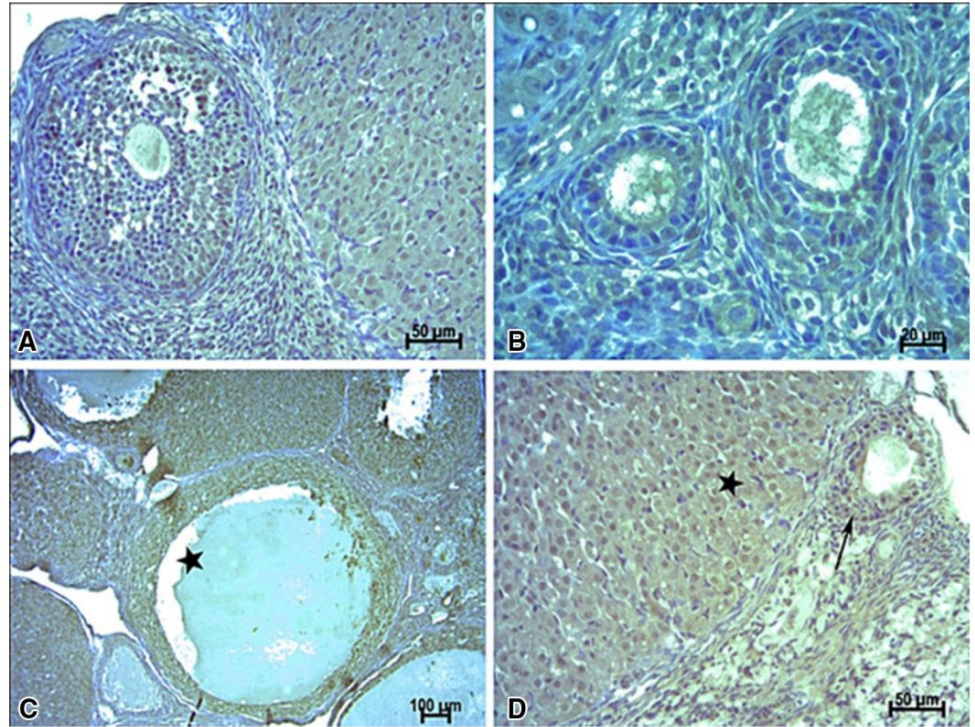
Ayrıca oksidanlar mitokondriyal bütünlüğü bozarak steroidogenezi olumsuz etkiler. Preantral ve antral foliküllerde apoptotik süreç daha da artar, çünkü gelişimleri steroidogeneze daha yüksek bir bağımlılık gösterir. Gelişimin steroidogeneze daha az bağımlı olduğu primordiyal foliküllerde, radyasyona bağlı oksidatif stresin shilajit tarafından azaltılması, bu çalışmada radyasyona maruz kaldıktan sonra primordiyal folikül sayısının önemli ölçüde daha yüksek korunmasına neden olmuştur. Radyasyonda preantral ve antral foliküllerde kısmen korunmuş foliküler morfoloji ve daha zayıf apoptotik belirteç ekspresyonu? shilajit grubuna karşı sadece radyasyon grubu öneriyor

Şekil 3 PAS boyama. a Kontrol grubunda zona pellucida'nın (ok) normal şekli açıktır. b Shilajit grubunda zona pellucida'nın şekli kontrol grubunda olduğu gibi normaldir. c Sadece radyasyon verilen grupta zona pellucida'nın harap görünümü belirgindir. d Radyasyonda zona pellucida'nın şekli zarar görmesine rağmen ? shilajit grubunda, bu gruptakinden daha normaldir.

sadece radyasyon grubu



Şekil 4 Tüm gruplarda p53 ekspresyonunun immünohistokimyasal gösterimi. a Kontrol grubu. b Yalnızca Shilajit grubu. c Sadece radyasyon grubunda, özellikle antral sınıra yakın granüloza hücrelerinde (Yıldız işareti), yoğun p53 ekspresyonu dikkat çekiciydi. d Yalnız radyasyon grubunun aksine, radyasyonda granüloza hücreleri ? shilajit grubu daha az yoğun p53 ifadesi gösterdi (ok)

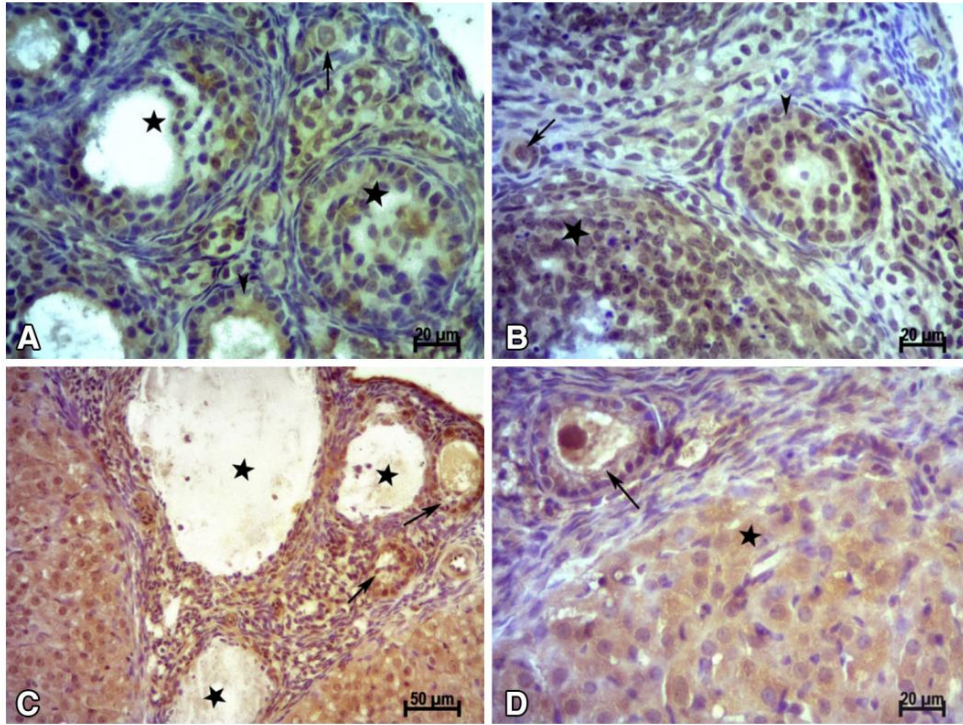


Shilajit'in bu aşamada yumurtalık foliküllerinde radyasyona bağlı hasarı iyileştirmede de etkili olduğu.

Radyasyon foliküler atreziyi hızlandırabilir [15].

Radyasyon apoptozu indükler ve foliküler fonksiyonu bozar [16]. Erken foliküler fazlar radyasyona karşı daha hassastır.

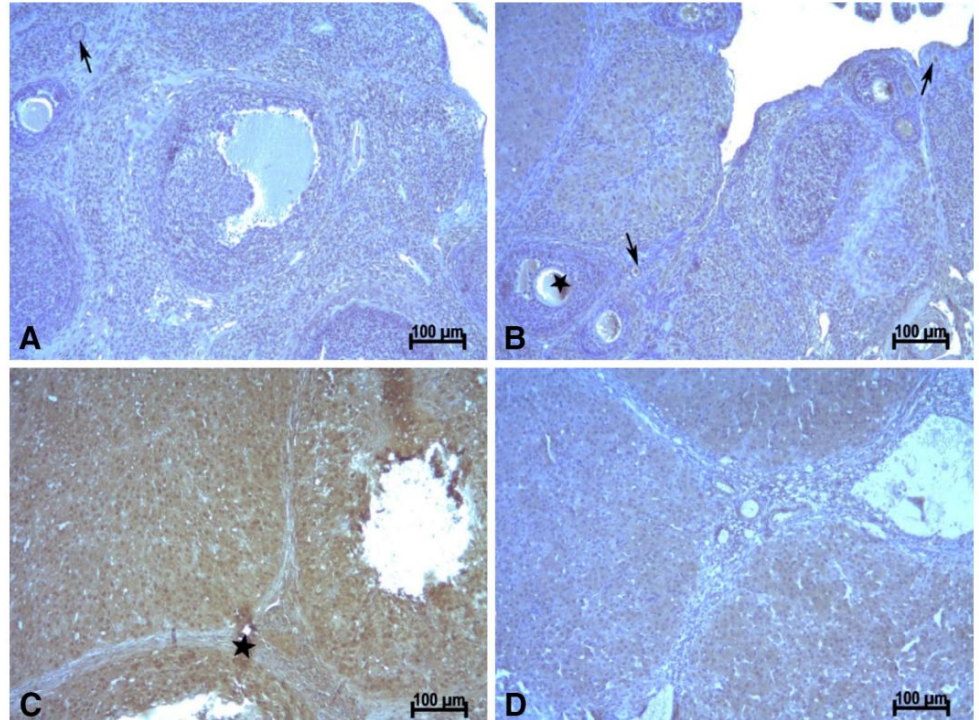
kaynaklı hasar [31]. Foliküler dejenerasyon, granüloza hücre apoptozu ile ilişkilendirilmiştir [29]. Foliküler apoptoz, hem proapoptotik faktörler (örn., p53, Bax, androjenler, oksidatif stres son ürünleri, tümör nekroz faktörü-a) hem de anti-apoptotik faktörler (örn.



Şekil 5 Tüm gruplarda Bax ifadesinin immünohistokimyasal gösterimi. a Primordiyal foliküllerdeki kontrol grubu granüloza hücrelerinde ekspresyon saptanmadı (ok). İleri evre foliküllerde granüloza hücrelerinde (yıldız işareti) hafif ekspresyon saptandı. Tekal katmanda ifade saptanmadı. b Shilajit grubu kontrol grubuna benzerdi. c Sadece radyasyon uygulanan grupta granüloza tabakasında ve korpus luteumda yoğun ekspresyon saptandı ve

tekal tabakada (farklı aşamalıdaki atretik foliküller (yıldız) ve preantral foliküller (oklar)). d Radyasyonda ? shilajit grubu, morfolojik olarak normale yakın preantral foliküller ve erken tekal tabaka görüldü; sadece radyasyon grubunun (ok) aksine daha zayıf ekspresyon saptandı. Bu grupta korpus luteum, yalnızca radyasyon grubunun aksine hafif ifade gösterir.

Şekil 6 Tüm gruplarda kaspaz-3 ekspresyonunun immünohistokimyasal gösterimi. a Kontrol grubu, normal görünümlü primer folikül (ok) ve ileri evre foliküllerde granüloza hücreleri; kaspaz-3 ifadesi saptanmadı. b Shilajit tek grup. Kontrol grubuna benzer şekilde shilajit grubunun granüloza hücrelerinde kaspaz-3 ekspresyonu saptanmadı. Antral folikül (yıldız), ilkel folikül (ok). c Sadece radyasyon uygulanan grupta granüloza tabakasında ve korpus luteumda yoğun ekspresyon saptandı. Tekal katmanda (yıldız işareti), ifade zayıftı, ancak kontrol ve shilajit gruplarından daha güçlüydü. d Radyasyonda Kaspaz-3 ifadesi ? shilajit grubu granüloza hücreleri, yalnızca radyasyon grubundakilerden daha zayıftı



östrojenler, gonodatropinler, insülin benzeri büyüme faktörü, Bcl-2, anti-oksidatif ajanlar) [32].

Yumurtalıklarda radyasyona bağlı hasarı önlemek için çeşitli ajanlar ve teknikler kullanılmıştır. Şimşek ve ark.'da, resveratrolün (iyi bilinen bir antioksidan ajan), muhtemelen oksidatif stresi azaltarak, radyasyonun yumurtalıklardaki toksik etkilerini önlemede etkili olduğu bulunmuştur [19]. Radyasyona maruz kalan hayvanlarda değerlendirilen diğer antioksidan maddeler arasında melatonin ve selenyum bulunmaktadır [16, 17]. Araştırmacılar, oksidatif stresle ilişkili maddelerin azaltılmasının radyasyona bağlı hasarın azaltılmasında faydalı olabileceği sonucuna vardı.

Çeşitli hastalıklar için eski bir ilaç olan Shilajit, antioksidan, bağışıklık modüle edici ve yaşlanma karşıtı etkileri nedeniyle son zamanlarda dikkatleri üzerine çekmiştir. Humus (% 60-80), benzoik asit, hippurik asit, yağ asitleri, ik tiyol, albüminoidler, dibenzo-a-pironlar, uçucu yağlar ve B1 ve B2 gibi çeşitli vitamin ve mineraller içerir [20-24].

Şilajitin ana fizyolojik etkilerinin, aktif bileşenler için taşıyıcı moleküller olan fulvik asit, hümmik asit ve dibenzo-a-pironların varlığına bağlı olduğuna inanılmaktadır [21]. Son zamanlarda hayvanlarda hem spermatojenik hem de ovojenik etkilere sahip olduğu bildirilmiştir [25, 26]. Foliküler gelişimi ve farklılaşmayı tetiklediği ve ovulasyon sıklığını arttırdığı gösterilmiştir [25].

Primordiyal folikül sayıları açısından radyasyon ? arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. sadece shilajit ve radyasyon grupları. Radyasyonda serum MDA değerleri daha düşük, TAC seviyeleri daha yüksek olmasına rağmen ? shilajit grubu ile sadece radyasyon grubuna göre farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi, bunun nedeni örnek toplama ve saklama teknikleri olabilir.

Grupların histopatolojik değerlendirmesinde over hasarı radyasyon grubunda en fazlaydı. Radyasyon grubunda foliküllerin tamamına yakını atretik idi. Radyasyonda en azından bazı normal görünümümlü ilkel foliküllere rastlandı mı? shilajit grubu. İleri evre foliküllerin çoğu apoptoz geçiriyor olsa da, bazıları apoptozun erken evrelerindeydi. Radyasyonda mı? Shilajit grubunda, sadece radyasyon grubuna kıyasla yumurtalık dokusu hasarı azaldı.

Bu çalışmada, dokulardaki p53, Bax ve kaspaz-3 ekspresyonunu değerlendirerek yumurtalık foliküllerindeki apoptotik süreci değerlendirdik. En yüksek ekspresyon radyasyon grubunda bulunurken, radyasyon ? Shilajit grubunda, bazı ilkel foliküller ifade göstermedi ve birkaç ileri evre folikül hafif ifade gösterdi.

Shilajit ile yumurtalık radyo-koruması, bileşenlerinin anti-oksidatif özellikleri ve bu çalışmada immünohistokimyasal olarak p53, Bax ve kaspaz 3'ün azalmış ekspresyonu ile gösterilen anti-apoptotik etkileri ile açıklanabilir.

Bu çalışmanın birkaç sınırlaması vardır. İlk olarak, farklı dozlarda shilajit değerlendirmedik. İkincisi, radyasyonun oksidatif strese neden olduğu açıkça bilinmesine rağmen, bu çalışmada serum oksidatif stresi ve antioksidan kapasitesini değerlendirmedik ve teknik zorluklar nedeniyle doku oksidatif stresi ve antioksidan kapasitesini değerlendiremedik. Dokuların bu şekilde değerlendirilmesi, oksidatif hasar için daha kesin değerler sağlayabilir. Üçüncüsü, shilajitin anti-apoptotik etkisi, yumurtalıklarda radyasyona bağlı hasarın korunması ve iyileştirilmesinde esas olmasına rağmen, kanser hücreleri üzerindeki etkisi değerlendirilememiştir. Bu nedenle, prospektif çalışmalarda kanser modellerinde shilajitin anti-apoptotik etkileri de değerlendirilmelidir.

Bildiğimiz kadarıyla bu, shilajitin radyasyona bağlı yumurtalık hasarının iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendiren ilk bildirilen çalışmadır. Shilajit'in özellikle primordiyal foliküllerdeki hasarın iyileştirilmesinde etkili olduğu bulundu. Daha yüksek dozlarla daha yüksek koruma sağlanıp sağlanamayacağını değerlendirmek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

Teşekkür Bu çalışma Bülent Ecevit Üniversitesi Bilimsel Araştırma Fonu (2012-20-00-33) tarafından finanse edilmiştir.

Etik standartlara uyum

Çıkar çatışması Yok.

Referanslar

1. Kaatsch P (2010) Çocukluk çağı kanseri epidemiyolojisi. *Cancer Treat Rev* 36(4):277–285 2. Bath LE, Hamish W, Wallace B, Critchley HOD (2002) Çocukluk çağı kanseri tedavisinin kadın üreme sistemi üzerindeki geç etkileri ve doğurganlığın korunması potansiyeli. *BJOG* 109(2):107–114
3. Miller RW, Young JL, Novakovic B (1995) Çocukluk çağı kanseri. *Yengeç* 75(1):395–405
4. Delaney G, Jacob S, Featherstone C, Barton M (2005) Kanser tedavisinde radyoterapinin rolü: kanıta dayalı klinik kılavuzların gözden geçirilmesinden optimal kullanımın tahmin edilmesi. *Cancer* 104(6):1129–1137 5. Hudson MM (2010) Çocukluk çağı kanserinden kurtulanlar için üreme sonuçları. *Obstet Gynecol* 116(5):1171–1183 6. Geenan M, Cardous-Ubbink M, Kremer L ve diğerleri (2007) Çocukluk kanserinden uzun süre kurtulanlarda olumsuz sağlık sonuçlarının tıbbi değerlendirmesi. *JAMA* 297(24):2705–2715
7. Oeffinger KC, Mertens AC, Sklar CA ve diğerleri (2006) Çocukluk çağı kanserinden kurtulan erişkinlerde kronik sağlık durumları. *N Engl J Med* 355(15):1572–1582 8. Shinomiya N (2001) Radyasyona bağlı apoptozda yeni kavramlar: 'premitotik apoptoz' ve 'postmitotik apoptoz'. *J Cell Mol Med* 5(3):240–253 9. Feinendegen LE (2002) Toksik maddelere karşı hücre yanıtlarında reaktif oksijen türleri. *Hum Exp Toxicol* 21(2):85–90 10. England K, Cotter TG (2005) Memeli hücrelerinde sinyal proteinlerinin doğrudan oksidatif modifikasyonları ve bunların apoptoz üzerindeki etkileri. *Redoks Rep* 10(5):237–245

11. Chemaitilly W, Mertens AC, Mitby P ve diğerleri (2006) Akut yumurtalık yetmezliği çocukluk kanseri hayatta kalma çalışmasında. *J Clin Endocrinol Metab* 91(5):1723–1728
12. Pouilles JM, Tremollieres F, Bonneau M, Ribot C (1994) Menopozda erken yaşın vertebral kemik kütlesi üzerindeki etkisi. *J Bone Miner Res* 9(3):311–315
13. Hendry JH, West CM (1997) Apoptoz ve mitotik hücre ölümü: normal doku ve tümör radyasyonuna göreceli katkıları
- cevap. *Int J Radiat Biol* 71(6):709–719
14. Chapman RM (1982) Sitotoksik tedavinin cinsellik ve gonadal fonksiyon. *Semin Onkol* 9(1):84–94
15. Kim JK, Lee CJ, Song KW, Do BR, Yoon YD (1999) c-Radyasyon olgunlaşmamış farelerde foliküler atreziiyi hızlandırır. *Vivo* 13(1):21–24
16. Kaya H, Delibaş N, Serteser M, Ulukaya E, Özkaya O (1999) Dişi sıçanlarda radyoterapi sırasında melatoninin lipit peroksidasyonu üzerindeki etkisi. *Strahlenther Onkol* 175(6):285–288
17. Abedelahi A, Salehnia M, Allameh AA (2008) Farklı konsantrasyonlarda sodyum selenitin serumsuz ve serum takviyeli besiyerlerinde preantral foliküllerin in vitro matürasyonu üzerindeki etkileri. *J Assist Reprod Genet* 25(9–10):483–488
18. Morita Y ve diğerleri (2000) Oosit apoptozisi, asit sfingomiyelinaz geninin bozulması veya sfingosin-1-fosfat tedavisi ile baskılanır. *Nat Med* 6(10):1109–1114
19. Şimşek Y ve diğerleri (2012) Resveratrolün, genç yetişkin sıçanlarda tüm vücut ışınlanmasının neden olduğu akut yumurtalık toksisitesi üzerindeki iyileştirici etkileri. *J Pediatr Adolesc Gynecol* 25(4):262–266
20. Rajesh K, Witt M, Anwer MK, Agarwal SP, Koch BP (2008) Kaya ekşudası shilajit'ten ekstrakte edilen fulvik asitlerin spektroskopik karakterizasyonu. *Org Geochem* 39(12):1719–1724
21. Ghosal S, Lal J, Singh SK, Goel RK, Jaiswal AK, Bhattacharya SK (1991) Shilajit'in izole edilmiş aktif bileşenleri tarafından formülasyon ihtiyacı. *Fitother Res* 5(5):211–216
22. Frolova LN, Kiseleva TL (1996) Mumijo'nun kimyasal bileşimi ve orijinalliğini ve kalitesini belirleme yöntemleri (inceleme). *Pharm Chem J* 30(8):543–547
23. Al-Himaidi AR, Mohammed U (2003) Dişi farelerin hamileliği sırasında güvenli salajet kullanımı. *Çevrimiçi J Biol Sci* 3(8):681–684
24. Agarwal SP, Khanna R, Karmarkar R, Anwer MK, Khar RK (2007) Shilajit: bir inceleme. *Fitoter Res* 21(5):401–405 (inceleme)
25. Park Jeong-Soog, Kim Gee-Young, Han Kun (2006) Sıçanlara kronik olarak uygulanan shi lajit'in sperm matojenik ve ovojenik etkileri. *J Ethnopharmacol* 107(3):349–353
26. Biswas TK, Pandit S, Mondal S, Biswas SK, Jana U, Ghosh T, Tripathi PC, Debnath PK, Auddy RG, Auddy B (2009) Clinical oligospermide işlenmiş shilajit. *Andrologia* 42(1):48–56
27. Velmurugan C, Vivek B, Wilson E, Bharathi T, Sundaram T (2012) Sıçanlarda 91 gün tekrarlanan uygulamadan sonra siyah shilajit'in güvenlik profilinin değerlendirilmesi. *Asian Pac J Trop Biomed* 2(3):210–214
28. Stohs SJ (2014) Shilajit'in (mumie, moo) güvenlik ve etkinliği miyo). *Fitother Res* 28(4):475–479
29. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB (2000) Sıçan yumurtalık foliküllerinde atrezii sırasında oositlerin ultrastrüktürel değerlendirmesi. *Biol Reprod* 63(5):1245–1252
30. Qian H, Xu J, Laloti MD, Gulle K, Sakkas D (2010) Faredeki oosit sayıları 5-aminoizo kinolinon ile tedaviden sonra artar: güçlü bir poli(ADP inhibitörü) -ribosil)asyon. *Biol Reprod* 82:1000–1007
31. Baker TG (1971) Oogenez sırasında radyasyonun etkilerinin karşılaştırmalı yönleri. *Mutat Res* 11(1):9–22
32. Gosden Roger (1997) Norah spears. Üreme sisteminde programlanmış hücre ölümü. *Br Med Bull* 52(3):644–661