ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.
2015; 29 (2): 57 - 62
http://www.fusabil.org

Doksorubisin ve Siklofosfamid Uygulanmasının Sıçan Over Dokularında Meydana Getirdiği Değişiklikler Üzerine Vitamin D' nin Etkileri *

Şeyda YAVUZKIR[1]
Alpaslan AKYOL[1]
Tuncay KULOĞLU[2]

[1]Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

[2]Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı,
Elazığ, TÜRKİYE

Amaç: Kanser hastalığının, sık görülmesi ve yüksek oranda ölümlere yol açması, artan çevresel kanser yapıcı etkenler nedeni ile günümüzün önemli sağlık sorunlarından birisidir. Hastaların çoğu kadın olup siklofosfamid ve doksorubisin gibi kemoterapötik ajanlar kadınlardaki kanserlerde sık kullanılmaktadır. Bu kemoterapötik ajanlar germ hücrelerine belirgin toksik etkisi olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Vitamin D hem anti-proliferatif etkiyle hem de anjiyogenezi inhibe ederek hücrelerin apoptozisini engeller. Doksorubisin ve siklofosfamid'in over dokusunda oluşturduğu hasar üzerine vitamin Din etkisi belli değildir. Bu çalışmada doksorubisin ve siklofosfamid uygulanmasinin siçan over dokusunda ve fonksiyonlarında meydana getirdiği değişiklikler üzerine vitamin D'in etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya otuzaltı adet dişi rat alındı. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak şekilde rastgele, 6 gruba; Kontrol grubu, Doksorubisin grubu, Doksorubisin + Vitamin D grubu, Siklofosfamid grubu, Siklofosfamid + Vitamin D grubu, Vitamin D grubu ayrıldı. Deney sonunda tüm gruplardaki ratlar anestezi altında dekapite edildi. Over dokuları hızla çıkarılıp histopatlojık kesitler alınıp over rezervi incelendi.

Bulgular: Kontrol grubu ve Vitamin D grubunda over rezervi iyi bulunurken diğer gruplarda overrezervinde azalma izlendi. En fazla azalmada siklofosfamid grubunda izlendi.

Sonuç: Sonuç olarak, bu çalışmada Vitamin D ek dozunun uygulamasının, siklofosfamid ve doksorubisinin sitotoksik etkisini önleyemediğini görüldü.

Anahtar Kelimeler: *Sıçan, Siklofosfamidin, Doksorubisin, Vitamin D*

The Effects of Vitamin D on Changes in Rat's Ovarium Tissues Induced by the Administration of Doxorubicin and Cyclophosphamide

Objective: Due to the incidence and high death rate, cancer is one of the important health problems together with environmental carcinogenic factors today. Cancer is most frequently seen in females. Chemotherapeutic agents such as cyclophosphamide and doxorubicin were administered for the cancers seen in females. Previous studies indicated that these chemotherapeutic agents have an evident effect in germ cells. Vitamin D prevents apoptosis of cells by both inhibiting angiogenesis and proliferative effect. The effect of vitamin D on the damage of ovarium tissue by Cyclophosphamide and doxorubicin is not known yet. In this study, it was aimed to investigate the effects of vitamin D on the changes on rat ovarium tissue and it's function by cyclophosphamide and doxorubicin administration.

Materials and Methods: Thirty-six female rats were used in the study. The rats were divided into six groups including 6 rats each: control group, doxorubicin group, doxorubicin plus vitamin D group, cyclophosphamide group, cyclophosphamide plus vitamin D group and vitamin D group. All rats were decapitated under anesthesia after the experiments. Ovarium tissues were immediately extracted and histopathologic sections were prepared and ovarium reserves were examined.

Results: Whereas ovarium reserve was found as sufficient in control and vitamin D groups, decrease was observed in the ovarium reserves of the other groups. The maximum decrease was seen in cyclophosphamide group.

Conclusion: As a result it was seen that substantial dose of vitamine D had no preventive effect on cytotoxic effect of cyclophosphamide and doxorubicin

Key Words**:** *Rat, cyclophosphamide, doxorubicin, vitamin D*

Geliş Tarihi : 03.12.2014
Kabul Tarihi : 08.05.2015

Yazışma Adresi
Correspondence

Şeyda YAVUZKIR
Fırat Üniversitesi,
Tıp Fakültesi,
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı,
Elazığ - TÜRKİYE

s.yavuzkir@gmail.com

Giriş

Kanser hastalığının, sık görülmesi ve yüksek oranda ölümlere yol açması, artan çevresel kanser yapıcı etkenler nedeni ile günümüzün önemli sağlık sorunlarından birisidir (1) . Dünyada her yıl on milyondan fazla yeni kanser olgusu ortaya çıkmakta ve beş milyon insan kanserden ölmektedir (1-2). 2007 yılında 7.9 milyon kişinin ölümüne yol açmıştır; bu sayı tüm nedenlere bağlı ölümlerin %13'ünü oluşturmaktadır (3).

*13. Ulusal Jinekoloji ve Obstetrik Kongresi, 11-15 Mayıs 2015, Antalya/TÜRKİYE.

Kanserden ölümlerin giderek artacağı ve 2030 yılında 12 milyon kişinin kanser nedeniyle öleceği tahmin edilmektedir (3). Siklofosfamid ve Doksorubisin gibi kemoterapötik ajanlar kadınlardaki kanserlerde sık kullanılmaktadır. Bu kemoterapötik ajanlar germ hücrelerine belirgin toksik etkisi olduğu Yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (4-7). Vitamin D hem anti-proliferatif etkiyle hem de anjiyogenezi inhibe ederek hücrelerin apoptozisini engeller Ayrıca vitamin D, DNA'yı tamir eden genlerle, genomun bütünlüğünü sağlayan genlerin ekspresyonunu uyarmaktadır (8-10). Doksorubisin ve Siklofosfamidin over dokusunda oluşturduğu hasar üzerine vitamin D in etkisi belli değildir.

Bu çalışmada Doksorubisin ve Siklofosfamid uygulanmasının sıçan over dokusunda ve fonksiyonlarında meydana getirdiği değişiklikler üzerine vitamin D' in etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışmaya başlamadan önce Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan onam alındı. Çalışma için gerekli hayvanlar Fırat Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Laboratuvarından temin edildi. Deney, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Otuzaltı adet düzenli siklusa sahip, 200±40 gram ağırlığında, 12 haftalık, erişkin dişi Wistar Albino cinsi rat alındı. 12 saat ışık (08-20), 12 saat karanlık foto-periyodunda ve 21- 23 °C sabit sıcaklıktaki odada, standart pellet yemi ve şehir suyu ile beslendi. Deney hayvanları her grupta 6 hayvan olacak şekilde rastgele, prospektif olarak 6 gruba ayrıldı;

Grup 1 (Kontrol grubu); Deney süresi olan 7 gün boyunca herhangi bir işlem yapılmadı.

Grup 2 (Doksorubisin); Doksorubisin 10 mg/kg/tek doz intraperitoneal (İP) olarak uygulandı.

Grup 3 (Doksorubisin + Vitamin D grubu); Doksorubisin 10 mg/kg/tek doz IP verildikten sonra deney süresince Vitamin D 50 IU/rat/gün oral olarak verildi.

Grup 4 (Siklofosfamid grubu); Siklofosfamid 100 mg/kg/tek doz İP olarak uygulandı.

Grup 5 (Siklofosfamid + Vitamin D grubu); Siklofosfamid 100 mg/kg/tek doz İP olarak verildikten sonra deney süresince vitamin D 50 IU/rat/gün oral olarak veridi.

Grup 6 (Vitamin D grubu); Deney süresince sadece vitamin D 50IU/rat/gün oral olarak veridi.

7. gün sonunda tüm gruplardaki sıçanlar ketamin (75mg/kg) + xylazine (10 mg/kg) İP uygulanarak anestezi altında dekapite edildi. Dekapitasyonun ardından sıçanların over dokuları hızla çıkarılıp uygun fiksatiflerle tespit edilip ardından parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5–6 μm kalınlığında alınan kesitlere Masson Trikrom ve Hematoksilen-eozin ile boyaları uygulanıp, araştırma mikroskobunda (Olympus BH-2) incelendi. Gruplara göre histopatolojik değişiklikler kaydedildi. Matür folliküller sayıldı. Masson Trikromboyamada; fibrozisve korpus luteum angiogenezi 0'dan +3'e kadar sayı ile semi-kantitatif olarak skorlandı (yok= 0, az= +1, orta= +2, şiddetli= +3).

Verilerin analizinde "SPSS for Windows 10.0" istatistik paket programı kullanıldı. Mann Whitney U, Ki-kare ve Fisher exact test'leri ile grup karşılaştırmaları yapıldı. $P<0.05$ anlamlı olarakkabul edildi

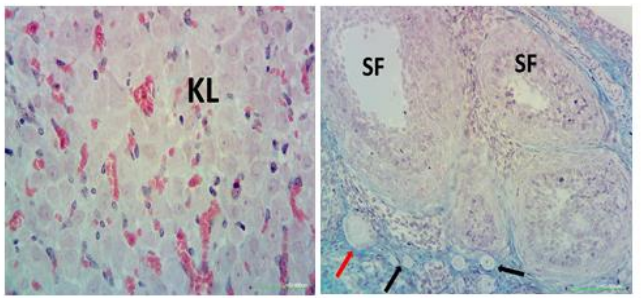
Bulgular

Yaş ve ağırlık için yapılan karşılaştırmalı istatistiksel analizlerde hayvanların yaşları ve ağırlıklar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 1).

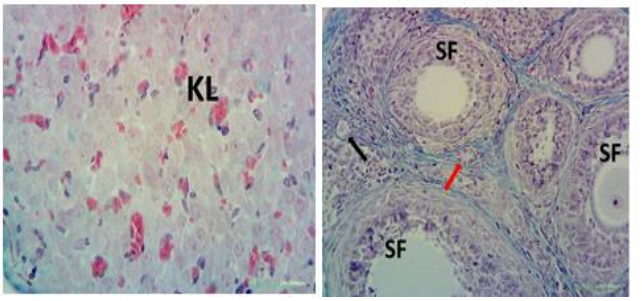
Masson's trichrome ile boyamanın ışık mikroskobu altında incelenmesi sonucu; kontrol (Şekil 1) ve vitamin D (Şekil 2) grubuna ait over dokuları normal görünümdeydi.

Tablo 1. Yaş ve ağırlıkların gruplar arasında dağılımı

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	Grup 6	P
Yaş (Gün)	180.6±10.1	180.6±10.09	180.3±13.2	180.6±11.1	180.5±10.	180.5±10.1	0.68
Ağırlık (Gram)	198.75±7.46	197.36±7.66	188.75±6.53	188.84±7.53	189.68±7.64	195.75 ± 6.53	0.97



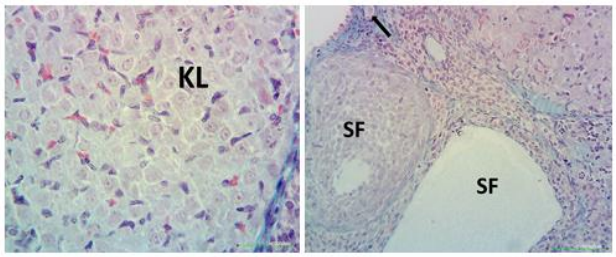
Şekil 1. Normal over dokuları



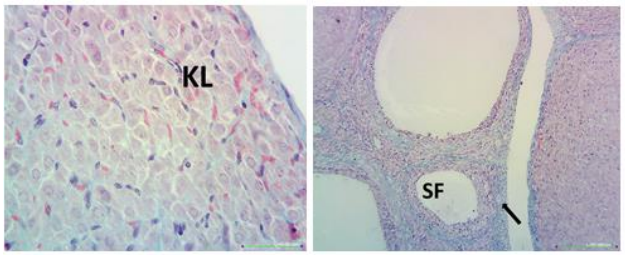
Şekil 2. Vitamin D uygulanan over dokuları

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında doksourubisin grubunda (Şekil 3) fibrozisde bir değişiklik olmamakla beraberkorpus luteum angiogenezinde gerileme belirgin olarak artmıştı. Doksourubisin grubu ile karşılaştırıldığında doksorubisin + vitamin D grubunda (Şekil 4) korpus luteum angiogenezinde artma izlenmedi.

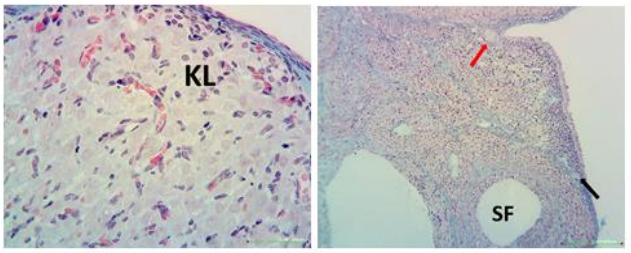
Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Siklofosfamid grubunda (Şekil 5) fibrozisde bir değişiklik olmamakla beraberkorpus luteum angiogenezinde gerileme belirgin olarak artmıştı. Siklofosfamide grubu ile karşılaştırıldığında Siklofosfamide + vitamin D grubundakorpus luteum angiogenezinde bir değişiklik izlenmedi (Şekil 6).



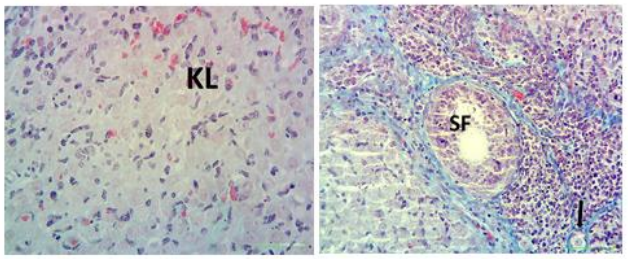
Şekil 3. Doksorubisin grubu



Şekil 4. Doksorubisin + vitamin D grubu



Şekil 5. Siklofosfamid grubu



Şekil 6. Siklofosfamid + vitamin D grubu

Ayrıca tüm gruplara ait over dokularında primordiyal follikül, primer follikül, sekonder follikül ve tersiyer follikül sayılarak over rezervi belirlendi. Over rezervi için yapılan sayımda kontrol grubu ile vitamin D grubu benzerdi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, doksorubisin ve Siklofosfamide gruplarında over rezervinin belirgin olarak azaldığı tespit edildi. Tedavi olarak verilen vitamin D'nin doksorubisin ve Siklofosfamide gruplarında over rezervini etkilemediği gözlendi (Skala bar: 50µm).

Tartışma

Amerika Birleşik Devletleri'nde 2008 yılında kansere yakalanan kadın sayısının yaklaşık 700.000 olduğu tahmin edilmektedir (11). Ülkemizde de kanser hastalıklarının çok önemli bir sağlık sorunu olduğuna şüphe yoktur. İkibin altı yılında toplanan Sağlık Bakanlığı Epidemiyoloji ve Kanser Kayıt Alt Danışma Kurulunda aktif kanser kayıtsistemi 14 ilden 8 ilin kanser verilerinin yayınlanmasına karar verilmiştir. Bu iller Ankara, Antalya, Samsun, Erzurum, Trabzon, İzmir, Edirne ve Eskişehir'dir. 2005 yılında Türkiye nüfusu 72 milyon 65 bin olarak belirlenmiştir. Bu 8 ilin toplam nüfusu 14.273.465 olarak hesaplanmış olup toplam nüfusun yaklaşık %20 sini temsil etmektedirler (12). Bu oran sağlıklı bir istatistik vermek için yeterli gibi görülmektedir. Buna göre 1999-2005 yılları arasında kanser insidansı yaklaşık 100 binde 58 den 100 binde 173'e çıkmıştır. Kadınlarda en fazla görülen 5 kanser türü sırasıyla (yüzbinde) meme (35.4), deri (17.8), tiroid (8.4), akciğer ve bronş (7.2), ve mide (2.91.)'dir (12). Yıllar içinde tüm illerden bilgi akışı sağlandıkça daha sağlıklı ve güncel kanser verilerine ulaşılacaktır. Yeni kombinasyon kemoterapileri ve radyoterapi rejimlerinin üreme sistemi üzerine önemli olumsuz etkileri olduğu bilinmektedir (4, 6). Bu negatif etkinin boyutu tedavinin sitotoksik potansiyeli, dozu, süresi ve hastanın yaşına bağlı olarakdeğişebilmektedir (4-7). Prematür over yetmezliği dışında uzun dönemli olarak bu hastaların gebeliklerinde kötü obstetrik sonuçlar ortaya çıkabilmektedir (13). Bunlara örnek olarak preterm eylem, düşükler, düşük ve çok düşük ağırlıklı bebek doğumları sayılabilir (13). Ovaryan rezerv primordiyal folliküllerin sayısı tarafından belirlenir. Özellikle primordiyal folliküller hedefleyen herhangi bir toksik etki reproduktif yaşam aralığını kısaltabilir (4-7). Bunun yanı sıra prematür over yetmezliği oluşumunu indükleme riski de daha yüksektir. Prematür ovaryan yetmezliğin altında, mekanizma olarak germ hücrelerinin prematür, kitlesel ve hızlı ölümü (apoptosis) yatar (6, 7). Oositi çevreleyen steroid üreten somatik hücre katmanlarına (granüloza ve teka hücreleri) toksik etkide bunlara neden olabilir (14). Giderek artan bir ilgiyle, 40 yaş altı kadınlarda anti kanser tedavi sonrası fertilitenin korunması konusu çalışılmaktadır. Genç kanser hastalarının fertilitelerinin korunması konusunda Amerikan Klinik Onkoloji kurumu bir kılavuz yayınlamıştır. Başka kurumlar da bu konuda teşvik edici yayınlar yapmaktadır (15, 16). Esas olarak kanser kemoterapilerinin amacı hücre ölümünü apoptozis yolu ile uyarmaktır. Bu etki tüm vücutta olduğu gibi overde de apoptozisin uyarılması şeklindedir (17).

Kemoterapi ve radyoterapinin over dokusu üzerindeki uzun dönem etkisi, infertiliteye neden olan azalmış ovaryan rezerv ve prematür ovaryan yetmezliktir. Ovaryan rezervin göstergesi primordial follikül sayısıdır (17, 18). Kemoterapi ile indüklenmiş ovaryan hasarın ultrastrüktürel göstergesi yaygın follikül kaybı ve ovaryan fibrozistir (19). Bununla birlikte kanser tedavilerinin ovaryan stromal hücrelere etkisi de önemlidir (17-19). Ovaryan stromal hücreler endokrin fonksiyon görür ve büyük olasılıkla kemoterapi sonrası hasarın tamirinde rol oynar (18-20). Kemoterapi sonrası ovaryan yetmezliğe etki eden faktörler arasında hasta yaşı, kemoterapi ajanının türü, ilacın kümülatif dozu ve kemoterapi öncesi ovaryan rezerv durumu sayılabilir. Yaşlı hastalarda ovaryan yetmezlik gelişmesi, aynı doz kemoterapi alan genç hastalara göre daha olasıdır. Örneğin ovaryan yetmezliğe sebep olacak kümülatif siklofosfamid dozu 40'lı yaşlardaki bir hasta için 5.2 g iken 30'lu yaşlarda 9.3 g, 20'li yaşlarda 20.4 g olmaktadır (4, 19).

Alkilleyici ajanlar en yüksek follikül kaybına sebep olmaktadır (4,5). Hücre siklusuna spesifik değillerdir yani hücre bölünme sırasında olmasalar da tek sarmal yada çift sarmal DNA kırıklarına neden olarak etki gösterirler (11, 18). Folliküler hasar yanında, DNA cross-link oluşturarak, steroid sentezinin azalmasıyla karakterize yaygın granüloza hücre hasarına da neden olurlar (4, 5, 11, 18, 21). Bu grubun üyesi olan N-mustardlardan olan Siklofosfamid birçok antikanser protokolde kullanılmaktadır (2, 18, 21). Bu, her yıl birçok kadının siklofosfamid nedenli ovaryan yetmezliğe girdiği anlamına gelir. Kanser sağ kalım oranlarının arttığı düşünülürse bu kadınların fertilite koruyucu yöntemlere yöneleceği açıktır (11, 18). Bu yöntemlerden kriyoprezervasyon yöntemleri, ovaryan transpozisyon işlemleri bilinmektedir. Üzerinde çalışmalar yürütülen alternatiflerden birisi de apoptozis inhibitörleridir (18). Bizde çalışmamızda Siklofosfamid verilen grupta follikül sayısındabelirgin derecede azalma ve dejenere olmuş folliküller yaygın olarak izledik. Öktem ve ark. (17), yaptıkları ovaryan xenograft modelinde; tek doz 200 mg/kg siklofosfamid uygulanması ile 72 saat içerisinde bütün primordiyal follikülerin %97'sinin kaybolduğunu ve follikül kaybının ilaç enjeksiyonunu takiben oniki saat gibi kısa bir süre zarfında başladığını göstermişlerdir. Bu çalışmayla uyumlu olacak şekilde, siklofosfamide verilen gurupta ilk yedi günde over rezervinin %80 etkilendiğini izledik.

Doksorubisin, antrasiklin grubu antibiyotikler olarak sınıflandırılır. Antrasiklinlerin hücre tipine göre değişen etkileri vardır. Bu etkiler en belirgin siklusun S ve G2 fazlarında görülür (6, 7). Bu ilaçlar seçicilik göstermeksizin birbirine yakın baz çiftleri arasına girerek DNA ve RNA sentezini engellerler (7). Doksorubisin, en önemli ve en sık kullanılan kemoterapötik ilaçlardan birisidir. Sarkomların, meme ve akciğer kanserleride dahil olmak üzere karsinomların, akut lenfositik lösemilerin ve lenfomaların tedavisinde kullanılmaktadır (22). Doksorubisinin over rezervine olumsuz etkileri mevcuttur (5, 6). Bu çalışmada doksorubisin verilen grupta folliküllerde sayıca azalma ve dejenere folliküller yaygın olarak izlendi ve bunlarda tunnel metodu ile apopitozisin yaygın olduğunu görüldü.

Kanser tedavisine bağlı olarak ortaya çıkan over yetmezliği hastayı hem menopoz, hem de infertilite riski ile karsı karsıya bırakmaktadır (23, 24). Bu hastalar kemoradyoterapi ile sterilize olmasalar bile, erken gebelik kayıpları, prematür eylem ve düşük doğum ağırlığı riski ile karsı karsıya kalmaktadırlar (23). Kanser tedavisi öncesinde ve sonrasında fertilitenin korunması için medikal ve cerrahi yöntemler mevcuttur. Fakat bunların tam koruyucu etkileri net değildir (24-29).Uzun etkili gonadotropin analogları (26, 27) GnRH antagonistleri (28), antioksidanlar (29) over rezervini korumak amaçlı kullanılmaktadır (26-29).

Kanserin önlenmesi ve bazı kanser tiplerinin tedavisinde (kolorektal, meme, prostat, over, mesane, akciğer, deri kanserleri ve lösemi) vitamin D bileşiklerinin önemli bir role sahip olduğu birçok epidemiyolojik ve klinik çalışmalarda gösterilmiştir (8-10). Vitamin D hem anti-proliferatif etkiyle, hem de anjiyogenezi inhibe ederek hücrelerin apoptozisini engeller (9, 10). Vitamin D aynı zamanda tümörün yayılımını kolaylaştıran telomeraz ekspresyonunu, apoptozisi ve anjiyogenezi inhibe etmektedir (30-32). Ayrıca vitamin D, DNA'yı tamir eden genlerle, genomun bütünlüğünü sağlayan genlerin ekspresyonunu uyarmaktadır (32).

Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada hormon duyarlı meme kanseri tedavisinde Vitamin D'nin tümör ilerlemesini engellediği gösterilmiştir (33). Ratlarda oluşturulan barsak tümörlerinin gelişiminin engellenmesinde de vitamin D'nin olumlu etkileri bildirilmiştir (34). Bu çalışmada, doksorubisin ve siklofosfamid verilen grupta Vitamin D'nin over rezervini korumada olumlu etkisi görülmedi. Kılıç ve ark. (35) siklofosfamid verilen ratlarda ovaryen toksitenin azaltılmasında kemik iliğinden alınan mezenkimal kök hücrelerin olumlu etkisini göstermişlerdir. Bu olumlu etkileri, özelikle DNA hasarının engellenmesi ve apopitozisin azaltılmasına bağlamışlardır. Gürgen ve ark. (36) siklofosfamid verilen ratlarda selenyumun ovaryen toksitenin azaltılmasında olumlu etkisini göstermişlerdir. Wietrzyk ve ark. (37) farelerde verilen yeni vitamin D analoglarının sitoksik etkileri önleyemediğini saptamışlardır.

Kanser hastalarında, fertilitenin korunmasında apoptozis inhibitörleri, etkili olabileceği düşünülen, ancak deneysel ve klinik bilginin henüz yeterli olmadığı bir konudur. Bu çalışmada, Vitamin D ek doz uygulamasının, Siklofosfamid ve Doksorubisin'in sitotoksik etkisini önleyemediği görüldü.

Kaynaklar

1. Schottenfeld D**.** The epidemiology of cancer: An overview. Cancer 1981; 47: 1095-108.
2. Silverberg E, Lubera JA. A review of American Cancer Society estimates of cancer cases and deaths. Cancer J Clin 1983; 33: 2-8.
3. King G, Soneji S. The future of death in America. Demogr Res 2011; 25: 1-38.
4. Koyama H, Wada T, Nishizawa Y. Cyclophosphamide-induced ovarian failure and its therapeutic significance in patients with breast cancer. Cancer 1977; 39: 1403-1409.
5. Maltaris T, Seufert R, Fischl F, Schaffrath M. The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2007: 130: 148-155.
6. Atagündüz P. Antikanser ilaçlar. Oktay (Çeviri Editörü). Farmakoloji. 2. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1998: 373-400.
7. Rajagopalan S, Politi PM, Sinha BK, Myers CE. Adriamycin-induced free radical formation in the perfused rat heart: implications for cardiotoxicity. Cancer Res 1988; 48: 4766-4769.
8. Richards JB, Valdes AM, Gardner JP. Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women. Am J Clin Nutr 2007; 86: 1420-1425.
9. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: Results of a randomized trial. Am J Clin Nutr 2007; 85: 1586-1591.
10. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB. Vitamin D and prevention of breast cancer: pooled analysis. J Steroid Biochem Mol Biol 2007; 103: 708-711.
11. Sonmezer M, Oktay K. Assisted reproduction and fertility preservation techniques in cancer patients. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2008; 15: 514-522.
12. Anonim. http/www.saglik.gov.tr/dokumanlar/11.10.2014.
13. Stankiewicz A, Skrzydlewska E, Makiela M. Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. Drug Metabol Drug Interact 2002; 19: 67-82.
14. Injac R, Perse M, Obermajer N, et al. Potential hepatoprotective effects of fullerenol C60(OH)24 in doxorubicin-induced hepatotoxicity in rats with mammary carcinomas. Biomaterials 2008; 29: 3451-3460.
15. Kim C, Kim N, Joo H, et al. Modulation by melatonin of the cardiotoxic and antitumor activities of adriamycin. J Cardiovasc Pharmacol 2005; 46: 200-210.
16. Della Torre P, Mazue G, Podesta A, et al. Protection against doxorubicin-induced cardiotoxicity in weanling rats by dexrazoxane. Cancer Chemother Pharmacol 1999; 43: 151-156.
17. Oktem O, Oktay K. A Novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. Cancer Resarch 2007; 67: 21-28
18. Oktay K, Sonmezer M. Chemotherapy and amenorrhea: Risks and treatment options. Curr Opin Obstet Gynecol 2008; 20: 408-415.
19. Higgins RV, van Nagell JR Jr, Donaldson ES, et al. Transvaginal sonography as a screening method for ovarian cancer. Gynecol Oncology 1989; 34: 402-406.
20. Lass A. Assessment of ovarian reserve: Is there still a role for ovarian biopsy in the light of new data? Hum Reprod 2004; 19: 467-469.
21. Oktem O, Oktay K. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy ovarian follicle reserve and stromal function. Cancer 2007; 110: 2222-2229.
22. Kayaalp O. İmmün Sistem Bozuklukları ve İmmünomodülatör İlaçlar. Ankara: Pelikan Yayıncılık, 2005.
23. Chiarelli AM, Marrett LD, Darlington GA. Pregnancy outcomes in females after treatment for childhood cancer. Epidemiology 2000; 11: 161-166.
24. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients. Hum Reprod Update 2004; 10: 251-266.
25. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in young women undergoing breast cancer therapy. Oncologist 2006: 11; 422-434.
26. 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: 1044-1054.
27. Azem F, Samara N, Cohen T, et al. Assessment of ovarian reserve following ovarian tissue banking and/or GnRH-a co-treatment prior to chemotherapy in patients with Hodgkin's disease. J Assist Reprod Genet 2008; 25: 535-538.
28. Meirow D, Assad G, Dor J, Rabinovici J. The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. Hum Reprod 2004; 19: 1294-1299.
29. Yeh J, Kim BS, Peresie J. Protection against cisplatin-induced ovarian damage by the antioxidant sodium 2-mercaptoethanesulfonate (mesna) in female rats. Am J Obstet Gynecol 2008; 198: 461-466.
30. Richards JB, Valdes AM, Gardner JP. Higher serum vitamin D concentrations are associated with longer leukocyte telomere length in women. Am J Clin Nutr 2007; 86: 1420-1425.
31. Lappe JM, Travers-Gustafson D, Davies KM. Vitamin D and calcium supplementation reduces cancer risk: Results of a randomized trial. Am J Clin Nutr 2007; 85: 1586-1591.
32. Garland CF, Gorham ED, Mohr SB. Vitamin D and prevention of breast cancer: Pooled analysis. J Steroid Biochem Mol Biol 2007; 103: 708-711.
33. Colston KW, Berger U, Coombes RC. Possible role for vitamin D in controlling breast cancer cell proliferation. Lancet 1989; 28: 188-191.

34. Otoshi T, Iwata H, Kitano M, et al. Inhibition of intestinal tumor development in rat multi-organ carcinogenesis and aberrant crypt foci in rat colon carcinogenesis by 22-oxa-calcitriol, a synthetic analogue of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3. Carcinogenesis 1995; 16: 2091-2097.

35. Kilic S, Pinarli F, Ozogul C, et al. Protection from cyclophosphamide-induced ovarian damage with bone marrow-derived mesenchymal stem cells during puberty. Gynecol Endocrinol 2014; 30: 135-40

36. Gürgen SG, Erdoğan D, Elmas C, Kaplanoğlu GT, Ozer C. Chemoprotective effect of ascorbic acid, α-tocopherol, and selenium on cyclophosphamide-induced toxicity in the rat ovarium. Nutrition 2013; 29: 777-784.

37. Wietrzyk J, Nevozhay D, Filip B, Milczarek M, Kutner A. The antitumor effect of lowered doses of cytostatics combined with new analogs of vitamin D in mice. Anticancer Res 2007; 27: 3387-3398.