

ARAŞTIRMA MAKALESİ

**Sıçanlarda Favipiravir ve Deksmetazonun Tek Başına ve
Kombine Halde Over Dokusu ve Üreme Fonksiyonuna Etkisi:
Biyokimyasal ve Histopatolojik Değerlendirme**

**The Effect of Favipiravir and Dexamethasone Alone and Combined on
Ovarian Tissue and Reproductive Function in Rats: Biochemical and
Histopathological Evaluation**

Emrullah AKYÜZ¹, Sümeyye AKYÜZ^{2,a}, Paşa ULUĞ³, Fikret ALTINDAĞ⁴, Halis SÜLEYMAN⁵

¹Erzincan Mengücek Gazi Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Erzincan, Türkiye

²Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

³Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

⁴Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Van, Türkiye

⁵Erzincan Binali Yıldırım Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, Erzincan, Türkiye

E.A. 0000-0002-5475-6394, S.A. 0000- 0003-1999-7827, P.U. 0000-0001-9870-0109,

F.A. 0000-0002-7085-623X, H.S. 0000-0002-9239-4099.

*Sorumlu Yazar: Sümeyye AKYÜZ (sumeyye_sfl@hotmail.com)

ÖZET

Amaç: Deksmetazon ve bir RNA polimeraz inhibitörü olan favipiravir, COVID-19 tedavisinde kullanılabilir-mektedir. Bu çalışmada, dişi sıçanlarda favipiravir ve deksametazonun tek başına ve kombine halde over dokusu ve üreme fonksiyonuna etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Araştırmada sekizerli dört gruba ayrılan toplam 32 adet albino wistar türü dişi sıçan kullanıldı. Birinci grup kontrol grubu-SG olup, İkinci gruba favipiravir (FPR-100 mg/kg), üçüncü gruba deksametazon (DEKSA-8 mg/kg), dördüncü gruba favipiravir ve deksametazon kombine olarak (FDA-100 mg/kg favipiravir+8 mg/kg deksametazon) uygulandı. Bir hafta boyunca favipiravir günde iki defa oral; deksametazon ise günde bir defa intraperitoneal yoldan verildi. Alınan kan örneklerinde serum AMH seviyesine bakıldı. Over dokusunda MDA, tGSH ölçümü, histopatolojik olarak hasar tespiti ve folikül sayımı yapıldı.

Bulgular: AMH düzeyinin FPR ve FDA grubunda daha düşük olduğu görülmüştür. MDA düzeyinin FPR grubunda SG'nin yaklaşık iki katı, FDA grubunda ise SG'nin yaklaşık 6 katı olduğu görülmüştür. tGSH düzeyleri SG ve DEKSA grubunda birbirine yakın olup FPR ve FDA grubunda anlamlı seviyede daha düşüktür. FDA grubundaki primordiyal folikül sayısı, SG'ye göre anlamlı derecede düşüktür.

Sonuç: Favipiravir ve/veya deksametazonun serum AMH düzeyini ve ovaryan primordial folikül sayısını azaltarak over rezervini olumsuz yönde etkileyebileceği, over dokusunda oksidan reaktiflerin miktarını artırıp antioksidan reaktiflerin miktarını azaltarak oksidatif strese neden olabileceği in vivo olarak gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Favipiravir, Deksmetazon, Over Rezervi, Anti Müllerian Hormon, Sıçan.

ABSTRACT

Objective: Dexamethasone and favipiravir, an RNA polymerase inhibitor, are utilized in the treatment of COVID-19. This study aimed to evaluate the effects of favipiravir and dexamethasone, both individually and in combination, on ovarian tissue and reproductive function in female rats.

Material and Method: The study included 32 female albino Wistar rats, divided into four groups of eight rats each. The first group served as the control group (SG), the second group received favipiravir (FPR, 100 mg/kg), the third group received dexamethasone (DEKSA, 8mg/kg), and the fourth group received a combination of favipiravir and dexamethasone (FDA, 100mg/kg favipiravir+8 mg/kg dexamethasone). Favipiravir was administered orally twice daily for one week, while dexamethasone was administered intraperitoneally once daily. Se-

rum AMH levels were measured in blood samples. In the ovarian tissue, MDA and tGSH levels were assessed, and histopathological damage and follicle counts were evaluated.

Results: AMH levels were found to be lower in the FPR and FDA groups. The MDA level in the FPR group was approximately twice that of the SG, while the MDA level in the FDA group was approximately six times higher than that of the SG. tGSH levels were similar between the SG and DEKSA groups but were significantly lower in the FPR and FDA groups. The number of primordial follicles in the FDA group was significantly lower compared to the SG group.

Conclusion: It was demonstrated in vivo that favipiravir and/or dexamethasone may negatively affect ovarian reserve by reducing serum AMH levels and the number of ovarian primordial follicles. Additionally, they may cause oxidative stress by increasing the levels of reactive oxygen species and decreasing the levels of antioxidant molecules in ovarian tissue.

Keywords: Favipiravir, Dexamethasone, Ovarian Reserve, Anti-Müllerian Hormone, Rat.

Over rezervi, dormant fazda oldukları düşünülen primordial foliküllerin sayısı ile belirlenir. Özellikle primordial foliküllere toksik bir etki, reproduktif yaşam aralığını kısaltabilir ve prematür over yetmezliğine neden olabilir (1). Over rezervi kadının mevcut oositlerinin sayısı ve kalitesinin bir fonksiyonu olarak üreme potansiyelini göstermektedir. Azalmış over rezervi; üreme çağındaki düzenli menstrasyon gören bir kadının kendi yaş grubundaki diğer kadınlara göre fekunditesinde ya da ovaryan stimulasyona cevabındaki azalma demektir. Azalmış over rezervi için risk faktörleri: ileri kadın yaşı (>35-yaş over rezervini belirleyen en önemli parametredir), tek over, endometriozis ve pelvik enfeksiyon gibi overlere zarar veren durumlar, otoimmün hastalıklar, diabetes mellitus, hipertansiyon ve diğer sistemik hastalıklar, ailede erken menapoz öyküsü, geçirilmiş over cerrahisi, geçirilmiş radyoterapi veya kemoterapi öyküsü, genetik bozukluklar ve sigara kullanımıdır (2).

Coronavirus hastalığı-2019 (COVID-19) Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi tarafından ciddi akut solunum sendromu Coronavirus-2 (SARS-CoV-2) olarak adlandırılan bulaşıcı bir hastalıktır (3, 4). COVID-19 vaka sayılarının hızla yükselmesi, tedavide yeni ilaçların kullanımı ve eşlik eden komplikasyonlar nedeniyle ilaç kaynaklı sorunlarda artış görülmektedir. İlaç kaynaklı sorunlar için önemli risk faktörleri arasında çoklu ilaç kullanımı, ilaçların renal eliminasyonun bozulması, tedavide terapötik aralığı dar ilaçlar ile antikoagülan veya diüretik bulunması ve hasta yaşının 65'in üzerinde olması yer almaktadır. Viral replikasyonu bloke eden bir ribonükleik asit (RNA) polimeraz inhibitörü olan favipiravir ile güçlü antiinflamatuvar ve anti-fibrotik etkili bir kortikosteroid olan deksametazon COVID-19 tedavisinde kombine halde kullanılabilir (5).

Favipiravir, sınırlı veriler doğrultusunda düşük yan etki profili (bulantı, kusma, gaz artışı, diyare, göğüs ağrısı, psikiyatrik semptomlar, karaciğer fonksiyon bozukluğu ve total bilirubin düzeylerinde artış, nötrofil düzeyinde azalma, hiperürisemi) sergilemekte olup, literatürde favipiravir ve deksametazonun birlikte kullanımının sıçanlarda over dokusu ve üreme fonksiyonuna etkisine dair çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle çalışmamızın amacı, sıçan-

larda favipiravir ve deksametazonun tek başına ve kombine halde over dokusu ve üreme fonksiyonuna etkisini biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırmaktır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, yerel Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın onayı ile gerçekleştirildi (Tarih: 30/07/2021 ve Toplantı / Karar no:6/189).

Çalışmamızda kullandığımız toplam 32 adet albino wistar türü dişi sıçan (Ağırlık: 240-255 gr) Erzincan Binalı Yıldırım Üniversitesi Tıbbi Deneyisel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Hayvanlar aynı merkeze bağlı laboratuvarında normal oda sıcaklığında (22 °C) standart hayvan yemi ile beslendi. İki günlük adaptasyon süresinin ardından, bir siklusu tamamlayana kadar vajinal smear takibi yapıldı, bu sürenin sonunda 4-5 günlük östrus siklusu gösterip, fazları düzenli devam eden denekler çalışmaya dahil edildi.

Deneyde kullanılan, favipiravir tablet formu (Türkiye), deksametazon ampul enjeksiyonluk form Sağlık Bakanlığı'na bağlı hastaneden (Türkiye) ve tiyopental sodium İE Ulugay'dan (Türkiye) temin edildi.

Deneyde kullanılan ratlar; favipiravir uygulanan (FPR), deksametazon (DEKSA) uygulanan, favipiravir + deksametazon (FDA) uygulanan ve sağlıklı kontrol (SG) gruplarına ayrıldı. Bu deneyin tatbiki için FPR (n-8) grubuna favipiravir 100 mg/kg dozda sonda ile oral yoldan mideye verildi. DEKSA grubuna (n-8) 8 mg/kg dozda deksametazon intraperitoneal (i.p.) yoldan enjekte edildi. FDA grubuna ise 100 mg/kg favipiravir (n-8) + 8 mg/kg dozda deksametazon (n-8) aynı yoldan uygulandı. SG hayvan grubuna çözücü olarak aynı hacimde distile su verildi. Favipiravir günde iki defa, deksametazon ise bir defa verildi. Bu prosedür bir hafta boyunca tekrarlandı. Deney süresince her gün, bir kez smear alınarak östrus fazları takip edildi. Vajinal smear yöntemi; farelerin vajinasına distile su verildi ve bu sıvı geri alınarak lama yayıldı, ışık mikroskopunda değerlendirildi. Bu süre sonunda hayvanlar yüksek doz tiyopental sodyum anestezisi ile (30 mg/kg) uyutuldu ve AMH seviyesini araştırmak için kalpten kan örnekleri alındı. Alınan kan örnekleri 3000 devir/dk da 15 dakika santrifüj edildi ve serumları

ayrıştırıldı. Biyokimyasal tetkik yapılana kadar -20 C'de saklandı. Daha sonra dekapitasyonla öldürülen hayvanların over dokuları çıkartıldı. Çıkarılan over dokusu biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırıldı. FPR, DEKSA ve FDA gruplarından elde edilen biyokimyasal ve histopatolojik sonuçlar SG grubundan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı.

Biyokimyasal analizler

1. AMH Ölçümü

Hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde AMH düzeyleri, rat AMH (Hangzhou Eastbiopharm Co. Ltd. Hangzhou, CHINA) kitiyle, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay testi (ELISA) yöntemi kullanılarak ölçüldü. Prospektüste kitin analitik duyarlılığı 0,05 ng/mL ve analiz sınırları 0.1-40 ng/mL olarak bildirilmektedir.

2. Doku Malondialdehid (MDA) ve Total Glutasyon (tGSH) analizi

Over dokusunda MDA tayini için % 1.15'lik potasyum klorür çözeltisi, tGSH ölçümü için pH=7.5 olan fosfat tamponu içinde 2 mL'ye tamamlanarak buzlu ortamda homojenize edildi. Daha sonra +4 °C'de 10000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı analiz numunesi olarak kullanıldı.

-Doku MDA miktar tayini

MDA ölçümü için, Ohkawa H ve ark.'nın (6) kullandıkları yöntem esas alındı. Bu yöntem, yüksek sıcaklıkta (95 °C'de) tiyobarbitürik asit (TBA) ile MDA'nın oluşturduğu pembe renkli kompleksin absorbansının 532 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesi esasına dayanır. Homojenatlar, 5000 g'de 20 dakika santrifüj edildi ve bu süpernatantlar, MDA miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 250 µl homojenat, 100 µl % 8 sodyum dodesil sülfat (SDS), 750 µl % 20 asetik asit, 750 µl % 0.08 TBA ve 150 µl saf su pipetlenerek vorteksleildi. Karışım 100 °C'de 60 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra üzerine 2,5 ml n-bütanol ilave edildi ve spektrofotometrik olarak ölçüm yapıldı. Oluşan kırmızı renk miktarları 532 nm'de 3 ml'lik küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan MDA stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanarak numunelerin MDA miktarı belirlendi.

-Doku tGSH miktar tayini

Ölçüm ortamındaki DTNB (5,5'-Ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)) disülfid bir kromojendir ve sülfidril gruplu bileşikler tarafından kolayca indirgenmektedir. Meydana gelen sarı renk 412 nm spektrofotometrik olarak ölçüldü. Homojenatlar, 12000 g'de 10 dakika santrifüj edildi ve süpernatantlar, Glutasyon (GSH) miktarının belirlenmesinde kullanıldı. Kapaklı deney tüpleri içerisine 1500 µl ölçüm tamponu (0,2 mM etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) içeren 200 mM Tris-HCl, pH=8,2), 500 µl süpernatant, 100 µl 5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB)

ve 7900 µl metanol pipetlenerek vorteksleildi. Karışım 37°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı ve sonra spektrofotometre ile ölçümler yapıldı. Oluşan sarı renk miktarları 412 nm'de 3 ml'lik kuartz küvetler kullanılarak okundu ve seyreltme katsayıları dikkate alınarak önceden hazırlanan GSH stok çözeltisi kullanılarak oluşturulan standart grafikten yararlanılarak numunelerin GSH miktarı belirlendi (7).

3. Histopatolojik inceleme

Histopatolojik değerlendirme için ovaryum %10'luk formalin solüsyonu içerisinde tespit edildi. Rutin histolojik doku takip aşamalarından geçirildikten sonra parafine gömüldü. Mikrotomda 5µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler Hematoksilen-Eozin (HE) boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskobu ile incelendi (Olympus BX53, Japan). Histopatolojik değerlendirme için gruptaki her hayvan için rastgele örnekleme yapılarak ortalama 15-17 alanda değerlendirme yapıldı. Bulgular semikuantitatif olarak değerlendirildi. Bulgular, incelenen bölgelerde gözlenen hasar derecesine göre semikuantitatif olarak değerlendirildi. Buna göre: (-) (normal doku), çok az hasar: (+) (hasar < % 25), az hasar: (++) (% 25-50), orta hasar: (+++) (% 50-75), şiddetli hasar: (+++++) (hasar > %75) şeklinde değerlendirildi.

4. Stereoloji

Stereolojik değerlendirme için mikrotomda 5 µm kalınlığında ardışık kesitler alındı. İlk kesit çifti rastgele seçilerek diğer kesit çiftleri ise sistematik olarak her 20. adımda bir alındı. Böylece her doku bloğundan 12-17 arasında kesit çifti alınmış oldu. Lam üzerine alınan doku çiftleri HE boyası ile boyandıktan sonra ışık mikroskobunda incelenmeye alındı. Dokunun toplam hacmi için *Cavalieri Prensipli*, folikül sayımı için *fiziksel disektör* sayım metodu uygulandı. Dokunun hacmi hesaplamak için şu formül kullanıldı;

$$V_{ref} = \sum P. a(p).t$$

$\sum P$: Yapıya denk gelen toplam nokta sayısı, $a(p)$: Bir noktanın kapladığı alan, t : Kesit kalınlığı

Toplam primordiyal folikül sayısı hesaplamak için kullanılan formül;

$$N = N_v. V_{ref}$$

N : Toplam folikül sayısı, N_v : Foliküllerin sayısal yoğunluğu, V_{ref} : Dokunun toplam hacmi

Hücre sayısal yoğunluğunu hesaplamak için kullanılan formül;

$$N_v = \frac{\sum \bar{Q}^-}{V_{dis}}$$

$\sum \bar{Q}^-$: Toplam disektör hücre sayısı, V_{dis} : Toplam disektör hacmi

5. İstatistiksel Analizler

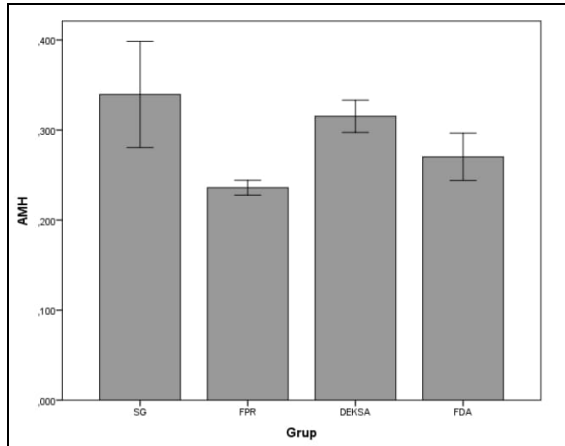
Deneylerden elde edilen sonuçlar “ortalama değer $\pm$ standart sapma” ($\bar{x} \pm SEM$) olarak ifade edildi. Gruplar arası farkın önemlilik derecesi tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) testi kullanılarak belirlendi. Takibinde Fisher’s post-hoc LSD (least significant differences) yapıldı. Post-hoc test olarak varyanslar homojen olduğu için Tukey testi kullanıldı. Tüm istatistiksel işlemler “SPSS for Windows, 18.0” istatistik programında yapıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi.

BULGULAR

Over dokusunun biyokimyasal analiz sonuçları

1. AMH Ölçüm Sonuçları

Çalışma gruplarından elde edilen AMH (Antimüllerian Hormon) verileri değerlendirildiğinde, en az bir grubun istatistiksel olarak farklı olduğu bulunmuştur. Şekil 1’den de görüldüğü gibi, FPR ($0,236 \pm 0,008$) grubundaki AMH düzeyleri, SG ($0,339 \pm 0,059$) grubuna göre anlamlı şekilde daha düşük ölçülmüştür ($p < 0,001$).



Şekil 1. SG, FPR, DEKSA ve FDA gruplarında AMH düzeylerinin karşılaştırılması.

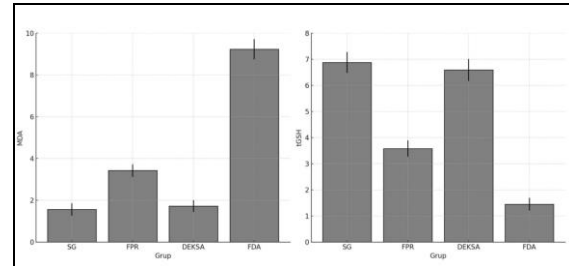
SG: Sağlıklı grup, FPR: Favipiravir verilen grup, DEKSA: Deksametazon verilen grup, FDA: Favipiravir + Deksametazon verilen grup.

Ayrıca, DEKSA grubundaki AMH düzeyleri ($0,315 \pm 0,018$), FPR grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuş ($p < 0,001$), ancak SG grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark göstermemiştir ($p > 0,05$). FDA grubundaki AMH düzeyleri ($0,270 \pm 0,026$), SG grubuna göre daha düşük, ancak FPR grubuna göre daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Sonuç olarak, FPR grubundaki AMH düzeylerinin en düşük, SG grubundaki düzeylerin ise en yüksek olduğu belirlenmiştir (Veriler normal dağıldığı için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırmalar gerçekleştirildi. Post-hoc test olarak varyanslar homojen olmadığı için Games-Howell testi kullanıldı.).

2. Doku Malondialdehid (MDA) ve Total Glutasyon (tGSH) analizi sonuçları

Çalışmamızda, oksidatif stres parametreleri olan MDA ve tGSH seviyeleri gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar göstermiştir. MDA düzeyleri değerlendirildiğinde, FDA grubunda (9.23 ± 0.48) MDA seviyeleri, SG grubuna (1.56 ± 0.30) kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$). Ayrıca, FPR (3.42 ± 0.30) ve DEKSA (1.72 ± 0.28) gruplarında da MDA seviyeleri SG grubuna göre artış göstermiştir ($p < 0.001$). FDA grubundaki MDA düzeyleri, FPR ve DEKSA gruplarına göre de anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.001$).

tGSH seviyeleri incelendiğinde, FDA grubunda (1.45 ± 0.24) tGSH seviyelerinin SG grubuna (6.88 ± 0.40) kıyasla anlamlı derecede düşük olduğu gözlemlenmiştir ($p < 0.001$). FPR (3.58 ± 0.31) ve DEKSA (6.59 ± 0.42) gruplarında da tGSH seviyeleri SG grubuna göre azalmıştır ($p < 0.001$). Ayrıca, FDA grubunda tGSH seviyeleri, FPR grubuna kıyasla daha belirgin bir azalma göstermiştir ($p < 0.001$). Bu bulgular, oksidatif stres göstergelerinin farklı gruplarda önemli değişiklikler gösterdiğini ve FDA grubunda en yüksek MDA seviyeleri ile en düşük tGSH seviyelerinin bulunduğunu ortaya koymaktadır. Şekil 2’de gruplara ait MDA ve tGSH düzeyleri görülmektedir (Veriler normal dağıldığı için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırmalar gerçekleştirildi. Post-hoc test olarak varyanslar homojen olduğu için Tukey testi kullanıldı.).



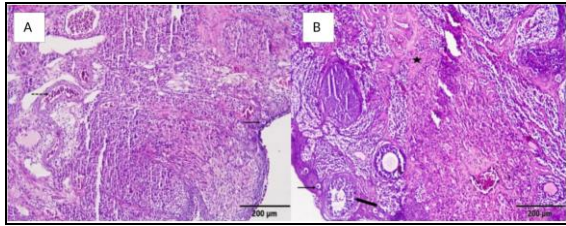
Şekil 2. Gruplar arasında MDA ve tGSH düzeylerinin karşılaştırılması.

SG: Sağlıklı grup, FPR: Favipiravir verilen grup, DEKSA: Deksametazon verilen grup, FDA: Favipiravir + Deksametazon verilen grup.

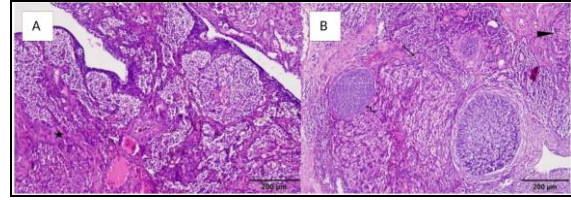
3. Histopatolojik ve Stereolojik Bulgular

Kontrol grubu normal histolojik yapıda olduğu gözlemlendi. FPR grubunda foliküler hücre bütünlüğünün bozulduğu ve fibrotik alanların arttığı gözlemlendi. DEKSA grubunda kontrol grubuna göre kortikal alanda bağ doku artışı gözlemlendi. FDA grubunda kontrol grubuna göre primordiyal foliküllerin azaldığı ve atretik foliküllerin arttığı, korteks/medulla oranında artış ve folikül hücrelerinde dejenerasyon

gözlendi. Her dört gruptaki ratların over dokularına ait histopatolojik görüntüler şekil 3, 4'te verilmiştir.



Şekil 3. A. SG, ince ok primordiyal folikül, kesikli ok: damar. H-E. 20x. B. FPR, Yıldız: Fibröz bağ dokusu, Kalın ok: Foliküler hücre deformasyonu. H-E. 20x.



Şekil 4. A. DEKSA grubu. H-E. 20x. B. FDA grubu. Kavisli ok: Dejenerasyon, ok başı: Atretik folikül. H-E. 20x.

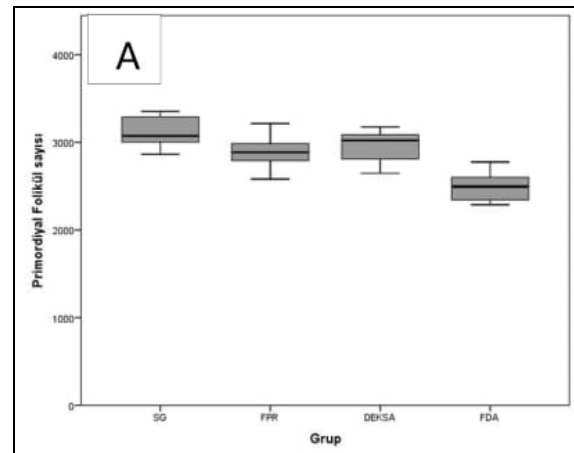
Çalışma gruplarında stereolojik ölçümler yapılmış ve primordiyal folikül sayısı, korteks hacmi, medulla hacmine ait tanımlayıcı istatistikler tablo 1'de sunulmuştur.

Tablo 1. Ovaryuma ait stereolojik bulgular.*

		Primordiyal Folikül sayısı	Korteks Hacmi	Medulla hacmi
SG	Ortalama	3118	8,9	1,3
	Standart sapma	177	0,8	0,2
	Medyan	3072,5	8,8	1,4
	Minimum	2864	7,5	1,1
	Maksimum	3352	10,1	1,8
FPR	Ortalama	2889,6	9,1	2,2
	Standart sapma	186,6	0,6	0,2
	Medyan	2885	9,2	2,1
	Minimum	2581	8,1	2,0
	Maksimum	3214	9,8	2,6
DEKSA	Ortalama	2956,1	7,9	2,8
	Standart sapma	182,7	0,4	0,2
	Medyan	3020	8	2,8
	Minimum	2647	7,1	2,4
	Maksimum	3174	8,4	3,1
FDA	Ortalama	2492	6,3	1,9
	Standart sapma	171,8	0,3	0,1
	Medyan	2494	6,3	1,9
	Minimum	2287	5,9	1,7
	Maksimum	2775	6,8	2,1

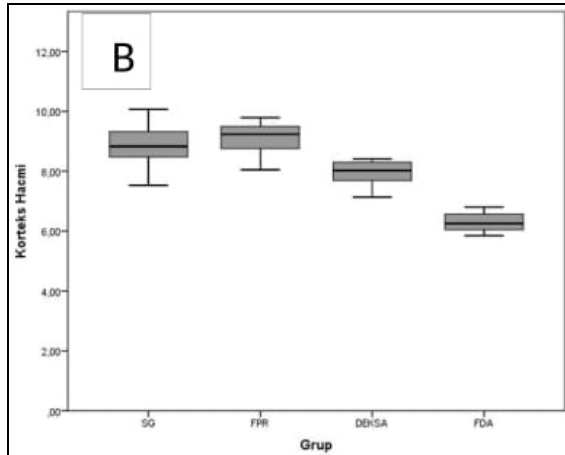
*Veriler normal dağıldığı için tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile karşılaştırmalar gerçekleştirildi. Post-hoc test olarak varyanslar homojen olduğu için Tukey testi kullanıldı.

Gruplarda primordiyal folikül sayısı karşılaştırıldığında, FPR ve DEKSA grubunda SG'ye göre daha düşük sayıda folikül görülmesine rağmen farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi (sırasıyla $p = 0,075$; $p = 0,293$). Fakat kombinasyon uygulanan grupta (FDA) SG'ye göre düşük folikül sayısına rastlanmıştır ($p < 0,001$) (Şekil 5A).



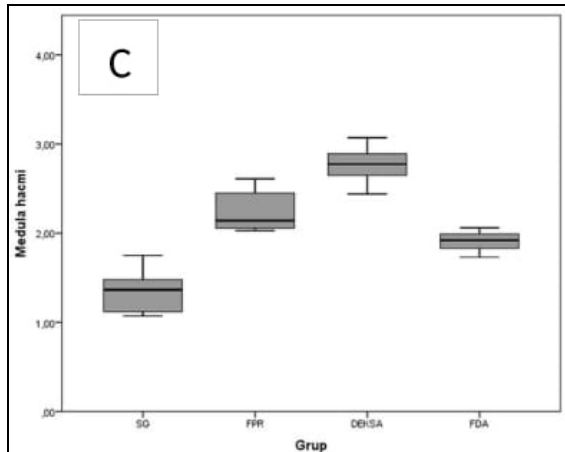
Şekil 5A. Sırasıyla SG, FPR, DEKSA ve FDA gruplarında A. Primordiyal folikül sayısının karşılaştırılması.

Korteks hacmi incelendiğinde, FPR grubunda hacim SG ile benzer düzeyde görüldü ($p=0,812$). DEKSA ve kombinasyon gruplarında ise hacim SG'ya göre daha düşüktü (sırasıyla $p=0,012$; $p<0,001$) (Şekil 5B).



Şekil 5B. Korteks hacminin karşılaştırılması.

Medulla hacmi ölçümleri karşılaştırıldığında tüm ilaç gruplarında SG'ya göre yüksek hacme rastlandı (sırasıyla $p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$) (Şekil 5C).



Şekil 5C. Medulla hacminin karşılaştırılması.

TARTIŞMA

COVID-19'un ana hedefi akciğerler, bağışıklık sistemi organları ve sistemik küçük damarlar olsa da, diğer sistemleri etkileyebilmektedir (8). SARS-CoV2'nin fonksiyonel reseptörü olan anjiyotensin dönüştürücü enzim-2'nin (ACE2) reseptörleri, başta endotel ve epitel hücrelerinin yüzeyinde olmak üzere testis, ince bağırsak, böbrekler, kalp, tiroid ve yağ dokusu yüksek düzeyde ekspresyone edilmektedir (9-11). Özellikle overler, uterus, plasenta ve vajende de enzim ekspresyonunun yüksek düzeydedir (12). Ovaryan granüloza hücrelerinde ACE2 ekspresyonunun rapor edilmesi nedeniyle overlerin SARS-CoV2'nin hedefi haline gelebileceği, yumurtalıkların foliküler membranına ve granüler

hücrelerin olumsuz etkilenecek ve oosit kalitesini düşürerek kadın kısırlığına yol açabileceğini öne sürülmüştür (13, 14). Ancak COVID-19'un reproduktif çağıdaki kadınların over işlevi üzerindeki etkisine ilişkin yeterli klinik veri bulunmamaktadır. Üreme çağındaki kadınlarda COVID-19 enfeksiyonu ile yumurtalık fonksiyonu arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma, COVID-19'un yumurtalık rezervlerinde ve üreme endokrin yanıtlarında azalma ve yumurtalık hasarına yol açtığını göstermiştir (15). Temmuz 2021'de Wilkins ve Al-Inizi (16), COVID-19 ile enfekte olmuş bir kadında gelişen erken yumurtalık yetmezliği ve hormonal bozukluğa ilişkin ilk raporu sundu. COVID-19 enfeksiyonundan iki ay önce hastanın adetleri ve gonadotropin seviyeleri normalken, enfeksiyondan yedi ay sonra FSH ve LH seviyeleri yüksek bulunmuştur. İki ay sonra test tekrarlandığında gonadotropin seviyesi düşmemiş ve bu durum kişinin hamile kalması için yardımcı üreme yöntemlerine ihtiyaç duyacağını göstermiştir. SARS-CoV2'nin tedavisinde kullanılan ilaçların etkileri ve yan etkileri ile ilgili çalışmalar yapılmış olsa da favipiravir ve deksametazonun dişi üreme sistemi ve ovaryan rezerv üzerindeki kombine etkileri ile ilgili az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmada COVID-19 tedavisinde tek başına veya kombine halde kullanılabilen favipiravir ve deksametazonun dişi sıçanların over rezervine ve üreme fonksiyonuna etkisini biyokimyasal ve histopatolojik olarak araştırmayı amaçladık.

Favipiravir; bir ribonükleik asit (RNA) polimeraz inhibitörü olup, birçok RNA virüsüne etkilidir. National Medical Products Administration of China tarafından, Mart-2020 tarihinde favipiravir, minimal yan etkilili ilk anti-COVID-19 ilaç olarak onaylanmıştır (17). Favipiravir, sınırlı veriler doğrultusunda düşük yan etki profili sergilemekte olup, şimdiye kadar bildirilen yan etkiler arasında bulantı, kusma, gaz artışı, diyare, döküntü göğüs ağrısı, psikiyatrik semptomlar, karaciğer fonksiyon bozukluğu, nötrofil düzeyinde azalma ve hiperürisemi bulunmaktadır (18, 19). COVID-19 enfeksiyonunda favipiravirin yüksek dozlarda kullanımı önerilmektedir ancak favipiravir yüksek dozlarda daha ciddi yan etkilere neden olmaktadır (20, 21). Balcı ve ark.'nın (22) yaptığı çalışmada düşük (100 mg/kg) ve yüksek doz (400 mg/kg) favipiravirin dişi sıçanlarda yumurtalık ve üreme fonksiyonları üzerindeki etkilerini araştırılmış ve favipiravir yüksek dozlarda hayvanların yumurtalık dokusunda daha şiddetli oksidatif hasara neden olduğu görülmüştür. Düşük doz favipiravir uygulanan hayvanların bir kısmında kısırlık gelişmiş, yüksek doz favipiravir ile tedavi edilen tüm hayvanlarda kısırlık gözlenmiştir. Sonuç olarak çalışmamızla uyumlu şekilde, favipiravirin yumurtalık dokusu ve üreme fonksiyonu üzerindeki olumsuz etkisi ilk kez ortaya konmuştur. Çalışmamızda favipiravir uygulanan deney

grubunda AMH ve tGSH düzeylerinin ve folikül sayısının sağlıklı gruba göre daha düşük, MDA düzeylerinin ise daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca FPR grubunda foliküler hücre bütünlüğünün bozulduğu ve fibrotik alanların arttığı gözlenmiştir. High-flow oksijen takviyesi veya ventilatör desteği alan veya Ekstrakorporal Membran Oksijenizasyon (ECMO) yapılan COVID-19 hastaları için kortikosteroidler önerilmektedir. Güçlü antiinflamatuar ve antifibrotik etkili olan deksametazon düşük dozda kullanıldığında pulmoner ve sistemik inflamasyonun çözümünü hızlandırmaktadır. Uzun süredir alerji, astım ve inflamasyon tedavisinde kullanılan deksametazonun 6000'den fazla hasta gönüllünün dahil edildiği bir çalışmada COVID-19 nedenli ölümleri azalttığına ilişkin kanıtlar bulunmaktadır (23, 24). COVID-19 hastalarında deksametazon tedavisinin en önemli kısıtlamalarından biri viral klirense etkisidir. İki büyük meta-analize göre, bazı çalışmalarda deksametazonun viral klirenste uzamaya yol açtığı, bazılarında değişmediği, az sayıda çalışmada ise kısaldığı görülmüştür. Bunun yanında sekonder enfeksiyon gelişimi, hiperglisemi, hipertansiyon, psikoz ve heparin birlikte uygulandığında gastrointestinal kanama riskinin artması gibi yan etkiler de görülebilmektedir (25, 26). Er ve ark. (27) koçlarda deksametazonun kandaki oksidatif duruma etkisini araştırmışlar ve cilt altına tek doz deksametazon (0.5 mg/kg) uygulamasının ilk 24 saat içinde serum oksidan seviyelerini azalttığını belirtmişlerdir. Ancak mevcut araştırmada deksametazon uygulamasının serum oksidan düzeylerinde istatistiki düzeyde olmayan dalgalanmalara neden olduğunu belirlemişlerdir ($p > 0.05$). İlacın ratlarda MDA düzeyini düşürücü etkisi olduğu bildirilmesine (28) rağmen, invitro şartlarda gelişen oksidatif stresi engelleyemediğini (29) ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında rat mide dokusu MDA düzeyini artırdığını gösteren (30) çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmalarda deksametazonun oksidatif stres üzerine etkisinin uygulama dozuna, seçilen oksidatif stres parametre türüne, gelişen oksidatif stresin şiddetine ve hayvan türüne göre değişiklik gösterebileceği ifade edilmiştir.

Gong ve ark.'nın (31) 2021 yılında Çin'de yaptığı bir rat çalışmasında prenatal deksametazon maruziyeti (PDM)'nin, dişi yavrular üzerinde uzun süreli üreme toksisitesine neden olabileceği ve maternal hat yoluyla nesiller arası aktarılabileceği gösterilmiştir.

Çalışmamızda deksametazon uygulanan grupta AMH, MDA ve tGSH düzeylerinin SG ile benzer olduğu, dolayısıyla tek başına deksametazonun over rezervine ve oksidan parametrelere belirgin etkisi olmadığı ancak kontrol grubuna göre overlerde kortikal alanda bağ doku artışına neden olduğu gözlenmiştir. Literatürde deksametazonun favipiravirle kombine halde over rezervine biyokimyasal veya histopatolojik etkisiyle ilgili bir çalışma bulunmamıştır. Çalışmamızda FDA grubunda deksametazonun, favipiravirin over rezervine olan olumsuz etkisini azalttığı düşünülmüştür. Bu durumun aksine FDA grubunda diğer gruplara göre oksidan içeriği artmış, antioksidan aktivite azalmış, dolayısıyla AMH'da görülen tersine deksametazon, oksidan ve antioksidan sistemlerde favipiravirin olumsuz etkisini artırıcı etki göstermiştir. Yine bu grupta kontrol grubuna göre primordiyal foliküllerin azaldığı ve atretik foliküllerin arttığı, korteks/medulla oranında artış ve folikül hücrelerinde dejenerasyon gözlenmiştir.

Sonuç olarak, COVID-19 tedavisinde tek başına veya kombine halde kullanılabilen favipiravir ve deksametazonun, dişi reproduktif sisteme advers etkileri ve ilaç etkileşimleri olabilmektedir. Çalışmamızda favipiravir ve/veya deksametazonun serum AMH düzeyini ve ovaryan primordiyal folikül sayısını azaltarak over rezervini olumsuz yönde etkileyebileceği, over dokusunda oksidatif strese neden olabileceği in vivo olarak gösterilmiştir. Bizim çalışmamız, favipiravirin ve deksametazonun kombine halde kullanımının yumurtalık dokusu ve üreme fonksiyonu üzerindeki etkisini ortaya koyan ilk çalışmaydı. Ancak hayvan çalışmaları insanlar üzerinde aynı etkiyi yaratmayabilir. Bu nedenle sözü edilen ilaçların tek başına veya kombine kullanımlarının izlenmesi amacıyla birçok kapsamlı ve detaylı çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bu ilaçların yan etki profilleri açıkça ortaya konmalı, özellikle üreme çağındaki kadınlarda kar/zarar hesabı yapılarak kullanılmalıdır.

KAYNAKLAR

- Oktem O and Urman B. Understanding follicle growth in vivo. *Hum Reprod* 2010; 25: 2944-54.
- Nelson SM. Biomarkers of ovarian response: current and future applications. *Fertil Steril* 2013; 99: 963-9.
- Shi Z and Hu Z. A review of studies on animal reservoirs of the SARS coronavirus. *Virus Res* 2008; 133: 74-87.
- Altındış M and Toptan H. SARS CoV 2 Laboratuvar Tanısı. *J Biotechnol and Strategic Health Res* 2020; 1: 76-84.
- İzci-Çetinkaya F, Karagöz H and Yıldız O. Comparison of liver safety of favipiravir and hydroxychloroquine in COVID-19 treatment. *Klinik Derg* 2020; 33: 235-40.
- Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-8.
- Sedlak J and Lindsay RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Anal Biochem* 1968; 25: 192-205.
- Zhang Y, Geng X, Tan Y et al. New understanding of the damage of SARS-CoV-2 infection outside the respiratory system. *Biomed Pharmacother* 2020; 127: 110195.
- Zhou XL, Yang XG, Wang B, Hu L and Zhang W. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020; 579: 270-3.
- Li MY, Li L, Zhang Y and Wang XS. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty* 2020; 9: 1-7.
- Hamming I, Timens W, Bulthuis M et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 2004; 203: 631-7.
- Jing Y, Run-Qian L, Hao-Ran W et al. Potential influence of COVID-19/ACE2 on the female reproductive system. *Mol Hum Reprod* 2020; 26: 367-73.
- Honorato-Sampaio K, Pereira VM, Santos RA and Reis AM. Evidence that angiotensin-(1-7) is an intermediate of gonadotrophin-induced oocyte maturation in the rat preovulatory follicle. *Exp Physiol* 2012; 97: 642-50.
- Xu H, Zhong L and Deng J. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci* 2020; 12: 816.
- Ding T, Wang T, Zhang J et al. Analysis of ovarian injury associated with COVID-19 disease in reproductive-aged women in Wuhan, China: An observational study. *Front Med (Lausanne)* 2021; 8: 635255.
- Wilkins J and Al-Inizi S. Premature ovarian insufficiency secondary to COVID-19 infection: An original case report. *Int J Gynaecol Obstet* 2021; 154: 179-80.
- Küçük İG ve Öngel K. Covid-19 tedavisinde favipiravir kullanımı: Tartışılan konular. *TJFMPC* 2021; 15: 5-7.
- Sürmelioglu N ve Demirkan K. COVID-19 tedavisinde kullanılan ilaçlar ve akılcı ilaç kullanımı. *AKTD* 2020; 29(Özel Sayı 1): 44-53.
- Cai Q, Yang M, Liu D et al. Experimental treatment with favipiravir for COVID-19: An open-label control study. *Engineering (Beijing)* 2020; 6: 1192-8.
- Uğuz M ve Eşkut B. Covid 19 enfeksiyon tedavisi. *Med Res Rep* 2020; 3: 17-31.
- Pilkington V, Pepperrell T, Hill A. A review of the safety of favipiravir - a potential treatment in the COVID-19 pandemic? *J Virus Erad* 2020; 6: 45-51.
- Balcı S, Çöllüoğlu Ç, Yavuzer B et al. Effect of low and high dose of favipiravir on ovarian and reproductive function in female rats: Biochemical and histopathological evaluation. *Gen Physiol Biophys* 2022; 41: 457-63.
- Horby P, Lim WS, Emberson JR, Mafham M and Bell JL. Recovery Collaborative Group. Dexamethasone in hospitalized patients with Covid-19-preliminary report. *N Engl J Med*, 2020.
- Coronavirus Drug and Treatment Tracker <https://www.nytimes.com/interactive/2020/science/coronavirus-drugs-treatments.html>. (Erişim: 05 Ağustos 2020).
- Cano EJ, Fuentes XF, Campioli CC et al. Impact of corticosteroids in coronavirus disease 2019 outcomes: systematic review and metaanalysis. *Chest* 2021; 159: 1019-40.
- Van-Paassen J, Vos JS, Hoekstra EM et al. Corticosteroid use in COVID 19 patients: A systematic review and metaanalysis on clinical outcomes. *Crit Care* 2020; 24: 43-4.
- Er A, Çorum O, Eser H, Bahçivan E ve ark. Koçlara deksametazon uygulamasının kan oksidatif durum ve prostaglandin F2α metaboliti düzeyine etkisi. *Eurasian J Vet Sci* 2016; 32: 89-93.
- Gokce M, Saydam O, Hanci V, Can M and Bahadır B. Antioxidant vitamins C, E and coenzyme Q10 vs dexamethasone: comparisons of their effects in pulmonary contusion model. *J Cardiothorac Surg* 2012; 26: 92-8.

29. Deng Z, Zhou JJ, SY SYS et al. Procaterol but not dexamethasone protects 16HBE cells from H₂O₂-induced oxidative stress. J Pharmacol Sci 2014; 125: 39-50.
30. Swamy AH, Sajjan M, Thippeswamy AH, Koti BC and Sadiq AJ. Influence of proton pump inhibitors on dexamethasone-induced gastric mucosal damage in rats. Indian J Pharm Sci 2011; 73: 193-8.
31. Gong X, Dai S, Wang T et al. MiR-17-5p/FOXL2/CDKN1B signal programming in oocytes mediates transgenerational inheritance of diminished ovarian reserve in female offspring rats induced by prenatal dexamethasone exposure. Cell Biol Toxicol 2023; 39: 867-83.