



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK
LİSANS
TEZİ

ADOLESAN DIŞI RATLARDA İZOTRETİNOİNİN FOLLİKÜL
AKTİVASYONUNDAKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ASIYE ASLI EMNİYET SERT

HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEMMUZ 2018



**ADOLESAN DİŞİ RATLARDA İZOTRETİNOİNİN FOLLİKÜL
AKTİVASYONUNDAKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

Asiye AŐı EMNİYET SERT

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TEMMUZ 2018

Asiye Aslı EMNİYET SERT tarafından hazırlanan “Adolesan Dişi Ratlarda İzotretinoinin Follikül Aktivasyonundaki Etkilerinin İncelenmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Başkan : Prof. Dr. Engin ÇALGÜNER

Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Üye : Doç. Dr. Mete KÖKSAL

Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalı, Lokman Hekim Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/~~onaylamıyorum~~

Tez Savunma Tarihi: 27/07/2018

Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Asiye Aslı EMNİYET SERT

27 /07 / 2018

ADOLESAN DIŞI RATLARDA İZOTRETİNOİNİN FOLLİKÜL
AKTİVASYONUNDAKİ ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Asiye Aslı EMNİYET SERT

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Temmuz 2018

ÖZET

Akne yağ bezlerinin ve kıl köklerindeki piloseböz folliküllerin fonksiyonel inflamasyonu ve lezyonu ile sonuçlanan bir cilt hastalığıdır. İzotretinoin klinikte akne tedavisinde kullanılan bir preparattır. Forkhead Transkripsiyon Faktörleri ailesinden olan FOXO3 proteini ise primordial folliküldeki oositte olgun oosit oluşması sürecinde anahtar rol oynamaktadır. İnaktif primordial folliküldeki oositlerde çekirdekte ifade edilirken aktivasyonun başlamasıyla sitoplazmada ifadelenmeye başlar. Oosit aktivasyonu süreci başladığında aktive olan primordial folliküllerdeki ve primer folliküllerdeki oositlerin sitoplazmalarında yüksek derecede ifadelenir. Bu bilgiler FOXO3' ün, oosit aktivasyonu aşamasında önemli bir belirteç olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda farklı dozlarda uygulanan izotretinoinin adolesan rat ovaryumundaki oosit aktivasyonuna olan etkisinin incelenmesi amaçlandı. Deneyler 32 adet adolesan Wistar albino cinsi rat üzerinde gerçekleştirildi. Denekler rastgele seçilerek 4 gruba ayrıldı (n=8): I. kontrol grubu II. Susam yağı grubu, III. düşük doz izotretinoin grubu ve IV. yüksek doz izotretinoin grubu. Alınan ovaryum doku örnekleri Bouin fiksatif ile tespit edilerek takip yöntemlerinden geçirildi. Kesitler immünohistokimyasal olarak anti-FOXO3 antikoru ile işaretlendi. Histomorfolojik inceleme için ikili (H&E) ve üçlü boyama prosedürü (Crossman's Modification of Mallory's triple stain) uygulandı. Çalışmamızdan elde edilen bulgular doğrultusunda yüksek doz izotretinoin uygulamasının FOXO3 ün primordial folliküllerde yer alan oositlerin çekirdeklerindeki ifadelenmesinin zayıflamasına neden olduğu ve FOXO3' ün nükleustan sitoplazmaya geçişini inhibe ederek oositlerin gelişim aktivasyonlarını engellediğini gösterdi.

Bilim Kodu : 1033

Anahtar Kelimeler : Follikül aktivasyonu, ovaryum, akne, izotretinoin, FOXO3

Sayfa Adedi : 93

Danışman : Prof. Dr. Candan ÖZÖĞÜL

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ISOTRETINOIN IN
FOLLICULARACTIVATION IN ADOLESCENT FEMALE RATS

(M. Sc. Thesis)

Asiye Aslı EMNİYET SERT

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

July 2015

ABSTRACT

Acne is a skin disease that results in functional inflammation and lesions of pilosebaceous follicles in sebaceous glands and hair follicles. Isotretinoin is a drug used clinically for the treatment of acne. The FOXO3 protein from Forkhead Transcription Factor family plays a key role in the process of mature oocyte formation from primordial follicular oocyte. The FOXO3 protein is expressed in the nucleus of the inactive primordial follicular oocytes and begins to be expressed in the cytoplasm at the onset of activation. When the oocyte maturation process begins, it is expressed at high levels in the cytoplasm of the active primordial follicles and oocytes in the primary follicles. This information indicates that FOXO3 is an important marker for oocyte maturation. The aim of this study was to investigate the effect of isotretinoin administered at different doses on oocyte activation in the adolescent rat ovary. Experiments were performed on 32 adolescent Wistar albino rats. Animals were randomly selected and divided into 4 groups (n = 8): I. control group, II. sesame oil group, III. low dose isotretinoin group and IV. high dose isotretinoin group. Obtained ovary tissue specimens were fixed with Bouin's fixative solution and tissue was prepared according to light microscopic methods. Sections were immunohistochemically labeled with anti-FOXO3 antibody. Our study showed that administration of high dose isotretinoin in the direction of the findings from study resulted in a decrease in the expression of FOXO3 in the nuclei of oocytes in primordial follicles and inhibited the developmental activation of oocytes by inhibiting the transition of FOXO3 from the nucleus to the cytoplasm.

Science Code : 1033

Key Words : Follicle activation, ovarium, acne, isotretinoin, FOXO3

Page Number : 93

Advisor : Prof. Dr. Candan ÖZÖĞÜL

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim süresince bilgi tecrübesi ve sabırla, her zaman desteğini ve sevgisini hissettiğim, tez çalışmalarım boyunca yönlendirme ve bilgilendirmeleri ile bana yol gösteren, her zaman yanımda olan Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız ve Danışman hocam Sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL'a en kalbi duygularıyla teşekkürlerimi sunarım. Anabilim dalımızın saygıdeğer öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS, Prof. Dr. Gülnur Take KAPLANOĞLU ve Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU hocalarıma bana öğrettikleri bilgi ve donanım nedeniyle çok teşekkür ederim. Yüksek lisans eğitimimin bir kısmında bilgi ve tecrübelerini fedakarca sunan, yetişmemdeki katkısını her zaman dile getirdiğim Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Hikmet ALTUNAY hocama ve asistan arkadaşım Arş. Gör. Nuh YILDIRIM'a teşekkürü borç bilirim.

Ayrıca laboratuvar çalışmalarım boyunca desteğini ve dostluğunu daima hissettiğim, dirsek temaslarını her zaman sürdüren Arş. Gör. Dr. Gülistan Sanem SARIBAŞ'a, Arş. Gör. Dr. Saadet Özen AKARCA DİZAKAR'a, Arş. Gör. Hüseyin Erdiç BEŞİKÇİOĞLU'na, sevgili arkadaşım Arş. Gör. Pınar KAÇAMAK'a ve bölümümüzdeki tüm uzmanlarımıza, asistan arkadaşlarıma teşekkür ediyorum. Ayrıca her zaman yardımımıza koşan Anabilim Dalımız teknik personeli Recep ORHAN'a teşekkür ederim. Hayatımın her alanında iyi ki varsınız dedirten, her zaman yanımda olan, beni tamamlayan, beni ben yapan, canım kardeşlerim; Nihat Egemen'e, Atilla Samed'e, en yakın arkadaşım olarak bildiğim ve hayatımın sonuna kadar öyle olacak olan biricik kız kardeşim Derya Gülenay'a, beni okutup bu günlere getiren, annem Öğretmen Nilüfer Mehtap BİÇMEN'e, Anneannem Fazilet ve dayım Faysal BİÇMEN'e ve Babam Atilla EMNİYET'e çok teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanması sırasında daima yanımda olan, her zaman sabırla desteğini sunan, mutluluğumuzu her şeyden üstün tutan, denizlerce, okyanuslarca uzakta da olsa daima yanı başımda olduğunu bana hissettiren, uzak yol vardiya zabiti sevgili eşim Kadir SERT'e çok teşekkür ederim.

Arş. Gör. Asiye Aslı EMNİYET SERT

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ovaryumun Gelişimi	5
2.2. Ovaryumun Anatomisi	6
2.3. Ovaryumun Histolojisi	7
2.3.1. Ovaryum follikülleri.....	8
2.3.2. Ovulasyon	11
2.3.3. Korpus Luteum (Sarı Cisim).....	12
2.3.4. Oosit maturasyonu	12
2.4. Ovaryumun Fizyolojisi.....	13
2.5. Follikül Aktivasyonu.....	16
2.6. Forkhead Transkripsiyon Faktörleri ve FoxO3	18
2.7. Akne ve Tedavisi.....	19
2.7.1. Retinoik asit ve türevleri	20
2.7.2. İzotretinoin ve etki mekanizması	20
3. YÖNTEM	23
3.1. Deney Hayvanları.....	23
3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasallar	23
3.3. Deney Protokolü.....	23

Sayfa

3.4. Deneklerde Ötenazi	24
3.5. Işık Mikroskopik Takibi Yöntemi.....	25
3.6. Hematoksilen- Eozin Boyama yöntemi	26
3.7. Üçlü boyama (Crossman’s Modification of Mallory’s Triple Stain) Yöntemi.....	28
3.8. Crossman’s Modification of Mallory’s Triple Stain ile Fibrotik Alan Değerlendirmesi.....	31
3.9. Follikül Sayımı için Kullanılan Stereolojik Yöntem	31
3.10. İmmünohistokimyasal Yöntem	34
3.11. İstatistiksel Yöntem.....	37
4. BULGULAR	39
4.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması Histomorfoloji Bulguları	39
4.2. Follikül Sayım Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirmesi	49
4.3. Fibrotik Alan Değerlendirmesi	54
4.4. FOXO3 İmmün İşaretleme Bulguları	58
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	79
EKLER.....	87
EK-1. Etik Kurul Onay Yazısı.....	88
EK-2. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası	89
ÖZGEÇMİŞ	90

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge		Sayfa
Çizelge 4.1.	Tüm gruplara ait mavi piksel sayımına dayalı fibrotik alan değerleri	51
Çizelge 4.2.	Tüm grupların fibrozis yoğunluklarına ait tanımlayıcı değerleri (SD: Standart sapma, IQR: Çeyrekler arası genişlik)	57



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil		Sayfa
Şekil 3.1.	Folikül sayımında kullanılan örnek bir disektör (Kesikli çizgi sayım için kullanılabilirken Sayım kenarı, sürekli çizgi sayım için kullanılmayan Sayım dışı kenarı ifade eder (Altunkaynak, ve diğerleri, 2016)'dan düzenlenerek alınmıştır)	32
Şekil 3.2.	Örnek bir primordiyal follikül sayımı	32
Şekil 4.1.	Tüm gruplara ait primodial follikül sayısı ortalamaları *p<0,005	51
Şekil 4.2.	Tüm gruplara ait unilaminar primer follikül sayısı ortalamaları *p<0,005	52
Şekil 4.3.	Tüm gruplara ait multilaminar primer follikül sayısı ortalamaları *p<0,005	52
Şekil 4.4.	Tüm gruplara ait sekonder follikül sayısı ortalamaları	53
Şekil 4.5.	Şekil 4.5. :Tüm gruplara ait Graaf follikülü sayısı ortalamaları	53
Şekil 4.6.	Tüm gruplara ait mavi piksel sayımına dayalı fibrotik alan değerleri ...	57

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 1.1. Bir ovaryumun yapısı((Standing , 2008) -Gray's Anatomy'den düzenlenerek alınmıştır.)	8
Resim 4.1. Kontrol grubunda normal histolojik karakterde primordiyal follüküller (yeşil oklar) (H&E)	39
Resim 4.2. Kontrol grubunda normal histolojik görünümde unilaminar primer follüküller (mavi oklar) (H&E)	39
Resim 4.3. Kontrol grubunda teka-follükül kompleksi (yeşil ok), zona pellusida (kırmızı ok), primer oosit (O), granüloza hücreleri (*) ile normal histolojik yapı sergileyen multilaminar primer follükül (}), (H&E)	40
Resim 4.4. Kontrol grubunda tüm yapısal elemanları ile normal histolojik görünüm sergileyen teka ve sekonder follükül yapısı (}) (H&E) ...	40
Resim 4.5. Kontrol grubunda tüm yapısal elemanları ile normal histolojik yapıda tersiyer follükül (H&E)	41
Resim 4.6. Susam yağı grubunda sağlıklı histolojik görünüm sergileyen primordiyal follüküller (yeşil oklar) (H&E)	41
Resim 4.7. Susam yağı grubunda normal histolojik yapıda unilaminar primer follükül (mavi ok) (H&E)	42
Resim 4.8. Susam yağı grubunda tüm yapısal elemanları ile normal histolojik karakterde multilaminar primer follükül (}) (H&E)	42
Resim 4.9. Susam yağı grubunda normal histolojik yapıda antral follükül (}) (H&E)	43
Resim 4.10. Susam yağı grubunda teka katmanları ve tüm yapısal elemanları ile sağlıklı bir graff follükülü (}) (H&E)	43
Resim 4.11. Düşük doz grubunda normal histolojik görünümde primordiyal follükül (sarı ok) (H&E)	44
Resim 4.12. Düşük doz grubunda unilaminar primer follükül; granüloza hücrelerinde sitoplazmik vakuoller, oosit-kumulus disintegrasyonu (H&E)	44
Resim 4.13. Düşük doz grubunda henüz zona pellusida gelişimini tamamlamamış multilaminar primer follükül ({ }) (H&E).....	45

Resim	Sayfa
Resim 4.14. Düşük doz grubunda antral follükül; az sayıda piknotik çekirdekli granüloza hücreleri (mavi oklar), düzenli teka-follükül bileşkesi (yeşil ok), vakuollü görünüm sergileyen primer oosit (O)(H&E).....	45
Resim 4.15. Yüksek doz grubunda sitoplazmik dejenerasyon gösteren primordiyal follükül (sarı ok) ve erken atreziye giden follükül (yeşil ok) (H&E)	46
Resim 4.16. Yüksek doz grubunda disintegre follükül hücrelerine sahip unilaminar primer follükül (sarı ok) (H&E)	47
Resim 4.17. Yüksek doz grubunda teka-follükül bağlantısında dejeneratif açılmalarla atreziye giden multilaminar primer follükül (}),(H&E)..	47
Resim 4.18. Yüksek doz grubunda çok sayıda piknotik çekirdekli follükül hücresi içeren antral follükül ve teka-follükül bileşkesinde düzensizlik (H&E)	48
Resim 4.19. Yüksek doz grubunda eritrositlerle dolu graff follükülü antrumu (*), teka tabakalarında disintegrasyon ve teka-follükül bileşkesinde düzensizlik (mavi oklar), kümeler halinde çok sayıda piknotik çekirdekli granüloza hücresi (□) (H&E)	48
Resim 4.20. Kontrol grubu. Crossman's Modification of Mallory's triple stain, (x40 objektifinde)	54
Resim 4.21. Susam yağı (çözücü) grubu. Crossman's Modification of Mallory's triple stain	55
Resim 4.22. Düşük doz izotretinoin grubu. Crossman's Modification of Mallory's triple stain	55
Resim 4.23. Yüksek doz izotretinoin grubu. Crossman's Modification of Mallory's triple stain	56
Resim 4.24. Kontrol gurubunda FOXO3 kuvvetli sitoplazmik tutulumu gösteren primordiyal follükülde yer alan aktive oosit (kırmızı ok)	58
Resim 4.25. Kontrol gurubunda FOXO3 kuvvetli sitoplazmik tutulumu gösteren multilaminar primer follükülde yer alan oosit (kırmızı ok)	59
Resim 4.26. Susam Yağı (çözücü) gurubunda FOXO3 sitoplazmik tutulumu gösteren primordiyal follükülde yer alan aktive oosit (kırmızı ok)...	59
Resim 4.27. Susam Yağı (Çözücü) grubunda FOXO3 kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren multilaminar primer follüküldeki oosit (kırmızı ok)	60

Resim		Sayfa
Resim 4.28.	Düşük doz izotretinoin grubunda zayıf sitoplazmik FOXO3 immüntutulumu gösteren primordiyal folliküllerdeki oositler (kırmızı oklar)	60
Resim 4.29.	Düşük doz izotretinoin grubunda gelişen unilaminar primer follikü oosit sitoplazmasında zayıf FOXO3 ifadenmesi	61
Resim 4.30.	Yüksek doz izotretinoin grubunda inaktif primordiyal folliküldeki oosit çekirdeğinde FOXO3 ifadenmesi (kırmızı ok)	61



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Simgeler	Açıklamalar
cc	cubic centimetre(s), santimetre küp
cm ³	santimetre küp
kda	kiloDalton
kg	kilogram
M	Molarite
mg	miligram
ml	mililitre
ng	nanogram
µm	mikrometre, mikron
°C	Celcius Derece, Santigrad Derece
%	1/100, yüzde
P	istatistiksel olarak anlamlılık değeri

Kısaltmalar

Açıklamalar

AFX	bir Forkhead Transkripsiyon Faktörü
Akt	A Serin/Threonin Kinaz 1, Protein kinaz B
Al ₂ SO ₄	Alüminyum Sülfat
AMH	Anti Müllerman Hormon
ATRA	All- <i>trans</i> retinoic Acid
BMP-4	Bone Morfogenic Protein-4
BMP-7	Bone Morfogenic Protein-7
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
Cdkn1B	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B
CK1	Kazein Kinaz 1
CYP26	Retinoik asit 4-hidroksilaz enzimi

Kısaltmalar**Açıklamalar**

DAB	Diamino benzidin
DYRK-1	İkili Fosforilasyonla düzenlenen kinaz-1
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi
FIGLA	Factor In The Germline
FKHR	Forkhead kutusu bağlanma proteinleri
FOXO	Forkhead Transkripsiyon Faktörleri Ailesi
FOXO1	Forkhead Transkripsiyon Faktörü 1
FOXO3	Forkhead Transkripsiyon Faktörü 3
FOXO4	Forkhead Transkripsiyon Faktörü 4
FOXO6	Forkhead Transkripsiyon Faktörü 6
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GnRH	Gonodotropin Serbestleştirici hormon
GÜDAM	Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi
HCl	Hidroklorik Asit
HDL	High Density Lipoprotein
H&E	Hematoksilen ve Eozin ikili boyama yöntemi
HFD	High Fat Diet
H₂O₂	Hidrojen peroksit
IGF-I	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I
IK-β Kinaz	I Kappa-β Kinaz
IRS-1	İnsülin Reseptör Substratı-1
i.m.	inramüsküler
JNK	Jun N Terminal kinaz
K₂SO₄	Potasyum Sülfat
Kit Ligandı	Tirozin Kinaz Reseptörü
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Lüteinleştirici hormon
Li₂CO₃	Lidyum Karbonat
mRNA	mesajcı RiboNükleik Asit
mTOR	Mammalian Target of Rapamycine
Mst-1	Mammalian Sterile 20-like kinase-1

Kısaltmalar**Açıklamalar**

NaOH	Sodyum hidroksit
NaH₂PO₄	Sodyum dihidrojen fosfat
Na₂HPO₄	Disodyum hidrojen fosfat
NOBOX	Newborn Ovary Homeobox
OMI	Oocyte Maturation Inhibitory Factor
p21	Siklin bağımlı kinaz 1
p27	Siklin bağımlı kinaz 2
p53	Tümör baskılayıcı gen
PAS	Periyodik Asit Schiff reaksiyonu
PBS	Fosfat Tuzlu Tamponu
PCNA	Proliferatif Hücrenin Nükleer Antijeni
pH	Hidrojen potansiyeli, asitlik-bazlık derecesi
PIP2	Fosfotidil İnositol 4,5 Bifosfat
PIP3	Fosfotidil İnositol 3,4,5 Trifosfat
PI3K	Fosfotidil İnositol 3 Kinaz
POF	Prematür Ovaryan Yetmezlik Sendromu
POU5F1	Octamer Binding Transcription Factor-4
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu Protein
RA	Retinoik Asit
RARs	Retinoik Asit Reseptörleri
RXR	Retinoik Asit X Reseptörü
SGK	Serum glikokortikoid indüklenbilir kinazları
SOCS3	Supressor of Cytokine Signaling-3
Sohlh-1	Spermatogenez ve Oogenez özgü helix loop helix-1
SRY	Sex Determining Region of Y
TDF	Testis Belirleyici Faktör
TGF	Dönüştürücü Büyüme Faktörü
TLR-2	Toll Like Receptor-2
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
Tris	Hidroksimetil aminometan
TRAIL	TNF Bağlı Apoptoz İndükleyici Ligand
TUNEL	TdT, deoksiUTP İşaretli uçların işaretlenmesi yöntemi

Kısaltmalar**Açıklamalar****Wnt**

Drosophiladaki kanatsızlık geni homologu olan gen.

VEGF

Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü

VLDL

Very Low Density Lipoprotein

ZP

Zona pellucida



1. GİRİŞ

Akne (Yunanca kökenli kelimedir, çiçeklenme, berelenme anlamına gelir), yağ bezlerinin ve kıl köklerindeki piloseböz folliküllerin fonksiyonel inflamasyonu ve lezyonu ile sonuçlanan bir cilt hastalığıdır (Dökmeci ve Dökmeci, 2005). Kişinin yaşam kalitesini, psikososyal durumunu ve kendine güvenini olumsuz etkileyen dermatolojik bir problemdir (Kraft ve Freiman, 2011). Akne tedavisinde en etkin çözüm oral yoldan izotretinoin alınmasıdır. İlk kez FDA onayı ile 1982 yılında Amerika Birleşik Devleti'nde ve de ertesi yıl Avrupa Birliği Devletlerinde ciddi seyirli akne hastalarında uygulanmaya başlanmıştır (Karadag, Parish, ve Lambert, 2017).

Kanada, ABD ve Avrupa klinik uygulama kılavuzları, izotretinoinin, orta-şiddetli akne tedavisi için kullanımını önermektedir (Vallerand, ve diğerleri, 2017). Genellikle dirençli, nodülositik sivilce tedavisinde kullanımının yanı sıra çeşitli deri hastalıklarında da kullanılan sentetik bir A vitamini analogudur (Kartal, Yaşar, Kartal, Özcan, & Borlu, 2017) (Gürel G., Şahin S., & Çölgeçen E., 2017). Oral mukoza ve burun mukozası tahribatı, fotosensitivite, deride kuruluk, kserozis, saç dökülmesi ve kırılganlık en sık yan etkilerdir (Gürel G., Şahin S., & Çölgeçen E., 2017). İzotretinoinin psikiyatrik bozukluklar, -laboratuvar sonuçlarının olumsuz sonuçları, barsak inflamasyonu gibi etkileri üzerine de derlemeler yayınlanmıştır (Vallerand, ve diğerleri, 2017) (Dawson & Dellavalle, 2013) (Williams, Dellavalle, & Garner, 2012)(Haider A, Shaw JC. Treatment of acne vulgaris. , 2004). İzotretinoinin üreme sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olduğu, spontan düşük insidansının artması ile arasında ilişki varlığı daha önce bildirilmiştir (Schnorr, ve diğerleri, 1991).

Forkhead Transkripsiyon Faktörleri, (FoxO); IGF-I/PTEN/Akt sinyal yolağının azalan ifadesine neden olan ve FoxO1, a, FoxO4 ve FoxO6'yu içeren bir gen ailesidir. FoxO geni Akt fosforilasyonu ile düzenlenir. Akt fosforilasyonu FoxO proteinlerinin nükleustan stoplazmaya geçişini inhibe eder. FOXO geninin downstream ifadesi apoptotik genlerin aktivasyonunu engeller. Bu nedenle FOXO proteinleri apoptotik süreçler için önemlidir (Abali, ve diğerleri, 2013) (Huang ve diğerleri, 2016).

FoxO1 proteini (FKHR= Forkhead Rhabdomyosarcoma homologu Forkhead kutusu Bağlanma proteini olarak bilinir.) (Forkhead benzeri protein-1= FKHL1) ve FoxO4

(AFX= bir Forkhead transkripsiyonu faktörü) proteinleri fosforilasyon ve FSH hormonu ile düzenlenir ve kemirgen ovaryumda ifade edilmektedir (Burgering & Kops, 2002).

Ovaryan Folliküler Büyüme, otokrin, parakrin ve intrensek mekanizmalar ile çalışan Intraovarian yerel büyüme düzenleyiciler (IGF-I, steroidler TGF ve de Wnt / Frizzled ailesinin ailesinin üyeleri) ve de endokrin faktörler (pituitar gonadotropinler, FSH, and LH) ile düzenlenmektedir (Burgering & Kops, 2002). FoxO proteinleri de gametogenik fonksiyonlara sahiptir. FoxO3 proteini özellikle primordial folikül aktivasyonu için gereklidir. Primordial ve primer oositlerde yüksek derecede eksprese edilir ve immünohistokimyasal olarak işaretlenebilmektedir (Richards, Sharma , Falender , & Lo, 2002).

Dişilerde ovaryumdaki follikül rezervi, menopoza kadar maturasyon ve atreziyle azalır. FOXO proteinleri ovaryumda follikül rezervini korumak için gereklidir (Tarnawa , Baker , Aloisio , Carr , & Castrillon, 2013). Birey ilk doğduğunda FOXO proteini sitoplazmik konumdadır fakat postnatal 3. günden itibaren dereceli olarak nükleusa konumlanmaya başlar ve postnatal 14. günde nükleusa taşınım sonlanır. Bundan sonra proteini yaşam boyu oosit nükleusunda kalır. Primordial follikülün aktifleşmesinin akabinde sitoplazmaya tekrar konumlanır. Bu gözlemler proteininin primordial folikülden olgun oosite farklılaşma aşamasında moleküler bir anahtar olduğunu göstermektedir (Pelosi , ve diğerleri, 2013). Yapısal olarak aktif FOXO3'ün aşırı ekspresyonunun farelerde üreme kapasitesini artırabileceği bildirilmektedir (Tarnawa , Baker , Aloisio , Carr , & Castrillon, 2013).

Problem Durumu/ Konunun Tanımı

İzotretinoin ciddi nodulokistik akne tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir retinoid olduğu bildirilmiştir. (Abali, ve diğerleri, 2013); izotretinoinin kadın gonadlarındaki olası toksik etkilerini araştırmıştır. Çalışmada toplam 30 dişi sıçan kullanılmıştır ve denekler uygulanan izotretinoin dozuna göre eşit olarak üç eşit gruba ayrılmıştır: 0 mg / kg / gün (grup 1), 7.5 mg / kg / gün (grup 2) ve 15 mg / kg / gün (grup 3). İzotretinoinin ovaryumlar üzerindeki etkilerini, serum anti-Müllerian hormonu (AMH) konsantrasyonlarını ölçerek, TUNEL testi ile apoptoz ve Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ile proliferasyon belirteçlerini işaretleyerek değerlendirmişlerdir. Folikülogenezin her aşamasında atretik folliküllerin yüzdesini, hesaplamışlardır. Serum AMH konsantrasyonlarının her iki izotretinoin grubunda daha düşük olduğunu ve atriyal folliküllerin her iki izotretinoin grubundaki yüzdesinin

kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. İzotretinoin gruplarında PCNA-pozitif granüloza hücrelerinin sayısının azalmış olduğunu, deney grubunda apoptotik granüloza hücreli folikül sayısının arttığını kaydetmişlerdir. Sonuçta izotretinoin maruziyetinin, over rezervinin azalması ve sıçan ovaryumları üzerindeki toksik etkilerden sorumlu olabileceğini belirtmişlerdir (Abali, ve diğerleri, 2013).

Pelosi ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, yapısal olarak aktif FOXO3'ün aşırı ekspresyonunun farelerde üreme kapasitesini artırabileceğini göstermişlerdir. Çalışmada yaşlı -transgenik farelerde yabancı tip farelere kıyasla gonadotropin seviyelerinin azaldığını, folliküllerinin sayısında ise artış olduğunu ve over rezervinin daha fazla korunduğunu bildirmişlerdir. Transgenik dişilerde artan yaş temel alınarak % 31-49 oranında daha fazla doğurganlık saptamışlardır. FOXO3 gen ekspresyonu susturulmuş knockout farelerde, normal farelere kıyasla ovaryum daha yaşlanmış bir profile sahipken, transgenik farelerde ise yabancı tip transkriptomun büyük kısmının onarıldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmayla, farelerde atılmış over rezervinin modelinin nasıl ortaya koyulacağı bildirilerek, FOXO3'ün memeli ovaryumundaki follikül havuzunun koruyucusu olduğunu ve menopozun başlamasındaki potansiyel bir belirleyici olduğunu bildirmişlerdir (Pelosi , ve diğerleri, 2013).

Araştırmanın Amacı

Araştırmanın amacı, (7-8 haftalık) dişi Wistar albino sıçanlar üzerinde farklı doz ve konsantrasyonlarda izotretinoin uygulamasının follikül aktivasyonu üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu kapsamda deneklerin kontrol grubuna kıyasla gen ifadesinin immünohistokimyasal olarak belirlenmesi ve buna bağlı olarak follikül aktivasyonunun değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Belirlenen amaçlara ulaşıldığı takdirde izotretinoin kullanımının ovaryumdaki follikül aktivasyonu üzerine etkileri belirlenmesidir.

Araştırmanın Önemi

Akne tedavisinde yaygın olarak kullanılan izotretinoinin bilinen yan etkilerinin dışında üreme organlarında özellikle ovaryumlardaki etkileri ile ilgili literatürde yer alan çalışmaların çoğu üremeyle ilgili hormon parametreleri üzerinedir. Çok az sayıdaki yapısal verileri inceleyen çalışmalar ise moleküler düzeyde birçok soru işaretine yanıt verememektedir. Araştırmamızda farklı dozlarda uygulanan izotretinoinin follikül aktivasyonundaki etkilerini FOXO3 belirteci kullanılarak yapısal ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmesi

amaçlandı. Çalışma konuyla ilgili olarak literature önemli katkı sağlamakta ve klinik uygulamalar için dikkat çekici olan bir temel sunmaktadır. .

Varsayımlar/Sayıtlar

İzotretinoin ilacının oral uygulanması, Ovaryumda bulunan follikül havuzunun korunmasında anahtar role sahip olan FOXO3 geninin, fosforilasyon enzimlerini inhibisyon etkisi ortadan kalkacağı için ovaryumdaki follikül aktivasyonu üzerinde arttırıcı, over rezervini azaltıcı bir etkiye sahip olduğu varsayılmıştır. Deneylerde bu durumun geçerli olup olmadığı araştırıldı.

Sınırlılıklar

Araştırmamızda follikül aktivasyonu üzerinde doğrudan etkili olan başka yolların da ele alınabileceği, bu yolların FOXO3 proteini ile ilişkilerinin irdeleneceği farklı tekniklerle desteklenen benzer çalışma konularının gelecekte gerçekleştirilecek yeni çalışmalara gereksinim oluşturacağı öngörülmektedir.

Tanımlar

Akne: Yunanca kökenli kelimedir, çiçeklenme, berelenme anlamına gelir, yağ bezlerinin ve kıl köklerindeki piloseböz foliküllerin fonksiyonel inflamasyonu ve lezyonu ile sonuçlanan bir cilt hastalığıdır.

Forkhead Transkripsiyon Faktörleri: (FoxO); IGF-I/PTEN/Akt sinyal yolağının azalan ifadesine neden olan ve FoxO1,a, FoxO4 ve FoxO6'yı içeren bir gen ailesidir.

İzotretinoin: Genellikle dirençli, nodülositik sivilce tedavisinde kullanımının yanı sıra çeşitli deri hastalıklarında da kullanılan sentetik bir A vitamini analogudur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumun Gelişimi

Embriyonun cinsiyeti daha fertilizasyon sırasında genetik açıdan X kromozomuna sahip haploit bir oositin spermle birleşmesi esnasında tayin edilir. Oositi fertilize eden sperm X kromozomuna sahip ise embriyo cinsiyeti dişi, **cinsiyet belirleyici bölgesinde (sex determining region of Y=SRY) testis belirleyici faktör (testes determining factor=TDF)** genini taşıyan Y kromozomuna sahip ise erkek fenotipe sahip olacaktır. Bu gen gonodal farklanmayı kontrol eden genlerin aktivasyonu için anahtar role sahiptir ve cinsiyet organlarının kaderini belirler. Gonadlar gelişimin 7. haftasına kadar erkek veya dişi morfolojik özelliklerini taşımazlar. Gelişimin bu ilk 7 haftalık süresine **farklanmamış gonodal evre** denir. Bu evrede, epiblasttan köken alan primordiyal germ hücreleri ve onların göçü önem arz eder. Bu hücreler ileride gonadları ve genital sisteme ait organları oluşturacaktır. Primordiyal germ hücreleri ilk olarak gelişimin ikinci haftasında epiblasttan ayrılıp, primitif çizgi boyunca ilerleyerek vitellüs kesesinin allantoise yakın duvarına göç eder. Burada gelişimin 3. haftasında endoderm hücreleri arasında konumlanır. Gelişimin 4. haftasında ise ameboid hareketlerle son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek göç hareketine başlarlar ve primitif gonadlara 5. haftanın başında ulaşırlar. **Germ hücreleri** gelişimin 6. haftasına kadar, intermediate (ara) mezodermden gelişen genital (gonodal) kabarıklıklar içinde mevcut değildir ancak 6. haftada genital kabarıklıkların içlerine geçişi gerçekleştirirler. Bu hücrelerin göçü sırasında gerçekleşecek olası bir aksilik gonadların testise ya da ovaryuma farklanmasını engeller. Çünkü bu hücreler gonadların dönüşümü için indüktör etkiye sahiptir (Dudek , 2016) (Moore & Persaud , 2002) (Sadler , 2011).

Gonodal kabarıklıklar kölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşurlar ve bir çift halinde uzunlamasına gelişirler. Primordiyal germ hücreleri primitif gonadlara ulaştığında kölomik epitel proliferasyonunu durdurur, primordiyal germ hücreleri epitel hücrelerinin altında yer alan mezenşim içine girer ve bu yapı **primitif cinsiyet kordonları** denilen düzensiz kordonları meydana getirir. Farklanmamış evre henüz bitmeden bu düzensiz kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu aşamada gonadlar **farklanmamış gonad** olarak isimlendirilir (Dudek , 2016) (Moore & Persaud , 2002) (Sadler , 2011).

XX gonozomlarına sahip olan dişi embriyolarda **primitif cinsiyet kordonları** önce düzensiz hücre kümelerine ayrılır ve overin medullasında konumlanır. Bir süre sonra bu düzensiz hücre kümelerinin olduğu alan vaskülerize bir stroma haline gelerek ovaryum medullasını oluşturur. Dişi embriyonun gonadının yüzey epiteli proliferasyona devam ederek ikincil kordon yapılarını oluşturmaktadır. Yedinci haftada oluşan bu ikincil kordonlara ise **kortikal kordonlar** denmektedir. Bu kordonlar altlarındaki mezenşimin içine yerleşirler ancak kortekste konumlu olarak kalırlar. Gelişimin 4. ayında (yani 16 haftalık bir embriyoda) ise kortikal kordonlar izole hücre kümeleri oluştururlar. Oluşan bu hücre kümelerindeki hücreler mitoz bölünmeyle sayılarını artırırlar ve oogonyumların etrafı **folliküler hücreler** adı verilen epitel tabakası ile kuşatılmış olur. Folliküler hücreler oogonyumlarla birlikte artık primordiyal follikül yapısını oluşturmaktadır. Gelişimin 5. Ayında, yani 20 haftalık bir dişi embriyoda ovaryumun kortikal kısmı follikül hücreleri ile çevrelenmiş oogonia kümeleri içerir. Özetle dişi embriyoda farklılaşmamış evredeki gonada, medüller kordonları dejenerer olur, kortikal kordonları kalıcı olur. (Dudek , 2016) (Moore & Persaud , 2002) (Sadler , 2011)

Oogonyumlar ilk oluştuğlarında son derece hızla bölünürler ve prenatal yaşamın ikinci ayında yaklaşık 600 000, 5. Ayda 7 milyonun üzerinde oogonyum vardır. Üçüncü aydan itibaren oogonyumlar I. mayoz bölünmenin profaz evresine girmeye başlar, ancak bölünme diploten evresinde durur. Bu aşamada duraklayan hücreler primer (birincil) oositlerdir. Primer oositler **follikül hücreleri** olarak adlandırılan yassı hücrelerle çevrilidir. Prenatal 7. ayda oogonyumların çoğu, **atreziye** uğrayarak ortadan kaybolur. Atrezi doğum sonrası da devam eder. Ergenlik çağında yaklaşık 300 000 dolaylarında oosit bulunuyorken 40-45 yaşlarına gelindiğinde yaklaşık 8000 oosit kalır. Doğurganlık çağı süresince bir dişinin başlangıçtan beri sahip olduğu primer oositlerden yaklaşık 400-450 tanesi olgunlaşıp ovülasyonla atılmış olur. Menopoz gerçekleştiğinde, geriye kalan tüm oositler tedrici olarak atreziye uğrayarak ortadan kaldırılır (Dudek , 2016) (Moore & Persaud , 2002) (Sadler , 2011).

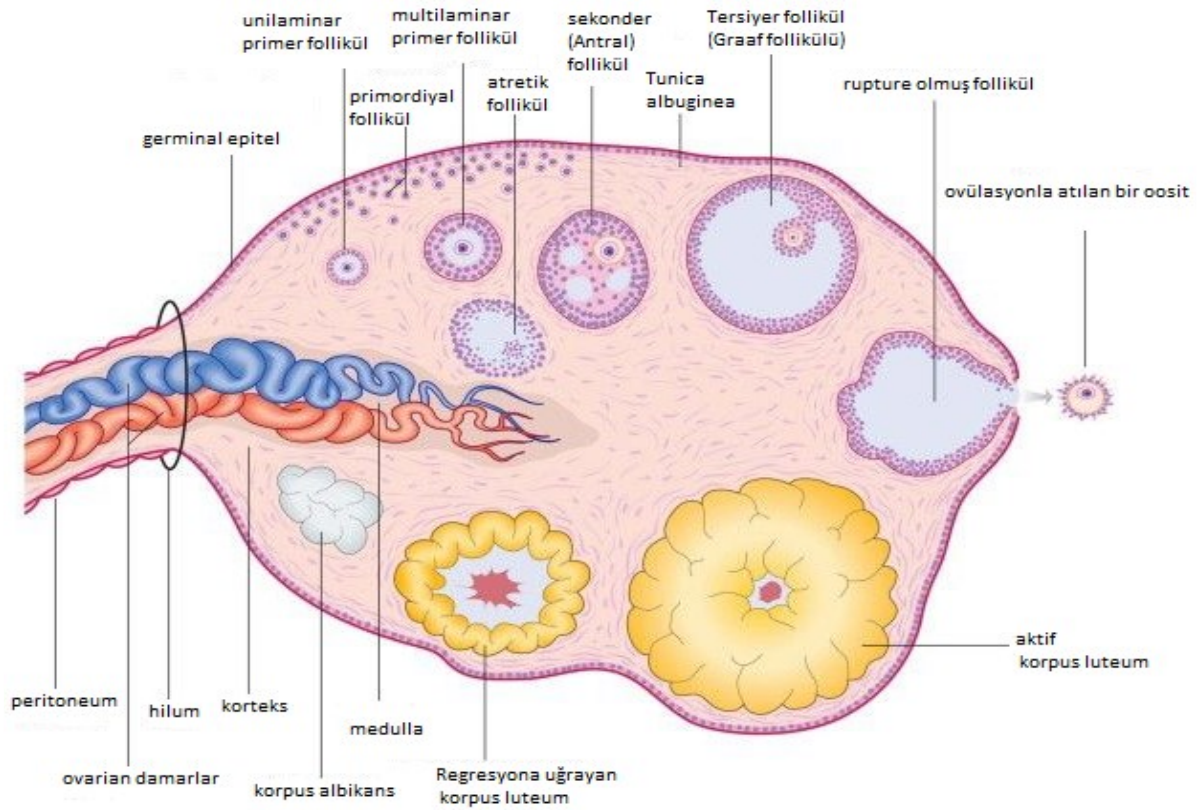
2.2. Ovaryumun Anatomisi

Oval şekilli kalın bir cinsiyet bezi olan ovaryum, pelvisin yan duvarlarında yerleşik bir çift halinde bulunan, oositleri ve eşey hormonlarını üreten organdır. Uterusun üst yan taraflarına **ligamentum ovarii proprium** ile bağlıdır. Ligamentum latum uterinin arka bölümünden

asılı kalmasını **mesovaryum** denilen yapı sağlamaktadır. **Ligamentum suspensorium ovarii** peritonun bir katlantısıdır ve pelvisin girişinden ovaryuma geçerek ovaryumu drene eden damarları ve innerve eden sinirleri içerir. Ovaryumu aorta abdominalisden L2 (lumbal 2) pozisyonunda ayrılan bir dal olan **a. ovarica** beslemektedir. Venöz boşaltımını ise tek bir **vena ovarica** yı oluşturan **plexus pampiniformis** sağlar. Sağ kısımdaki vena ovarica doğrudan **vena cava inferiora**, soldaki vena ovarica ise **vena renalis sinistra** ya açılmaktadır. Ovaryumun lenf damarları **nodi aortici laterales**'e yukarı doğrudur ve Ovaryumu damarlarla birlikte seyreden **pelvis sinir ağı** donatmaktadır (Gilroy , 2015) .

2.3. Ovaryumun Histolojisi

Ovaryumlar, eni yaklaşık 1,5 cm, boyu 3 cm ve kalınlığı 1 cm olan badem biçiminde, yüzeyleri germinal epitelyum olarak adlandırılan tek katlı yassı ya da kübik epitel ile kaplı organlardır(**Gürsoy ve Ergin, 2007**). Germinal epitelin altında, tıknaz bir bağ dokusu içeren ve ovaryuma beyazımsı rengini veren **tunika albuginea** katmanı bulunur. Tunika albugineanın altında dış kısımda **kortikal bölge** yer alır. Kortikal bölgede **stroma** içine gömülü halde bol miktarda oosit içeren ovaryum follikülleri bulunur. Kortekste yer alan stroma fibroblastlardan zengindir ve hormonlara duyarlıdır. Daha iç kısımda korteksin altında gevşek bağ dokusunun yoğun şekilde vaskülerize olduğu bölge olan medüller bölge yer alır (Junqueira & Carneiro , 2009,)



Resim 1.1. Bir ovaryumun histolojik yapısı (Standring, 2008-Gray's Anatomy'den düzenlenerek alınmıştır.)

2.3.1. Ovaryum follükülleri

Ovaryum follükülü; bir oosit ve onun etrafında yer alan bir ya da daha fazla sayıda follükül hücresi (granüloza hücresi) katmanından oluşan yapıdır (Ross & Pawlina , 2014). Ovaryumu dıştan çevreleyen ve peritonun bir katlantısı olan mezovaryuma daha yakın konumlanan fetal yaşamda oluşan ve kortikal bölgeye yerleşmiş tek katlı yassı follükül hücreleriyle çevrili bir primer oosit içeren follüküllere **primordiyal follüküller** denir (Erdoğan, Hatipoğlu , Görgün , & Ilgaz, 2007). Primordiyal follükülün içinde yer alan primer oosit henüz mayoz bölünmenin I. profaz evresindedir ve küre şeklindeki bu hücre 25 µm çapındadır. Çekirdekleri ökromatiktir, çok sayıda mitokondri ve birkaç golgi aparatı ve endoplazmik retikulum içerir, organelleri nükleusa yakın konumlanmıştır (Junqueira & Carneiro, 2009) (Eşrefoğlu , 2016). Soluk boyanan sitoplazmalarında küçük mitokondriler, tübüler endoplazmik retikulum sisternaları, Golgi membranlarına serpiştirilmiş poliribozomlar, mikroflamentler, değişen sayıda glikojen partikülleri ve lipit damlaları içerir (Picton, 2001) .

Oositin sitoplması olan ooplazmada **Balbiani cisimciği** olarak adlandırılan ve ultrastrüktürel inceleme yapıldığında Golgi membranları ve vezikülleri, endoplazmik retikulum, birçok mitokondriyon ve lizozomlardan oluşan yapılar gözlenmektedir (Ross & Pawlina , 2014).

Puberteden itibaren ovaryumdaki küçük bir primordiyal hücre grubu folliküler büyüme aşamasına geçer. Follikül büyümesinin birinci evresinde; hipofizden salınan follikül uyarıcı hormon (FSH) etkisi ile oositin büyümesi uyarılır, çekirdeği büyür, endoplazmik retikulum hipertrofiye uğrar, mitokondri sayısı artar ve sitoplazmaya homojen şekilde mitokondri yayılımı gerçekleşmesiyle oosit çapı 120 µm düzeyine kadar artar (Junqueira & Carneiro, 2009) (Ross & Pawlina , 2014). Tüm bu değişikliklerle eş zamanlı olarak, oositin çevresindeki follikül hücreleri mitoz bölünme geçirir ve bu sayede oositin etrafında tek katlı kübik epitel katmanı bulunur. Bu aşamadaki follikül **tek katmanlı (unilaminer) primer folliküldür** (Junqueira & Carneiro, 2009) (Ross & Pawlina , 2014) (Eşrefoğlu , 2016).

Tek katmanlı (unilaminer) primer follikül follikül hücreleri mitoz bölünme geçirmeye devam eder ve oosit çok katlı follikül hücreleri ile çevrelenir. Bu aşamada follikül hücreleri “gap junction” larla iletişim halindedir ve bundan sonra granülosa hücreleri olarak adlandırılmaktadırlar. Follikülün bu organize haline **çok katmanlı (multilaminer) primer follikül** ya da **preantral follükül** denir. Multilaminer primer follikül aşamasında follikülde yer alan oositin etrafında, oositin mikrovilluslarıyla ve follikül hücrelerinin filopodlarıyla tutunduğu glikoprotein yapısında “Zona pellucida” gelişir. Zona pellucida, sülfatlı asidik glikoprotein yapısında ZP1 (80-120 kda molekül ağırlığında), ZP2 (73 kda molekül ağırlığında) ve ZP3 (59-65 kda molekül ağırlığında) olmak üzere 3 proteinden oluşmaktadır (Ross & Pawlina , 2014). Follikül granülosa hücrelerinin boyut ve sayısının artmasıyla büyüme devam eder. Çoğalan follikül hücreleri arasını plazma bileşenleri, glikozaminoglikan, steroid bağlayıcı proteinler, progesteron, androjen ve östrojenleri içeren follikül sıvısı işgal eder ve bu sayede follikülde içi sıvı dolu “antrum” adı verilen büyük boşluklar oluşur. Bu durumdan sonra folliküller **sekonder follikül** ya da **ikincil follikül** olarak adlandırılır. Follikülün antrumunda yer alan bu sıvıya ise **likör folliküli** denmektedir (Junqueira & Carneiro, 2009). Antrum oluşumu sırasında bazı granüloza hücreleri follikül duvarında bir noktada kümeleşerek tepecik oluşturur ve bu sayede oositi içeren bu hücre kümesi antrumun iç kısmına doğru yarımada gibi bir çıkıntı yapar. Bu yapıya **kumulüs**

ooforus adı verilir. Oositin hemen dışındaki granüloza hücreleri daha prizmatik formdadır ve ovülasyon sırasında oosite eşlik eder. Bu hücelere ise **korona radiata** denir (Junqueira & Carneiro, 2009) (Ross & Pawlina , 2014) (Gartner & Hiatt, 2007). Granüloza hücreleri arasında bu hücreler tarafından üretilen, daha koyu boyanan PAS+ hyaluronan ve proteoglikan içerikli madde birikimleri görülmektedir. Bu yapılara **Call exner cisimcikleri** denir (Ross & Pawlina , 2014).

Folikülle hemen temas halinde olan ovaryum stromasındaki fibroblastlar **teka follikülü** (teka Yunanca: kutu) oluşturmak için birtakım değişiklikler geçirirler; **teka interna** ve **teka eksterna** olmak üzere özelleşirler (Gartner & Hiatt, 2007). Teka internayı oluşturan hücreler; tübüler kristaya sahip mitokondriyonları, bol miktarda düz endoplazmik retikulumu ve çok sayıda lipid damlacıklarını içeren bir forma dönüşerek steroid içeren hücelere benzer ve **androstenedion** üretirler. Bu molekül de granüloza hücrelerinin FSH etkisi ile ürettikleri aromataz enzimi aracılığıyla östrojene dönüştürülür (Junqueira & Carneiro, 2009) (Kierszenbaum, 2006). Üretilen bu östrojen önce follikül sıvısına oradan da follikülü çevreleyen kan damarları aracılığıyla dolaşıma katılır. Teka interna endokrin faaliyeti gereği yaygın bir vaskülarizasyona sahiptir. Teka eksterna ise teka internayı dıştan saran düzenli bağ dokusu katmanıdır. Teka interna ile teka eksterna arasındaki sınır ayırt edilemezken, teka interna ile follikülün granüloza hücreleri arasında bazal membran bulunur ve bu iki yapının hücrelerinin birbirlerinden morfolojik farklılıklarının varlığı da bu ayrıma yardımcı olur (Junqueira & Carneiro, 2009) (Ross & Pawlina , 2014) (Gartner & Hiatt, 2007).

Graaf Follikülü

Her menstrüel siklusta bir follikül diğer folliküllere nisbeten baskın gelir ve gelişimini tamamlayarak ovülasyonunu gerçekleştirebilir. Baskın follikül büyümesini artırır ve ovülasyon öncesi en olgun follikül olan **Graaf follikülü** haline ulaşır. Bu evrede follikül içi sıvının artmasının da etkisiyle follikül çapı 2,5 cm dir ve ovaryum yüzeyinden ultrasonografik incelemelerle saptanabilen stigma adı verilen bir çıkıntı yapar (Junqueira & Carneiro, 2009). Aynı zamanda oosit etrafında bir miktar granüloza hücresi ile antruma doğru asılı kalmış şekilde konumlanmıştır ve fetal yaşamda profaz I evresinde duraklayan oosit I. mayoz bölünmesini tamamlar. Bir primordiyal follikülün gelişimini tamamlayarak Graaf folliküne dönüşümü yaklaşık 90 gün içinde gerçekleşmektedir (Junqueira & Carneiro, 2009) (Ross & Pawlina , 2014) (Gartner & Hiatt, 2007).

Atretik Follikül

Gelişimin herhangi bir aşamasındaki ovaryum follikülleri baskın follikül olmadıkları takdirde atreziye uğrar. Bu follikül hücreleri ile oositlerin dejenere olması anlamına gelmektedir. Dejenere olan bu hücreler fagositler tarafından fagosit edilir. Atreziye uğrayan bir follikülde granüloza hücrelerinin bazal laminadan ayrıldığı ve oositin dejenere olduğu görülür. Bu nedenle dokuda makrofaj aktivitesinin de yoğun olduğu gözlenir. Atrezi ilerledikçe dejenere olan hücrelerin yerini fibroblastlar alır ve burada skar dokusu oluşur. Atezi folliküllerin ilk üretildiği prenatal dönemde görülmeye başlar ve menopoza sonrası son bulur (Junqueira & Carneiro, 2009) (Ross & Pawlina , 2014) (Gartner & Hiatt, 2007).

2.3.2. Ovulasyon

Olgun bir Graaf follikülünün duvarının yırtılarak oositin serbest kalmasına **ovulasyon** denir (Erdoğan, Hatipoğlu , Görgün , & Ilgaz, 2007). Ovulasyon büyüyen folliküllerin ürettiği östrojene cevaben ön hipofizden salgılanan Lüteinleştirici hormon (LH) etkisiyle gerçekleşir. Bu hormon organa giden kan akımının artışı sağlayarak kapillerlerden ve venüllerden plazma proteinlerinin dokuya sızmasına neden olur ki bu durum dokuda ödemli bir yapı oluşmasının nedenini açıklar. Tüm bunlara ek olarak dokuda vasopressin, histamin, prostaglandinler ve kolajenaz salınımı sözkonusudur. Granüloza hücreleri arasındaki bağlantı birimleri hyaluronik asit üretimi nedeniyle yapısını koruyamamaktadır. Tüm bu nedenlerle follikül duvarı yırtılır, oosit ve I. kutup cismi, zona pellucida, korona radiata ve bir miktar follikül sıvısı eşliğinde vücut boşluğuna bırakılır (Junqueira & Carneiro, 2009). Bu şekilde vücut içi boşluğa bırakılan oosit tuba uterinaların fimbriaları tarafından yakalanarak tutulur ve tuba uterinanın açık ucundan içeri girer. Burada döllenme gerçekleşebilir. Döllenme gerçekleştiği takdirde tuba uterinadaki silli prizmatik hücrelerin de yardımıyla uterusu doğru taşınır. Ovulasyondan sonra ilk 24 saat içinde döllenme gerçekleşmezse, oosit dejenere olur ve fagosit edilir. Ovulasyon 28 günlük menstrüal siklusun yaklaşık 14. gününe denk gelir. Her ay genellikle bir oosit ovulasyonla atılır ancak bazı durumlarda hiç oosit atılmadığı gibi birden fazla sayıda oosit de bir seferde ovüle olabilir (Junqueira & Carneiro, 2009) (Ross & Pawlina , 2014) (Gartner & Hiatt, 2007).

2.3.3. Korpus Luteum (Sarı Cisim)

Oositin ovülasyonundan sonra geride kalan folliküle ait granülosa hücreleri ve teka interna hücreleri geçici bir iç salgı bezi oluşturmak üzere yeniden düzenlenir. Bu yeniden düzenlenen yapıya korpus luteum (sarı cisim) denir. Korpus luteum ovaryumun korteksinde konumlanmıştır (Gartner & Hiatt, 2007) (Erdoğan, Hatipoğlu, Görgün, & Ilgaz, 2007) (Junqueira & Carneiro, 2009) (Ross & Pawlina, 2014). Follikül duvarı follikül sıvısının boşalması ile kıvrımlı bir hal alır. Ovulasyon nedeniyle teka internadaki bütünlüğü bozulan damarlarda bir miktar kanama oluşur. Bu kanama önce pıhtılaşır daha sonra da bağ dokusuna dönüşerek korpus luteumun karakteristik sarı görüntüsünü veren iç kısmına dönüşür. Bu sırada teka internadaki hücreler lüteinleştirici hormon salgılayan **teka lutein hücrelerine** dönüşür. Korpus luteum ilk oluştuğu zaman 10-12 gün hormon salgılamak üzere aktiftir. Gebelik oluşmadığı takdirde korpus luteum bu süre içinde görevini tamamlar, progesteron miktarındaki azalma nedeniyle menstrüasyon oluşur, uterus mukozası dökülür (Junqueira & Carneiro, 2009) (Ross & Pawlina, 2014). Korpus luteum apoptoz ile ortadan kaldırılır ve yerini çok miktarda kollajen içermesi nedeniyle **korpus albicans** olarak isimlendirilen tıkHz bir bağ dokusu işgal eder. Menstrüasyonun bir kısmı boyunca işlevsel olan korpus luteuma **menstrüasyon korpus luteumu** denir. Gebelik oluşması durumunda uterus mukozası dökülmez, embriyonun implantasyonu gerçekleşir ve trofoblastik hücreler tarafından **insan koryonik gonodotropin (HCG)** sentezlenerek korpus luteum uyarılır ve progesteron salgılar. Gebelik süresince bozulmadan hormon sentezi işlevini sürdüren bu korpus luteuma **gebelik korpus luteumu (corpu luteum pregnancy)** denir ve bu yapı gebeliğin ilk 4-5 ayı süresince ovaryumdaki varlığını sürdürür (Junqueira & Carneiro, 2009).

Follikül atrezisi sonrasında geride kalan, çocukluktan menopoza kadar her dönemde ovaryumda izlenebilen, ovaryum korteksindeki teka interna hücreleri kalıntısı olan ve steroid salgılayan hücrelere ise intersitisyel hücreler denir (Junqueira & Carneiro, 2009).

2.3.4. Oosit maturasyonu

Dişide puberteye kadar primordiyal folliküllerde bulunan oosit 1. Mayozun profaz I evresinde bekleme halindeyken, follikül gelişimi sonrasında ovulasyondan hemen önce LH'nin hızla artması nedeniyle mayoz bölünmenin ilk evresi tamamlanır. I. polar cisim oluşur ve ovulasyondaki oosit mayoz II.'nin metafaz aşamasında tekrar duraklar (Ünlüsoy & Ertuğrul, 2014).

2.4. Ovaryumun Fizyolojisi

Hormonların etkisi ile ovaryumda; folliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evrenin birbirini takip ettiği ve eş zamanlı olarak cinsel organlarda da ritmik değişikliklerin görüldüğü, ortalama 28 günde tamamlanan fizyolojik döngüye **menstrüel siklus** denir (Guyton & Hall, 2013) (Kierszenbaum, 2006).

Fizyolojik olarak menstrüel siklus aşağıdaki hormonların düzenli ve ritmik salınımı ile düzenlenmektedir;

Gonodotropin serbestleştirici hormon (GnRH)

Ovaryum hormonları olan östrojen ve progesteron

Ön hipofiz hormonları olan Follikül uyarıcı hormon (FSH) ve Lüteinleştirici hormone (LH)

Menstrüel döngü sonucunda iki temel olay gerçekleşmektedir. Bunlardan biri her ay bir oositin atılması ve diğeri uterusun endometriyumunun implantasyon için hazırlanmasının sağlanmasıdır (Kierszenbaum, 2006) (Guyton & Hall, 2013).

Gonadotropin serbestleştirici hormon (GnRH), hipotalamustan salınarak ön hipofizi (adenohipofizi) uyararak gonodotropinlerin serbestleşmesini sağlar. Hipotalamustan GnRH sentezinin fazla uyarılmasına neden olduğu için gebelik önleyici kontraseptik ajanların kullanımı, serebral yangı, bazı tümörler gonadotropin sentezini arttırıcı etkiye sahiptir. Ağır psikolojik ve fiziksel bunalım, beslenme bozukluğu, malabsorbsiyon, böbrek yetmezliği, ciddi sistemik hastalıkların varlığı, yüksek performanslı spor yapılması, nöradrenalin-dopamin-serotonin-endorfin gibi nörotransmitterlerin eksikliği, GnRH analoglarının serumda yüksek düzeyde bulunması, hipofiz harabiyeti nedeniyle ise GnRH normalden az salgılanmaktadır (Silbernagl & Lang, 2011).

Ovarial döngününün uyarımı **FSH** ve **LH** ile gerçekleştirilir. Bu hormonların yeterince salınmaması durumunda ve çocukluk çağında overler inaktif olarak kalırlar (Silbernagl & Lang, 2011). 9-12 yaşlar arasında FSH ve LH seviyeleri kademe kademe artarak salınır ve 11-15 yaşları arasında menstrüel döngü başlar. Bu döneme **puberte**, ilk döngünün tamamlanması ile gerçekleşen ilk adet kanamasına **menarş** denir (Ross & Pawlina , 2014). FSH ve LH hormonlarının serum seviyeleri ovulasyonun gerçekleştiği günler haricinde kural olarak 200 ng/ml nin altındaki seviyelerde iken, ovulasyonun gerçekleştiği menstrüel

siklusun tahmini 14. gününde serumda en üst seviyede salınırlar. Bu en üst serum konsantrasyon seviyesi LH için ortalama 800 ng/ml, FSH için ortalama 400 ng/ml dir (Guyton & Hall, 2013). Hormonlar pulsatil şekilde her 60-90 dakikada bir ve 1 dakika süreyle dolaşıma salınır. Bu salınım aynı frekansta hipotalamustan salınan GnRH (Gonodotropik Serbestleştirici Hormon) uyarımıyla gerçekleşir (Silbernagl & Lang, 2011). Her iki hormonun da hedef hücrelerin membranında yer alan reseptörleri vardır. Hücre zarındaki özgül reseptöre bağlanan hormon hücre içindeki ikincil haberci olan cAMP aktivasyonunu sağlayarak hem hücrelerin salgı yapmasını hem de büyüme-bölünme-çoğalma hızını artırır. cAMP nin aktivasyonu protein kinazların oluşumuna sebebiyet verir ki bu koşulda hücrelerin cinsiyet hormonları olan östrojen ve progesteron sentezini sağlayan proenzimler de fosforillenmiş olur. Özetle bu iki hormon korpus luteum oluşuncaya dek folliküllerin olgunlaşması ve dişi cinsiyet hormonlarının üretilmesinin uyarılması üzerinde etkilidir (Guyton & Hall, 2013) (Silbernagl & Lang, 2011).

Dişi birey ilk doğduğunda etrafı yassı hücrelerle çevrili bir oosit içeren primordiyal folliküllere sahiptir. Bu yassı şekilli follikül hücreleri hem oosite desteklik yapar hem de **Oosit Maturation Inhibitory Factor (OMI)** adı verilen bir madde sentezinden sorumludur. Bu inhibitör madde sayesinde primordiyal follikül içindeki oosit mayoz I profaz aşamasında dinlenme halinde kalır. Puberte ile birlikte ovaryumdan her menstrüel siklus ile bazı folliküller uyarılarak bu inhibisyon etkisinden kurtulur ve gelişmesine devam eder. Follikül Uyarıcı Hormon (FSH) etkisi ile folliküldeki granüloza hücreleri proliferer olur ve folliküldeki granüloza hücre tabakasının sayısı artırılır. Granüloza hücrelerinden gonodotropin sentezini uyaran **aktivin** ile bu sentezi inhibe eden **inhibin** sentezlenerek kana verilmektedir. Granüloza hücreleri hücre membranlarında taşıdıkları FSH reseptörleri nedeniyle östrojen içeren follikül sıvısı sentezlerler. Bu sıvı etkisiyle follikülün antrum boşluğu oluşmaktadır (Kierszenbaum, 2006) (Guyton & Hall, 2013) (Silbernagl & Lang, 2011).

Östrojenler fütal dönemde Müller kanalının fallop tüplerine, uterusu, vajinaya dönüşmesini ve ikincil cinsiyet karakterlerinin ortaya çıkmasını sağlayan hormonlardır (Sadler, Langman's Medikal Embriyoloji, 2011) (Dudek , 2016). Progesteron ve analogları ile antagonist etkiye sahiptirler. Meme bezlerinin duktal gelişimini sağlar. Serumdaki HDL ve VLDL üretimini artırıp LDL derişimini azaltarak ateroskleroz riskini azaltır. Kanın pıhtılaşmasını kolaylaştırıcı etki yapar, kemik oluşumunu ve kemiğin mineralize olmasını artırır, epifiz plaklarının kapanmasını hızlandırır. Böbrekte elektrolit tutulmasını sağlar.

Uterus mukozasının proliferasyonunu arttırıcı etkiye sahiptir. Servikal mukusun yoğunluğunu azaltıp buradaki epitelin dökülerek yenilenmesini sağlarlar. Epitelin içerdiği glikojenler laktobasillerin beslenmesini sağlayarak ortamın pH değerinin azalmasına neden olur. Ortamın asiditesinin artışı bu bölgeye patojen mikroorganizmaların kolonize olmasına engel olur. Bu nedenle dolaylı olarak dişi genital sistemin sağlığının korunması açısından önemlidir. Eksikliğinde, özellikle çocukluk çağında epifiz plakları normalden geç kapanır ve gigantizm görülür. Aşamalı olarak menstrüel siklus bozuklukları, infertiliteye kadar ulaşan problemler gelişir. Menopoz sonrası yetişkin bir bireyde yeterli östrojen hormonunun olmaması durumunda uterus mukozası proliferere olamaz, vajinal enfeksiyonlara yatkınlık artar ve vazomotor bozukluklar nedeniyle vücut sıcaklığında ani artışlar görülür. Deride büzüşme ve kıllanma meydana gelirken, ankisiyete ve duyu durum bozuklukları görülebilir (Silbernagl & Lang, 2011).

Östrojenlerin fazla salgılanması durumunda, özellikle çocukluk çağında epifiz plakları erken kapanacağı için nanizm durumu sözkonusudur. Yetişkin bireyde fazla östrojen salgılanması nedeniyle menstrüel siklus süresi bozulur. Uzun süre plazma düzeyinin yüksek olması nedeniyle follikül olgunlaşmasında aksamalar oluşarak ovaryumun polistik bir morfolojiye sahip olmasına neden olur. Artan pıhtılaşma nedeniyle tromboz gelişme riski artar (Silbernagl & Lang, 2011).

Progesteron uterus mukozasının gelişimini destekler, mukozanın devamlılığını sağlar. Buradaki kasların kasılabilirliğini ve tuba uterinanın hareketliliğini azaltır. Servikal mukusun viskozitesini arttırır. Vajinal epitelin proliferere olmasını ve dökülmesini engeller. Metabolizmayı hızlandırarak vücut sıcaklığının artışına neden olur. Bu durumda hiperventilasyon gelişeceği için insülin duyarlılığının azalmasına bağlı olarak fazlalığında diabetik tablonun oluşmasını tetikler. Plazma HDL ve LDL derişimini azaltır. Eksikliğinde menstrüel döngü bozulur, uterus mukozası olgunlaşamaz ve bireyde adet kanaması olmaz (amenore) ve infertilite meydana gelir (Silbernagl & Lang, 2011).

Ovaryumdan bu hormonlara ek olarak **relaksin** homonu da üretilir. Relaksin simfizis pubis ve uterusun serviksini gevşemesini uyarır. Nörohipofizden salgılanan oksitosin ise, uterus ve meme bezlerindeki miyoepitelyal hücreleri uyarır (Silbernagl & Lang, 2011).

Östrojenlerle birlikte FSH, granüloza hücrelerinin yüzeyinde LH yüzey reseptörlerinin oluşmasını sağlar. Bu da follikülün sıvı salgılama hızını arttırarak başlangıca göre 10-1000

kata kadar büyümesini sağlar. Yine FSH etkisiyle ovaryumda yer alan intersitisyel hücrelerin farklanmasıyla oluşan iç hücreleri teka tabakasını oluşturur. Teka interna hücreleri granüloza hücrelerinin morfolojisine benzer şekilde epiteloid yapıdadır ve ek östrojen ve progesteron salgısı yaparken, teka eksterna damarlanmış bir bağ dokusu kapsülüdür (Silbernagl & Lang, 2011) (Guyton & Hall, 2013) (Ross & Pawlina , 2014).

Her ovaryan siklusta birden fazla follikül oluşmaya başlar ve biri gelişimini tam olarak tamamlar. Maturasyonunu tamamlayan follikül içerdiği oosit kompleksini ovulasyonla serbestleştirir. Onunla eş zamanlı olarak gelişen diğer folliküller geriler. Bu duruma **atrezi (involüsyon)** denir. Atrezi gerçekleşme mekanizması henüz tam olarak anlaşılammış olmakla birlikte baskın follikülün ürettiği fazla miktardaki östrojen nedeniyle hipotalamus uyarılarak hipofizden FSH salgılanması engellenir (Ross & Pawlina , 2014).

Ovulasyon 28 günlük döngünün yaklaşık 14. gününe denk gelir. LH artışı hem ovulasyon için önemlidir. Ovulasyondan yaklaşık 16 saat kadar önce LH 6-10 kat artarak plazma seviyesi pik yapar. Aynı anda FSH 2-3 kat artış göstererek ikisi birlikte östrojen salgısının azalmasına, onunla zıt çalışan progesteron salgısının artmasına yol açar. LH etkisiyle progesteron içeren folliküller steroid hormonlar salgılamaya başlar. Teka eksternadan salgılanan hidrolitik enzimler kapsül duvarını zayıflatıp çözerken, vazodilatasyona neden olan prostaglandinlerin sentezi ile vaskülarizasyon hızlanarak follikülün şişmesi gerçekleşir. Artan follikül sıvısı nedeniyle iç basıncın artması ve proteolitik enzimlerin hücre bağlantılarını zayıflatması nedeniyle follikül stigma denilen noktadan yırtılır ve oosit kompleksi vücut iç boşluğuna serbest kalır. Atılan bu kompleks fimbriaların senkronize hareketleriyle tuba uterinaya alınırken, geride kalan follikül materyali ve etrafındaki teka tabakaları **korpus luteumu** oluşturur. Oluşan bu yapıdan hem östrojen ve analogları hem de progesteron ve analogları üretilir. Bu sayede gonadotropin salınımı inhibe olur. Bu aşama ovaryum için **luteal faz** olarak adlandırılır (Silbernagl & Lang, 2011) (Guyton & Hall, 2013).

2.5. Follikül Aktivasyonu

Primordiyal folliküller ovaryumlarda dormant halde beklerler. Folliküllerin nasıl aktive olduğu henüz tam olarak bilinmemekle birlikte hücre içi haberleşme sinyalizasyonunun bu konuda önemli olduğu bildirilmiştir (Adhikari & Lui, Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles, 2009). Ovaryan Folliküler Büyüme;

otokrin, parakrin ve intrinsek mekanizmalar ile çalışan Intraovarian yerel büyüme düzenleyiciler (IGF-I, steroidler TGF ve de Wnt / Frizzled ailesinin üyeleri) ve hipofizer endokrin faktörler (pituitier gonadotropinler, FSH, and LH) ile düzenlenmektedir. (Burgering & Kops, 2002). Pek çok faktör oosit maturasyonu ve follikül aktivasyonunda görevlidir (van den Hurk & Zhao, 2005). Kit ligandı, nörotropinler, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), kemik morfogenezik protein (BMP4 ve BMP7), lösemi inhibisyon faktörü, temel Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF) gibi çok sayıda intraovaryan faktör follikül aktivasyonunda etkilidir (Hsueh, Kawamura, Cheng, & et al., 2015). Ovaryumda follikülün aktivasyonunu kontrol eden sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin etkileşimini içeren intersellüler ve intrasellüler haberleşme sistemi vardır. Bu sistem oosit ile onun etrafındaki hücreler arasındaki moleküler sinyal mekanizması sayesinde işlevseldir (Ünlüsoy & Ertuğrul, 2014) (Hutt, McLaughlin, & Holland, 2006). Oosit ve çevresindeki granüloza hücrelerinin ilişkilerine Anti Müllerian hormon örnek verilebilir. TGF- β süper ailesinin bir üyesi olan Anti Müllerian hormon 140 kDa molekül ağırlığında bir glikoproteindir. İlk kez 1947 yılında tanımlanan hormon erkek eşey farklanması süresince fetal testisin Sertoli hücreleri tarafından salgılanarak Müllerian kanalın gerilemesini sağlar. Dişilerde ise postnatal yaşamda granüloza hücreleri tarafından salgılanarak ilk folliküler aktivasyondan menopoza kadar üretilmektedir. Dişilerde antral ve preantral folliküllerin granüloza hücreleri parakrin bir faktör olarak Anti Müllerian Hormon (AMH) salgılar. Antral ya da preantral follikülden salgılanan bu hormon, orada bulunan primordiyal folliküllerin FSH ve LH hormonuna olan duyarlılıklarını azaltarak dormant statüde kalmasını sağlar. Anti Müllerian hormonun ekspresyonunun artması, CY19A1 adında bir aromataz enziminin ekspresyonunu inhibe eder, granüloza hücrelerine östradiol oluşumunu engeller ve bu sayede de steroidogeneze ket vurarak follikülün gelişmesini inhibe eder. AMH, gelişmekte olan follikülün FSH ve LH'a duyarlılığını azaltmasıyla dormant follikülün seçilmesinde inhibitör bir rol oynar (Sacchi, ve diğerleri, 2017).

Farklı sinyalizasyon sistemleri arasında, deney hayvanları ile yapılan çalışmalar PI3K-Akt-FOXO3 (fosfatidilinositol 3 kinaz-Akt-forkhead box O3) yolağının primordiyal follikül aktivasyonu için önemli olduğunu göstermiştir. Kit ligandı aynı kökenden gelen tirozin kinaz reseptörüne (c-Kit)'e bağlanır ve PI3K'ı uyarır. Lipit ikincil haberci olan PIP2 (fosfatidilinositol (4, 5) Bisfosfat) molekülünün PIP3'e (fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfat) molekülüne dönüşümüne neden olur. Daha sonra PIP3, fosfatidilinositol bağımlı kinaz 1'i (PDK1) molekülünü uyarır, onu takiben AKT aktivasyonu gerçekleşir. AKT'nin çekirdeğe

translokasyonu bir transkripsiyon faktörü olan FOXO3'ün aktivitesini inhibe eder. Fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN) ise bu yolu, PIP3'ü PIP2'ye defosforile ederek negatif olarak düzenler (Reddy, ve diğerleri, 2005). PI3K / PTEN / Akt yolu, hücre çoğalması, sağkalım, büyüme, hareketlilik, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve metabolizma gibi çok sayıda normal hücrel işlemin anahtar düzenleyicisidir (Makker, Goel, & Mahdi, 2014).

2.6. Forkhead Transkripsiyon Faktörleri ve FoxO3

Forkhead Transkripsiyon Faktörleri, (FoxO); IGF-I/PTEN/Akt sinyal yolağının azalan ifadesine neden olan ve FoxO1, FoxO3a, FoxO4 ve FoxO6'yı içeren bir gen ailesidir (Abali, ve diğerleri, 2013) (Huang , ve diğerleri, 2016) . Forkhead ailesine ait proteinler ilk kez Drosophilalar'da keşfedilmişlerdir. FoxO üyesi proteinde var olan bir mutasyon Drosophila cinsi sineklerde da kafa morfolojisinin çatal şeklinde olmasına yol açmaktadır (Ünlüsoy & Ertuğrul, 2014) (Carter & Brunet, 2007).

FoxO geni Akt fosforilasyonu ile düzenlenir. Akt fosforilasyonu FoxO proteinlerinin nükleustan stoplazmaya geçişini inhibe eder. FoxO'nun downstream ifadesi apoptotik genlerin aktivasyonunu engeller. Bu nedenle FoxO proteinleri apoptotik süreçler için önemlidir (Abali, ve diğerleri, 2013) (Huang , ve diğerleri, 2016).

FoxO1 proteini (FKHR= Forkhead Rhabdomyosarcoma homologu Forkhead kutusu Bağlanma proteini olarak bilinir.) FoxO3 (Forkhead benzeri protein-1= FKHL1) ve FoxO4 (AFX= bir Forkhead transkripsiyonu faktörü) proteinleri fosforilasyon ve FSH hormonu ile düzenlenir ve kemirgen ovaryumda ifade edilmektedir (Burgering & Kops, 2002). FoxO proteinleri gametogenik fonksiyonlara sahiptir. FoxO3 proteini özellikle primordial follükül aktivasyonu için gereklidir. Primordial ve primer oositlerde yüksek derecede eksprese edilir ve immünohistokimyasal olarak işaretlenebilmektedir (Richards J. , Sharma, Falender, & Lo, 2002).

Dişilerde ovaryumdaki follükül rezervi, menopoza kadar maturasyon ve atreziyle azaltılır. FoxO3, ovaryumdafollükül rezervini korumak için gereklidir (Tarnawa E. , Baker, Aloisio, Carr, & Castrillon, 2013). Birey doğduğunda FoxO3 proteini sitoplazmik konumludur fakat postnatal 3. günden itibaren dereceli olarak nükleusa konumlanmaya başlar ve postnatal 14. günde nükleusa taşınım sonlanır. Bundan sonra FoxO3 proteini yaşam boyu oosit nükleusunda kalır. Primordial follükülün aktifleşmesinin sonrasında sitoplazmaya tekrar

konumlanır. Bu gözlemler FoxO3 proteininin primordial follikülden olgun oosite farklanma aşamasında moleküler bir anahtar olduğunu göstermektedir (Pelosi , ve diğerleri, 2013). Yapısal olarak aktif FoxO3 proteininin aşırı ekspresyonunun farelerde ovaryum kapasitesini artırabileceği bildirilmektedir (Tarnawa E. D., Baker , Aloisio , Carr , & Castrillon, 2013). FoxO3 tümörögenesis, hücre döngüsünün durdurulması, embriyögenesis, ve apoptozis gibi birçok hücrenel değişiklikte önemlidir (Kaufmann & Knochel, 1996) (Ünlüsoy & Ertuğrul, 2014).

2.7. Akne ve Tedavisi

Akne (Yunanca kökenli kelimedir, çiçeklenme, berelenme anlamına gelir), yağ bezlerinin ve kıl köklerindeki piloseböz folliküllerin fonksiyonel inflamasyonu ve lezyonu ile sonuçlanan bir cilt hastalığıdır (Dökmeci & Dökmeci, 2005). Pilaseböz bez birimlerinin blokajı ve *Propionobacterium acnes* kolonizasyonu nedeniyle iltihabıdır. Özellikle ergenlik dönemindeki bireylerin ciltlerinde daha çok yüzde, sırtta ve boyunda yaygın olarak görülür (Ayer & Burrows, 2006). Kişinin yaşam kalitesini, psikososyal durumunu ve kendine güvenini olumsuz etkileyen dermatolojik bir problemdir (Kraft & Freiman, 2011). Tanıda hastalığın derecelendirilmesi gerekir. Etkin tedavi sağlanması ve tedavi sonrasında oluşacak skarın oluşumunu minimize edebilmek için hastalığa mümkün olan en kısa sürede müdahale edilmeli, bireye özgü koşullar göz önünde bulundurulmalıdır. Tedavide kullanılacak yola, tedavi edilecek aknenin tipine, ciddi seyirli olup olmasına, seçilen yöntemin hasta tarafından uygulanabilir olup olmadığına ve hastanın psikolojik durumuna dikkat edilmektedir. Eğer hastalık hafif seyirli tipte ise topikal uygulanacak ajanlar ile tedavi sağlanabilir. Orta derecede şiddetli akne tedavisinde oral antibiyotiklerin kullanılmasını gerekir. Eğer tedavi sonrası antibiyotiğe dirençli bir tablo varsa yalnızca topikal ajanların ya da antibiyotiklerin kullanılması yeterli gelmeyecektir. Bu durumda kalıcı tedavi izotretinoin ile sağlanmaktadır (Ayer & Burrows, 2006). Akne tedavisinde en etkin çözüm oral yoldan izotretinoin alınmasıdır. İlk kez FDA onayı ile 1982 yılında Amerika Birleşik Devleti'nde ve de ertesi yıl Avrupa Birliği Devletlerinde ciddi seyirli akne hastalarında uygulanmaya başlanmıştır (Karadag, Parish, & Lambert, 2017).

2.7.1. Retinoik asit ve türevleri

Retinol vitamin A olarak bilinir ve bir prohormondur. Hücre içi enzimatik reaksiyonlarla aktif metabolitlere dönüştürülür ve bu şekilde iş görür. Bu aktif retinoidlere all-trans retinoik asit, 9-cis-retinoik asit gibi moleküller örnek verilebilir. Bu moleküllerden başka aktif retinol molekülleri de mevcuttur. Retinoller hücre içinde yer alan retinoik asit reseptörleri (RAR) ve retinoid X reseptörü (RXR) sınıfından reseptörlerle etkileşerek etki ederler. Her iki reseptör sınıfının da α , β , γ olmak üzere farklı biyolojik karakterde izoformları mevcuttur. Bu hücre içi reseptörler nükleer reseptör ailesinin üyesidirler ve belli genlerin ifadelerini düzenlerler. Retinoidler önemli morfogenerlerdir. Embriyonik gelişim süresince hücresel proliferasyon ve farklılaşma için gereklidirler. Bağışıklık fonksiyonunun gelişmesinde ve hücrelerin sitokin üretmesinde önemlidirler. Eksikliğinde fetal malformasyonlar gelişebilir. Bu nedenle doğurganlık çağındaki bayanlarda takip edilmesi önerilir (Rosenfeld & Loose, 2017).

2.7.2. İzotretinoin ve etki mekanizması

Derideki keratinizasyon bozuklukları ve şiddetli kistik akne durumunun tedavisi amacıyla oral kullanılan retinoik asit türevi bir ilaçtır. 13-cis tretinoin izomeridir. Bu izomer yağ bezlerinin büyüklüğünü geri dönüşümsüz şekilde azaltır ve bu sayede ciltte sebum üretimi de azaltılmış olur. Bilinen ve olası yan etkileri arasında genellikle dudaklarda daha fazla görülen mukus membran infiltrasyonu, ciltte yaygın döküntü ve alopesi (saçkıran), atralji (eklem ağrısı) ve miyalji (kas romatizması) dır. Lipoprotein lipazı inhibe etme özelliği nedeniyle serum trigliserid düzeyinin artışına neden olur. Teratojenik bir maddedir, hamilelerde kullanılmamalıdır (Rosenfeld & Loose, 2017). İzotretinoin (13-cis retinoik asit, 13-cis RA) akne gelişimini seböz bezlerin salgını azaltarak ve boyutlarını küçülterek, seböz bezlerin proliferasyonunu engelleyip apoptozunu indükleyerek çoklu mekanizmalarla baskılar. Aynı zamanda polimorfonükleer lökositlerin deriye göçünü bloke ederek deride antiniflamatuar ajan olarak rol alır (Ormerod, ve diğerleri, 2012).

İzotretinoinin depresyon, intahara yatkınlık, saldırganlık, psikoz gibi bazı psikiatrik yan etkilere de sahip olduğu bildirilmiştir. Aslında memelilerde retinoitler embriyonik dönemde ve yetişkinlik süresince doğal olarak vücutta vitamin A'dan üretilirler ve pek çok organın gelişimini ve sistemik çalışmasını düzenler. Bunu gen transkripsiyonunu kontrol eden retinoik asit reseptörüne bağlanan ve vitamin A metaboliti olan all-trans-retinoic acid

(RA), molekülü ile yapar. Embriyonun beyin gelişimi için gerekli olan bir dizi işleve sahip olan molekül bu nedenle hamilelik döneminde teratojenik aktiviteye neden olabileceği için kullanılmamalıdır (Bremner, Shearer, & McCaffery, 2012). 3. ve 5. haftalar arasında kullanımı spontan düşük ve doğumsal defekt riskinin arttırır. Prenatal dönemde izotretinoine maruz kalan bireylerde küçük kulak, küçük çene gibi kafa-yüz anomalileri ve nöral tüp defektleri görülür (Moore & Persaud , 2002).

İlk kez Mayıs 1982 yılında keşfedilen izotretinoin Amerikan Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından rekalsitran nodüler akne tedavisinde kullanılması için oral kapsül hazırlanmıştır (Leyden, Del Rosso, & Baum, 2014). Kanada, Amerikan ve Avrupa klinik uygulama kılavuzları, izotretinoinin, orta-şiddetli akne tedavisi için kullanımını önermektedir (Vallerand, ve diğerleri, 2017). Genellikle dirençli, nodülositik sivilce tedavisinde kullanımının yanı sıra çeşitli deri hastalıklarında da kullanılan sentetik bir A vitamini analogudur (Kartal, Yaşar, Kartal, Özcan, & Borlu, 2017) (Gürel G., Şahin S., & Çölgeçen E., 2017). Oral mukoza ve burun mukozası tahribatı, fotosensitivite, deride kuruluk, kserozis, saç dökülmesi ve kırılabilirlik en sık yan etkilerdir (Gürel, Şahin, & Çölgeçen, 2017). İzotretinoinin psikiyatrik bozukluklar, olumsuz laboratuvar sonuçları, barsak inflamasyonu gibi yan etkileri üzerine de sistematik derlemeler yayınlanmıştır (Haider & Shaw , 2004.) (Williams, Dellavalle, & Garner , 2012) (Dawson & Dellavalle, 2013) (Vallerand, ve diğerleri, 2017). İzotretinoinin üreme sağlığı üzerinde olumsuz etkileri, spontan düşük insidansının artışıyla ilişkisi daha önce bildirilmiştir (Schnorr , ve diğerleri, 1991). İzotretinoinin maruziyetinin, over rezervini azalttığı ve sıçan ovaryumları üzerindeki toksik etkilerden sorumlu olabileceği düşünülmektedir (Abali, ve diğerleri, 2013).



3. YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (GÜDAM) temin edilen 250 ± 20 gr ağırlığında 32 adet adolesan (7-8 haftalık) dişi Wistar albino sıçan kullanıldı. Deney prosedürü GÜDAM laboratuvarında gerçekleştirildi.

Sıçanların her biri ayrı kafeslerde 12 saat aydınlık-karanlık siklusunda, 24 ± 2 °C'lik ortamda, standart sıçan yemi ve musluk suyu ile serbest olarak beslendi. Sıçanların ağırlıkları bir haftalık aralıklarla periyodik olarak ölçüldü ve kaydedildi. Deney başlangıcındaki ve deney sonundaki ağırlık değişimleri istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasallar

20 mg izotretinoin içeren kapsüller (Roaccutane) açılıp A sınıfı hacim şişelerine aktarıldı ve istenen konsantrasyonda süspansiyon elde etmek için izotretinoin 1.42 ml susam yağında çözüldü (Tsai, ve diğerleri, 2013). (Asai & Wanatabe, 2000).

3.3. Deney Protokolü (Abali, ve diğerleri, 2013)'deki deney protokolüne göre tasarlanmıştır.)

Grup 1: (n=8) Kontrol Grubu

Grup 2: (n=8) Susam Yağı Grubu

Grup 3: (n=8) Düşük Doz İzotretinoin Grubu (7,5 mg/kg/gün)

Grup 4: (n=8) Yüksek Doz İzotretinoin Grubu (15 mg/kg/gün)

Grup 1: (n=8) Kontrol Grubu

Birinci günden itibaren 30 gün boyunca boş gavaj uygulaması (gavaj stresi) yapıldı.

Grup 2: (n=8) Susam Yağı Grubu

Birinci günden itibaren 30 gün boyunca 1.42 ml susam yağı gavaj uygulaması ile verildi.

Grup 3: (n=8) Düşük Doz İzotretinoin Grubu

Birinci günden itibaren 30 gün boyunca 1.42 ml süspansiyon hacmi içinde 7,5 mg/kg/gün izotretinoin gavaj uygulaması ile verildi.

Grup 4: (n=8) Yüksek Doz İzotretinoin Grubu

Birinci günden itibaren 30 gün boyunca 1.42 ml süspansiyon hacmi içinde 15 mg/kg/gün izotretinoin gavaj uygulaması ile verildi.

3.4. Deneklerde Ötenazi

Her birine ketamin (45mg/ kg i.m) ve xylazine (5mg/kg i.m) ile anestezi uygulanarak sırtüstü pozisyonda yatırılan sıçanlar derin anestezi altında intrakardiyak kan alınması ile feda edildi. Sıçanların ovaryum dokuları Bouin fiksatifinde tespit edildi.

- Bouin fiksatifinin hazırlanışı (100 mililitrelik birim hacim için)

75 ml Pikrik asit solüsyonu

24 ml formaldehit

1 ml Glasiyal asetik asit

Yukarıdaki maddeler belirtilen oranlarda karıştırılır.

- Lityum Karbonat (Li_2CO_3) solüsyonu hazırlanışı

70 ml absölü etanol üzerine son hacim 100 ml olacak şekilde saf su ile tamamlanır. Solüsyona spatül ucu ile Li_2CO_3 eklenir. Dokuların fiksasyon süresi ve lityum karbonatlı %70 lik etanol solüsyonunda bekletme süreleri aşağıda belirtilmiştir.

Bouin Fiksatif

6-12 saat

Lityum Karbonatlı %70 lik etanol

6 saatte bir değiştirilmek üzere toplam 24 saat

Fiksasyonun tamamlanmasının ardından doku ısıkmikroskopi takibine alındı.

3.5. Işık Mikroskopik Takibi Yöntemi

Deneklerin diseksiyonu sonrasında çıkarılan ovaryum dokuları Bouin fiksatifinde tespit edildikten sonra aşağıdaki işlem basamaklarına riayet edilerek ışık mikroskopi takibine alındı.

1. % 70 Etil Alkol 20 dakika
2. % 80 Etil Alkol 20 dakika
3. % 96 Etil Alkol 20 dakika
4. Aseton I 20 dakika
5. Aseton II 20 dakika
6. Aseton III 20 dakika
7. Aseton IV 20 dakika
8. Ksilol I 30 dakika
9. Ksilol II 30 dakika
10. 60 °C derecede erimiş parafin I 1 saat
11. Parafin II 1 saat
12. Parafin içinde bloklama

Hazırlanan bloklardan 4 *mikron* kalınlığında kesitler alınarak H&E boyama ve immünohistokimyasal işaretlemeler yapıldı.

3.6. Hematoksilen- Eozin Boyama yöntemi

- Haris Hematoksilen hazırlanışı

Hematoksilen	1 g
%100 etil alkol	10 ml
Potasyum alum ($Al_2SO_4)_3K_2SO_4 \cdot 24H_2O$	20 g
Saf su	200 ml
Civa oksit (HgO)	0,5 g
Glasiyal asetik asit	8 ml

Boyanın hazırlanışı: 1 gram hematoksilen 10 ml etil alkolde çözülür. Ayrıca potasyum alum saf suda ısıtılarak çözülür. İki eriyik birbirine karıştırılıp ½ dakika kaynatılır ve hemen soğutulur. İçerisine civa oksit eklenir ve soğuk su banyosunda hızla soğuması sağlanır. Son olarak da karışıma glasiyal asetik asit ilave edilir. Bu boya 3-4 ay kullanılabilir.

Eosin genellikle hematoksilen için zıt boya (Hematoksilen-Eosin) olarak kullanılır. Eosinin suda ve alkolde hazırlanabilen iki çeşidi vardır.

- Eozin solüsyonu hazırlanışı

Eosin Y (Yellowish)	1 gram
Saf su	100 mililitre
Bir adet küçük Timol kristali	

Eosin B (Bluish) % 90 alkol içinde doymuş olarak hazırlanır (Ozban & Ozmutlu, 1994). Biz çalışmamızda Eosin Y solüsyonunu kullandık.

- Hematoksilen-Eozin boyama Protokolü

Lama alınan kesitlerin üzerindeki parafinin erimesi için etüvde 70 °C'de 20 dakika ya da 60 °C'de bir gece boyunca bekletilir.

2x 15 dakika ksilolde bekletilir.

10 dakika % 100'lük alkolde bekletilir.

10 dakika % 96'lık alkolde bekletilir.

10 dakika % 80'lik alkolde bekletilir.

10 dakika % 70'lik alkolde bekletilir.

10 dakika % 50'lik alkolde bekletilir.

Havada alkol uçana kadar kurutulduktan sonra 10 dakika akar suda yıkanır.

10-15 dakika Harris Hematoksilen'de bekletilir.

10 dakika akar suda yıkanır.

(%70 alkol + 2-3 damla Glasiyal asetik asit) karışımına batırılarak 2-3 dip yapılır.

10 dakika akar suda yıkanır.

5-10 dakika Eozin'de bekletilir.

10 dakika akar suda yıkanır.

1-2 dakika % 50 alkol

1-2 dakika % 70 alkol

1-2 dakika % 80 alkol

1-2 dakika % 96 alkol

1-2 dakika % 100 alkol

2 x 15 dakika Ksilol'de bekletilir ve Entellan ile kapatılır.

Dokuda bulunan hücrelerin nükleusu Haris hematoksilen ile mor, sitoplazmik kısımları eozin ile pembe boyanır.

3.7. Üçlü boyama (Crossman's Modification of Mallory's Triple Stain) Yöntemi

Boyama için gerekli solüsyonların hazırlanışı aşağıdaki gibidir.

- İyodin solüsyonu hazırlanışı

İyot	2 g
% 70 lik etanol	100 cc

- Sodyum tiyosülfat solüsyonu hazırlanışı

Sodyum tiyosülfat	2 g
Distile su	100 cc

- Weigert Hematoksilen hazırlanışı

Solüsyon A

Hematoksilen	1 g
% 96 lık etil alkol	100 cc

Solüsyon B

Demir III klorür	1 g
Hidroklorik asit	1 cc
Distile su	99 cc

- Asit Fuksin Oranj G solüsyonu

Asit Fuksin	0,7 g
Orange G	0,3 g
Timol	0,13 g
Asetik asit	2 cc
Distile su	200 cc

- Fosfotungustik asit solüsyonu

Fosfotungustik asit	3 g
Distile su	100 cc

- Anilin Mavisi solüsyonu

Anilin mavisi	2 g
Asetik asit	2 cc
Distile su	100 cc

- % 2'lik asetik asit solüsyonu

Asetik asit	2 cc
Distile su	100 cc

Yukarıda belirtilen solüsyonlar hazırlandıktan sonra boyama işlemi başlatılır.

- Üçlü boyama protokolü

Lama alınan kesitlerin üzerindeki parafinin erimesi için etüvde 70 °C'de 20 dakika ya da 60 °C'de bir gece boyunca bekletilir.

2x 5 dakika ksilolde bekletilir.

2x 3 dakika % 100'lük alkolde bekletilir.

3 dakika % 96'lık alkolde bekletilir.

3 dakika % 80'lik alkolde bekletilir.

3 dakika % 70'lik alkolde bekletilir.

(Civalı tespit varsa alkol serilerinden sonra distile su aşamasında geçmeden önce 3 dakika iyodin solüsyonunda ve ardından 30 saniye sodyum tiyosülfat solüsyonunda beklenir. Daha sonra distile su aşamasında geçilir.)

2 kez distile su ile çalkalanarak yıkama yapılır.

5 dakika akarsuda yıkama yapılır.

3-8 dakika Weigert hematoksilen solüsyonunda bekletilir.

5 dakika akarsuda yıkanır.

Metil alkolde dip yapılır.

5 dakika akarsuda yıkanır.

5 dakika distile suda yıkanır.

1 dakika asit fuksin-oranj G solüsyonunda bekletilir.

4-5 defa distile su ile yıkanır.

10-15 dakika fosfotungustik asit solüsyonunda bekletilir.

4-5 defa distile su ile yıkanır.

1 dakika anilin mavisinde bekletilir.

4-5 defa distile su ile yıkanır.

1-5 dakika %2'lik glasiyal asetik asit karışımına batırılarak bekletilir.

Çok seri bir şekilde distile sudan geçirilir.

1-2 dakika % 96 alkol

1-2 dakika % 100 alkol

2 x 15 dakika Ksilol'de bekletilir.

Entellan ile kapatılır.

Kesitte bulunan bağ doku anilin mavisi ile mavi, nükleus Weigert hematoxilen ile siyah, sitoplazmik kısımlar asit fuksin ile pembe-kırmızı boyanır.

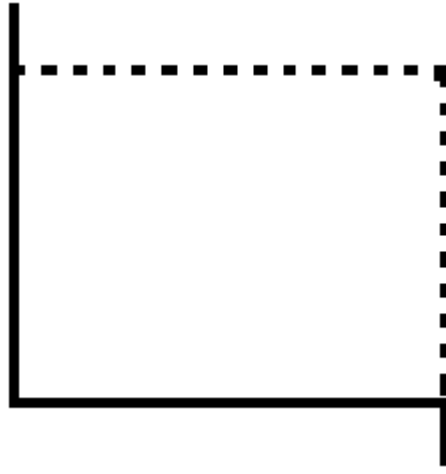
3.8. Crossman's Modification of Mallory's Triple Stain ile Fibrotik Alan Değerlendirmesi

Fibrotik alan değerlendirilmesi için 4 µm kalınlığında alınan ve Crossman's Modification of Mallory's triple stain metodu ile uygun şekilde üçlü boyaması yapılan ovaryum kesitleri Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde Leica Q Vin 3 programında fotoğraflanıp bilgisayar ortamına aktarıldı. Crossman's Modification of Mallory's triple stain ile boyanan ovaryum kesitlerinden elde edilen X40'lık büyültmedeki görüntülerde "Image J" programı ile mavi pikseller sayılarak ortalamaları alındı. Pembe renkli pikseller dikkate alınmadı. Gruplar arası farklılık olup olmadığı uygun istatistiksel metod (Kruskal Wallis /ShapiroWilk/Kolmogorow-Smirnov tesleri) ile değerlendirilerek fibrozis alanları belirlendi.

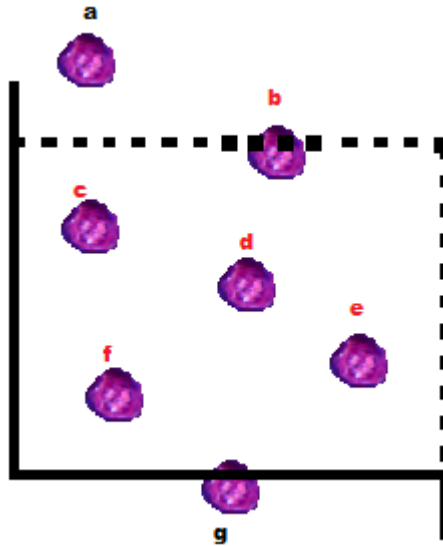
3.9. Follikül Sayımı için Kullanılan Stereolojik Yöntem

Primordiyal folliküllerin stereoloji sayımı için **fiziksel disektör** yöntemi uygulandı. Bunun için bloklardan tane olmak üzere 4 µm kalınlığında seri kesit çiftleri alındı ve H&E boyamaları yapılarak, Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde Leica Q Vin 3 programında fotoğrafları çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

Kesit çiftlerinden bir tanesi örnek kesit olarak kabul edilirken diğeri ise gözlem kesit olarak sayıma tabi tutuldu. İlk sayımın ardından yapılan ikinci sayımda, bu kez kesitlerin örnek kesit ve gözlem kesit olarak tam tersi kabul edilerek sayım gerçekleştirildi. Her bloktan 20 µm aralıklarla alınan 4'er kesit "Sistemik Rastgele Örneklemeye" yöntemine göre seçildi ve sayım işlemi gerçekleştirildi. Sayım için kullanılan fiziksel disektör çerçevesi Altunkaynak ve ark. (2012)'de belirlenen şekilde Microsoft Powepoint programında oluşturularak kullanıldı (Altunkaynak, ve diğerleri, 2016).



Şekil 3.1. Follikül sayımında kullanılan örnek bir disektör (Kesikli çizgi sayım için kullanılabilen Sayım kenarı, sürekli çizgi sayım için kullanılmayan Sayım dışı kenarı ifade eder (Altunkaynak, ve diğerleri, 2016)'dan düzenlenerek alınmıştır)



Şekil 3.2. Örnek bir primordiyal follikül sayımı

Yukarıdaki şekilde gösterilen primordiyal folliküllerden disektör dışında yer alan “a” follikülü ve sürekli çizginin olduğu yerde bulunana “g” follikülü sayıma dahil edilmezken, disektörün içinde yer alan “c, d,e,f” ve kesikli çizgi üzerinde yer alan “b” follikülü sayıma dahil edilir.

Blokta ilerlenen mesafenin hacmi Cavalieri metodu ile hesaplandı. Bunun için sayımı yapılan primordiyal folliküllerin yüzey alanı “a” ölçüldü. Kesitte bulunan toplam primordiyal follikül sayısı “P” saptandı. Bu değerler kesit kalınlığı ile çarpılarak hacim hesaplaması yapıldı. Buna göre hacim;

$$\Sigma V = t \times \Sigma P \times a(\text{follikül})$$

Formülü ile hesaplanır. Formülde yer alan

ΣV : Toplam Hacim

t: kesit kalınlığı

ΣP : Toplam primordiyal follikül sayısı

a(follikül): Tek bir primordiyal follikülün yüzey alanını ifade etmektedir.

Birim hacimde yer alan follikül sayısı ise ;

$$N = (\Sigma Q) / (h \times \Sigma a(\text{disektör})) \times V$$

formülü ile hesaplanır. Bu formülde yer alan

N : Birim hacimde bulunan follikül sayısını

ΣQ : Sayılan follikül sayısını

h : kesit çiftleri arasındaki mesafeyi

$\Sigma a(\text{disektör})$: disektör olarak kullanılan çerçevenin yüzey alanını

V : hacmi ifade eder (Altunkaynak, ve diğerleri, 2016).

3.10. İmmünohistokimyasal Yöntem

- FOXO3 immün işaretlemesi

İmmünohistokimyasal işaretlemeler için 4 µm kalınlığındaki ovarium dokuları polilizinli lamlara alınarak 62°C' deki etüvde 1 saat bekletildi. Lamlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15'şer dakika ksilende bekletildi. Bu sayede dokuların parafini tamamen uzaklaştırılmış oldu. Daha sonra 10'ar dakika sırasıyla %100, %96, %90, %80 ve %70'lik alkol serilerinden geçirildi. Boyama işlemine hazırlamak için dehidrate edilen dokuları alkolden arındırmak için kesitler 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Daha sonra doku içerisinde formaldehit'in kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla, dokulara sitrat tamponu (pH 6.0) ile mikrodalga fırında retriiver işlemi uygulandı. Bu işlem süresinin 7 dakikadan uzun olmamasına özen gösterildi.

- Sitrat tamponu hazırlanışı:

2,1 g Sitrik asit (susuz)

1 litre Distile su

2 M NAOH ile pH 6 ya ayarlanır (Suvarna, Layton, & Bancroft, 2013).

Mikrodalgadan çıkan sitrat tamponundaki dokular 20 dakika oda sıcaklığında soğumaya bırakıldı. Daha sonra dokular sitrattan arındırılmak için 2 kez 5'er dakika distile sudan geçirildi. Dokuların etrafı PAP-Pen ile çevrilerek nemli ortam olan immünohistokimya barına dizildi. Dokular 3 kez 3'er dakika PBS (Phosphate Buffer Saline) (Ph:7,4) ile yıkandı.

- PBS (Phosphate Buffer Saline) (Ph:7,4) (Gomori, 1955) hazırlanışı:

Solüsyon A

14.2 g Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)

1000 ml Distile su

Solüsyon B

51.6 g Sodyum dihidrojen fosfat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

1000 ml Distile su

Method: Solüsyon A'dan 40.5 ml alınır 9.5 ml solüsyon B ile karıştırılır. pH değeri ölçülür, gerekirse 0.1 M hidroklorik asit ya da 0.1 M sodyum hidroksit ile pH değeri ayarlanır (Suvarna ve ark., 2013) .

Dokular PBS (Phosphate Buffer Saline) (Ph:7,4) ile yıkandıktan sonra, 15 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokulardan endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi.

- %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) hazırlanışı:

45 ml metanol

45 ml PBS

10 ml %30 luk H_2O_2

İşlem sonrasında PBS ile camlar 3 kez 3'er dakika yıkandı. Yıkanan camlara 5 dakika UltraVblock uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemden sonra dokular yıkanmadan primer antikör aşamasına geçildi. İşaretleyici olarak kullandığımız ajanın endojen preoksidazlara bağlanmasını engellemek amacıyla yaptığımız bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, 1/100 oranında hazırlanan FoxO3 primer antikoru (FoxO3a (Ser253) Polyclonal Antibody- Bioss-bs-3140R)'nda 4°C' de 1 gece inkübe edildi. Primer antikordan sonra camlar 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Daha sonra 10 dakika antijen-primer antikör kompleksini görünür hale getirmek için biotinli sekonder antikör uygulanarak sekonder antikörün primer antikora bağlanması sağlandı. İşlem sonunda dokular yine 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı. Sonra 10 dakika biyotin ile yüksek oranda bağlanma özelliğinde olan streptavidin uygulandı. Streptavidin biyotine bağlanma açısından yüksek bir afiniteye sahiptir, fakat benzer amaçla kullanılan avidin molekülüne göre kullanımı daha avantajlıdır. Çünkü streptavidin endojen biyotin moleküllerine bağlanma afinitesi çok düşüktür ve bu sayede endojen biyotin kaynaklı arka plan boyanması önlenmiş olur. Streptavidin uygulanması reaksiyonun sensitivitesini (hassaslığını) arttırması açısından önemlidir. İşlem sonunda dokular 3 kez 3'er dakika PBS ile yıkandı.

Son olarak dokulara diaminobenzedin (DAB) substratı içeren DAB kromojeni damlatılarak gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı.

- Diaminobenzedin (DAB) substratı solüsyonunun hazırlanışı (Suvarna, Layton, & Bancroft, 2013)

22 mg Diaminobenzidin (DAB)

50 ml Tris tamponu (stok)

0.2 ml %30'luk Hidrojen peroksit

Deneyde bu işlemi DAB Substrate System (Thermo Scientific) ile gerçekleştirildi. Buna göre 1-2 damla (40-100 µl) DAB kromojen solüsyonu 1 ml DAB substratı ile karıştırılır. Bu işlemin süresi dokuların bu kromojenle tepkime verme zamanı ön deneyle mikroskopta kontrol edilerek yapıldı. Reaksiyonun ışığa duyarlı olması nedeniyle dokular DAB solüsyonu solüsyonla belirlenen sürede karanlıkta inkübe edildi.

2 kez 5'er dakika distile su ile yıkanan dokularda zemin boyası olarak Mayer's Hematoksilen'i kullanıldı. Hematoksilen boyamasının ardından preparatlar distile su ile tekrar yıkandı. DAB ile boyanan lamalar azalan alkol serilerinden geçirildi. Sonrasında 20 dakika ksilende bekletilen lamlara entellan damlatılıp lamel ile kapatıldı.

- Mayer's hematoksilen hazırlanışı

1 g Hematoksilen

1000 ml Distile su

50 g Potasyum ya da amonyum alum

0.2 g Sodyum iyodat

1 g Sitrik asit

50 g Kloral hidrat (Triklor asetaldehit hidrat) SLR ya da

30 g Kloral hidrat AR

Hematoksilen, potasyum alum ve sodyum iyodat distile suda çözülür karıştırılarak ve ısıtılarak. Bu işlem ısı kullanmaksızın çözeltinin oda sıcaklığında karıştırıcıda karıştırılarak bir gece bekletilmesi ile de gerçekleştirilebilir. Kloral hidrat ve sitrik asit eklenir. Karışım

bu halde 5 dakika karıştırılır ve süzülür. Boyamız kullanıma hazırdır (Suvarna, Layton, & Bancroft, 2013).

Kesitler Leica DM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programında fotoğrafları çekilerek değerlendirildi. Değerlendirmeler sonunda immünohistokimyasal tutulum yoğunlukları incelenerek istatistiksel verileri oluşturuldu.

3.11. İstatistiksel Yöntem

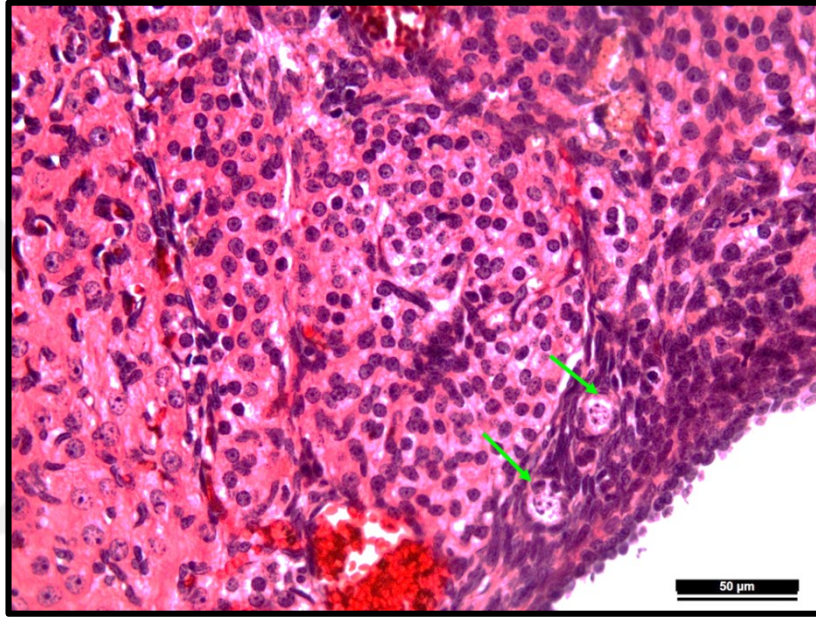
Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Değişkenleri tanımlamak için ortalama \pm standart sapma; ortanca (çeyreklikler arası genişlik) ve minimum-maksimum değerleri kullanıldı. Parametrik test varsayımlarını sağlayan değişkenleri karşılaştırmak için ise Student's t testi, grupları karşılaştırmak için ise tek yönlü varyans analizi (ANOVA) uygulandı. Anova sonucunda fark bulunduğunda farkın kaynağı Bonferroni post-hoc testi ile araştırıldı. Çarpık verileri (nonparametrik) karşılaştırmak için Kruskal-Wallis nonparametrik varyans analizi kullanıldı. Fark bulunduğunda farklı grubu belirleyebilmek için Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi ile post-hoc ikili karşılaştırmaları yapıldı. İstatistiksel analiz ve hesaplamalar IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp, NA, USA) ve MS-Excel 2013 ile yapıldı. İstatistiksel kararlarda $p \leq 0.05$ anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.



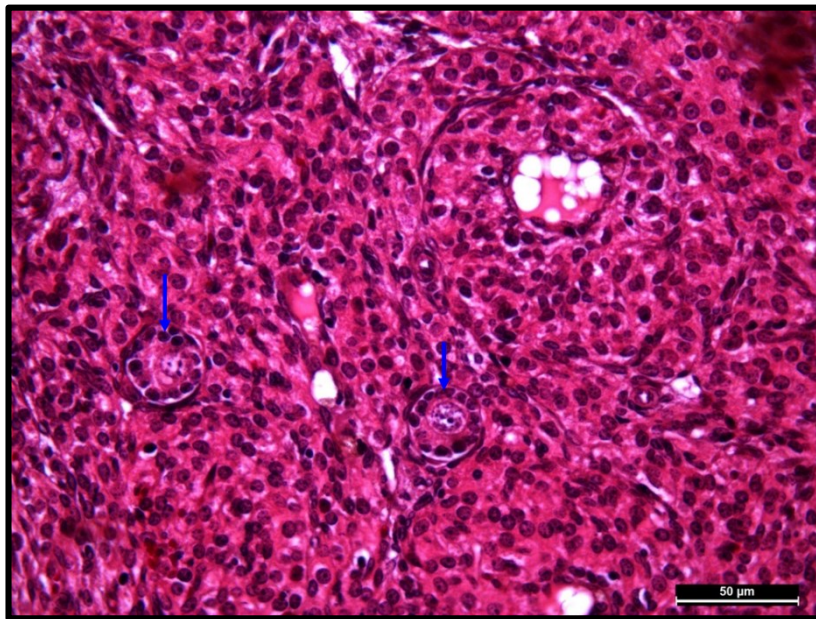
4. BULGULAR

4.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması Histomorfoloji Bulguları

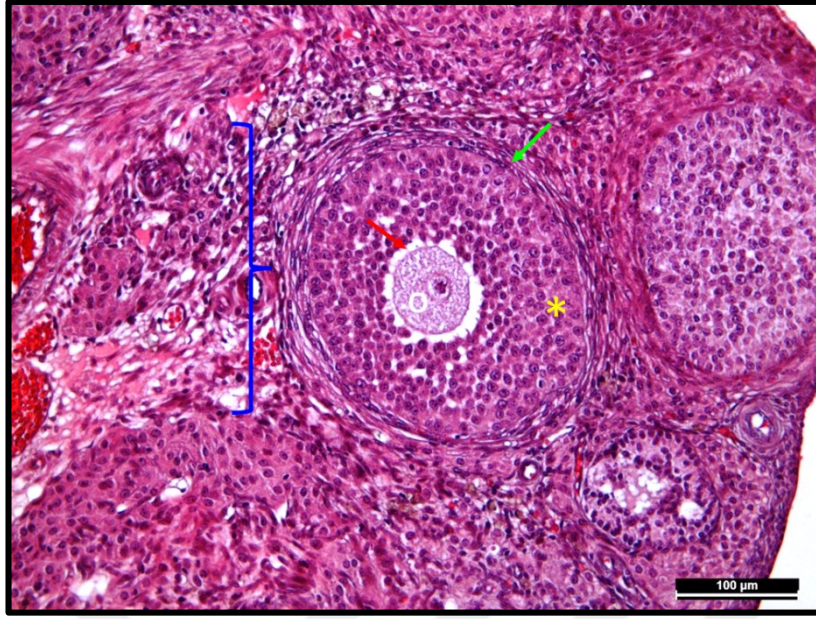
Kontrol grubunda primordiyal, unilaminar ve multilaminar primer folliküller, sekonder folliküller ve tersiyer folliküller normal histolojik karakterde gözlemlendi. (Resim 4.1.,4.5.)



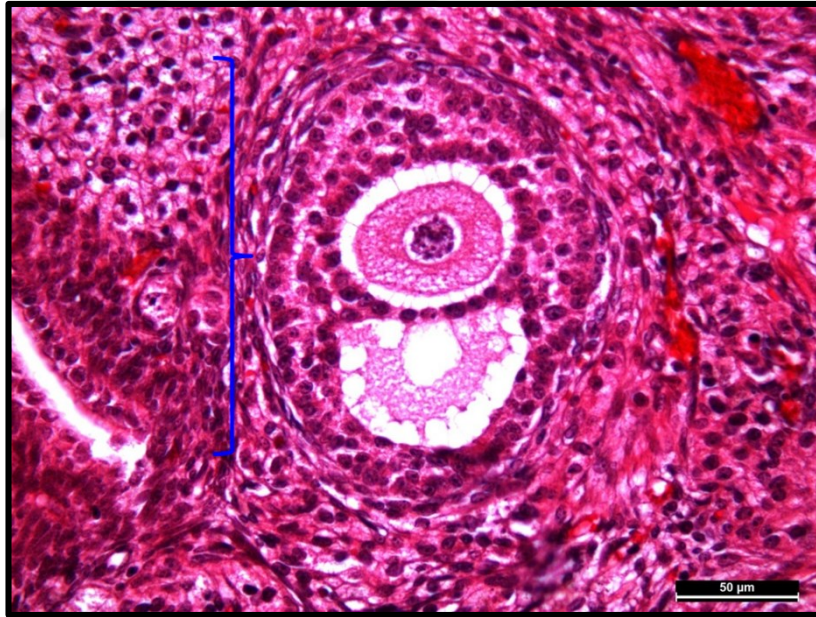
Resim 4.1. Kontrol grubunda normal histolojik karakterde primordiyal folliküller (yeşil oklar) (H&E)



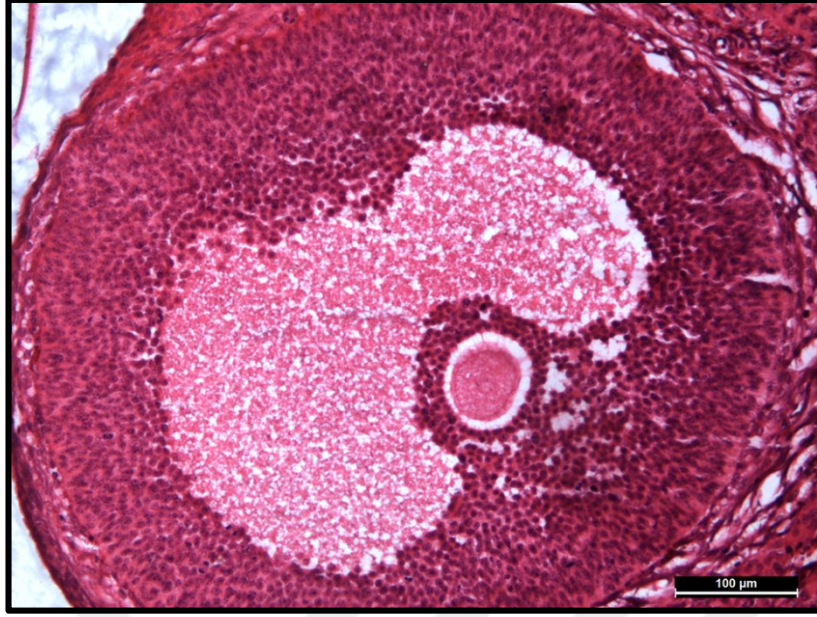
Resim 4.2. Kontrol grubunda normal histolojik görünümde unilaminar primer folliküller (mavi oklar) (H&E)



Resim 4.3. Kontrol grubunda teka-folikül kompleksi (yeşil ok), zona pellusida (kırmızı ok), pimer oosit (O), granüloza hücreleri (*) ile normal histolojik yapı sergileyen multilaminar primer follikül (}), (H&E)

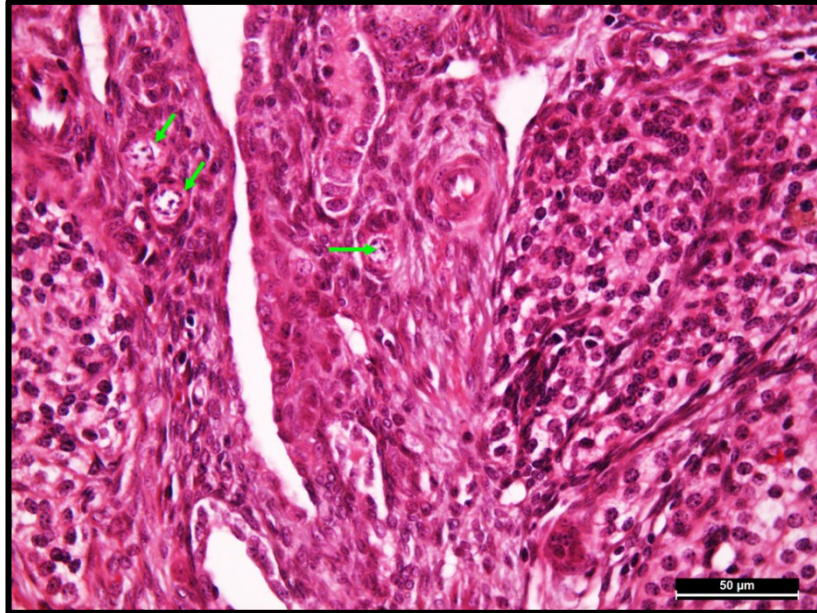


Resim 4.4. Kontrol grubunda tüm yapısal elemanları ile normal histolojik görünüm sergileyen teka ve sekonder follikül yapısı (}) (H&E)

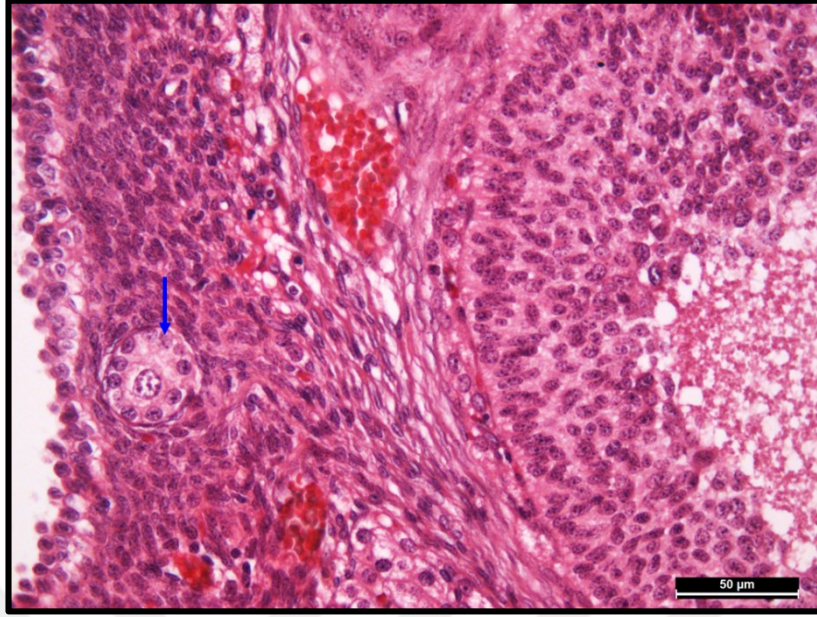


Resim 4.5. Kontrol grubunda tüm yapısal elemanları ile normal histolojik yapıda tersiyer follükül (H&E)

Susam Yağı grubunda gelişen tüm follüküller yai follüküler her aşama kontrol grubu ile özdeş olarak normal histolojik karakterdeydi (Resim 4.6.-4.10.)



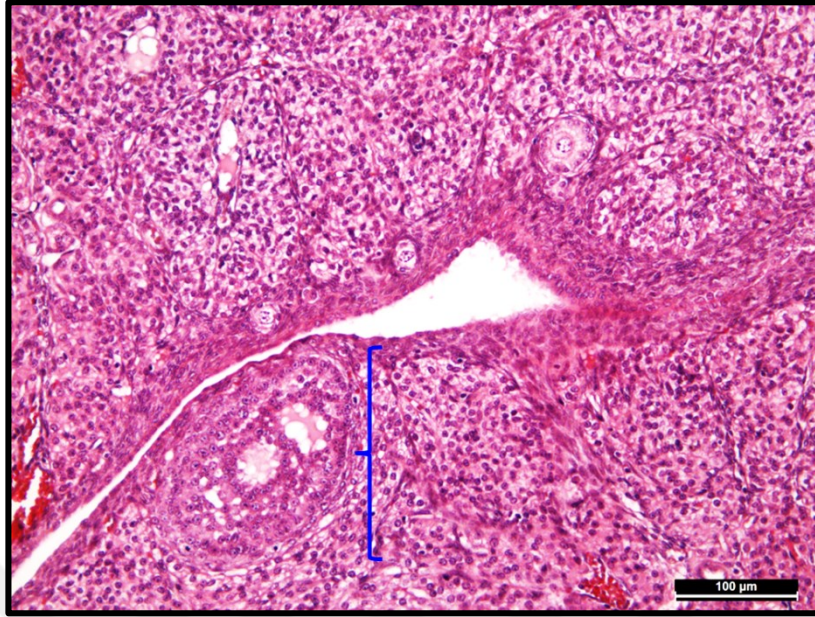
Resim 4.6. Susam yağı grubunda sağlıklı histolojik görünüm sergileyen primordiyal follüküller (yeşil oklar) (H&E)



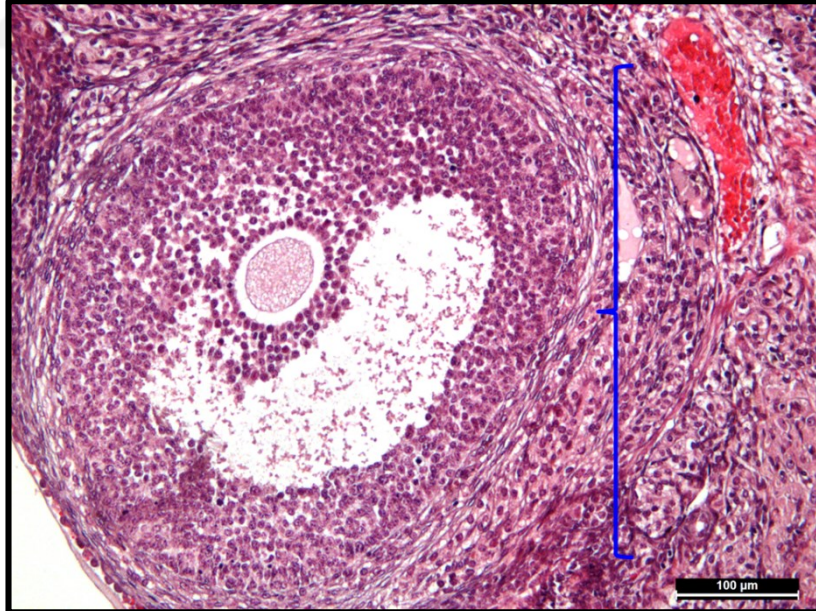
Resim 4.7. Susam yağı grubunda normal histolojik yapıda unilaminar primer follükül (mavi ok) (H&E)



Resim 4.8. Susam yağı grubunda tüm yapısal elemanları ile normal histolojik karakterde multilaminar primer follükül (}) (H&E)



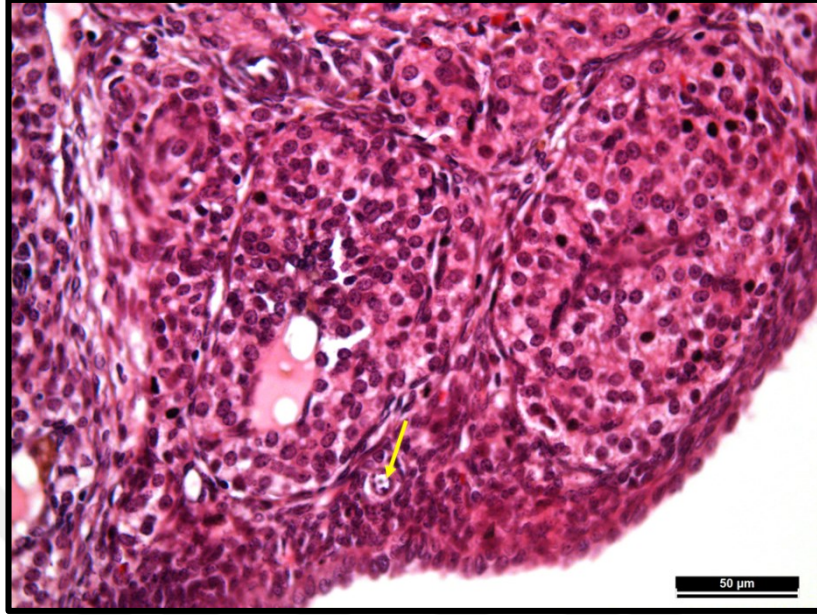
Resim 4.9. Susam yağı grubunda normal histolojik yapıda antral follükül (}) (H&E)



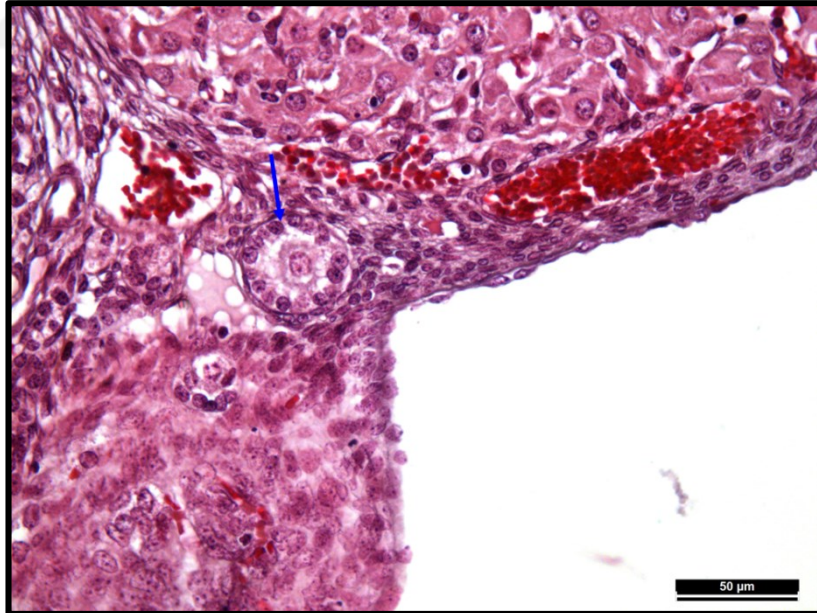
Resim 4.10. Susam yağı grubunda teka katmanları ve ve tüm yapısal elemanları ile sağlıklı bir graff follükülü (}) (H&E)

Düşük doz grubunda ise primordial follüküller ve unilaminar primer follüküller normal histolojik karakterde gözlenirken (Res: 4.11., 4.12.) bir kısım multilaminar primer

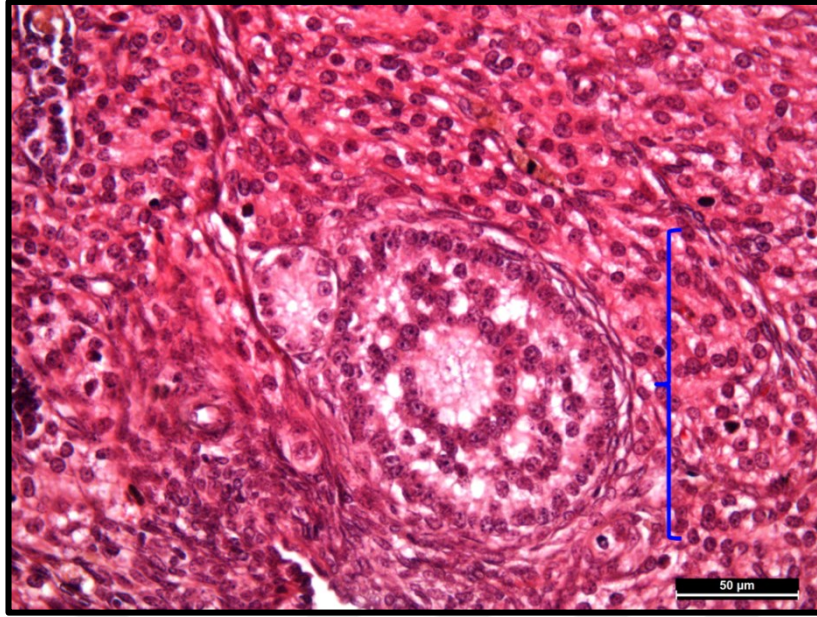
folliküllerde zona pellusidanın gelişmediği belirlendi (Res: 4.13.), antral folliküllerin çoğunda az sayıda piknotik çekirdekli follikül hücrelerinin varlığı saptandı (Res: 4.14.)



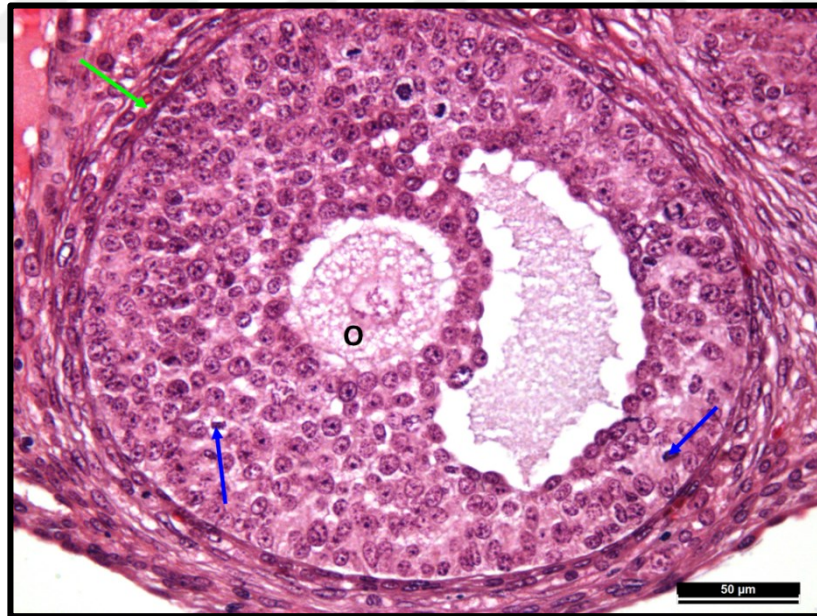
Resim 4.11. Düşük doz grubunda normal histolojik görünümde primordiyal follikül (sarı ok) (H&E)



Resim 4.12. Düşük doz grubunda unilaminar primer follikül; granuloza hücrelerinde sitoplazmik vakuoller, oosit-kumulus disintegrasyonu (H&E)



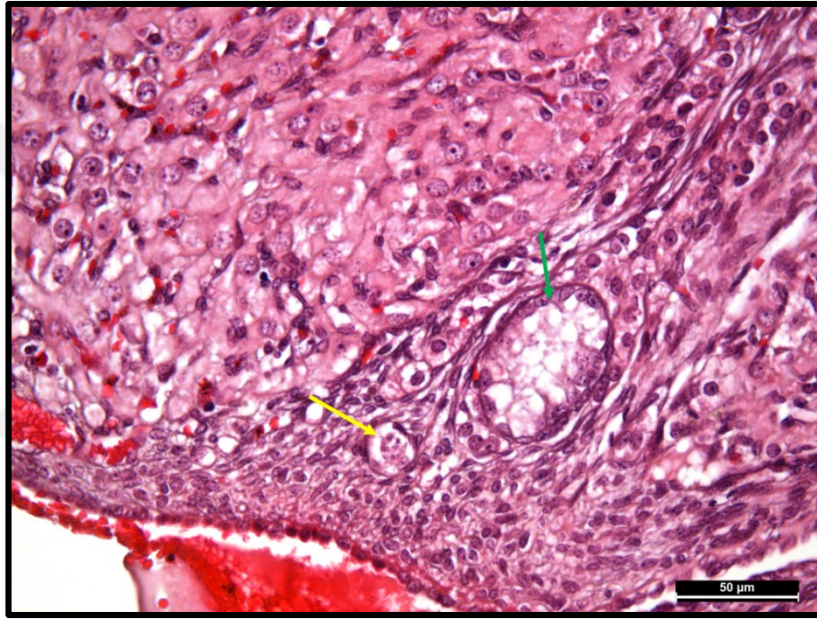
Resim 4.13. Düşük doz grubunda henüz zona pellusida gelişimini tamamlamamış multilaminar primer follükül ({) (H&E)



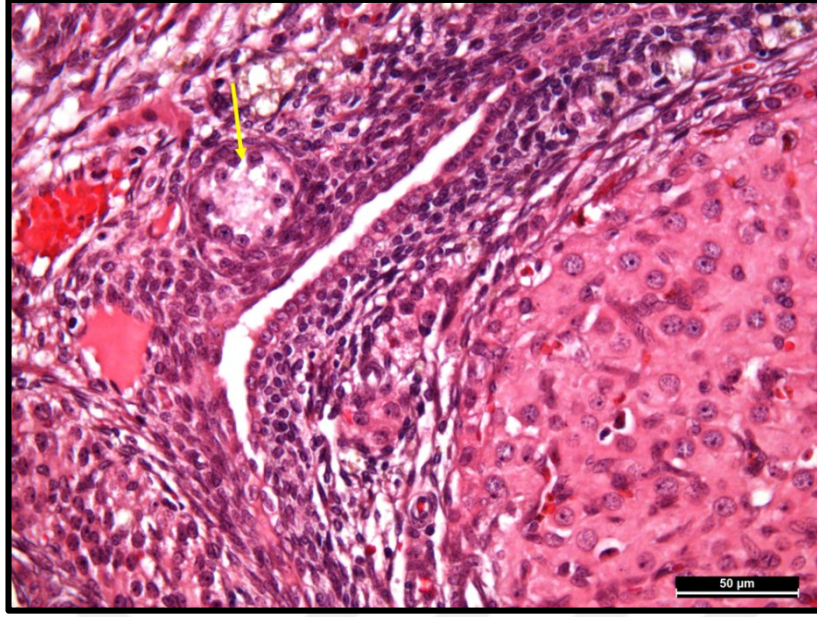
Resim 4.14. Düşük doz grubunda antral follükül; az sayıda piknotik çekirdekli granüloza hücreleri (mavi oklar), düzenli teka-follükül bileşkesi (yeşil ok), vakuollü görünüm sergileyen primer oosit (O)(H&E)

Yüksek doz grubunda primordiyal follüküllerin histolojik olarak normal yapıda gözlenmesine rağmen (Res 4.15), unilaminar primer follüküllerde follükül hücrelerinin

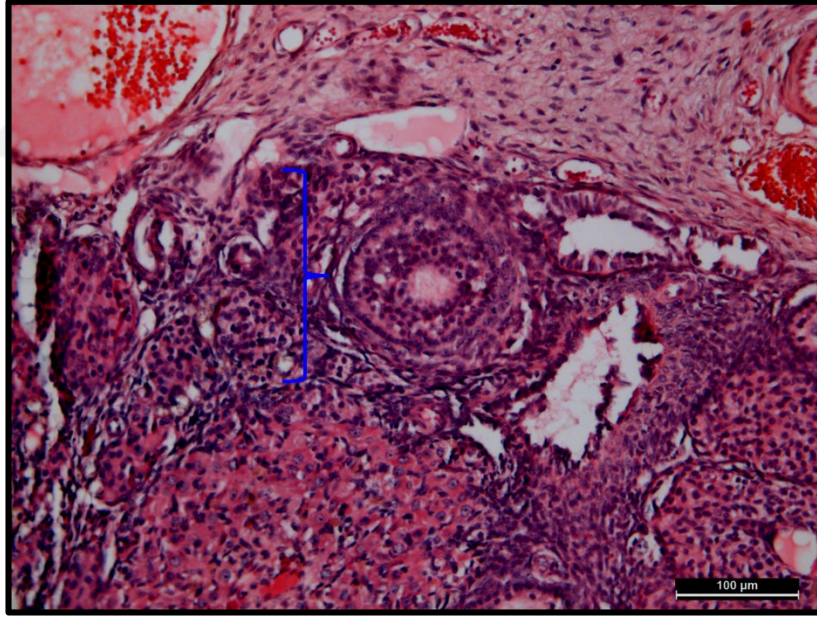
organizasyonunda disintegrasyon (Res 4.16.), çoğu atreziye gider görünümdeki multilaminar primer follüküllerde teka-follükül hücre katmanları bileşkesinde dejeneratif açılmalarla gözlendi (Res: 4.17.). Ayrıca antral follüküllerin bir grubunda düşük doz grubuna göre daha çok sayıda piknotik çekirdekli follükül hücresi gözlenirken bu grup follüküllerde teka-follükül bileşkesinde düzensizlikler izlendi (Res 4.18.) Yüksek doz grubunda graff follüküllerinin bir grubunda antrumun eritrositlerle dolu olduğu, kümeler halinde piknotik çekirdekli granüloza hücrelerinin varlığı, teka katmanları arasında disintegrasyon olduğu ve teka-follükül hücre katmanları arasında organizasyon bozukluğu dikkati çekti. (Res: 4.19)



Resim 4.15.Yüksek doz grubunda sitoplazmik dejenerasyon gösteren primordiyal follükül (sarı ok) ve erken atreziye giden follükül (yeşil ok) (H&E)



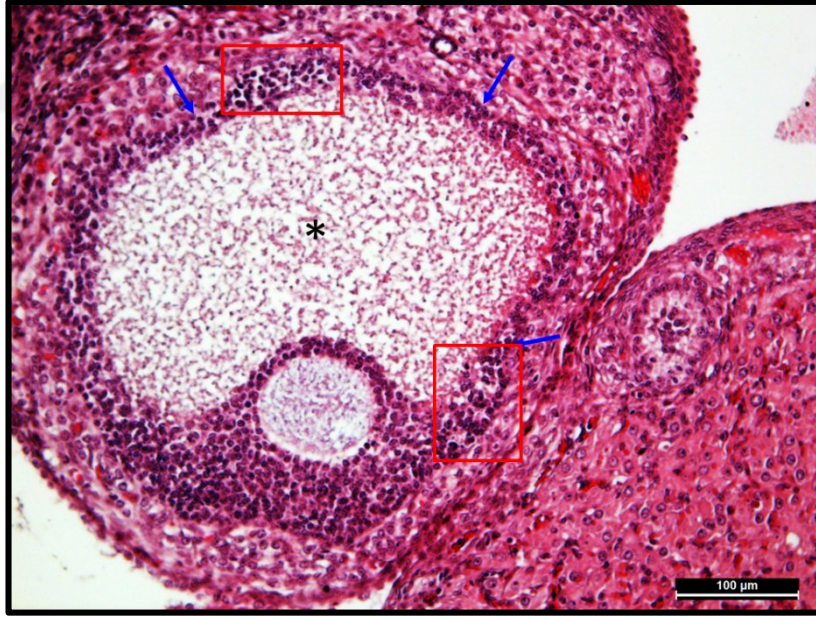
Resim 4.16. Yüksek doz grubunda disintegre follükül hücrelerine sahip unilaminar primer follükül (sarı ok) (H&E)



Resim 4.17. Yüksek doz grubunda teka-follükül bağlantısında dejeneratif açılmalarla atreziye giden multilaminar primer follükül (}),(H&E)



Resim 4.18. Yüksek doz grubunda çok sayıda piknotik çekirdekli follikül hücresi içeren antral follikül ve teka-follikül bileşkesinde düzensizlik (H&E)



Resim 4.19. Yüksek doz grubunda eritrositlerle dolu graff follikülü antrumu (*), teka tabakaları arasında disintegrasyon ve teka-follikül bileşkesinde düzensizlik (mavi oklar), kümeler halinde çok sayıda piknotik çekirdeli granuloza hücresi () (H&E)

4.2. Follikül Sayım Sonuçları ve İstatistiksel Değerlendirmesi

Primordial follikül sayısı ortalamaları kontrol grubunda $289,62 \pm 75,12$; susam yağı grubunda $138,20 \pm 36,94$; düşük doz grubunda $121,56 \pm 53,36$ ve yüksek doz grubunda $50,41 \pm 39,94$ olarak saptandı (Çizelge 4.1, Şekil 4.1). ANOVA testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,004$). Farklı grupları belirleyebilmek için post-hoc testi ile gruplar ikili karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile susam yağı grubu kıyaslandığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p=0,051$). Kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz gruplarıyla kıyaslandığında ise aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı (sırasıyla, $p=0,029$; $0,004$). Düşük doz ve yüksek doz gruplarındaki primordiyal follikül sayısı kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalma gösterdi. Düşük doz ile yüksek doz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=0,852$); ancak yüksek doz grubundaki primordial follikül sayısı daha azdı. Susam yağı grubu, düşük ve yüksek doz gruplarıyla kıyaslandığında da aralarında istatistiksel açıdan fark gözlenmedi (sırasıyla, $p=1,000$; $0,476$).

Unilaminar primer follikül sayısı ortalamaları kontrol grubunda $132,89 \pm 16,85$; susam yağı grubunda $47,83 \pm 20,67$; düşük doz grubunda $28,05 \pm 20,40$ ve yüksek doz grubunda $14,58 \pm 13,18$ olarak saptandı (Çizelge 4.1, Şekil 4.2). Kruskal-Wallis testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,033$). Farklı grupları belirleyebilmek için Bonferroni düzeltilmeli Mann – Whitney post-hoc testi ile gruplar ikili karşılaştırıldı. Kontrol grubu ile susam yağı grubu kıyaslandığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p=1,000$). Kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz gruplarıyla kıyaslandığında (sırasıyla, $p=0,246$; $0,028$) sadece yüksek doz grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Düşük doz ve yüksek doz gruplarındaki unilaminar primer follikül sayısı kontrol grubuna göre azalma gösterdi. Düşük doz ile yüksek doz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=1,000$); ancak yüksek doz grubundaki unilaminar primer follikül sayısı daha azdı. Susam yağı grubu, düşük ve yüksek doz gruplarıyla kıyaslandığında da aralarında istatistiksel açıdan fark gözlenmedi (sırasıyla, $p=1,000$; $0,678$).

Multilaminar primer follikül sayısı ortalamaları kontrol grubunda $54,34 \pm 18,62$; susam yağı grubunda $25,94 \pm 3,83$; düşük doz grubunda $12,85 \pm 1,69$ ve yüksek doz grubunda $12,79 \pm 7,26$ olarak saptandı (Çizelge 4.1, Şekil 4.3). Kruskal-Wallis testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,024$). Farklı grupları belirleyebilmek için Bonferroni düzeltilmeli Mann – Whitney post-hoc testi ile gruplar ikili karşılaştırıldı. Kontrol

grubu ile susam yağı grubu kıyaslandığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdı ($p=1,000$). Kontrol grubu, düşük doz ve yüksek doz gruplarıyla kıyaslandığında (sırasıyla, $p=0,105$; $0,039$) sadece yüksek doz grubu ile aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı. Düşük doz ve yüksek doz gruplarındaki multilaminar primer follikül sayısı kontrol grubuna göre azalma gösterdi. Düşük doz ile yüksek doz grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p=1,000$); ancak yüksek doz grubundaki multilaminar primer follikül sayısı daha azdı. Susam yağı grubunda, düşük ve yüksek doz grupları kıyaslandığında da aralarında istatistiksel açıdan fark gözlenmedi (sırasıyla, $p=1,000$; $0,537$).

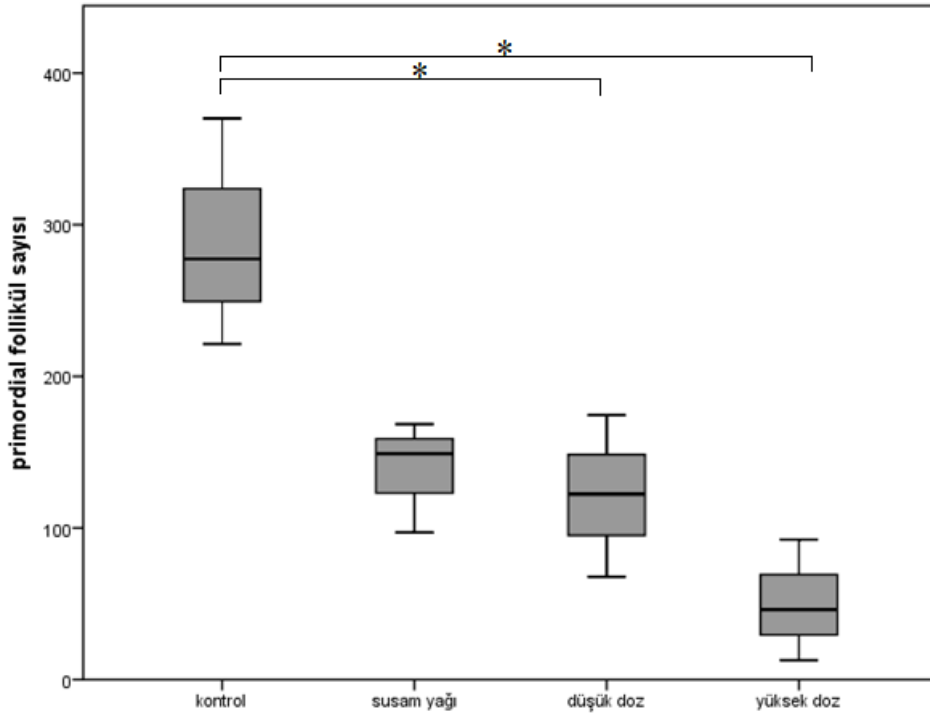
Sekonder follikül sayısı ortalamaları kontrol grubunda $42,03\pm 31,99$; susam yağı grubunda $27,98\pm 4,37$; düşük doz grubunda $21,61\pm 9,30$ ve yüksek doz grubunda $7,86\pm 9,53$ olarak saptandı (Çizelge 4.1, Şekil 4.4). ANOVA testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,196$).

Graaf follikülü sayısı ortalamaları kontrol grubunda $21,57\pm 22,15$; susam yağı grubunda $4,90\pm 5,62$; düşük doz grubunda $11,02\pm 6,58$ ve yüksek doz grubunda $3,04\pm 2,73$ olarak saptandı (Çizelge 4.1, Şekil 4.5). Kruskal-Wallis testi sonucu gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmedi ($p=0,114$).

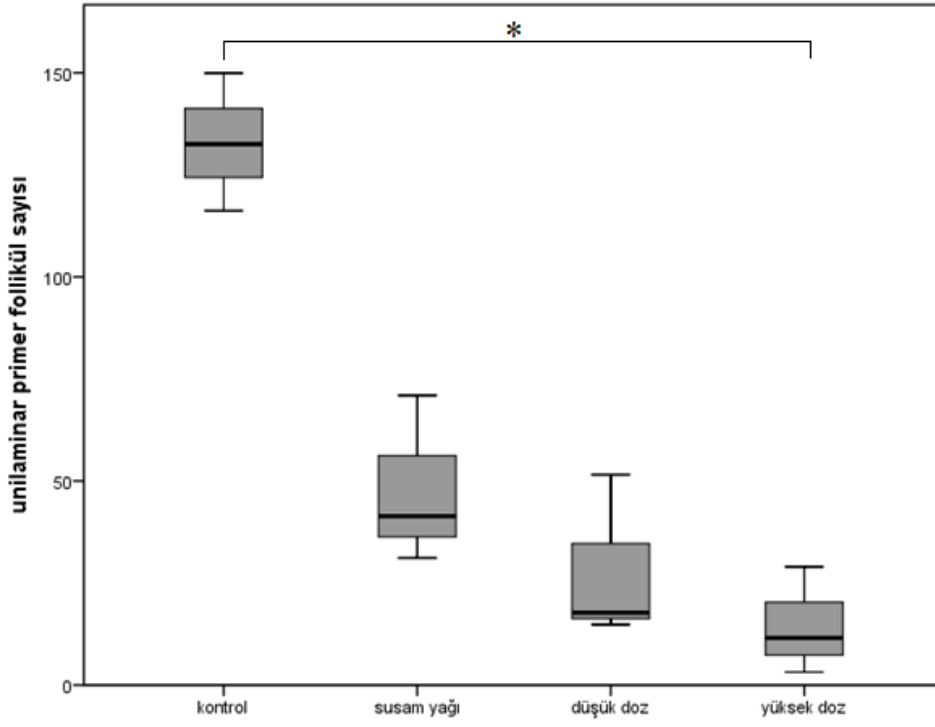
Primordiyal follikül, sayımlarında kontrol grubu ve çözücü grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmezken, düşük doz ve yüksek doz gruplarındaki primordiyal follikül sayısı kontrol grubu ve çözücü grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark belirlendi. Primordial follikül sayılarının azaldığı saptandı. Düşük doz ile yüksek doz grupları karşılaştırıldığında ise aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte yüksek doz grubundaki primordiyal follikül sayısı daha azdı. Unilaminar ve multilaminar primer folliküller değerlendirildiğinde ise istatistiksel olarak anlamlı farklılık sadece kontrol grubu ile yüksek doz grubu arasındaki ikili karşılaştırmada belirlendi. Yüksek doz grubunda bu follikül sayılarının azaldığı saptandı. Sekonder folliküllerin ve tersiyer folliküllerin sayısı tüm gruplar arasında ve gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir.

Çizelge 4.1. Tüm gruplara ait follikül sayılarının tanımlayıcı verileri

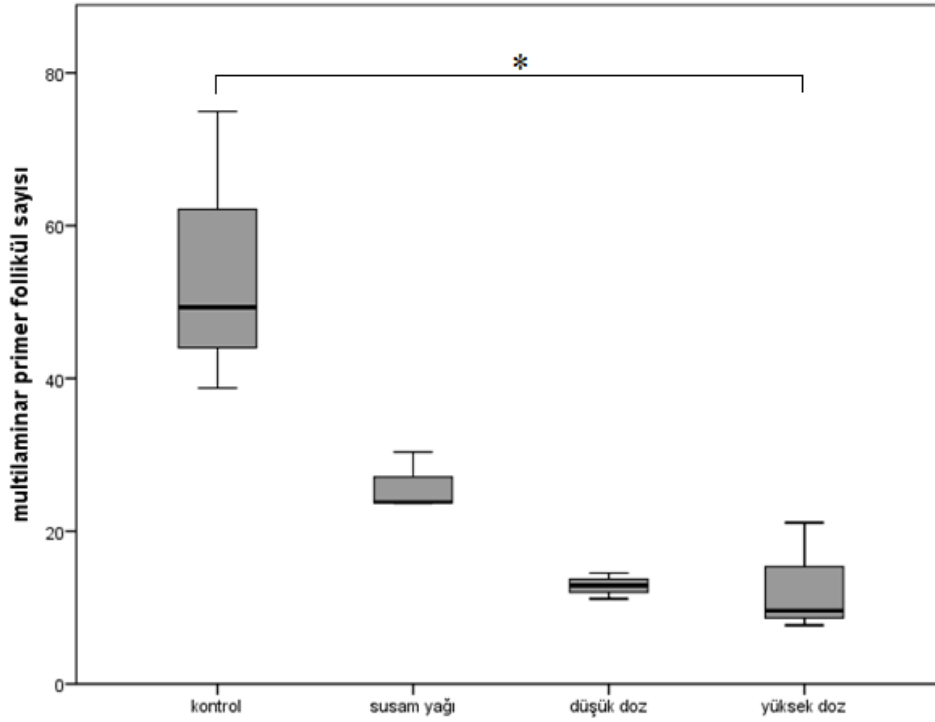
		Follikül Tipleri				
		Primordiyal	Unilaminer Primer	Multilaminer Primer	Sekonder	Graaf
Kontrol	Ortalama	289,62	132,88	54,33	42,03	21,57
	Standart sapma	75,12	16,85	18,62	31,99	22,15
	Medyan	277,4	132,53	49,31	40,06	12,32
	Minimum	221,36	116,21	38,74	11,07	5,53
	Maksimum	370,11	149,92	74,96	74,96	46,85
Susam yağı	Ortalama	138,20	47,82	25,93	27,97	4,90
	Standart sapma	36,94	20,67	3,83	4,36	5,62
	Medyan	149,04	41,40	28,80	27,60	3,66
	Minimum	97,06	31,13	23,62	23,81	0
	Maksimum	168,51	70,95	30,36	32,52	11,04
Düşük doz izotretinoin	Ortalama	121,56	28,04	12,84	21,60	11,02
	Standart sapma	53,36	20,40	1,69	9,30	6,57
	Medyan	122,43	17,74	12,88	17,74	8,06
	Minimum	67,77	14,85	11,14	14,85	6,44
	Maksimum	174,48	51,55	14,52	32,22	18,56
Yüksek doz izotretinoin	Ortalama	50,41	14,58	12,79	7,86	3,03
	Standart sapma	39,93	13,17	7,25	9,53	2,72
	Medyan	46,11	11,52	9,59	5,12	3,84
	Minimum	12,79	3,20	7,69	0	0
	Maksimum	92,32	29,01	21,10	18,46	5,28



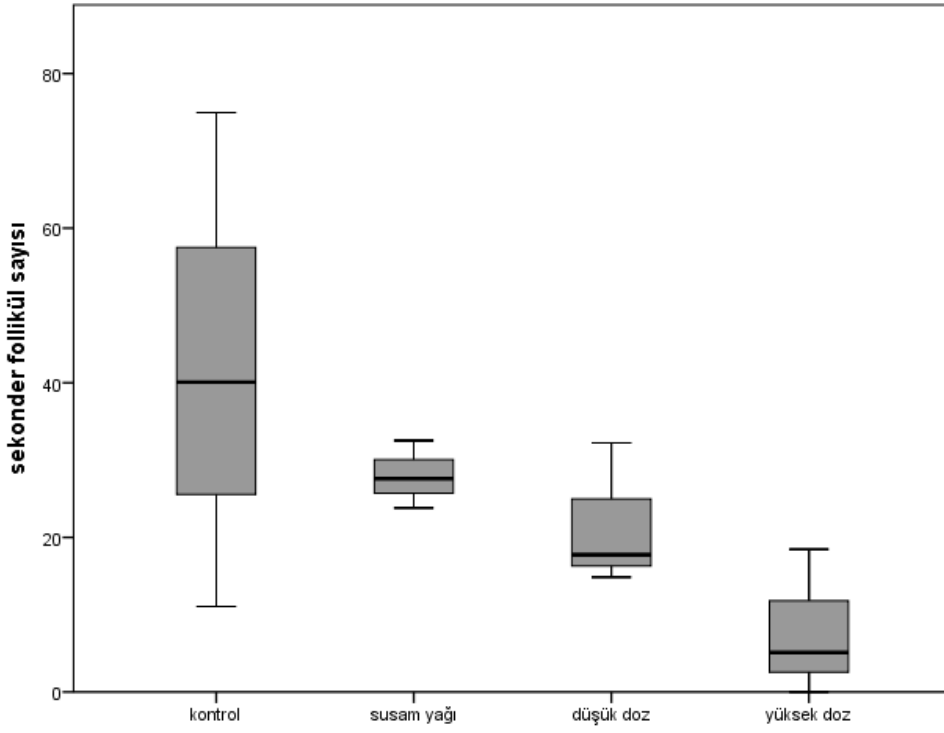
Şekil 4.1. Tüm gruplara ait primordial follikül sayısı ortalamaları *p<0,005



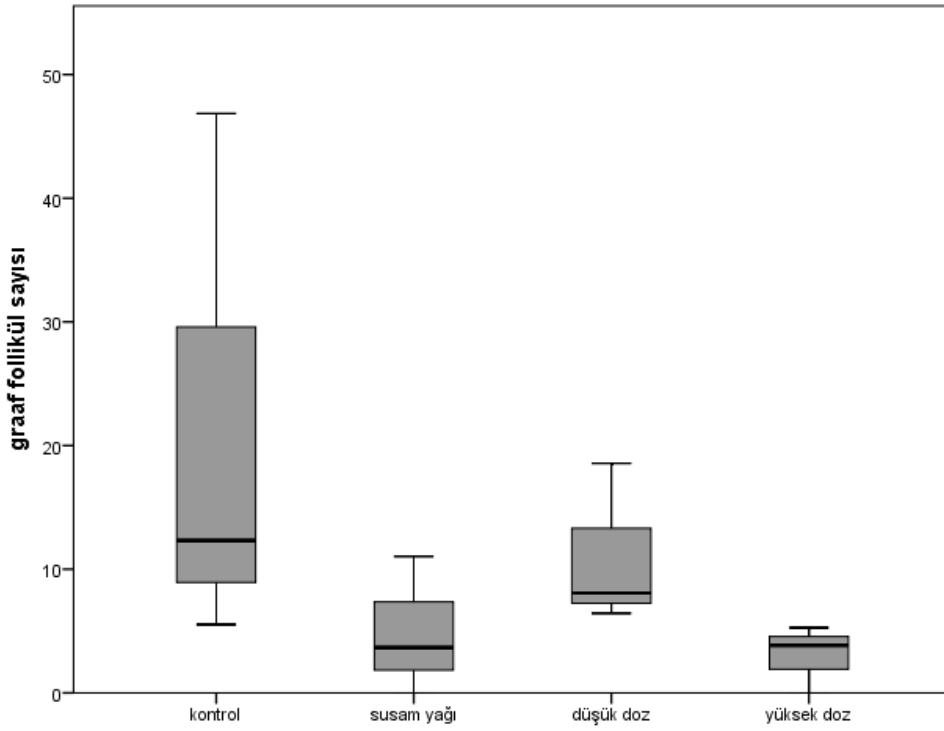
Şekil 4.2. Tüm gruplara ait unilaminar primer follikül sayısı ortalamaları * $p < 0,005$



Şekil 4.3. Tüm gruplara ait multilaminar primer follikül sayısı ortalamaları * $p < 0,005$



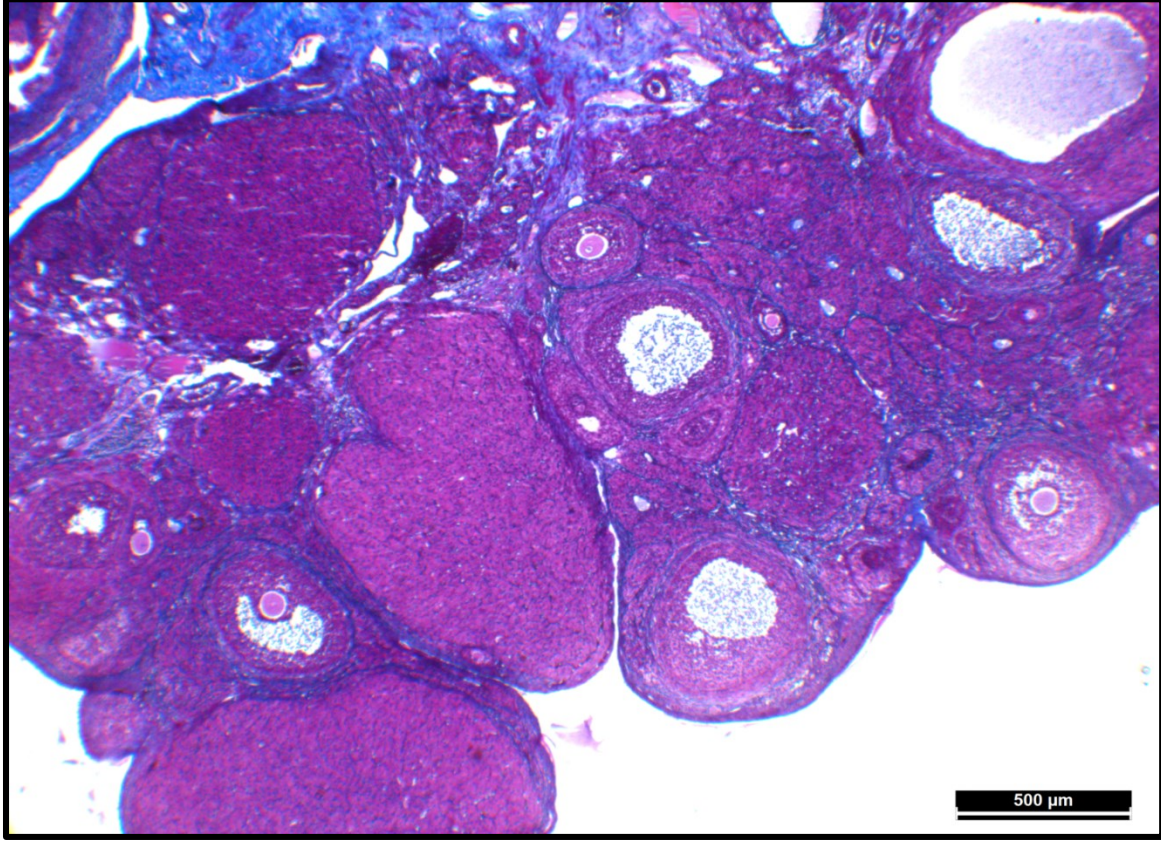
Şekil 4.4. Tüm gruplara ait sekonder follikül sayısı ortalamaları



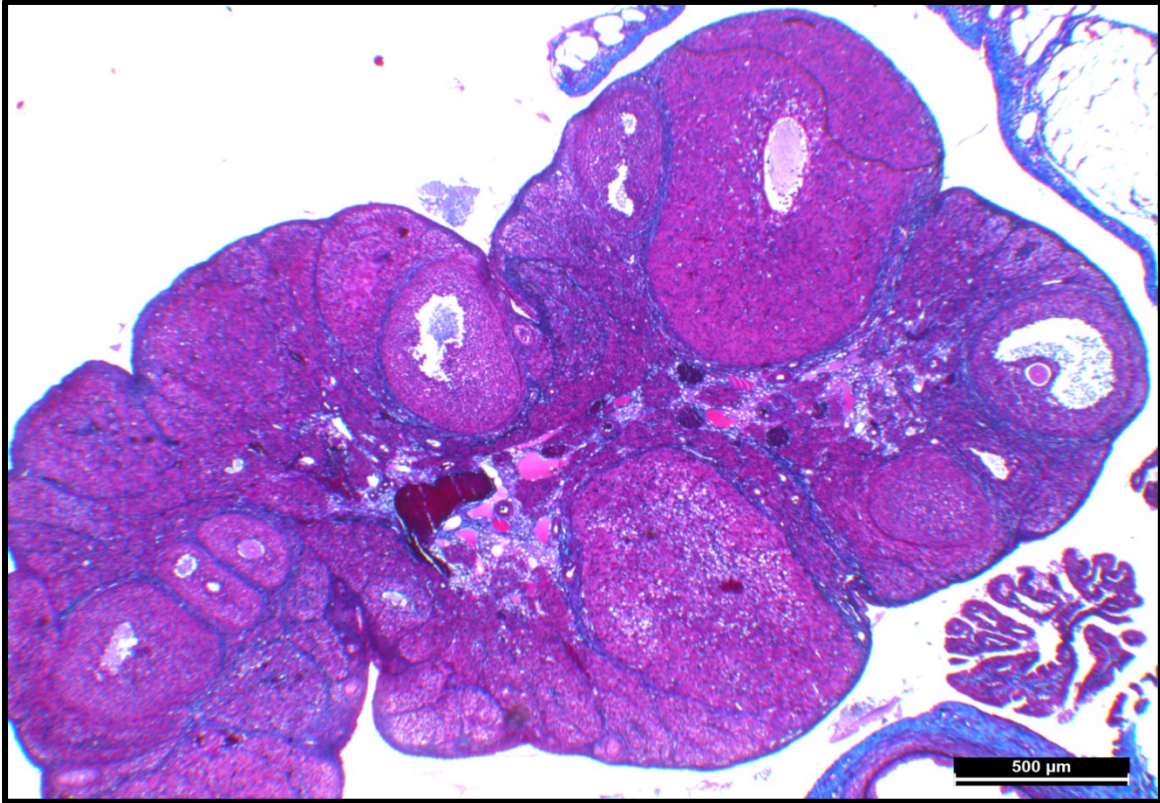
Şekil 4.5. :Tüm gruplara ait Graaf follikülü sayısı ortalamaları

4.3. Fibrotik Alan Değerlendirmesi

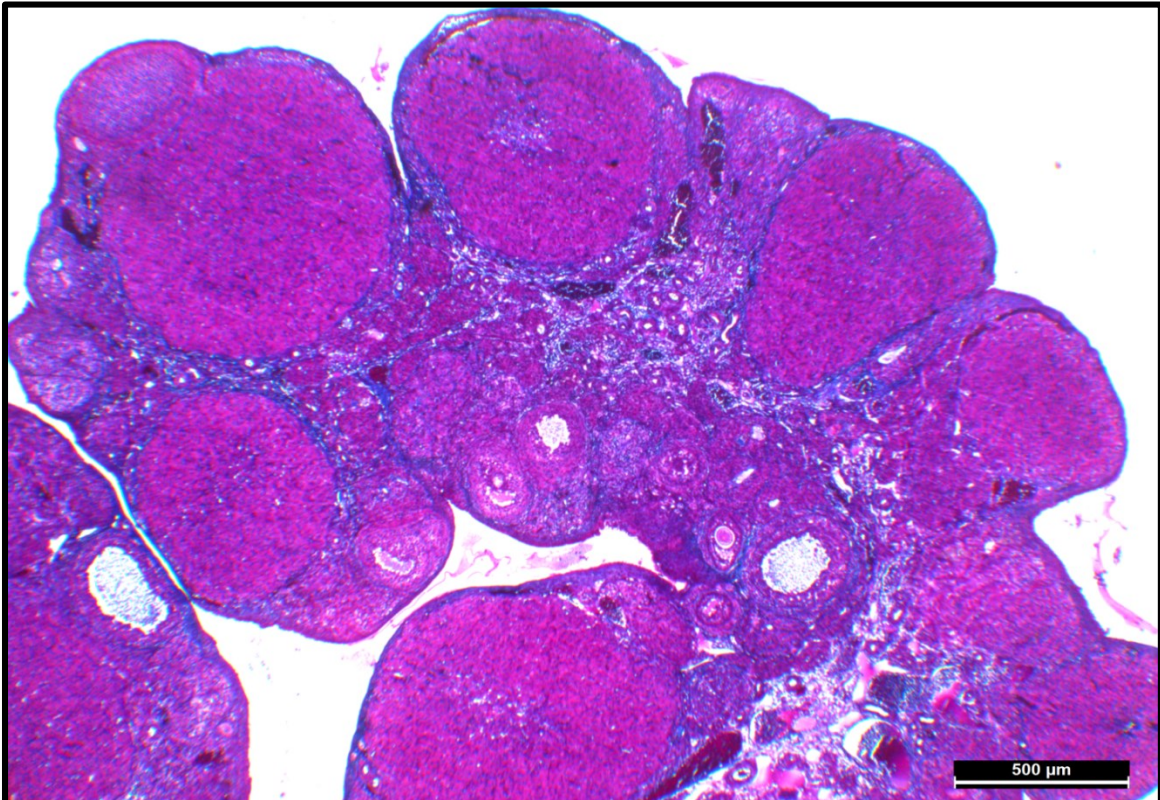
Çalışmamızda fibrozis değerlendirmesi için ovaryum dokuları korteks ve medulla olarak tümüyle değerlendirilmiştir.



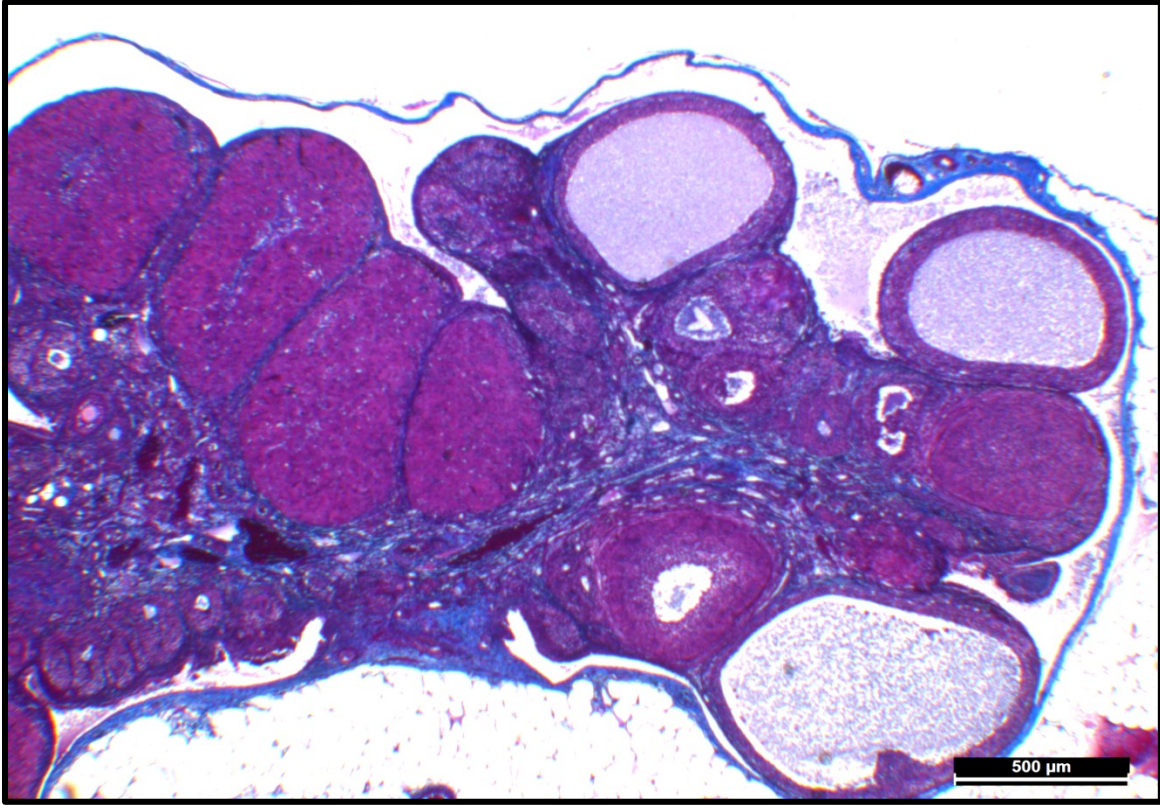
Resim 4.20. Kontrol grubu. Crossman's Modification of Mallory's triple stain, (x40 objektifinde)



Resim 4.21. Susam yağı (çözücü) grubu. Crossman's Modification of Mallory's triple stain



Resim 4.22. Düşük doz izotretinoin grubu. Crossman's Modification of Mallory's triple stain



Resim 4.23. Yüksek doz izotretinoin grubu. Crossman's Modification of Mallory's triple stain

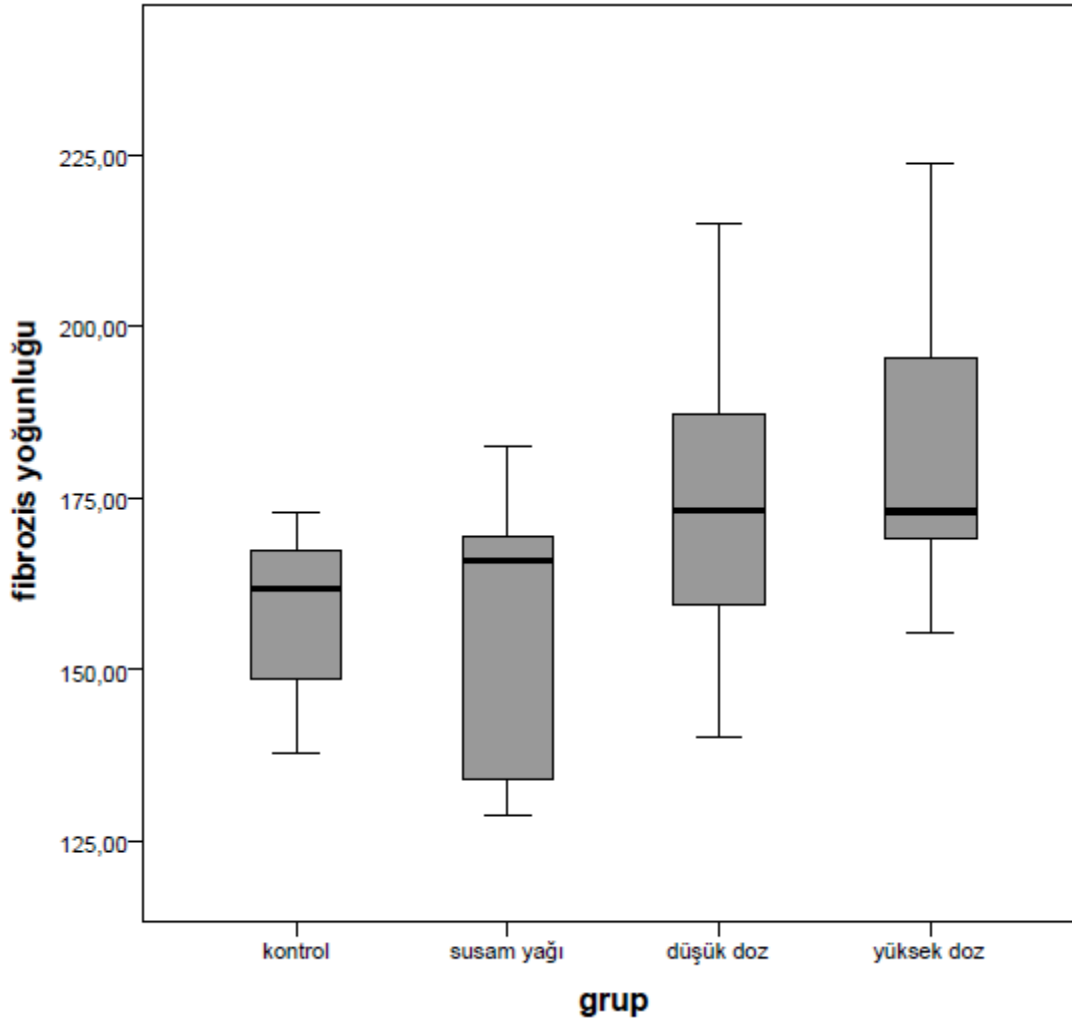
Fibrotik alan değerlendirmesi için ölçümler Adobe Photoshop CS4 programı kullanılarak yapıldı. 40lık büyütmedeki tüm fotoğraflar tercih edildi. Sayım yapılırken her bir fotoğraf için rastgele 10 alandan mavi pikseller seçildi ve tüm resimdeki seçilmiş olan pixellerin miktarı program tarafından hesaplandı ve aritmetik ortalaması alındı. Elde edilen tüm verilerin aritmetik ortalaması alınarak herbir grup için tek bir değere ulaşıldı (Tan, Pan, & Li, 2011)'e göre yapılmıştır.).

Mavi piksel ölçümüne dayalı değer ortalamaları kontrol grubunda $158,31 \pm 12,33$; susam yağı grubunda $156,27 \pm 20,73$; düşük doz grubunda $174,36 \pm 22,96$ ve yüksek doz grubunda $181,76 \pm 24,37$ olarak saptandı (Grafik 1, Tablo 1).

Kruskal Wallis testine göre gruplar arasında fark istatistiksel olarak anlamsız bulundu ($p < 0,056$).

Çizelge 4.2. Tüm grupların fibrozis yoğunluklarına ait tanımlayıcı değerleri (SD: Standart sapma, IQR: Çeyrekler arası genişlik)

	Ortalama±SD	Medyan (IQR)	Minumum	Maksimum
Kontrol	158,31±12,33	161,71 (21,02)	137,75	172,94
Susam yağı	156,27±20,73	165,99 (38,51)	128,93	182,44
Düşük doz	174,36±22,96	173,21 (32,01)	140,26	214,96
Yüksek doz	181,76±24,37	173,05 (37,70)	155,53	223,68

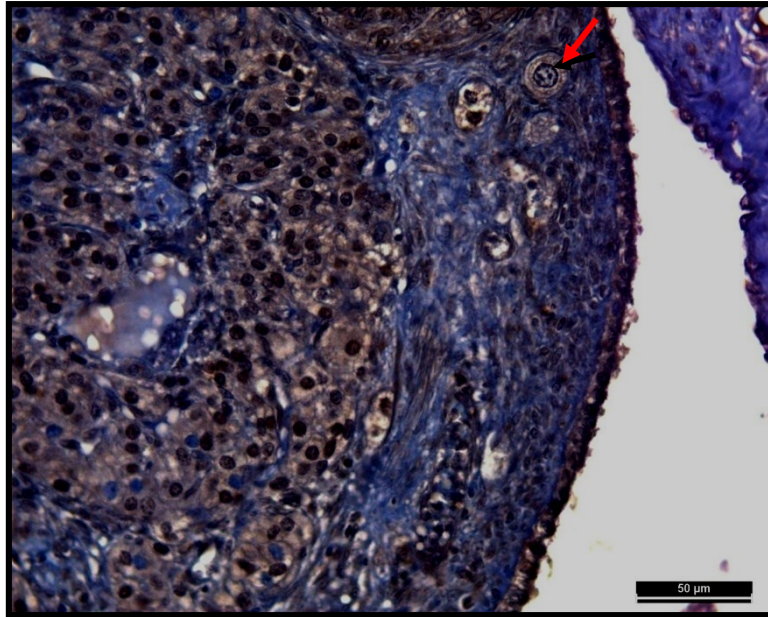


Şekil 4. 6. Tüm gruplara ait mavi piksel sayımına dayalı fibrotik alan değerleri

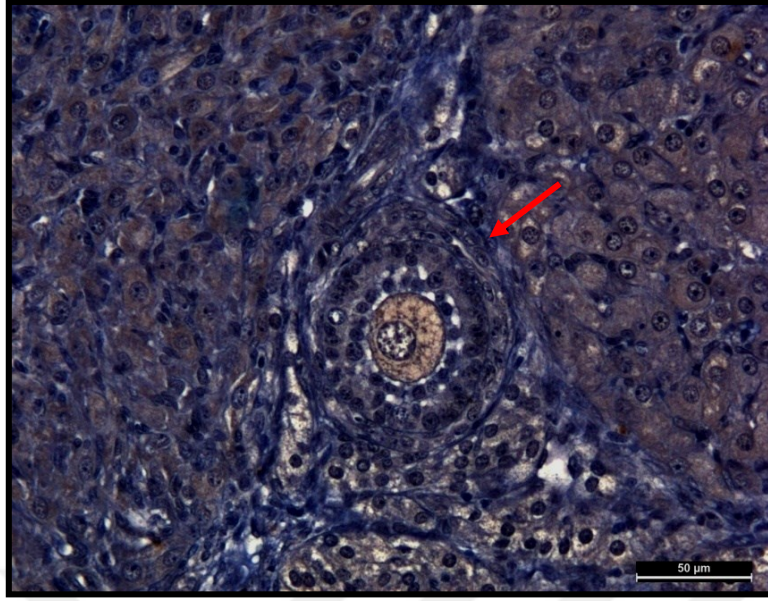
4.4. FOXO3 İmmün İşaretlemesi Bulguları

Kontrol grubundaki ve çözücü (susam yağı) grubundaki FOXO 3 ifadenmesi inaktif primordiyal folliküllerde yer alan oositlerin çoğunda çekirdekte gözlenirken, az sayıdaki primordiyal follikül oositlerinde ve multilaminar primer folliküllerdeki oositlerde kuvvetli sitoplazmik tutulum göstermekteydi (Resim 4.24-4.27). Çekirdeklerinde FOXO3 ifadenmesinin belirlendiği oositlerin inaktif hücreler olduğu ve follikül havuzundaki rezervin korunan hücreleri olduğu şeklinde yorumlandı. Sitoplazmik immüntutulum gösteren az sayıdaki oositlerin ise aktive forma geçen hücreler olarak ovulasyon fazına girmiş oogeneze aşamasında hücreler olduğu düşünüldü.

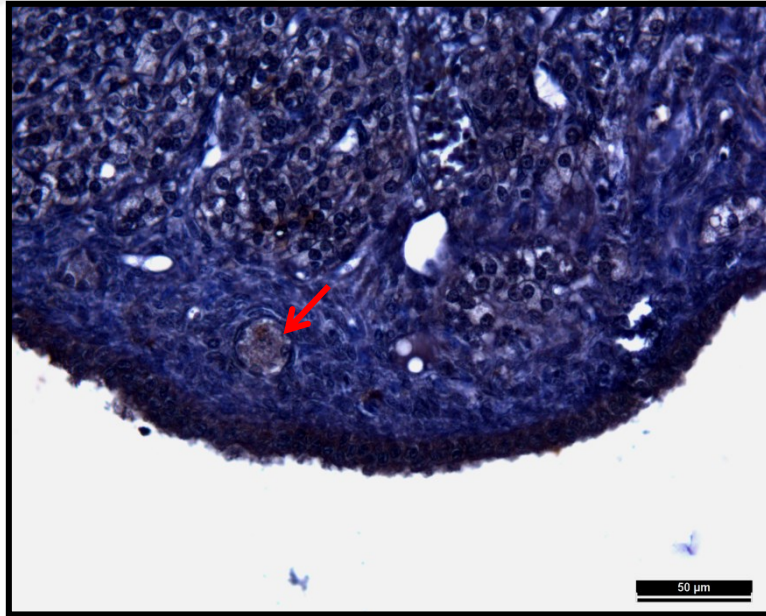
Kontrol grubu ve çözücü grubuna göre düşük doz izotretinoin uygulanan grupta FOXO3 immüntutulmaları zayıf olarak hem primordiyal hem de multilaminar primer folliküllerde yer alan oositlerde çekirdeklerde ve sitoplazmik olarak ifadenmişti. (Resim 4.28. ve 4.29). Yüksek doz izotretinoin grubunda ise hem primordiyal hem de multilaminar primer folliküllerde yer alan oositlerde çekirdek ve sitoplazmik FOXO3 immün tutulumu gözlenmedi. Bu durum follikül aktivasyonunun önemli düzenleyicilerinden olan FOXO3 ün ekspresyonunun bu tip hücrelerde gerçekleşmediği ve bu gibi hücrelerin aktivasyon ve maturasyon sinyallerine yanıt vermede yetersiz kalacağı şeklinde yorumlandı. (Resim 4.30.).



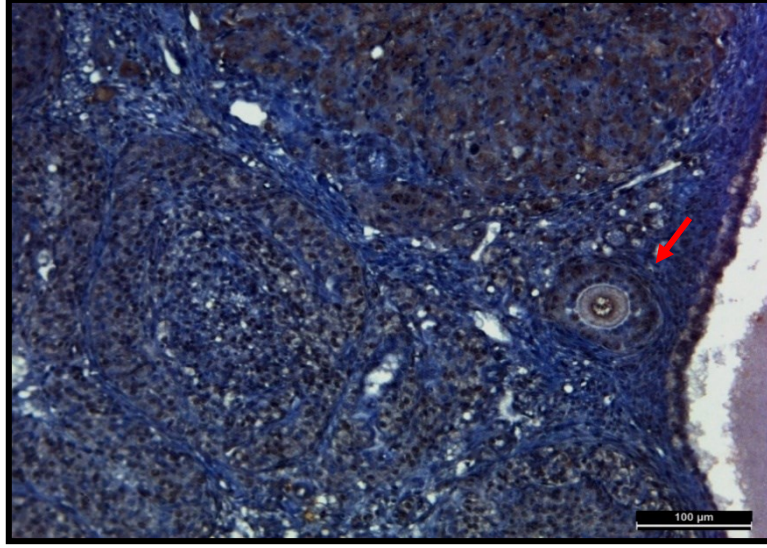
Resim 4.24. Kontrol gurubunda FOXO3 kuvvetli sitoplazmik tutulumu gösteren primordiyal follikülde yer alan aktive oosit (kırmızı ok)



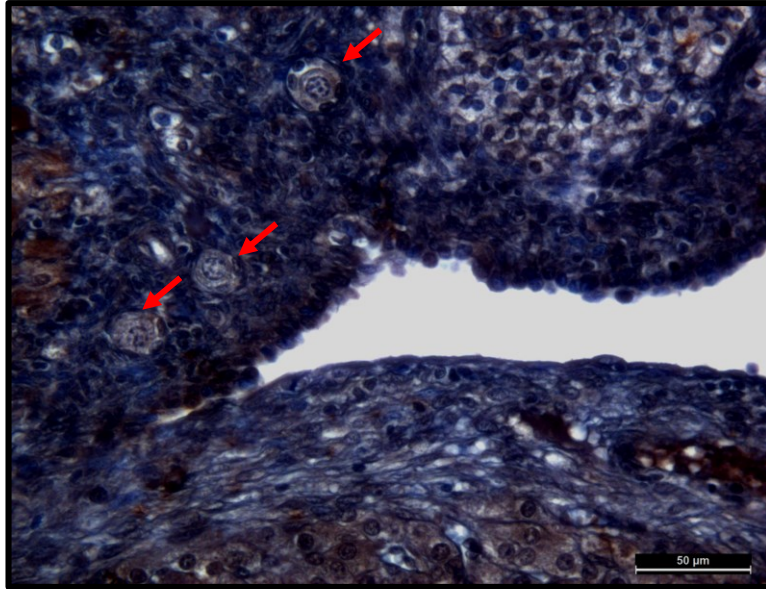
Resim 4.25. Kontrol grubunda FOXO3 kuvvetli sitoplazmik tutulumu gösteren multilaminar primer follükülde yer alan oosit (kırmızı ok)



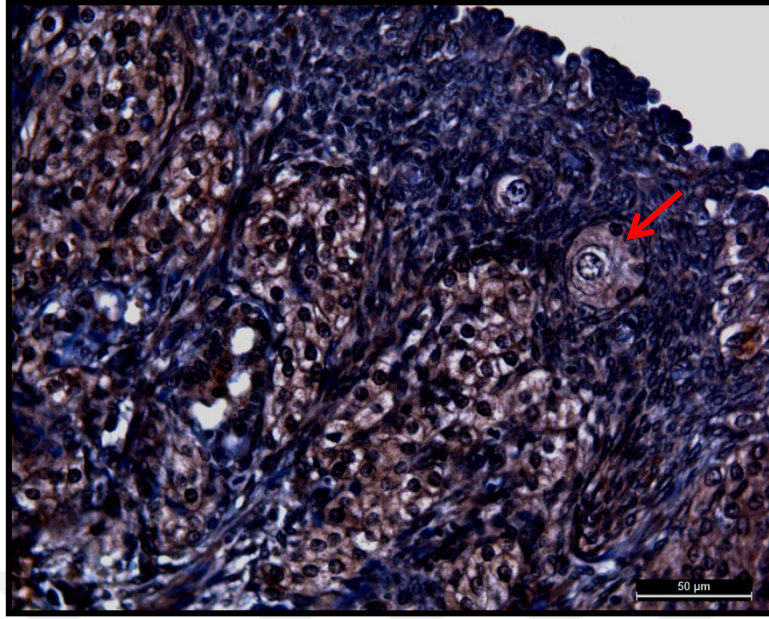
Resim 4.26. Susam yağı (çözücü) gurubunda FOXO3 sitoplazmik tutulumu gösteren primordiyal follükülde yer alan aktive oosit (kırmızı ok)



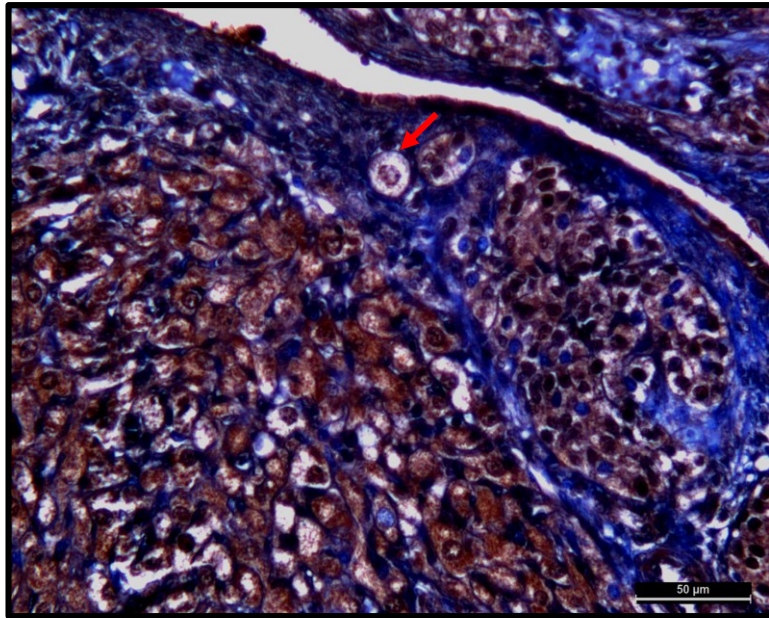
Resim 4.27. Susam yağı (çözücü) grubunda FOXO3 kuvvetli sitoplazmik tutulum gösteren multilaminar primer folliküldeki oosit (kırmızı ok)



Resim 4.28. Düşük doz izotretinoin grubunda zayıf sitoplazmik FOXO3 immüntutulumu gösteren primordiyal folliküllerdeki oositler (kırmızı oklar)



Resim 4.29. Düşük doz izotretinoin grubunda gelişen unilaminar primer follikülün oosit sitoplazmasında zayıf FOXO3 ifadenmesi



Resim 4.30. Yüksek doz izotretinoin grubunda inaktif primordiyal folliküldeki oosit çekirdeğinde FOXO3 ifadenmesi (kırmızı ok)



5. TARTIŞMA

Akne vulgaris genellikle adolesan bireylerde ve genç yetişkinlerde pilosebasöz bezlerin yaygın bir inflamatuvarı şeklinde seyreden papül, püstül, nodül, kist ve yaraları içeren hastalıktır. Akne terimi ilk kez Yunanlı filozof Celsus tarafından 2. Yüzyılda derideki sivilceler ve kabarıklıkları tanımlamak için kullanılmıştır (Al-Hammadi, ve diğerleri, 2016). Kişinin yaşam kalitesini büyük oranda etkilemektedir. Seböz bezlerin aşırı aktivasyonu bu bezlerin kanallarının tıkanmasına ve inflamatuvar tablonun oluşmasına neden olmaktadır (Al-Talib, Al-khateeb, Hameed, & Murugaiah, 2017). Etiyolojisi tam olarak bilinmemekle birlikte aşırı sebum üretimi, deride aşırı keratinizasyon ve *Propionibacterium acnes* türü gram pozitif bakteri ile kıl follikülleri ve pilosebasöz yağ bezlerinin enfeksiyonu gibi nedenlerle oluşmaktadır (Al-Hammadi, ve diğerleri, 2016) Amerika birleşik devletlerinde her yıl %80'inini adolesan bireylerin oluşturduğu 40-50 milyon insan akne nedeniyle dermatoloji kliniğine başvurmaktadır (Bhate & Williams, 2014).

Akne çoklu etkiye sahip bir hastalıktır. Anormal folliküler epitel ve yüzeyde deskumasyon nedeniyle sebasöz folliküllerin tıkanması ve hiperkeratinizasyonu söz konusudur. Campbell ve Strassmann, 11-18 yaş arası adolesan bireyleri içeren 1182 kişilik kohort çalışmasında, gruplardaki akne prevelansının %28 oranında olduğunu ve bu orana dahil olan bireylerin %90'ının hafif ve orta derecede seyirli olduğunu bildirmektedir. Araştırmaya göre toplumun yüksek gelir dağılımına sahip kesiminde daha alt gelir düzeyine sahip kırsal kesimdeki bireylere göre prevelansının daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu durumun modern şehir yaşamın getirdiği sağlıksız beslenme kültürü ve sağlıksız çevre şartlarının nedeniyle oluşabileceğini belirtilmiştir (Campbell & Strassmann, 2016).

Canavan ve ark. kronik inflamatuvar bir hastalık olan aknenin sağaltımında uzun dönem etkili olacak bir yönteminin seçilmesi gerektiğini önermişlerdir. Hastalığın tedavisinde dermatologlar hastaya tetrasiklinler, makrolidler ve sülfanomidler gibi sistemik antibiyotikler ve klindomisin ve eritromisin gibi topikal antibiyotikleri reçete etmektedir. Ancak hastalığa neden olan *Propionibacterium acnes* türü bakterinin antibiyotik dirençliliği geliştirmesi antibiyotik olmayan tedavileri zorunlu kılmıştır. Antibiyotik olmayan tedaviyi sağlayan ve yaygın olarak kullanılan maddeler azelaik asit, retinoid türevleri (en yaygın olarak da izotretinoin)dir. Çalışmada hastalığın yönetiminde antibiyotik olmayan tedavinin antibiyotik tedavisine kıyasla daha etkili olduğu bildirilmiştir (Canavan, Chen, & Elewski, 2016)

İzotretinoin, moleküler ağırlığı 300,442 g/mol, C₂₀H₂₈O₂ molekülüdür (U.S. National Library of Medicine). İzotretinoin retinoik asit türevi olan ve akne üzerinde en etkili tedaviyi sunan ilaçtır. İlk kez 1982 yılında orta ve şiddetli seyreden aknenin tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Alhusayen, ve diğerleri, 2013). İzotretinoin piyasada yaygın adı Accutane®/Roaccutane® olan ilaçtır (Lagan, Dolk, White, Uges, & Sinclair, 2014) İzotretinoin için önerilen kullanım dozunun 0,5-1,0 mg/kg/ gün olarak 6 ay boyunca kullanılması önerilerek dermatologlar tarafından genellikle reçete edildiğini bildirmiştir (Rao, ve diğerleri, 2014).

Melnik yayınladığı derleme çalışmasında, topikal retinoidlerin prototipi olan *All-trans* retinoik asit (ATRA) ilaçlarının komedonları parçalayıcı ve antiinflamatuvar etkiye sahip olduğunu ve p53 geninin upregüle olmasına da neden olduğunu bildirmiştir. p53 geninin retinoik asit aracılığıyla upregülasyonunun akut miyeloblastik lösemi hücreleri, servikal karsinoma hücreleri, glioma hücreleri ve insan embriyo karsinom hücreleri gibi hücrelerde upregülasyona neden olduğunu ve benzer şekilde keratinositlere de etki ederek pro-apoptotik kaspazların ekspresyonunu arttırıp onları apoptoza duyarlı hale getirdiğini bildirmiştir. Bu nedenle izotretinoinin sebum baskılayıcı etki göstererek sebosit apoptozunu sağladığını belirtilmiştir. Ayrıca IGF-1 reseptörü ve androjen reseptörünün ekspresyonunu inhibe eden p53 geni, IGF bağlayıcı protein 3'ün ekspresyonunu başlatır. Bu aktivasyon sebositlerin sitoplazmasındaki Akt geninin downregüle olmasına neden olur. Bu durumda da FoxO3 proteininin fosforile olması engellenir. FoxO3 proteininin fosforile olamaması ve p53 geninin upregüle olması Tümör Nekroz Faktörü ilişkili apoptozu uyaran ligand (TRAIL) gibi apoptozu destekleyen proteinleri aktifleştirerek sebositlerin apoptozunu hızlandırıldığı kaydedilmiştir. (Melnik B. C., 2017).

Bu çalışmada düşük dozda izotretinoin uygulamasının primordiyal ve primer folliküllerde yer alan oositlerde FoxO3 ifadenmesini zayıflattığı ancak özellikle yüksek doz uygulanan grupta FoxO3 genlerinin ekspresyonunun inhibe edildiği düşünülmektedir.

Wang ve ark., retinoidlerin deride bulunan epitel hücrelerinin çeşitli hücre işlemlerle keratinositlere ve sebositlere farklılaşması üzerinde etkili olduğunu, epitel hücrelerinde üretilen CYP26 (retinoik asit 4-hidroksilaz) enziminin retinoik asit türevlerinin katabolizmasını başlatıp etkisini sınırlandıran bir enzim olduğunu bildirmiştir. Retinoik asitlerin hücre yüzeyinde bulunan RARs (retinoik asit reseptörleri) ve RXRs (retinoik asit X

reseptörleri) nin ligandı olduğunu, retinoik asitin bu reseptörlere bağlanarak gen ifadesini düzenlediğini belirtmişlerdir (Wang, ve diğerleri, 2009).

Akne hastasında *P. acnes* bakterisi nedeniyle periferik kan monositlerinden Toll like Receptor-2 (TLR-2) aşırı derecede eksprese edilir. Salınan aşırı TLR-2 immün cevabın olması gerekenden daha fazla bir şiddette gelişmesine neden olmaktadır. Dispenza ve ark. sistemik retinoik asit türevlerinin *P. acnes* bakterisine karşı immün cevabın düzenlenmesini sağlayarak inflamasyonu inhibe ettiğini önermiştir (Dispenza, ve diğerleri, 2012) .

İzotretinoin, akne tedavisinde sebum üretimini baskılayarak aktivite gösteren en etkili ilaçtır. Sebositlerin apoptozu, apoptotik bir protein olan TNF ilişkili apoptotik ligand, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-3 ve nötrofil jelatinaz ilişkili lipocalin proteinlerin izotretinoin ile uyarılması sonucu olur. Aynı apoptoz mekanizmasından akut miyeloblastik lösemi ve nöroblastoma tedavisinde de faydalanılmaktadır. İzotretinoin nöral krest hücrelerinde apoptozu uyarması ile teratojenik etki göstermektedir. Apoptozun hipokampal nöronlarda görülmesi depresif etkiyi, epidermal keratinositlerde ve müköz membranlarda görülmesi müköz membranlarla ilişkili yan etkiyi, saç follikülü hücreleri üzerinde etkili olursa Telogen effluvium, intestinal epitel hücreleri üzerinde etkili olursa inflamatuvar bağırsak hastalığı, kas ve iskelet sistemi hücreleri üzerinde etkili olursa miyalji ve karaciğer hücreleri üzerinde etkili olursa kreatin kinaz salınımı, transaminazların salınımı ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin salınımına neden olmaktadır. RARA polimorfizmi gibi apoptotik sinyalizasyon kaskadının genetik çeşitliliği, izotretinoinin apoptotik etkisinin büyüklüğünün çeşitliliğini açıklar. Aynı zamanda ilaca karşı dirençlilik oluşan ve aşırı duyarlı bireylerin oluşturduğu alt gruplar oluşması durumunu da açıklamaktadır (Melnik B. C., 2017). Nöroblastoma üzerinde antitümorejenik etkiye sahip olduğu ve bu nedenle de tümör gelişimini engellemek amacıyla kullanıldığı bildirilmektedir (Sonawane, ve diğerleri, 2014)

İzotretinoin sinir sistemi, kas ve iskelet sistemi, oküler alan, gastrointestinal sistemi, kan dokusu, kardiyak sistem üzerinde çeşitli yan etkilere sahiptir. Vücutta kelitis (dudakların aşırı kuruluğu nedeniyle inflamasyonu), kserosis (cilt kuruluğu), ocular sicca (konjanktive ve korneanın kronik şekilde kuruması), artralji (eklem ağrısı), miyalji (kas ağrısı) ve hiperlipidemi gibi yan etkilere neden olan ilacın kullanımı süresince bireyin kan değerleri ve klinik çıktılarının doktor tarafından takip edilmesi gerektiği belirtilmiştir (Ornelas, ve diğerleri, 2016) (Alan, Ünal, & Yildirim, 2016).

İlacın yan etkilerinin doza bağımlı olarak ortaya çıktığı belirtilmiştir. Sistemik izotretinoin tedavisinin kardiyak sistem üzerinde yan etkileri taşikardi, sinüs taşikardisi ve konjenital kalp hastalığıdır. Literatürde prematür ventriküler kontraksiyona da neden olduğu bildirilmiştir (Alan, Ünal, & Yildirim, 2016).

Akne tedavisi nedeniyle izotretinoin kullanan 60 hastalık örnekleme alan bir durum kontrol çalışmasında inflamatuvar bağırsak hastalıkları ile isotretinoin arasında ilişki olduğu bildirilmiştir. Çalışma verilerine göre izotretinoinin ülseratif kolit gelişimi ile ilişkili olduğu ve izotretinoin kullanan hastalarda bu riskin artış gösterdiği saptanmıştır (Crockett, Porter, Martin, Sandler, & Kappelman, 2010).

İzotretinoin tedavisinin hastalarda depresyon, duygu durum bozukluğu ve intihara meyillilik gibi psikiyatrik sorunların ortaya çıkmasına neden olabileceği ve ilacın kullanımının durdurulması ile bu sorunların ortadan kaldırılabilirdiği bildirilmiştir (Bremner, Shearer, & McCaffery, 2012).

Hematoksilen-Eozin morfoloji bulguları ile ilgili literatür ve tartışma

Tadini ve ark. tüysüz farelere dorsal alanda, % 0,05 oranında izotretinoin ve tretinoin içeren kremleri 7 gün boyunca topikal olarak uygulamıştır. İşlem sonrasında denekler sakrefiye edilerek sırt kısmındaki derilerden doku örnekleri alınmıştır. Alınan doku örnekleri hematoksilen –eozin boyaması yapılarak kıyaslandığında tedavi almayan kontrol grubunda epidermis bazal tabakası, bazal membran üzerinde rahatça görülebildiği, yüzeysel tabakaların hücrelerindeki çekirdekten daha hafif boyanmış, iyi organize olmuş, sınırlı sitoplazmalı düşük hücrelerden ve oval çekirdekten oluştuğu belirtilmiştir. Tretinoin ile tedavi edilen alanda ise epitel kalınlığı artmış ve bazal tabaka, spinöz ve granüler tabakalardaki hücrelerin kontrol grubuna göre daha hacimli olduğu, dermişin kontrol grubuna benzer bir yapı sergilediği bildirilmiştir. İzotretinoin içeren formülasyonlar ise tam tersine, hem epiderminin hem de derminin kalınlığını arttırmıştır. Sonuç olarak tretinoin içeren kremin topikal olarak uygulandığı grupta yan etkilerin daha az görüldüğü ancak kaba deri kalınlıklarını gidermede izotretinoinin daha etkili olduğu belirtilmiştir (Tadini, Gaspar, & MaiaCampos, 2006).

Bravo ve ark., henüz menepoza girmemiş 45-50 yaş aralığındaki 20 bayan hastada, fotoyaşlanma (Solar elastozis) nedeniyle 12 hafta boyunca haftada 3 kez günlük 20 mg oral izotretinoin uygulamıştır. Klinik değerlendirme ve preaurikuler bölgeden alınan deri biyopsileri morfolojik olarak **Hematoksilen-Eozin-orcein**, Picro-Sirius, Resorcin-Fuchsin boyaması ile değerlendirilmiştir. Araştırmacılar bağ dokusunun kollajen ve elastik liflerinin izotretinoin uygulanan grupta daha iyi korunduğunu bildirmişlerdir (Bravo, ve diğerleri, 2015).

Araştırmacılar yaptıkları bu çalışmada dijital görüntüleri, LC Evolution kamera ve bir Olympus BX51 mikroskop ile iki rastgele kesit noktasından (JPEG formatı, 36 bit renk, 1280 X1024 piksel) elde etmişlerdir. Görüntülerin Image Pro Plus yazılımı, 5.0 versiyonu (Media Cynetics, Silver Spring, ABD) aracılığıyla analiz edildiği ve daha sonra aynı renk ve yoğunluk düzeyini elde etmek için aynı seviyede yarı tonlar kullanılarak bölümlere ayrıldığı bildirilmiştir. Çalışmada izotretinoin uygulamasından önceki ve uygulamadan sonraki kollajen ve elastik liflerin miktarını ölçmek için piksel bazında inceleme gerçekleştirilmiştir. Kollajen liflerine (pikro-sirius kırmızısı ile boyanmış kesitler) ve elastik liflere (hematoksilen-eozin ve orcein ile boyanan kesitlere) karşılık gelen pikseller seçilmiştir. Görüntülerde seçilen piksellerin sonuçları tam görüntü alanının bir yüzdesi olarak gösterilmiştir. Her bir kesitten iki rastgele nokta fotoğraflanmış ve bulunan miktarlardan bir ortalama hesaplanmıştır. Bu elastik veya kollajen lifinin yüzdesi olarak tanımlanmış ve daha sonra, tedaviden sonraki 12 haftada bulunan tedavi sonrası miktarlarla karşılaştırılmıştır. İzotretinoin uygulanan bireylerden alınan biyopsi matreyalinin hem papiller hem de yüksek retiküler dermiste yüksek bir kolajen yoğunluğunu saptamak amacıyla Picrosirius kırmızısı ile boyanan histolojik kesitleri incelendiğinde, tipik olarak epidermiste paralel düzenlenişli olan kollajen liflerindeki yayılmasında azalma ile birlikte yoğunluğun arttığı kaydedilmiştir. Bu lifler, hastaların% 60'ında daha kalın ve eşit olarak dağıldığı bildirilmiştir. Tedaviden on iki hafta sonra tüm hasta dokularının % 83'ünde liflerin yoğunluğunda bir artış göstermeye devam ettiği gösterilmiştir. Spnuç olarak kollajen yoğunluğunun arttığı bildirilmektedir (Bravo, ve diğerleri, 2015).

Elastik liflerin analiz edilmesi amacıyla biyopsi materyallerinden alınan hematoksilen-eozin ve Orcein ile boyanan kesitler incelendiğinde izotretinoin tedavisi uygulanan hastaların % 65'inin tedaviden sonra epidermiste daha uzun, daha ince, eşit olarak dağılmış ve paralel olarak düzenleniş gösteren elastik liflerin morfolojisini açıklamışlardır (Bravo, ve diğerleri, 2015).

Çalışmamızda Crossman's Modification of Mallory's triple stain uygulanan ovaryum seri kesitlerinde kollagen lif içeren fibrotik alan değerlendirilmesi yapılmıştır. Değerlendirme sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Bu bulgu azalan ovaryum rezervine karşın kollagen lif yapısının ve miktarının korunduğu şeklinde yorumlandı.

Folikül sayımı ile ilgili literatür ve tartışma

Aksoy ve arkadaşları akne tedavisi gören ve 6 ay boyunca oral izotretinoin kullanan üreme çağındaki 82 kadınla yaptıkları çalışmada, hormonal parametrelerden Anti-Müllerian Hormon (AMH)'a, **ultrasonografik** olarak ovaryan hacme ve antral follikül sayısına bakmışlardır. Çalışmanın sonucunda tedavi öncesi ve tedavi sonrası AMH, ovaryan hacim ve antral follikül sayısı arasında anlamlı olarak farklılık olduğunu, saptamışlardır. Tedavi öncesi ortalama AMH değeri 2,20 ng/ml iken hastaların %25'inde 1,14 ng/ml, %75'inde 4,07 ng/ml seviyesinde olduğunu, total antral follikül sayısının ortalama 16 iken 12 düzeyine gerilediği ve ovaryum hacminin 23 ml den 15 ml ye gerilediğini belirlemişlerdir (Aksoy, ve diğerleri, 2015).

Yukarıdaki veriler doğrultusunda bu çalışmada da gelişen folliküllerin tüm tiplerinin sayımı yapılmıştır. Ancak düşük doz ve yüksek doz gruplarındaki primordiyal follikül sayıları kontrol grubu ve çözücü gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı azalma göstermiştir. Ayrıca düşük doz ile yüksek doz grupları karşılaştırıldığında da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte yüksek doz grubundaki primordiyal follikül sayısı daha az bulunmuştur. Bu durum istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte az anlamlılık şeklinde yorumlanmıştır. Unilaminar ve multilaminar primer folliküller değerlendirildiğinde ise yüksek doz grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi. Yüksek doz grubunda bu folliküllerin sayılarının azaldığı saptandı. Sekonder folliküllerin ve tersiyer folliküllerin sayısı ise tüm gruplar arasında ve gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiştir.

Amichai ve ark., orta derecede şiddette akne nedeniyle izotretinoinin tedavisi uygulanan 12-20 ve 25-35 yaş arası hastalarda günlük dozu 6 ay boyunca 20 mg / gün (günde yaklaşık 0.3-0.4 mg / kg) olarak uyguladıklarında 12 ile 20 yaş arası hastaların % 94.8'i ve 21-35 yaş arası

hastaların% 92.6'sının tedavi edildiğinin, bu yolla yüksek doz ilaç kullanımının oluşturduğu yan etkilerin hafifletilebileceğini önermişlerdir (Amichai, Shemer, & Grunwald, 2006).

Primordial folliküllerin aktivasyonu, folliküldeki oositin büyümesi ile etrafındaki yassı şekilli pregranülosa hücrelerinin farklılaşması ve proliferasyonu olayları gerçekleşir. Mevcut follikül havuzunda bulunan folliküllerden hangisinin aktive olacağını belirleme mekanizması hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır (Adhikari & Lui, Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles, 2009). Embriyogenezin geç evresinde veya doğumdan önce oluşturulan primordial follikül havuzunun büyüklüğü ve bu havuzda yer alan oositlerin apoptoz oranı dişi memelilerin üreme kapasitesini belirler (Sui, ve diğerleri, 2007). Follikülogenez ve gelişim süresince ovaryum rezervi primordial germ hücreleri ve proliferasyonu sırasında, oositin mayoz I'de duraklama aşamasında (sinasis, rekombinasyon ya da diktiyat aşamasında), oosit kümelerinden primordial follikül şekline geçerken, primordial follikül aktivasyonunda, follikülogenez ve ovülasyon defektlerinden etkilenebileceği ve bunun da mevcut ovaryan rezervin zarar görmesine neden olacağı bildirilmiştir (Johnson, Canning, Kaneko, Pru, & Tilly, 2004).

Folliküler havuzda olması gerekenden fazla miktarda oositin atreziye uğraması prematür ovaryan yetersizlik (Premature Ovarian Failure= POF) tablosunun oluşmasına neden olur. Bu tablo endokrin bozuklukları ve infertiliteyi beraberinde getirmektedir (Ding, Zhang, Mu, Li, & Hao, 2013).

Üçlü Boyama ve Fibrozis ile ilgili literatür ve tartışma

Ovaryan fibrozis, over fibroblastlarının aşırı proliferasyonu ve hücre dışı matriks (ECM) birikimi ile karakterize olan ve ovaryum disfonksiyonuna neden olan bir durumdur. Ovaryan fibrozisi olan hastalar infertiliteye duyarlıdır ve yardımcı üreme tedavisine yanıt verme oranları azalma eğilimi göstermektedir. MMP'ler, TIMP'ler, TGF- β 1, CTGF, PPAR- γ , VEGF ve ET-1 gibi birçok sitokin, ovaryum fibrojeninde rol oynar. Ovaryum fibrojenizi, yumurtalık kisti, PCOS ve prematüre ovaryan yetmezliği gibi çeşitli yumurtalık hastalıkları ile ilişkilidir (Briley, ve diğerleri, 2016).

Bu çalışmada Crossman's Modification of Mallory's triple stain uygulanan ovaryum seri kesitlerinde kollagen lif içeren fibrotik alan değerlendirilmesi yapılmıştır. Değerlendirme sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu bulgu azalan

ovaryum rezervine karşın “ki bu durum prematur ovarian yetmezlikle özdeş bulgular sergilemektedir” kollagen lif yapısının ve miktarının korunduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Zhang ve diğerleri,(2013) dişi ratlarda dehidroepiandrosteron indüksiyonu ile ovaryum hiperfibrozisi seviyesini inceledikleri çalışmada kollajen yoğunluğunu histomorfolojik olarak H&E boyaması ve Sirius Red boyaması ile incelemiştir. Çalışmada hem ovaryum hem de uterus dokularında DHEA maddesine maruziyetin dokulardaki fibrozis oranında artışa neden olduğu bulunmuştur. (Zhang, ve diğerleri, 2013).

Şimşek ve arkadaşları (2015)’de basit ovaryum kesitlerinde etanol ile 5 dakikalık skleroterapi uygulamasının etkisini araştırmışlar ve ratlarda ovaryum dokusu ve ovaryum kistlerini histomorfolojik olarak Masson’s Trichrome Boyaması ile incelemiştir. 200-220 g ağırlıkta ve 12-14 haftalık ratlardan alınan ovaryum örneklerinde gelişen folliküllerin sayımı yapılmış, ovaryan rezerv değerlendirilmiş, korpus luteumda anjiogenez oranı, fibrozis ve germinal epitel dejenerasyonu incelenmiştir. Buna göre çalışmada kontrol grubu grup 1, etanol ile skleroterapi uygulanan grup ise grup2 olarak isimlendirilmiştir. Çalışma verileri kontrol ve deney grupları arasında total follikül sayıları arasında anlamlı bir farklılık gözlemlenmediğini fakat ovaryan kist çapında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemlendiğini bildirmiştir. Yapılan histomorfolojik incelemede skleroterapi uygulanan deney grubunda kontrol grubuna göre kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı derecede germinal epitel dejenerasyonu ve apoptotik hasarı artışı gözlemlendiği bildirilmiştir. (Simşek, ve diğerleri, 2015).

FOXO3 immünohistokimyasal boyama ile ilgili literatür ve tartışma

İzotretinoinin all-trans retinoik aside (ATRA) izomerleştirilmesinden ve retinoik asit reseptörüne (RAR) ATRA bağlanmasından sonra, transkripsiyon faktörü FoxO3a upregüle olmaktadır. Promoter seviyesinde FoxO3a, tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) ve FoxO1 ekspresyonunu indükler. TRAIL kaspaz kaskatını aktive ederek apoptoza neden olur. FoxO1 hücre döngüsü inhibitörleri p21 ve p27'nin upregülasyonu yoluyla hücre döngüsünün bekleme aşamasında tutulmasına aracılık eder (Melnik B. C., 2017).

Follikül gelişimi üzerinde indükleyici ve inhibe edici çeşitli faktörler söz konusudur. Örneğin yapılan in vitro çalışmalar besin sınırlamasının follikül gelişimini inhibe ettiğini göstermektedir (Barilovits, ve diğerleri, 2014). Besin sınırlamasının primordiyal follikül

aktivasyonunu engellediğinin bilinmesine rağmen araştırmalar obezitenin de follikül gelişimi üzerinde olumsuz etkiye sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan bir çalışmada yüksek yağlı diyet (HFD: High Fat Diet) ile beslenen fare modelinde ovaryumda folliküler gelişim incelenmiştir. Western blot ile yapılan çalışmada transkripsiyon faktörü FOXO3 proteininin aktivitesini göstermişlerdir. Araştırmacılar bu transkripsiyon faktörünün fosforilasyonuna neden olduğu için HFD diyetin FOXO3 proteinin downregüle olmasına neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu downregülasyon follikülün inhibisyonuna neden olduğunu vurgulamışlardır. FOXO3a nın upstream düzenleyicisi AKT nin HFD grubunda fosforilasyonunun azaldığı bildirilmiştir. FOXO3 proteini de Akt nin substratı olduğu, optimal folliküler aktivite ve normal ovarian fonksiyon için Akt serin/treonin tirozin kinaz 1 proteininin primordial folikülleri dejenerasyondan koruması ve aktivasyonunu düzenlemesi, granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması açısından önemli olduğu belirtilmiştir. Bu doğrultuda Akt/Foxo3/Smad1/5/8 sinyal yolağının folliküler gelişimde önemli olduğunu bildirmişlerdir (Wu, ve diğeri, 2016).

Memeli ovaryumunda belli sayıda primordial follikülden oluşan sınırlı bir ovaryan rezerv üreme periyodu boyunca korunur. Primordial folliküllerin aktivasyonunda oosit içindeki PI3K/mTor yolağı ana role sahiptir. Yapılan çalışmalar genetiğı değıştirilmiş fare modellerinde primer oositlerin PI3K/mTor sinyal yolağının kronik aktivasyonu tüm primordial folliküllerin aktivasyonuna ve tamamının olması gerekenden erken sürede tükenmesine neden olduğunu göstermiştir. Fakat infertilite tedavisinde PI3K/mTor yolağının akut aktivasyonunun primordial follikülleri aktifleştirmesinin fertilite tedavisinin gerçekleştirilmesine olanak sağladığı belirtilmiştir (Sun, ve diğeri, 2015).

FOX ailesi proteinleri “forkhead box” yada “winged helix” olarak adlandırılan 110 amino asitlik bir DNA bağlayıcı ana yapıya (domaine) sahiptir. Günümüze kadar 100 kadar FOX geni tanımlanmıştır. İnsanda bu genler sekans benzerliklerine göre 19 alt gruba ayrılmıştır (FOXA-FOXS) (Tothova & Gilliland, 2007). Accili ve Arden, Forkhead transkripsiyon faktörlerinin hücrede farklılaşma, metabolizma, proliferasyon ve sağkalım gibi fonksiyonlar için gerekli olduğunu bildirmişlerdir (Accili & Arden, 2004). FOXO transkripsiyon faktörlerinin organizmada tümör gelişiminin baskılanması, enerji metabolizması ve stres dirençliliğı mekanizmaları üzerinde etkili olarak ömür uzunluğunu destekleyici yönde görev yaptıkları, insülin, büyüme faktörleri, besinler ve oksidatif stresin hedefi olan bir gen ailesi olduğu ve hücrede glukoneogenez, nöropeptit salınımı, atrofi, otofaji, apoptoz, hücre

döngüsü duraklaması, stres dirençliliğinde bu transkripsiyon faktörlerinin cevaplar oluşturduğu literatürde belirtilmiştir (Salih & Brunet, 2008).

Araştırmacılar FOXO transkripsiyon faktörlerinin, fosfotidilinositol-3 kinaz (PI3K) ve protein kinaz B (Akt)' nin downstream gen ekspresyonunu sağlamak üzerine insülinin ve büyüme faktörlerinin uyarımıyla PI3K/Akt yolağının aktive olduğunu belirtmişlerdir (Zhang, ve diğerleri, 2002). PI3K/Akt yolağının efektörü olan FOXO alt grubunun üyeleri olan FOXO1, FOXO3, FOXO4 proteininin hematopoietik hücrelerde, yağ doku hücrelerinde, beyin ve kalp hücreleri gibi pek çok dokuda eksprese edildiği ve ekspresyonu oldukça sınırlı olan FoxO6 proteininin embriyonun gelişimi sırasında beyinde eksprese edildiği belirtilmiştir (Tothova & Gilliland, 2007). Memelilerde beyin dokusundaki hücrelerde üretilen FOXO6 transkripsiyon faktörünün hafıza ve sinaptik fonksiyon üzerine etkili olduğu belirtilmiştir (Tarnawa E. , Baker, Aloisio, Carr, & Castrillon, 2013).

Folikülogenez ve follikül gelişimi sırasında oosit bir orkestra şefi, granülosa hücreleri de o orkestranın müzisyenleri gibi davranır. Sadece kendi gelişim sürecini yönetmekle kalmaz, onu çevreleyen hücrelerin akıbetinden sorumludur ve onlarla sürekli iletişim halindedir (van den Hurk & Zhao, 2005). Başarılı bir fertilizasyon, implantasyon ve sağlıklı bir bireyin oluşturulması için canlı ve kaliteli bir oosit ön koşuldur. Sağlıklı bir oositte Foxo3 transkripsiyon faktörünün de sentezinden sorumlu olan Forkhead Box proteini ailesi geni insanda 11. kromozom üzerinde bulunur (VirantKlun, Knez, Tomazevic, & Skutella, 2013). FOXO proteinleri fosforilasyon, asetilasyon ve ubikütinasyon ile işlev kazanmaktadır. Fosforilasyonun FOXO proteinlerini hem aktive ettiği hem de inhibe ettiği, aktifleştirilmiş Akt kinazın FOXO proteinlerinin 3 ayrı korunmuş nokta olan serin ve treonin kalıntısı üzerinden fosforilasyonunu sağlayarak Foxo1, Foxo3 ve Foxo4 ü inhibe ettiği belirtilmiştir. Bu fosforilasyon 14-3-3 şaperon molekülü için bağlanma motifi oluşturarak FOXO proteinlerinin DNA bağlayıcı bölgeleri ile etkileşmesine neden olmaktadır. Bu durum FOXO proteinlerinin hücrede nükleustan sitoplazmaya translokasyonunu başlatmaktadır. AKT, serum glukokortikoid indüklenebilir kinazları (SGK), kazein kinaz 1 (CK1), ikili fosforilasyonla düzenlenen kinaz 1 (DYRK1), I kapa-β kinaz (IKK-β kinaz) gibi diğer kinazlar da özel serin kalıntılılarından FOXO proteinlerini fosforilize eder ve nükleustan sitoplazmaya translokasyonu uyarırken, Jun N Terminal kinaz (JNK) enziminin ve mammalian sterile 20-like kinaz-1 (Mst1)'in stres nedeniyle uyarımı FOXO proteininin fosforilasyonuna neden olarak sitoplazmadan nükleusa taşınımı uyarmaktadır (Tothova & Gilliland, 2007).

FOXO3 Akt1 (fosfo kinaz B) molekülünün terminal hedefidir. Akt1 Foxo3'ü fosforilize eder ve bu durumda FOXO3 nükleustan sitoplazmaya taşınır. Bu da primordiyal follükülü aktive eder. Yapılan çalışmalar FOXO3 transkripsiyon faktörünün primordial follükülün oositin nükleusundaki ekspresyonunun primordial follükülün aktivitesini baskıladığını ve FOXO3 proteininin oositin nükleusundan sitoplazmasına devamlı translokasyonun yaygın follükül aktivasyonunda neden olduğunu göstermektedir (John, Gallardo , Shirley, & Castrillon, 2008).

Granüloza hücrelerinde eksprese olan siklin bağımlı kinaz inhibitörü 1B (Cdkn1B) FOXO3 molekülünü indirekt olarak inhibe eder. Cdkn1B oosite bulunmaz. Lui ve ark., . Cdkn1B proteininin primordial follükül havuzu ve ovaryan rezervi korumak için FOXO3 ile sinerjik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Liu , ve diğerleri, 2007).

PTEN molekülü Akt1'in negatif düzenleyicisidir. Araştırmalar PTEN yokluğunda Akt1 aktivitesine sürekli devam edeceğini ve bunun da kronik olarak FOXO3 fosforilasyonunu arttıracığını göstermiştir (John, Gallardo , Shirley, & Castrillon, 2008) (John, Shirley, Gallardo, & Castrillon, 2007). Bu da primordial follükül aktivasyonunu arttırarak ovar rezervinin daha hızlı tükenmesine neden olur. Over rezervinin hızla tükemesi prematür ovaryan yetersizlik (Premature ovarian Ovarian Failure: POF) tablosunun oluşmasına ve dışide infertiliteye neden olmaktadır (Adhikari, ve diğerleri, 2012). Pten-PI3K-Akt-Foxo3 yolağından sorumlu PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog deleted on kromozom 10, bir upstream negatif düzenleyici) ve FOXO3 (forkheadboxO3, downstream inhibitör etkiye sahip bir transkripsiyon faktörü) genlerinin susturulduğu deneysel çalışmalarda tüm primordial follüküllerin aktifleştigi bildirilmiştir (Castrillon, Miao, Kollipara, Horner , & DePinho, 2003) (Reddy, ve diğerleri, 2008) (Reddy, ve diğerleri, 2009).

Ünlüsoy ve Ertuğrul, follüküler aktivasyonda FIGLA (Factor In the Germline), FOXO3 (forkhead transkripsiyon ailesinin bir üyesi), FOXC1 (forkhead transkripsiyon ailesinin winged-helix yapısında olan bir transkripsiyon faktörü), NOBOX (Newborn Ovary Homeobox), POU5F1 (Octamer-binding transcription factor 4 olarak da bilinen POU domain, class 5, transcription factor 1), gibi transkripsiyon faktörleri görev aldığını bildirmişlerdir (Ünlüsoy & Ertuğrul, 2014).

FOXO3 primordial follükülün aktivasyonun oosite özgü negatif düzenleyicisi olan bir transkripsiyon faktörüdür (Wood & Rajkovic, 2013). FOXO3 knockout farelerin steril

olduğu bildirilmektedir (John, Shirley, Gallardo, & Castrillon, 2007). Yapılan çalışmalarda fare ovariumunda inaktif primordial folliküllerde FoxO3 nükleusta yüksek düzeyde eksprese edildiği ve bu bekleyiş süresince nükleusta konumlanmaya devam ettiği bildirilmektedir. FoxO3 molekülünün fosforile olması ve nükleustan sitoplazmaya konumlanması follikülün aktive olmasına neden olur. Follikül geliştikçe FoxO3 aktivasyonu baskılanmaktadır. Oositte nükleusta FoxO3a'nın gen ifadesinin azaltılması oositin gelişmesinin başlaması için ön koşuldur (Castrillon, Miao, Kollipara, Horner, & DePinho, 2003) (Nteeba, Ross, Perfield, & Keating, 2013) (Uhlenhaut & Treier, 2011) (Liu, ve diğerleri, 2007) (John, Shirley, Gallardo, & Castrillon, 2007) (Wu, ve diğerleri, 2016)

Kontrol grubundaki ve çözücü grubundaki FOXO 3 ifadenmesi primordiyal folliküllerde yer alan oositlerin çoğunda çekirdekte gözlenirken, az sayıdaki primordiyal follikül oositlerinde ve multilaminar primer folliküllerdeki oositlerde kuvvetli sitoplazmik tutulum göstermekteydi. Çekirdeklerinde FOXO3 ifadenmesinin belirlendiği oositlerin inaktif hücreler olduğu ve follikül havuzundaki rezervin korunan hücreleri olduğu şeklinde yorumlandı. Sitoplazmik immüntutulum gösteren az sayıdaki oositlerin ise aktive forma geçen hücreler olarak ovulasyon fazına girmiş oogenez aşamasında hücreler olduğu düşünüldü.

Kontrol grubu ve çözücü grubuna göre düşük doz izotretinoin uygulanan grupta FOXO3 immüntutulmaları zayıf olarak hem primordiyal hem de multilaminar primer folliküllerde yer alan oositlerde çekirdekte ve sitoplazmik olarak ifadenmişti. Yüksek doz izotretinoin grubunda ise hem primordiyal hem de multilaminar primer folliküllerde yer alan oositlerde çekirdek ve sitoplazmik FOXO3 immün tutulumu gözlenmedi. Bu durum follikül aktivasyonunun önemli düzenleyicilerinden olan FOXO3 ün ekspersyonunun bu tip hücrelerde gerçekleşmediği ve bu gibi hücrelerin aktivasyon sinyallerine yanıt vermede yetersiz kalabileceği şeklinde yorumlandı.

Zheng ve ark, (2014) postnatal sıçan ovariumunda primordiyal follikülleri oositin etrafındaki tek katlı yassı epitelin kökenine göre iki sınıfa ayrıldığını, bunlardan ilkinin medulladaki durgun hücrelerden kaynaklanan hücreler olduğunu ve bunların yetişkinlikte aktifleşmek üzere oluşturulan yetişkin primordial hücreleri olduğunu belirtmişlerdir. İkinci tip primordial hücrelerin de yassı epitelinin ise kortikal bölgede yer alan aktif mitotik hücrelerden kaynakladığını bildirmektedirler. Daha kortikal alanda yer alan bu primordial hücrelerin ilk önce aktifleşeceği ve puberte ile ilk yetişkinlikte öncelikle aktifleşecek olan

primordial hücreler olduğunu belirtmektedirler. Ayrıca FoxO transkripsiyon faktörleri ailesinde yer alan FoxL2 proteininin bu pregranüloza hücreleri üzerinde düzenleyici etkiye sahip olduğunu bildirmektedir (Zheng, Zhang, & Liu, 2014).

Wu ve ark., obezite ilişkili diş infertilitesini araştırdıkları çalışmada, yüksek yağlı diyetin dişi obez farelerde, zamana bağlı olarak follikül gelişimini düzenleyen Akt/Foxo3a/Smad1/5/8 sinyalizasyon yolağına etkilerini incelemişlerdir. Obezitenin yolağın çalışmasının olumsuz etkileyerek anormal follikül gelişmesine neden olduğu bildirilmiştir (Wu, ve diğerleri, 2016).

Schneider ve ark.; insülin reseptör substratı 1 (IRS1), fosfoinositid 3-kinaz (Pi3k), protein kinaz B (Akt1), Forkhead Box O3a (FOXO3a) yolaklarının ovarian aktivasyonda, folikül büyümesinde ve yaşlanmasına doğrudan etkili olduğunu bildirerek Irs1, Socs2, Socs3, Akt1, Pi3k, Mtor ve Foxo3a proteinlerinin mRNA'larının düşük ekspresyonunun ve Amh mRNA'sının düşük ekspresyonunun ovaryum aktivitesinin azalmasıyla ilişkili olduğunu kaydetmişlerdir (Schneider, ve diğerleri, 2014).

Ren ve ark., Nobox, Lhx8, Sohlh1, ve Sohlh2 genlerinin susturulduğu farelerde hızlı oosit kaybı ve ovaryyan yetersizlik tablosunun oluştuğunu ve insanlarda da özellikle Nobox ve Sohlh1 genlerinin prematür ovaryan yetersizlik ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar Lhx8 genleri susturulmuş farelerde postnatal follikülogenez yolağını aydınlatmak amacıyla yaptıkları çalışmada, çok sayıda primordiyal follikülün aktive olduğunu, bu durumun dolaylı olarak PI3K-AKT yolağı ile etkileşimi ile gerçekleştiğini ve FOXO3 proteininin nükleositoplazmik translokasyonu ve rps6 genininin aktivasyonu üzerinde de sinerjik etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Ren, ve diğerleri, 2015).

Zhou ve ark. (2012) FOXO1 ve FOXO3 proteinlerinin de dahil olduğu forkhead box O (FOXO) transkripsiyonel protein ailesi üyelerinin otofajinin düzenlenmesinde rol oynadığını bildirmişlerdir. FOXO3'ün transkripsiyona bağlı olarak bir otofajiye neden olduğunu ve FOXO1'in de bu işlem için gerekli olduğunu önermektedirler (Zhou, ve diğerleri, 2012).

Zhang ve Liu, follikül aktivastonu için primordial follikülün oositi ve granüloza hücrelerinin pek çok molekülden etkilenerak aktifleştiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu süreçte en fazla mTor yolağı, Kit ligandı ve PI3K yolağının önemli olduğunu bildirmişlerdir (Zhang & Liu, 2015).

Schneider ve diğeri Irs1, Socs2, Socs3, Akt1, PI3k, mTOR ve FOXO3a mRNA ekspresyonunun azaltılmasının primordial follikül aktivasyonu ve follikül gelişimini olumsuz etkilediğini bildirmişlerdir. Ames dwarf dişi (cüce) farelerle yaptıkları çalışmada FOXO3 gen ekspresyonunun devamlılığının follikül gelişimini inhibe ederek mevcut follikül havuzunun tükenmesini geciktirdiğini belirtmişlerdir (Schneider, ve diğeri, 2014).

Zhang ve ekibi 3 günlük fare yavrularından aldıkları ovaryumdan izole ettikleri primer oositleri iki aşamalı enzim sindirimi yöntemiyle kültüre etmişler ve bu hücrelerden dört deney grubu oluşturmuşlardır. Sohlh2 (Spermatogenesis and Oogenesis Specific Basic Helix-Loop-Helix 2) genini izole ettikleri primer hücre kültüründe, Sohlh2 geninin, c-kit / PI3K / Akt / Foxo3a sinyal yolu üzerinden oosit apoptozunu inhibe edebildiğini, yani embriyonik dönemde varolan follikül havuzunun korunmasında görevli olduğunu bildirmişlerdir (Zhang & Liu, 2015).

FOXO3 proteininin eritropoez süresince düzenleyici bir görev yapan, oksidatif stresi, hücre döngüsünün düzenlenmesi ve nükleusun hücre dışına atılması gibi eritroit maturasyon süreçlerini de düzenlediği bildirilmektedir (Thanuthanakhun, ve diğeri, 2017). FOXO3 transkripsiyon faktörünün kondrositlerde otofajinin düzenlenmesinde görev aldığı ve otofajik mekanizmada düzenleyici etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Shen, Cai, Peng, & Chen, 2015). Otofaji ovaryan primordial follikül rezervinin düzenlenmesinde ve korunmasında da görev alan bir mekanizmadır. Ovaryumda otofaji genlerinin inaktivasyonu sağlanmadığı takdirde primordial folliküllerin otofaji ile dejenerasyonu tablosu olduğu deneysel çalışmalarla bildirilmektedir (Song, ve diğeri, 2015).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kontrol grubu ve susam yağı grubunda tüm follikül tipleri normal histolojik karakterde gözlemlendi. Düşük doz grubunda ise primordiyal folliküller ve unilaminar primer folliküller normal histolojik karakterde gözlenirken bir kısım multilaminar primer folliküllerde zona pellusidanın gelişmediği belirlendi, antral folliküllerin çoğunda az sayıda piknotik çekirdekli follikül hücrelerinin varlığı saptandı.

Yüksek doz grubunda primordiyal folliküller histolojik olarak normal yapıda gözlenmesine rağmen, unilaminar primer folliküllerde follikül hücrelerinin organizasyonunda disintegrasyon, çoğu atreziye gider görünümdeki multilaminar primer folliküllerde teka-follikül hücre katmanları bileşkesinde dejeneratif alanlar gözlemlendi. Ayrıca antral folliküllerin bir grubunda düşük doz grubuna göre daha çok sayıda piknotik çekirdekli follikül hücreleri gözlenirken bu grup folliküllerde teka-follikül bileşkesinde düzensizlikler izlendi. Tersiyer folliküllerin bir grubunda antrumun eritrositlerle dolu olduğu, kümeler halinde piknotik çekirdekli granüloza hücrelerinin varlığı, teka katmanları arasında disintegrasyon olduğu ve teka-follikül hücre katmanları arasında organizasyon bozukluğu dikkati çekti.

Çalışmamızda Crossman's Modification of Mallory's triple stain uygulanan ovaryum seri kesitlerinde kollagen lif içeren fibrotik alan değerlendirilmesi sonucunda gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Kollagen lif kaybının olmadığı yönündeki bu bulgu izotertinoinin kollagen lif yapısını ve miktarını koruduğu şeklinde yorumlandı.

Gelişen folliküllerin tüm tiplerinin sayımının stereolojik yöntemle yapıldığı araştırmamızda düşük doz ve yüksek doz gruplarındaki primordiyal follikül sayıları kontrol grubu ve çözücü gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı azalma gösterdi. Ayrıca düşük doz ile yüksek doz grupları karşılaştırıldığında da aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamakla birlikte yüksek doz grubundaki primordiyal follikül sayısı daha azdı. Unilaminar ve multilaminar primer folliküller değerlendirildiğinde ise yüksek doz grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi. Yüksek doz grubunda bu folliküllerin sayılarının azaldığı saptandı. Sekonder folliküllerin ve tersiyer folliküllerin sayısı ise tüm gruplar arasında ve gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

Oosit aktivasyon faktörlerinden biri olan FOXO 3 ifadenmesi kontrol grubunda ve çözücü grubundaki primordiyal folliküllerde yer alan oositlerin çoğunda çekirdekte gözlenirken, az

sayıdaki primordiyal follikül oositlerinde ve multilaminar primer folliküllerdeki oositlerde kuvvetli sitoplazmik tutulum göstermekteydi. Çekirdeklerinde FOXO3 ifadenmesinin belirlendiği oositlerin inaktif hücreler olduğu ve follikül havuzundaki rezervin korunan hücreleri olduğu şeklinde yorumlandı. Sitoplazmik immütutulum gösteren az sayıdaki oositlerin ise aktive forma geçen hücreler olarak ovulasyon fazına girmiş oogeneze aşamasında hücreler olduğu düşünüldü.

Kontrol grubu ve çözücü grubuna göre düşük doz izotretinoin uygulanan grupta hem primordiyal hem de multilaminar primer folliküllerde yer alan oositlerde FOXO3 immütutulmaları zayıf olarak ifadenmişti. Yüksek doz izotretinoin grubunda ise hem primordiyal hem de multilaminar primer folliküllerde yer alan oositlerde çekirdek ve sitoplazmik FOXO3 immün tutulumu gözlenmedi. Bu durum oosit aktivasyonunun önemli düzenleyicilerinden olan FOXO3 ün ekspresyonunun bu tip hücrelerde gerçekleşmediği ve bu gibi hücrelerin aktivasyon sinyallerine yanıt vermede yetersiz kalabileceği şeklinde yorumlandı.

Bu bulgular ışığında, yüksek doz uygulanan izotretinoinin gelişmekte olan folliküllerde yapısal deformasyonlara neden olduğu over rezervini olumsuz etkilediği, aktivasyon faktörlerinden FOXO3 ekspresyonunun inhibe edildiği belirlenmiştir. Ancak literatürde izotretinoinin ovaryum üzerindeki etkilerinin çoğunlukla hormonal düzeyde incelendiği kısa ve uzun dönem bulgularının yer aldığı çalışmalar ne moleküler bilgi çok içermemektedir. Çalışmamızın literatür havuzuna histomorfolojik, setereolojik ve özellikle moleküler düzeyde katkı sağlayacağına inanmaktayız. Ancak yüksek doz uygulamanın olumsuz etkilerinin 30 günden daha uzun süredeki sonuçlarını görmek, diğer aktivasyon faktörlerinin de moleküler olarak incelenmesi izotretinoinin klinik kullanımında yol gösterici olacaktır kanısındayız.

KAYNAKLAR

- Abali, R., Yüksel, M. A., Aktas, C., Celik, C., Güzel, S., Erfan, G., & Şahin, Ö. (2013). Decreased ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats induced by isotretinoin (retinoic acid) exposure (Dişi Spregue-Dawley ratlarında İzotretinoin (Retinoik Asit) maruziyeti tarafından indüklenen over rezervinde azalışı. *Reproductive BioMedicine*, 184-191.
- Accili, D., & Arden, K. C. (2004). FoxOs at the Crossroads of Cellular Metabolism, Differentiation, and Transformation. *Cell*, 117, 421–426, by Cell Press.
- Adhikari, D., & Lui, K. (2009, August). Molecular Mechanisms Underlying the Activation of Mammalian Primordial Follicles. *Endocrine Reviews*, 30(5), 438–464.
- Adhikari, D., Gorre, N., Risal, S., Zhao, Z., Zhang, H., Shen, Y., & Liu, K. (2012). The Safe Use of a PTEN Inhibitor for the Activation of Dormant Mouse Primordial Follicles and Generation of Fertilizable Eggs. *PLoS ONE*, 6, e39034.
- Aksoy, H., Cinar, L., Acmaz, G., Aksoy, U., Aydın, T., Vurdem, U. E., . . . Kartal, D. (2015). The effect of isotretinoin on ovarian reserve based on hormonal parameters, ovarian volume, and antral follicle count in women with acne. *Gynecology and Obstetric Investigations*, 79(2), 78-82. doi:doi: 10.1159/000371551.
- Alan, S., Ünal, B., & Yildirim, A. (2016). Premature ventricular contractions associated with isotretinoin use. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 91(6), 820–821.
- Al-Hammadi, A., Al-Ismaïly, A., Al-Ali, S., Ramadurai, R., Jain, R., McKinley-Grant, L., & Mughal, T. (2016). Topical, Biological and Clinical Challenges in the Management of Patients with Acne Vulgaris. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 16(2), e152-e160.
- Alhusayen, R., Juurlink, D., Mamdani, M., Morrow, R., Shear, N. H., & Dormuth, C. (2013). Isotretinoin Use and the Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Cohort Study. *The Journal of Investigative Dermatology*, 133(4), 907–91.
- Al-Talib, H., Al-khateeb, A., Hameed, A., & Murugaiah, C. (2017). Efficacy and safety of superficial chemical peeling in treatment of active acne vulgaris. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 92(2), 212–216.
- Altunkaynak, B. Z., Nilgun, A., Yahyazadeh, A., Altunkaynak, M. E., Türkmen, A. P., Akgül, H. M., & Ünal, B. (2016). Effect of mercury vapor inhalation on rat ovary: Stereology and histopathology. *Journal of Obstetric and Gynaecology Research*, 42(4), 410-416. doi:doi:10.1111/jog.12911
- Amichai, B., Shemer, A., & Grunwald, M. H. (2006). Low-dose isotretinoin in the treatment of acne vulgaris. *Journal of American Academy of Dermatology*, 54(4), 644-6.
- Asai, Y., & Wanatabe, S. (2000). Formation and stability of the dispersed particles composed of retinoic acid, sesame oil and phosphatidylcholine. *International Journal of Pharmaceutics*(193), 189-196.

- Ayer, J., & Burrows, N. (2006, August). Acne: more than skin deep. *Postgraduate Medical Journal*, 82(970), 500–506. doi:doi: 10.1136/pgmj.2006.045377
- Barilovits, S. J., Newsom, K. J., Bickford, J. S., Beachy, D. E., RhotonVlasak, A., & Nick, H. S. (2014). Characterization of a mechanism to inhibit ovarian follicle activation. *Fertility and Sterility*, 101(5), 1450-1457.
- Bhate, K., & Williams, H. (2014). What's new in acne? An analysis of systematic reviews published 2011-2012. *Clinical Experiments of Dermatology*(39:), 273–7. doi:doi: 10.1111/ced.12270.
- Bravo, B., Azulay, D., Luiz, R., MandarimDeLacerda, C., Cuzzi, T., & Azulay, M. M. (2015). Oral isotretinoin in photoaging: objective histological evidence of efficacy and durability. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 90(4), 479–486.
- Bremner, J. D., Shearer, K., & McCaffery, P. (2012). Retinoic Acid and Affective Disorders: The Evidence for an Association. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 73(1), 37–50.
- Briley, S. M., Jasti, S., McCracken, J. M., Hornick, J. E., Fegley, B., Pritchard, M. T., & Duncan, F. E. (2016). Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary. *Reproduction (Cambridge, England)*, 152(3), 245–260. doi:http://doi.org/10.1530/REP-16-0129
- Burgering, B. M., & Kops, G. J. (2002). Cell cycle and death control: Long live Forkheads. *Trends Biochem Sci*(27), 352-360.
- Burgering, B., & Kops, G. (2002). Cell cycle and death control Long live Forkheads. *Trends in Biochemical Sciences*(27), 352-360.
- Campbell, C., & Strassmann, B. I. (2016). The blemishes of modern society?: Acne prevalence in the Dogon of Mali. *Evolution, Medicine, and Public Health*, 2016(1), 325–337.
- Canavan, T. N., Chen, E., & Elewski, B. E. (2016). Optimizing Non-Antibiotic Treatments for Patients with Acne: A Review. *Dermatology and Therapy*, 6(4), 555–578.
- Carter, M. E., & Brunet, A. (2007). FOXO Transcription Factors. *Current Biology*, 17(4), R113-R114.
- Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W., & DePinho, R. A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*(301), 215-218.
- Crockett, S. D., Porter, C. Q., Martin, C. F., Sandler, R. S., & Kappelman, M. (2010). Isotretinoin Use and the Risk of Inflammatory Bowel Disease: A Case Control Study. *The American Journal of Gastroenterology*, 105(9), 1986–1993.
- Dawson, A. L., & Dellavalle, R. P. (2013, May 8). Acne vulgaris, , . *British Medical Journal*(346:), f2634. doi:doi: 10.1136/bmj.f2634
- Ding, X. Y., Zhang, X. L., Mu, Y., Li, Y., & Hao, J. (2013). Effects of BMP4/ Smad Signaling Pathway on Mouse Primordial Follicle Growth and Survival via Up-Regulation of Sohlh2 and c-kit. *Molecular Reproduction and Development*, 80, 70–78.

- Dispenza, M., Wolpert, E., Gilliland, K., Dai, P., Cong, Z., Nelson, A., & Thiboutot, D. (2012). Systemic isotretinoin therapy normalizes exaggerated TLR-2-mediated innate immune responses in acne patients. *The Journal of Investigative Dermatology*, 132(9), 2198–2205.
- Dökmeci, İ., & Dökmeci, H. (2005). *Türkçe okunuşlu Yeni Tıp Sözlüğü* (2.Baskı b.). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Dudek, R. W. (2016). *BRS Embriyoloji*, ((6. Baskıdan Çeviri) b.). (P. D. Çeviri Editörleri Prof. Dr. Tülay İrez, Çev.) İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.
- E., P., Omari, S., Michel, M., Ding, J., Amano, T., Forabosco, A., . . . Ottolenghi, C. (2013). Constitutively active in oocytes preserves ovarian reserve in mice. *Nature Communications*(4), 1-14. doi:doi: 10.1038/ncomms2861.
- Erdoğan, D., Hatipoğlu, M. T., Görgün, M., & Ilgaz, C. (2007). *Özel Histoloji* (2. Baskı b.). Ankara: Hatipoğlu Yayınevi.
- Eşrefoğlu, M. (2016). *Özel Histoloji* (2. Baskı b.). İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2007). *Color Textbook of Histology* (3. Edition b.). USA: Elsevier's.
- Gilroy, A. M. (2015). *Anatomi temel ders kitabı*, (1. Baskıdan çeviri, b.). (Ç. E. DENK, Çev.) Ankara: Palme Yayıncılık.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2013). *Tıbbi Fizyoloji* (12. Baskı'dan Çeviri b.). (Ç. E. Yeğen, Çev.) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Gürel G., Şahin S., & Çölgeçen E. (2017). Pityriasis rosea-like eruption induced by isotretinoin, . *Cutaneous and Ocular Toxicology*,(19), 1-3 . doi:doi: 10.1080/15569527.2017.1312430.
- Gürel, G., Şahin, S., & Çölgeçen, E. (2017). Pityriasis rosea-like eruption induced by isotretinoin. *Cutaneous and Ocular Toxicology*(19), 1-3. doi:doi: 10.1080/15569527.
- Haider, A., & Shaw, J. C. (2004.). Treatment of acne vulgaris. *Journal of American Medical Association*, 292,((6)), 726-735. doi:doi:10.1001/jama.292.6.726,
- Hsueh, A. J., Kawamura, K., Cheng, Y., & et al. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*(36), 1–24.
- Huang, P., Zhou, Z., Shi, F., Shao, G., Wang, R., Wang, J., . . . Ding, W. (2016). Effects of the IGF-1/PTEN/Akt/FoxO signaling pathway on male reproduction in rats subjected to water immersion and restraint stress. *Molecular Medicine Reports*, 14, 5116-5124.
- Hutt, K. J., McLaughlin, E. A., & Holland, M. K. (2006). KIT/ KIT Ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: Roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. *Biology of Reproduction*(75), 421-433.
- John, G. B., Gallardo, T. D., Shirley, L. J., & Castrillon, D. H. (2008). Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Developmental Biology*, 321(1), 197–204.

- John, G. B., Shirley, L. J., Gallardo, T. D., & Castrillon, D. H. (2007). Specificity of the requirement for Foxo3 in primordial follicle activation. *Reproduction*(133), 855–863.
- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., & Tilly, J. L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428(6979), 145–150.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2009). *Temel Histoloji-Text&Atlas* (11. Baskıdan Çeviri, b.). (P. D. Çeviri Editörleri Prof. Dr. Seyhun SOLAKOĞLU, Çev.) İstanbul,: Nobel Tıp Kitabevi,.
- Karadag, A. S., Parish, L. C., & Lambert, W. C. (2017, . .). Isotretinoin in retrospect, . *Clinics in Dermatology*,(35), s. 335–339,.
- Kartal, D., Yaşar, M., Kartal, L., Özcan, İ., & Borlu, M. (2017). Effects of isotretinoin on the olfactory function in patients with acne., *Anais Brasileiros de Dermatologia*,, 92(2), 191-5. doi: DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175483>,
- Kaufmann, E., & Knochel, W. (1996). Five years on the wings of fork head. *Mechanisms of Development*(57), 3-20.
- Kierszenbaum, A. L. (2006). *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş* . (Ç. e. Demir, Çev.) Ankara: Palme Yayınları.
- Kraft, J., & Freiman, A. (2011, April 19). Management of acne. *Canadian Medical Association or its licensors-CMAJ*, 183(7), s. 430-435.
- Lagan, B., Dolk, H., White, B., Uges, D., & Sinclair, M. (2014). Assessing the availability of the teratogenic drug isotretinoin outside the pregnancy prevention programme: a survey of e-pharmacies. *Pharmacoepidemiology and Drug Safety*, 23(4), 411–418.
- Leyden, J., Del Rosso, J. Q., & Baum, E. W. (2014). The Use of Isotretinoin in the Treatment of Acne Vulgaris- Clinical Considerations and Future Directions. *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 7(2 Suppl), S3–S21.
- Liu , L., Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Jagarlamudi, K., Shen, Y., . . . Liu, K. (2007). Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte specific expression of Foxo3a. *Development*, 134, 199–209,.
- Makker, A., Goel, M. M., & Mahdi, A. A. (2014). PI3K/PTEN/Akt and TSC/mTOR signaling pathways, ovarian dysfunction, and infertility: an update, Signaling pathways and ovarian dysfunction., <http://jme.endocrinology-journals.org> *Society for Endocrinology* ,, 53(3), R103–R118. doi:DOI:10.1530/JME-14-0220
- Melnik, B. C. (2017). Apoptosis May Explain the Pharmacological Mode of Action and Adverse Effects of Isotretinoin, Including Teratogenicity. *Acta Dermato-Venereologica*(97), 173–181.
- Melnik, B. C. (2017). p53: key conductor of all anti-acne therapies. *Journal of Translational Medicine*, 15(195), 2–12. doi:DOI 10.1186/s12967-017-1297-2
- Moore , K. L., & Persaud, T. V. (2002). *İnsan Embriyolojisi-Klinik Yönleri ile*, (6. Baskıdan Çeviri b.). (P. D. Çeviri Editörleri: Prof. Dr. Mehmet Yıldırım, Çev.) İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.

- Nteeba, J., Ross, J. W., Perfield, J. W., & Keating, A. F. (2013). High fat diet induced obesity alters ovarian phosphatidylinositol 3 kinase signaling gene expression. *Reproductive Toxicology*(42), 68-77.
- Ormerod, A., Thind, C., Rice, S., Reid, I., Williams, J., & McCaffe, P. (2012). Influence of isotretinoin on hippocampal-based learning in human subjects . *Psychopharmacology* , 221((4)), 667–674. doi:doi: 10.1007/s00213-011-2611
- Ornelas, J., Rosamilia, L., Larsen, L., Foolad, N., Wang, Q., Li, C.-S., & Sivamani, R. (2016). Objective Assessment of Isotretinoin-Associated Cheilitis: Isotretinoin Cheilitis Grading Scale. *The Journal of Dermatological Treatment*, 27(2), 153–155.
- Ozban, N., & Ozmutlu, Ö. (1994). *Mikropreparasyon yöntemleri* (Cilt Sayı:3803,). İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul: İstanbul Üniversitesi Yayınları Fen Fakültesi,.
- Pelosi , E., Omari , S., Michel , M., Ding , J., Amano, T., Forabosco , A., . . . Ottolenghi , C. (2013). Constitutively active in oocytes preserves ovarian reserve in mice. *NATURE COMMUNICATIONS*, 4(1843). doi:DOI:10.1038/ncomms2861
- Picton, H. M. (2001). Activation Of Follicle Development: The Primordial Follicle, . *Theriogenology* (55), 1193-1210.
- Rao, P., Bhat, R., Nandakishore, B., Dandakeri, S., Martis, J., & Kamath, G. (2014). Safety and efficacy of low-dose isotretinoin in the treatment of moderate to severe acne vulgaris. *Indian Journal of Dermatology*, 59, 316.
- Reddy, P., Adhikari, D., Zheng, W., Liang, S., Hamalainen, T., Tohonen, V., . . . Huhtaniemi, I. (2009). PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*(18), 2813-24.
- Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., . . . Peng, S. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. . *Science*(319), 611-3.
- Reddy, P., Shena, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., . . . Liua, K. (2005). Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology*(281), 160 – 170.
- Ren, Y., Suzuki, H., Jagarlamudi, K., Golnoski, K., McGuire, M., Lopes, R., . . . Rajkovic, A. (2015). Lhx8 regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis. *BMC Biology*, 13(39), 1-12. doi:DOI 10.1186/s12915-015-0151-3.
- Richards, J. S., Sharma, S. C., Falender, A. E., & Lo, Y. H. (2002). Expression of FKHR, FKHL1, and AFX Genes in the Rodent Ovary: Evidence for Regulation by IGF-I, Estrogen, and the Gonadotropins. *Molecular Endocrinology*, 16(3), 580–599.
- Richards, J., Sharma, S., Falender, A., & Lo, Y. (2002). Expression of FKHR, FKHL1, and AFX Genes in the Rodent Ovary: Evidence for Regulation by IGF-I, Estrogen, and the Gonadotropins,. *Molecular Endocrinology*, 16(3), 580–599.
- Rosenfeld, G. C., & Loose, D. S. (2017). *BRS Farmakoloji* (6. Baskıdan Çeviri b.). (Ç. E. Barışkane, Çev.) İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi.

- Ross , M. H., & Pawlina , W. (2014). *Histoloji Konu anlatımı ve Atlas*, (6. Baskıdan Çeviri b.). (Ç. E. Baykal, Çev.) Ankara : Palme Yayıncılık .
- Sacchi, S., Marinaro, F., Xella, S., Marsella, T., Tagliasacchi, D., & La Marca, A. (2017). The anti-Müllerian hormone (AMH) induces forkhead box L2 (FOXL2) expression in primary culture of human granulosa cells in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics-Reproductive Physiology and Disease*, . doi:DOI 10.1007/s10815-017-0980-9
- Sadler , T. W. (2011). *Langman's Medikal Embriyoloji*, (11. Baskıdan çeviri b.). (Çeviri Editörü: Prof. Dr. A. Can BAŞAKLAR, Çev.) Ankara: Palme Yayıncılık.
- Sadler, T. W. (2011). *Langman's Medikal Embriyoloji* (11. Baskıdan çeviri b.). (Ç. E. BAŞAKLAR, Çev.) Ankara: Palme Yayıncılık.
- Salih, D., & Brunet, A. (2008). FoxO transcription factors in the maintenance of cellular homeostasis during aging. *Current Opinion in Cell Biology*(20), 126–136.
- Schneider, A., Zhi, X., Moreira, F., Lucia, T., Mondadori, R. G., & Masternak, M. M. (2014). Primordial follicle activation in the ovary of Ames dwarf mice. *Journal of Ovarian Research*, 7(120). doi:DOI 10.1186/s13048-014-0120-4
- Schnorr , T. M., Grajewski , B. A., Hornung , R. W., Thun , M. J., Egeland , G. M., Murray , W. E., . . . Halperin , W. E. (1991). Video display terminals and the risk of spontaneous abortion. *The New England Journal of Medicine*, 324, 727.
- Shen, C., Cai, G.-Q., Peng, J.-P., & Chen, X.-D. (2015). Autophagy protects chondrocytes from glucocorticoids-induced apoptosis via ROS/Akt/FOXO3 signaling, . *Osteoarthritis and Cartilage*(23), 2279-2287.
- Silbernagl, S., & Lang, F. (2011). *Renkli Fizyopatoloji Atlası*, (2. Baskı b.). (D. D. Çevirenler: Prof. Dr. Tuncay Özgünen, Çev.) Adana: Nobel Kitabevi.
- Simşek, M., Kuloğlu, T., Pala, Ş., Boztosun, A., Can, B., & Atılğan, R. (2015). The effect of ethanol sclerotherapy of 5 minutes duration on cyst diameter and rat ovarian tissue in simple ovarian cysts. *Drug Design, Development and Therapy*(9), 1341–1347.
- Sonawane, P., Cho, H. E., Tagde, A., Verlekar, D., Yu, A. L., Reynolds, C. P., & Kang, M. H. (2014). Metabolic characteristics of 13-cis-retinoic acid (isotretinoin) and anti-tumour activity of the 13-cis-retinoic acid metabolite 4-oxo-13-cis-retinoic acid in neuroblastoma. *British Journal of Pharmacology*, 171 (23), 5330–5344.
- Song, Z. H., Yu, H. Y., Wang, P., Mao, G. K., Liu, W. X., Li, M. N., . . . Li, W. (2015). Germ cell-specific Atg7 knockout results in primary ovarian insufficiency in female mice. *Cell Death and Disease*, 6.
- Standring , S. (2008). *Gray's Anatomy-The anatomical basis of clinical practice*, (4th Edition, b.). (E. i. Standring., Çev.) .: Churchill Livingstone Elsevier Company, .
- Sui, X. X., Fu, Y. C., Lu, L. L., Guo, X. G., Qian, Y. S., & Xu, J. J. (2007). Forkhead box transcription factor Foxo3a involves in oocyte apoptosis in neonatal rat. *China Journal of Modern Medicine*(1), 1438–1441.

- Sun, X., Su, Y., He, Y., Zhang, J., Liu, W., Zhang, H., . . . Li, J. (2015, March 1.). New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. *Cell Cycle*, *14*(5), 721-731.
- Suvarna, S. K., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2013). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (7th edition b.). United Kingdom: Churchill Livingstone Elsevier .
- Tadini, K. A., Gaspar, L. R., & MaiaCampos, P. (2006). Epidermal effects of tretinoin and isotretinoin: influence of isomerism. *Pharmazie*(61), 453–456.
- Tan, G., Pan, S., & Li, J. e. (2011). Hydrogen Sulfide Attenuates Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity, Liver Cirrhosis and Portal Hypertension in Rats. *Bertoletti A, ed. PLoS ONE.*, *6*(10), e25943. doi: doi:10.1371/journal.pone.0025943.
- Tarnawa , E. D., Baker , M. D., Aloisio , G. M., Carr , B. R., & Castrillon, D. H. (2013). Gonadal Expression of Foxo1, but Not , Is Conserved in Diverse Mammalian Species,. *Biology Of Reproduction*, *88*(4):(103), 1–11.
- Tarnawa, E., Baker, M., Aloisio, G., Carr, B., & Castrillon, D. (2013). Gonadal Expression of Foxo1, but Not Foxo3, Is Conserved in Diverse Mammalian Species. *Biology Of Reproduction*, *88*(4):103, 1–11. doi:DOI 10.1095/biolreprod.112.105791
- Thanuthanakhun, N., Nuntakarn, L., Sampattavanich, S., Anurathapan, U., Phuphanitcharoenkun, S., & Pornpaiboonstid, S. (2017). Investigation of FoxO3 dynamics during erythroblast development in β -thalassemia major. *PLoS ONE*, *12*(11).
- Tothova, Z., & Gilliland, G. (2007). FoxO Transcription Factors and Stem Cell Homeostasis: Insights from the Hematopoietic System. *Cell Stem Cell*, Elsevier, *1*, 140-152.
- Tsai, P. J., Huang, C. T., Lee, C. C., Li, C. L., Huang, Y. B., Tsai, Y. H., & Wu, P. C. (2013). Isotretinoin Oil-Based Capsule Formulation Optimization. *Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal* , Article ID 856967,(2013), 6 pages.
- U.S. National Library of Medicine. (tarih yok). *U.S. National Library of Medicine*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isotretinoin#section=Top> (U.S. National Library of Medicine).
- Uhlenhaut, N. H., & Treier, M. (2011). Forkhead transcription factors in ovarian function. *Reproduction*(142), 489-495.
- Ünlüsoy, İ., & Ertuğrul, O. (2014). Foliküler aktivasyonu etkileyen transkripsiyon faktörleri. *Lalahan Hayvan Araştırmaları Enstitüsü Dergisi*, *54*(1), 28-32.
- Vallerand, I. A., Lewinson, R. T., Farris, M. S., Sibley, C. D., Ramien, M. L., Bulloch, A. G., & Patten, S. B. (2017). Efficacy and Adverse Events of Oral Isotretinoin for Acne: A systematic Review (Systematic Review). *British Journal of Dermatology*, doi:10.1111/bjd.15668.
- van den Hurk, R., & Zhao, J. (2005). Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* (63), 1717–175.

- VirantKlun, I., Knez, K., Tomazevic, T., & Skutella, T. (2013). Gene Expression Profiling of Human Oocytes Developed and Matured In Vivo or In Vitro-Review Article,. *Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International, Volume 20, 20*. doi:Article ID 879489,
- Wang, F., Kwak, H., Elbuluk, N., Kaczmarek, A., Hamilton, T., Voorhees, J., & ... Kang, S. (2009). Retinoic Acid 4-Hydroxylase Inducibility and Clinical Response to Isotretinoin in Acne Patients. *Journal of the American Academy of Dermatology, 61*(2), 252–258.
- Williams, H. C., Dellavalle, R. P., & Garner , S. (2012). Akne vulgaris, . *Lancet, 379*(9813), 361-372.
- Wood, M. A., & Rajkovic, A. (2013). Genomic Markers of Ovarian Reserve,. *Seminars in Reproductive Medicine, 31* (6), 399–415.
- Wu, Y., Zhang, Z., Liao, X., Lingbin, Q., Yiping, L., & Zhengchao, W. (2016). Effect Of High-Fat Diet-Induced Obesity On The Akt/Foxo/Smad Signaling Pathway And The Follicular Development Of The Mouse Ovary. *Molecular Medicine Reports*(14), 3894-3900.
- Zhang, H., & Liu, K. (2015). Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Human Reproduction Update, 21*(6), 779–786.
- Zhang, X., Gan, L., Pan, H., Guo, S., He, X., Olson, S. T., . . . Unterman, T. G. (2002). Phosphorylation of Serine 256 Suppresses Transactivation by FKHR (FOXO1) by Multiple Mechanisms-Dİrect And Indirect Effects On Nuclear/Cytoplasmic Shuttling And DNA Binding. *The Journal Of Biological Chemistry , 277*(47), 45276–45284.
- Zhang, X., Zhang, C., Shen, S., Xia , Y., Yi, L., Gao, Q., & Wang, Y. (2013). Dehydroepiandrosterone induces ovarian and uterine hyperfibrosis in female rats. *Human Reproduction, 28*(11), 3074-85. doi:doi: 10.1093/humrep/det341.
- Zheng, W., Zhang, H., & Liu, K. (2014). The two classes of primordial follicles in the mouse ovary: their development, physiological functions and implications for future research. *Molecular Human Reproduction, 20*(4), 286–292.
- Zhou, J. J., Liao, W., Yang, J., Ma, K., Li, X., Wang, Y., . . . Zhu, W. (2012). FOXO3 induces FOXO1-dependent autophagy by activating the AKT1 signaling pathway. *Autophagy , 8* (12), 1712–1723.



EKLER

EK-1. Etik Kurul Onay Yazısı.

Evrak Tarih ve Sayısı: 10/07/2017-E.99079



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Candan ÖZOĞUL, Aslı EMNİYET, Gülistan Sanem SARIBAŞ, Saadet Özen AKARCA DİZAKAR, Pınar KAÇAMAK'tan oluşan, G.Ü.ET-17.049 kod numaralı ve "Adolesan Dişi Ratlarda İzotretinoinin Follikül Aktivasyonundaki Etkilerinin İncelenmesi" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-17.049 and entitled "*Investigation of the Effects of Isotretinoin In Follicular Activation In Adolescent Female Rats*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü: Rat Wistar Albino (Dişi)
Hayvan Sayısı: 32

Ek:1 Liste

Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Esengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2. Deneysel Hayvanlar Uygulama ve Etik Kursu Sertifikası



10-20 Aralık 2012

XII. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU

KATILIM SERTİFİKASI

Sayın, Asrîye Aslı EMNİYET

Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi
Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve
Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından,
10-20 Aralık 2012 tarihleri arasında düzenlenen
"Deneysel Hayvanlar Uygulama ve Etik Kursu XII"ye katılarak,
Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve
bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.



Prof. Dr. Süleyman BÜYÜKBERBER
Rektör



Prof. Dr. Nurten TÜRKÖZKAN
Merkez Müdürü



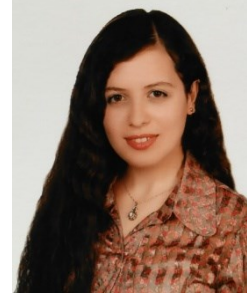
Prof. Dr. Leyla AÇIK
Etik Kurul Başkanı

Sertifika No. 2012/12 - 103

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : EMNİYET SERT, Asiye Aslı
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 1990-Çorum
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0312 202 6918
 e-mail : asiyeasliemniyet@hitit.edu.tr



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı	devam ediyor
Lisans	Hitit Üniversitesi, Biyoloji Bölümü	2012
Lise	Çorum Eti Lisesi (Yabancı Dil Ağırlıklı)	2008

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015-devam ediyor	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim dalı	ÖYP Araştırma Görevlisi
2009-2015	Hitit Üniversitesi Biyoloji / Moleküler Biyoloji ve Genetik bölümü	Yardımcı Araştırmacı

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

A. Uluslararası hakemli dergilerde yayınlanan makaleler:

A.1. Gulcin Alp Avcı, Emre Avcı, **Asiye Ash Emniyet**, Burcin Ozcelik. Determination of fundamental probiotic properties of Lactobacillus strains isolated from Turkish local yogurt. Hittite J Sci Eng Vol 2, No 2 (2015)

A.2. Kazım Köse, Kadir Erol, **Asiye Ash Emniyet**, Dursun Ali Köse, Gülçin Alp Avcı, Lokman Uzun. Fe(II)-Co(II) Double Salt Incorporated Magnetic Hydrophobic Microparticles for Invertase Adsorption. Appl Biochem Biotechnol DOI 10.1007/s12010-015-1794-9 (2015)

A.3. Avcı E., Alp Avcı G., Kose DA., **Emniyet AA.**, SuicmezM. In vitro Antimicrobial and Antioxidant Activities and GC/MS analysis of the Essential Oils of Rumex crispus and Rumex cristatus. Hacettepe J. Biol. & Chem., 2014, 42(1), 197-203.

A.4. **Emniyet AA**, Avcı E, Ozcelik B, Alp Avcı G, Kose DA. "Antioxidant and antimicrobial activities with GC/MS Analysis of the Morus alba L. Leaves" Hittite journal of science and engineering, 2014,37-41

B. Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler:

B.1. **Emniyet A. A.**, Özoğul C., Sarıbaş G. S., Akarca Dizakar S. Ö. , Kaçamak P., Adolesan Dişi Ratlarda İzotretinoinin Follikül Aktivasyonundaki Etkilerinin İncelenmesi, 1st International Health Science And Life Congress (IHSLC-2018) 02-05 May 2018.

B.2. Kaçamak P., Özoğul C., Sarıbaş G. S., Akarca Dizakar S. Ö. , **Emniyet A. A.**, Adolesan Dişi Sıçanlarda İzotretinoinin Oosit Maturasyonu Üzerine Etkisi, 1st International Health Science And Life Congress (IHSLC-2018) 02-05 May 2018.

B.3. Özoğul C., Başer Demircan İ., Barun S., Kavutçu M., İlhan M., Akyol SN., Hirfanoğlu İM., Bilge M., Sarıbaş GS., Kaçamak P., **Emniyet AA.**, Immunohistochemical study of Osteopontin and Bcl-2 gene expression in kidney

tissue in histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution prepared with N-acetyl-L-carnitine, 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC 2017), Antalya, Turkey, 18-21 May, 2017.

B.4.G. Alp Avcı, **A. A. Emniyet**, B. Ozcelik, E. Avcı. Determination of exopolysaccharide production in lactic acid bacteria isolated from Turkish local yogurt. FEBS Journal 282 (Suppl. 1) (2015) 279 [PDF]

B.5. Alp Avcı G., Ozcelik B., **Emniyet A. A.**, Avcı E., Suicmez M. Determination of human rotavirus genotypes among children under 5 years of age. 25th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2015). 25 - 28 April 2015 / Denmark, Copenhagen

B.6.A.A. Emniyet, E. Avcı, G. Alp Avcı, D.A. Köse. Antioxidant And Antimicrobial Activities With Gc/Ms Analysis Of The Morus Alba L. Leaves. Clin Chem Lab Med 2014; 52, Special Suppl, pp S1 – S1760,(IFCC 2014 CONGRESS) 2014.

B.7.EMNİYET AA, AVCI E, ALP AVCI G. “Antioxidant And Antimicrobial Activity Of Herbal Extract From Harnal (Peganum harmala L.)” International conference on biochemistry and molecular biology(ICBMB 2014), Vienna,2014.

C. Yazılan ulusal ve uluslararası kitaplar veya kitaplarda bölümler:

D. Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler:

E. Ulusal bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler:

E.1. Özoğul C., Başer Demircan İ., Barun S., Kavutçu M., İlhan M., Akyol SN., Hirfanoğlu İM., Bilge M., Sarıbaş GS., Kaçamak P., **Emniyet AA.**, Immunohistochemical study of Osteopontin and Bcl-2 gene expression in kidney tissue in histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution prepared with N-acetyl-L-carnitine, 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC 2017), Antalya, Turkey, 18-21 May, 2017.

E.2. Avcı E, **Emniyet AA**, Avcı G, Suiçmez M., Determination of DNA Damage Marker (8-OHdG) in Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD).

Türkiye Moleküler Biyoloji Derneği III. Uluslararası Kongresi, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, 10-12 Eylül 2014. P77 [PDF]

E.3.Emniyet A., Avcı E., Alp Avcı G. “Antioxidant And Antimicrobial Activity Of Leaf Extract From Quince (*Cydonia vulgaris* Pers.)” Turkish Journal Of Biochemistry, 38, 2013

E.4. Avcı E., Alp G., **Emniyet AA.**, “*Rumex crispus* ve *Rumex cristatus* Türlerinin Antimikrobiyal ve Antioksidan Aktiviteleri” Turkish Journal of Biochemistry, 36, 2011

E.5.Emniyet A.A., Özlük A., The Variation of the neurosecretory materials in the corpus allatum of *Pimpla truonelle* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae) During Oocyte Maturation, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, 21-25 Haziran 2010

F. Diğer Yayınlar

F.1.Emniyet A.A., Ceviz (*Juglans regia* L.) Bitkisinin Yapraklarının Antioksidan ve Antimikrobiyal Özelliklerinin belirlenmesi, 18. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 4-9 Temmuz 2011, (Marmara Üniversitesi – İstanbul)

F.2.Emniyet A.A., Prebiyotikler ve Probiyotikler, (Sözlü Bildiri), 17. Ulusal Biyoloji Öğrenci Kongresi, 14-17 Temmuz 2010 (Gazi Üniversitesi- Ankara)



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..



Central Bank of India

