



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

OVER FOLLİKÜLER ATREZİDE FSH UYGULAMASININ
GRANÜLOZA HÜCRELERİ MİTOKONDRİONLARI ÜZERİNDEN
ETKİSİNİN İNCELENMESİ

MELTEM ÜÇÖZ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

PROF.DR. M. KEMAL ÖZBİLGİN

MANİSA 2021

TEZ ONAYI

Meltem ÜÇÖZ tarafından hazırlanan " Over folliküler atrezide FSH uygulamasının granüloza hücreleri mitokondrionları üzerinden etkisinin incelenmesi "adlı tez çalışması 15/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri önünde Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman

Prof. Dr. M.Kemal ÖZBİLGİN

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Jüri Üyesi

Prof. Dr. Şakir Necat YILMAZ

Mersin Üniversitesi

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından, veri toplanması ve yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, butezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Meltem ÜÇÖZ

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezimi destekleyen Manisa Celal Bayar Üniversitesi Rektörlüğü'ne, Tıp Fakültesi Dekanlığı'na, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'na,

Tez konumun belirlenmesi, gerçekleştirilmesi ve yazımında bana deneyimleri ve bilgi birikimleri ile destek olan, her durumda beni sabırla karşılayıp yol gösteren değerli hocam Sayın Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca mesleki tecrübeleri ile eğitimime önemli katkısı olan, bilgi ve birikimlerini en verimli şekilde aktaran, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. H. Seda VATANSEVER olmak üzere değerli hocalarım Sayın Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER'e, Sayın Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU'ya ve Sayın Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a,

Lisansüstü eğitim hayatımda tanıdığım, yüksek lisans eğitimim ve tezimde gerek bilgi birikimi gerekse dostluğu ile yanımda olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı asistan arkadaşlarıma, tez deneylerimin gerçekleştirilmesinde bana destek olan Pınar KILIÇASLAN SÖNMEZ'e, Mustafa ÖZTATLICI'ya, Damla AKOĞULLARI'na, Yusuf PEKMEZCİ'ye,

Hayatımın her anında yanımda olan, maddi ve manevi her türlü desteklerini benden esirgemeyen ve her zaman yanımda olan sevgili annem Fadime Ana ÜÇÖZ'e, babam Tuncay ÜÇÖZ'e ve kardeşim Sahure ÜÇÖZ DURAN'a çok teşekkür ederim.

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2020-006 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Meltem ÜÇÖZ

Manisa, 2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEŞEKKÜR.....	i
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
RESİM DİZİNİ	vii
TABLO DİZİNİ	ix
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	3
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. OVARYUM	7
2.1.1 Overin Genel Yapısı	7
2.2. Over Histolojisi	9
2.3. Ovaryumun Gelişimi ve Embriyolojisi	10
2.3.1 Farklılaşmamış Gonadlar	11
2.4. OVARYAN SİKLUS	13
2.4.1. Folikül Gelişimi	14
2.4.2.Ovulasyon	22
2.5. FOLİKÜLER ATREZİ.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	27
3.1. DENEY ve MODELİN OLUŞTURULMASI	27
3.2. DENEYİN SONLANDIRILMASI İLE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI	28
3.3. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	29
3.3.1. Dokuların Takibi, Parafin Gömme ve Kesit Alma	29
3.3.2. Hematoksilen ve Eozin Boyaması	30
3.3.3. İndirekt İmmunohistokimya Protokolü.....	31
3.4. PCR ANALİZİ	34
3.4.1. Ovaryumlardan RNA İzolasyonu	34
3.4.2. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA)'nın Sentezi	35
3.4.3. qRT-PCR Analizi.....	36
4. BULGULAR	38

4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR.....	38
4.1.1.Hematoksilen Eozin Bulguları.....	38
4.1.2. Folikül Sayısı Bulguları	45
4.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULARI.....	48
4.2.1. LC3B İmmünoreaktivitesi	48
4.2.2. VDAC2 İmmünoreaktivitesi.....	56
4.2.3. SIRT6 İmmünoreaktivitesi	64
4.3. qRT - PCR BULGULARI.....	72
4.3.1. LC3B Bulguları	73
4.3.2. VDAC2 Bulguları	73
4.3.3. SIRT6 Bulguları.....	74
5. TARTIŞMA	76
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	87
6. KAYNAKLAR	89
8. EKLER.....	97
9. ÖZGEÇMİŞ	100

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

aER	Granülsüz Endoplazmik Retikulum
BMP-4	Kemik morfogenetik protein-4
Dd-FSH	Düşük Doz FSH
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
FH	Folikül Hücreleri
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GH	Granüloza Hücreleri
HCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
IGF-I	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
LC3B	Luteinizan Hormon
OMI	Oosit Maturasyon İnhibitörü
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
p-mTOR	Phospho-Rapamisin protein kompleksinin memeli
hedefi	
SIRT6	Sirtuin-6
TA	Tunika albuginea
TBF	Testis Belirleyici Faktör
Tİ	Teka interna
VDAC2	Voltaja-bağımlı anyon seçici kanal proteini 2
Yd- FSH	Yüksek Doz FSH
ZP	Zona Pellusida
ZP-1	Zona Pellusida Proteini 1
ZP-2	Zona Pellusida Proteini 2
ZP-3	Zona Pellusida Proteini 3

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 1. Overlerin genel görünümü.....	8
Şekil 2. Overin şematik görüntüsü.....	8
Şekil 3. Ovaryum histolojik kesitinin hematoxilen eozin boyaması.....	9
Şekil 4. Ovaryumun embriyonik gelişimi.....	10
Şekil 5. Primordiyal germ hücrelerinin göçü ile ovaryum gelişim süreci.....	11
Şekil 6. Beş haftalık bir embriyoda farklılaşmamış gonadların ovaryum veya testise farklılaşması.....	12
Şekil 7. Ovaryan siklus.....	13
Şekil 8. Folikülogenez ile primordiyal folikülün matürasyonu.....	14
Şekil 9. Primordiyal folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi.....	15
Şekil 10. Unilaminar primer folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi.....	15
Şekil 11. Multilaminar primer folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi.....	16
Şekil 12. Teka hücrelerinin Graaf folikülündeki şematik gösterimi.....	17
Şekil 13. İnsan Korpus Luteum histolojik kesiti. (a) Granüloza ve teka hücrelerini içeren kollabe olmuş folikül duvarı.....	18
Şekil 14. Sekonder folikül histolojik ve şematik gösterimi.....	19
Şekil 15. Graaf (Preovulatuvar) Folikülün histolojik ve şematik gösterimi.....	20
Şekil 16. Matür graaf folikülün histolojik (a) ve şematik (b) gösterimi.....	21
Şekil 17. Endokrin hormonların kontrolünde süren ovaryan siklus ve ovulasyon aşamasının gösterimi.....	22
Şekil 18. Oosit maturasyonunda mayoz bölünmeler sonucunda birinci ve ikinci polar cisim oluşumu.....	24
Şekil 19. Atrezik foliküllerin histolojik görünümü.....	25
Şekil 20. Foliküler atrezi sürecinde endokrin sistem ve ovaryumlar arasındaki ilişki.....	26
Şekil 21. Ovaryumlardaki toplam folikül sayısı grafiği.....	45
Şekil 22. Ovaryumlardaki primordiyal folikül sayısının grafiği.....	46
Şekil 23. Ovaryumlardaki primer folikül sayısı grafiği.....	46
Şekil 24. Ovaryumlardaki sekonder folikül sayısı grafiği.....	47
Şekil 25. Ovaryumlardaki Graaf folikül sayısı grafiği.....	47
Şekil 26. Ovaryumlardaki atretik folikül sayısı grafiği.....	48
Şekil 27. LC3B immunoreaktivitesi sekonder folikül analiz grafiği.....	53
Şekil 28. LC3B immunoreaktivitesi graaf folikül analiz grafiği.....	53
Şekil 29. LC3B immunoreaktivitesi sekonder atretik folikül analiz grafiği.....	56
Şekil 30. LC3B immunoreaktivitesi Graaf atretik folikül analiz grafiği.....	56
Şekil 31. Sekonder folikülde VDAC2 immunoreaktivesi analiz sonuçları.....	61
Şekil 32. Graaf folikülde VDAC2 immunoreaktivesi analiz sonuçları.....	61
Şekil 33. VDAC2 immunoreaktivitesi sekonder atretik folikül analiz grafiği.....	64
Şekil 34. VDAC2 immunoreaktivitesi Graaf atretik folikül analiz grafiği.....	64

Şekil 35. SIRT6 immunoreaktivitesi sekonder atretik folikül analiz grafiği.	69
Şekil 36. SIRT6 immunoreaktivitesi Graaf atretik folikül analiz grafiği.	69
Şekil 37. SIRT6 immunoreaktivitesi sekonder atretik folikül analiz grafiği.	72
Şekil 38. SIRT6 immunoreaktivitesi Graaf atretik folikül analiz grafiği.	72
Şekil 39. Ovaryum dokularının yapılan uygulamalar sonucunda LC3B gen ifadeleri.	73
Şekil 40. Ovaryum dokularının yapılan uygulamalar sonucu VDAC2 gen ifadeleri.	74
Şekil 41. Ovaryum dokularının yapılan uygulamalar sonucunda SIRT6 gen ifadeleri.	75



RESİM DİZİNİ

Sayfa No

Resim 1. İntraperitoneal enjeksiyon	28
Resim 2. Ovaryumların cerrahi olarak çıkarılması	29
Resim 3. Trizol ve Faz Oluşumu	34
Resim 4. RNA içeren saydam faz + EtOH	35
Resim 5. Kontrol grubu foliküllerin hematoksilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü.....	39
Resim 6. Sham grubu foliküllerin hematoksilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü.....	40
Resim 7. Düşük doz FSH+HCG grubu foliküllerin hematoksilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü.....	41
Resim 8. Yüksek doz FSH+HCG grubu foliküllerin hematoksilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü.....	42
Resim 9. Kontrol grubundaki sekonder folikül ve Graaf foliküllerdeki atretik foliküllerin hematoksilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü.....	43
Resim 10. Sham grubundaki sekonder folikül ve Graaf foliküllerdeki atretik foliküllerin hematoksilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü.....	43
Resim 11. Düşük doz FSH+HCG grubundaki sekonder folikül ve Graaf foliküllerdeki atretik foliküllerin hematoksilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü.....	44
Resim 12. Yüksek doz FSH+HCG grubundaki sekonder folikül ve Graaf foliküllerdeki atretik foliküllerin hematoksilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü.....	44
Resim 13. Kontrol grubu LC3B immünohistokimyasal boyaması.....	49
Resim 14. Sham grubu LC3B immünohistokimyasal boyaması.....	50
Resim 15. Düşük doz FSH+HCG grubu LC3B immünohistokimyasal boyaması.....	51
Resim 16. Yüksek doz FSH+HCG grubu LC3B immünohistokimyasal boyaması.....	52
Resim 17. Kontrol grubu atretik foliküllerin LC3B immünohistokimyasal boyaması.....	54
Resim 18. Sham grubu atretik foliküllerin LC3B immünohistokimyasal boyaması.....	54
Resim 19. Düşük doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin LC3B immünohistokimyasal boyaması.....	55
Resim 20. Yüksek doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin LC3B immünohistokimyasal boyaması.....	55
Resim 21. Kontrol grubu VDAC2 immünohistokimyasal boyaması.....	57
Resim 22. Sham grubu VDAC2 immünohistokimyasal boyaması.....	58
Resim 23. Düşük doz FSH+HCG grubu VDAC2 immünohistokimyasal boyaması.....	59

Resim 24. Yüksek doz FSH+HCG grubu VDAC2 immünohistokimyasal boyaması.	60
Resim 25. Kontrol grubu atretik foliküllerin VDAC2 immünohistokimyasal boyaması.	62
Resim 26. Sham grubu atretik foliküllerin VDAC2 immünohistokimyasal boyaması.	62
Resim 27. Düşük doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin VDAC2 immünohistokimyasal boyaması.	63
Resim 28. Yüksek doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin VDAC2 immünohistokimyasal boyaması.	63
Resim 29. Kontrol grubu SIRT6 immünohistokimyasal boyaması.	65
Resim 30. Sham grubu SIRT6 immünohistokimyasal boyaması.	66
Resim 31. Düşük doz FSH+HCG grubu SIRT6 immünohistokimyasal boyaması.	67
Resim 32. Yüksek doz FSH+HCG grubu SIRT6 immünohistokimyasal boyaması.	68
Resim 33. Kontrol grubu atretik foliküllerin SIRT6 immünohistokimyasal boyaması.	70
Resim 34. Sham grubu atretik foliküllerin SIRT6 immünohistokimyasal boyaması.	70
Resim 35. Düşük doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin SIRT6 immünohistokimyasal boyaması.	71
Resim 36. Yüksek doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin SIRT6 immünohistokimyasal boyaması.	71

TABLO DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Deney gruplarına verilen çözeltilerin miktarı	28
Tablo 2. Parafin takip prosedürü.	30
Tablo 3. Hematoksilen – eozin boyama protokolü.....	31
Tablo 4. İndirekt İmmunohistokimya Protokolü	33
Tablo 5. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.	36
Tablo 6. cDNA sentez basamakları.	36
Tablo 7. qRT-PCR için kullanılan primerler.	36
Tablo 8. qPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı.....	36
Tablo 9. qPCR amplifikasyon basamakları	37
Tablo 10. Kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarındaki folikül sayılarının H-skor değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.	45
Tablo 11. LC3B immunoreaktivitesinin kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarındaki sekonder, graaf ve atretik foliküllerin H-skor değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.	56
Tablo 12. VDAC2 immunoreaktivitesinin kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarındaki sekonder, graaf ve atretik foliküllerin H-skor değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.	64
Tablo 13. SIRT6 immunoreaktivitesinin kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarındaki sekonder, graaf ve atretik foliküllerin H-skor değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.	72
Tablo 14. Ovaryum dokusunun LC3B gen ifadeleri ve istatistiksel analizleri.....	73
Tablo 15. Ovaryum dokusunun VDAC2 gen ifadeleri ve istatistiksel analizleri.....	74
Tablo 16. Ovaryum dokusunun SIRT6 gen ifadeleri ve istatistiksel analizleri.....	75

ÖZET

Over Foliküler Atrezide FSH Uygulamasının Granüloza Hücreleri Mitokondrionları Üzerinden Etkisinin İncelenmesi

Meltem ÜÇÖZ

Manisa Celal Bayar Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

Özet: Folikülogenez, primordial germ hücrelerinde başlar ve matür folikül gelişimine kadar devam eder. Sonucunda olgun oosit ortaya çıkmaktadır. Primordial folikül sayısı, erken embriyonik dönemde fazladır fakat puberteye kadar azalır ve her siklusta yaklaşık 1000 folikül kaybı menopozla birlikte sona ermektedir.

Overdeki foliküllerin %99'unun atreziye uğradığı ve granüloza hücrelerinin foliküler atrezide rol oynadığı bilinmektedir. Granüloza hücrelerinde oluşan oksidatif stresin atreziyi başlatıcı etkisi olduğu ileri sürülmektedir.

Folikül gelişimi, hormonal ve çevresel uyarıların kontrolü altında gerçekleşmektedir. Aşırı Folikül Uyarıcı Hormon (FSH) kullanımının foliküler gelişimi bozduğu ileri sürülmektedir. FSH'nin, phospho-mTOR (p-mTOR) yolağı ekspresyonunu aktive ettiği, uygulamadan 1,5 saat sonra mikrotübülle ilişkili protein 1A/1B hafif zincir 3 (LC3-I) akümülyasyonunu ve 3 saat sonra p-mTOR yolağını inhibe ederek otofajiyi arttırdığı da bilinmektedir.

Voltaaj bağımlı anyon seçici kanal proteini 2 (VDAC2); apoptoz ile ilişkilidir. VDAC2'nin dominant folliküllerde varlığı gösterilmiş, folikülleri apoptozdan koruyarak folikülün devamlılığını sağlamaktadır.

Sirtuin-6 (SIRT6); preantal folikül gelişiminin inhibe edilmesi, foliküllerin gelişimini uzattığı ve ovaryan yaşlanmayı azalttığı bilinmektedir.

Gereç ve Yöntem: Fareler rastgele her grupta 6 fare olacak şekilde 4 gruba ayrıldı. Farelerin ötenazileri yapıldıktan sonra overleri toplandı. Ovaryumlar immunohistokimyasal ve qPCR ile incelemek için kullanıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Hematoksilen eozin boyama sonucu ovarum dokusu ve foliküller saptandı. Folikül sayımı ile doz artışına bağlı sağlıklı ve atretik folikül sayısı tespit edildi. Otofajik ve mitokondral ilişkili markerlar ile atretik foliküller PCR ile desteklenerek tespit edildi.

Sonuç: Çalışmada In Vitro Fertilizasyon (IVF) tedavilerinde yaygın olarak yüksek dozda kullanılan gonadotropinlerin over atreziye neden olup olmadığı; otofajik markerlar olan LC3B ve SIRT6, mitokondrial ilişkisi ise VDAC2 ile immunohistokimyasal ve moleküler olarak incelendi.

Anahtar Kelimeler: Folikülogenez, Atrezi , FSH, HCG, Granüloza hücreleri, Mitokondrion, LC3, SIRT6, VDAC

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

Investigation of the Effect of FSH Application on Granulosa Cells Mitochondria in Ovarian Follicular Atresia

Meltem ÜÇÖZ

Manisa Celal Bayar University

Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Histology and Embryology.

Supervisor: Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN

Abstract: Folliculogenesis begins in primordial germ cells and continues until mature follicle development. The result is a mature oocyte. The number of primordial follicles is high in the early embryonic period, but decreases until puberty, and the loss of approximately 1000 follicles per cycle ends with menopause.

It is known that 99% of the follicles in the ovary undergo atresia and granulosa cells play a role in follicular atresia. It has been suggested that oxidative stress in granulosa cells has an initiating effect on atresia.

Follicle development takes place under the control of hormonal and environmental stimuli. It is suggested that excessive use of Follicle Stimulating Hormone (FSH) impairs follicular development. FSH activates the expression of the phospho-mTOR (p-mTOR) pathway, inhibits the accumulation of microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3 (LC3-I) 1.5 hours after administration and increases autophagy by inhibiting the p-mTOR pathway 3 hours later. is also known.

voltage dependent anion selective channel protein 2 (VDAC2); associated with apoptosis. The presence of VDAC2 in dominant follicles has been shown, and it ensures the continuity of the follicle by protecting the follicles from apoptosis.

Sirtuin-6 (SIRT6); It is known that inhibiting preant follicle development prolongs the development of follicles and reduces ovarian aging.

Materials and Methods: Mice were randomly divided into 4 groups with 6 mice in each group. After the mice were euthanized, their ovaries were collected. The ovaries were used to examine by immunohistochemistry and qPCR and were evaluated statistically.

Results: Ovarian tissue and follicles were detected as a result of hematoxylin-eosin staining. With the follicle count, the number of healthy and atretic follicles was determined due to dose increase. Autophagic and mitochondrial related markers and atretic follicles were detected by PCR support.

Conclusion: In the study, whether high-dose gonadotropins commonly used in In Vitro Fertilization (IVF) treatments cause ovarian atresia; autophagic markers LC3B and SIRT6 and their mitochondrial relationship with VDAC2 were examined immunohistochemically and molecularly.

Keywords: Folliculogenesis, Ovarian follicular atresia, FSH, HCG, Granulosa cells, Mitochondrion, LC3, SIRT6, VDAC2



1. GİRİŞ

Kadınlarda üreme yeteneğini, overlerdeki primordial foliküllerin sayısı belirlemektedir. Primordial foliküller, primer foliküllere dönüşerek büyümeye başlar ve sırasıyla preantral ve antral foliküllere kadar devam etmektedir. Primordial foliküllerin büyümeye başlamasını neyin tetiklediği yıllarca bilinmezliğini korurken son yıllardaki veriler bir hormon veya sinyal yolağından ziyade gonadotropinlerden bağımsız bir şekilde overlerde lokal olarak üretilen büyüme faktörlerinin etkisi ile otokrin ve parakrin etkileşimler sonucu zamanla gerçekleştiğini göstermektedir.

Başlangıçta sayıları yüz kadar olan germ hücreleri mid-gestasyonda sayısını milyonlara ulaştırdıktan sonra atreziye bağlı olarak menopozda rezerv tükeninceye kadar harcanıp kaybolmaktadır. Üreme tıbbında en bilinmeyen sorunlardan biri de sadece 300-400 tanesinin ovulasyon aşamasına kadar gelebilen bu hücrelerin milyonlarcasının üretilmiş olmasıdır.

FSH ve LH glikoprotein yapıda hormonlardır. FSH ve LH overde folikül büyümesi, ovulasyon ve korpus luteum oluşumunu sağlarken aynı zamanda foliküllerden östradiol, progesteron ve inhibin gibi hormonların salınımından da sorumludurlar. Primordial foliküllerin aktivasyonu için FSH'a gerek yoktur ki primordial foliküller FSH reseptörü barındırmazlar. Endokrin düzeyde FSH hormonu overde büyümekte olan foliküllerin granüloza hücrelerinden salınan aktivin, inhibin ve follistatin denilen hormonlar tarafından hipofiz düzeyde gonadotropinleri etkilemektedir.

Granüloza hücrelerinde direk kan akımı yoktur. Bazal lamina kan-folikül bariyeri gibi fonksiyon gösterirken granüloza hücrelerini vaskülerize teka hücrelerinden ayırmaktadır. Granüloza hücreleri kendi aralarında ve oosit ile sıkı bir ilişki içerisindedirler.

Ovaryumda granüloza hücrelerinde görülen foliküler atrezi, birçok hücre ölüm mekanizmasının olduğu bir süreçtir. İlk olarak apoptoz ve otofajinin bu süreçte rol oynadığı bilinmektedir fakat son zamanlarda morfolojik ve biyokimyasal olarak farklılık göstermekte ve bir hücre ölüm çeşidi olan paraptozun da rol aldığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda öncelikle FSH uygulaması ile foliküler atrezi fare modeli oluşturulduktan sonra biyokimyasal olarak kandaki FSH hormon seviyeleri ile histopatolojik olarak overlerin değerlendirilmesi, sonrasında foliküler atrezi sürecinde görülen mekanizmalar için LC3B, VDAC2 ve SIRT6 primer antikorları kullanılarak immünohistokimyasal olarak kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG grupların karşılaştırılmalarının yapılması amaçlanmaktadır.

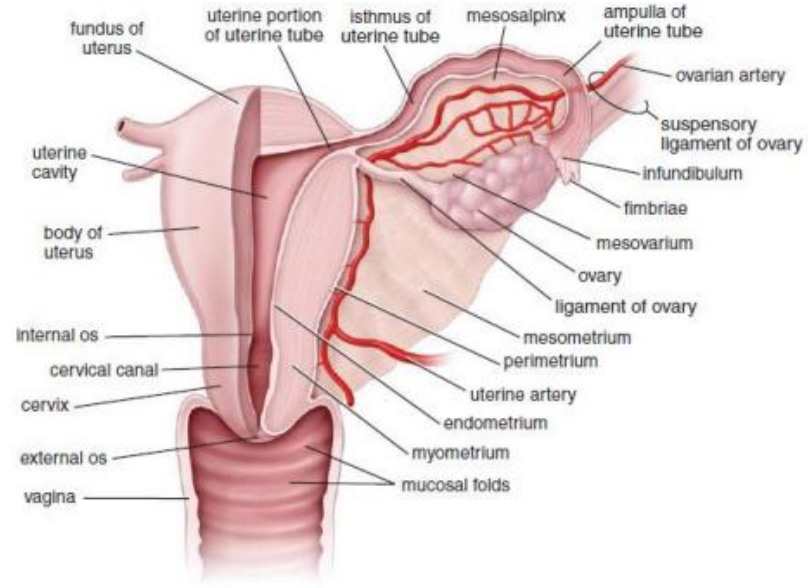


2. GENEL BİLGİLER

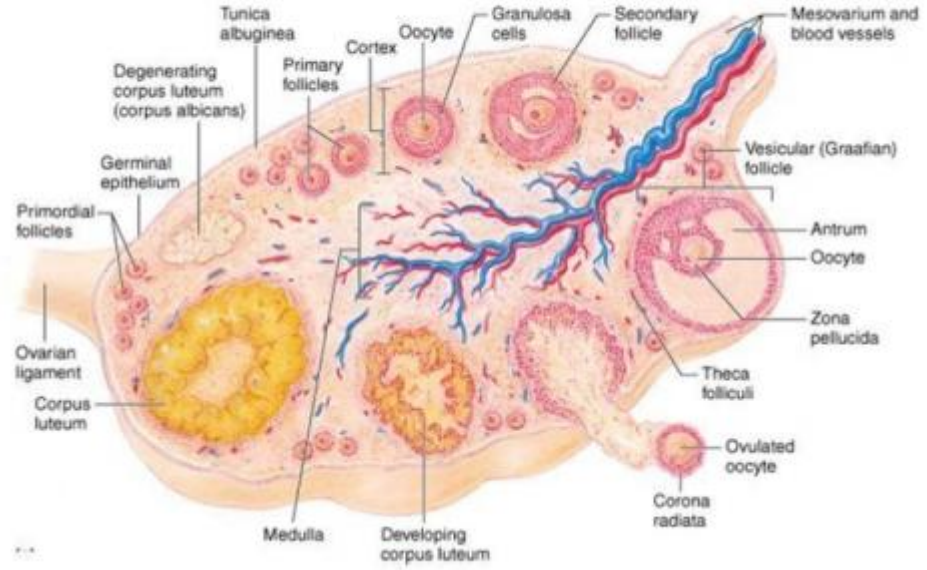
2.1. OVARYUM

2.1.1 Overin Genel Yapısı

Nullipar (hiç doğum yapmamış) kadınlarda overler badem şeklinde olup, sağ ve sol lateral pelvik duvarlara yakın yerleşimli pembe beyaz yapılar olarak gözlenen, uzunluğu 3 cm, kalınlığı 1 cm ve genişliği 1.5 cm olan bir çift dişi üreme sistemi organıdır (Ross ve Pawlina 2016; Moore ve ark. 2016). Yaklaşık 5 gram ağırlığındadır (Çelik 2011). Pelvisin yan duvarlarında fossa ovarica adı verilen çukurluklarda overler yer alır. Overlerin ön kısımlarında, kan damarlarının ve sinirlerin girdiği hilus denilen bölge bulunur. Mezovaryum (posterior), overlere kan damarlarını ileten bir periton kıvrımı olup, overi uterusun yan kenarlarından uzanan broad ligamentine bağlar. Overin süperiyor kutbu suspansör ligament ile pelvik duvara tutunur (**Şekil 1**). (Ross ve Pawlina 2016). Aorta abdominalisten çıkan arteria ovarica'lar overin kanlanmasını sağlar. Bu arter, suspensör ligament içerisinde seyreder. Venleri ve arterleri takip ederek hilum ovarii'den çıkar. İlk olarak plexus pampiniformis adı verilen bir venöz ağı, ardından da vena ovarica'yı oluşturur. Vena ovarica, sol tarafta vena renalis'e sağ tarafta ise doğrudan vena cava inferiora dökülür. Lenf damarları ise nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralis'e açılır ve ligamenti ile uterusu bağlanır. Bu ligament, embriyonik fibröz kord pelvisin tabanına gelişen gonadlara tutunan gubernakulumun bir kalıntısıdır. Puberte öncesi, overin yüzeyi düzdür fakat üreme dönemi boyunca tekrarlayan ovulasyonlardan dolayı devamlı olarak skar gelişir ve irregülerdir. Postmenopozal kadınlardaki overler üreme döneminde gözlenen boyutlarının dörtte biri kadardır (Ross ve Pawlina 2016 ; 3. Çelik 2011) (**Şekil 2**).



Şekil 1. Overlerin genel görünümü (Moore ve ark. 2016)

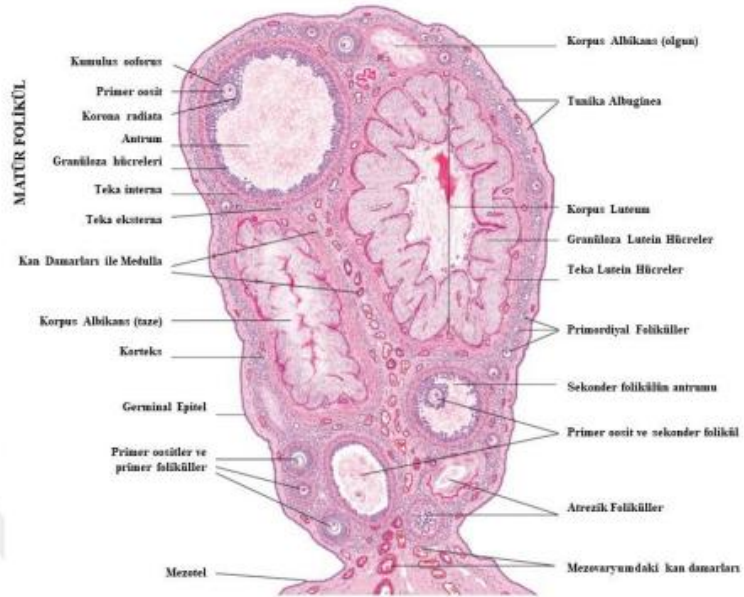


Şekil 2. Overin şematik görüntüsü.

(<http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>)

2.2. Over Histolojisi

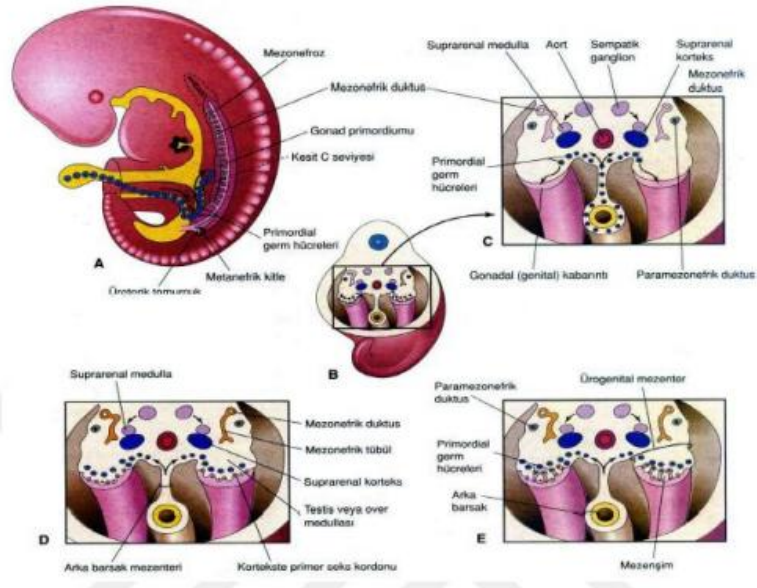
İnsanlardaki overler, badem şeklinde olup, yüzeyleri tek katlı yassı ya da kübik over yüzey epiteli (germinal epitel) ile kaplıdır. Over yüzey epitelinin altında, overlerin beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea (TA) olarak adlandırılan sıkı bağ doku tabakası bulunur. Tunika albuginea'nın altında ise primer oositlerin bulunduğu over foliküllerinin bol miktarda olduğu korteks yer alır (Junqueira ve Carneiro 2005). Kortekste over yüzey epitelinden sonra, primer oositlerin tek sıralı yassı folikül epiteli ile çevrili olduğu primordiyal folliküller bulunur (Kierszenbaum 2006). Folliküller, kortikal bölgedeki bağ dokusu içerisine gömülüdür. Bağ dokusunda hormonal uyarılara diğer organlarda bulunan fibroblastlarından farklı yanıt veren fibroblastlar bulunur. (Şekil 3). Overin medulla bölgesiyani en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar ağı ve sinirleri içeren kısımdır (Kierszenbaum 2006 ; Junqueira ve Carneiro 2005). Korteks ile medulla bölgeleri arasında net bir sınır yoktur.



Şekil 3. Ovaryum histolojik kesitinin hematoksilen eozin boyaması. (Eroschenko 2013)

2.3 Ovaryumun Gelişimi ve Embriyolojisi

Dişi üreme hücresi olan ogoniumlar, primordiyal germ hücrelerinin mitoz bölünmeleri sonucu oluşmaktadır (Kierszenbaum 2016). Primordiyal germ hücreleri, epiblasttan köken alarak, primitif çizgi boyunca göç eder ve üçüncü haftada yolk (vitellus) kesesine ulaşırlar (**Şekil 4**) (Kierszenbaum 2016; Sadler 2015). Bu küre şeklindeki büyük üreme hücreleri, allantoisten orijinlenen yolk kesesi (umbilikal kese) endodermal hücreleri arasında dördüncü haftanın başlarında görülür (Moore ve ark. 2016).



Şekil 4. Ovaryumun embriyonik gelişimi. A. Beş haftalık bir embriyo taslağında primordiyal germ hücrelerinin yolk kesesinden embriyoya göçü. B. Embriyonun kaudal bölgesinin gonadal sırtlarının yerini ve boyutunu gösteren üç boyutlu taslak. C. Suprarenal bezlerin primordiyumunu, gonadal sırtları ve gelişmekte olan gonadlara primordiyal germ hücrelerinin göçünü gösteren transvers kesit. D. Gonadal kordları gösteren altı haftalık bir embriyonun enine kesiti. E. Farklılaşmamış gonad ve paramesonefrik kanalları göstermektedir. (Moore ve ark. 2016).

Embriyo katlanırken, umbilikal kesenin dorsal parçası embriyoya dahil olur. Bu dördüncü haftada gerçekleştiğinde, primordiyal germ hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenterisi boyunca uzanır, beşinci haftada primitif gonadlara ve altıncı haftanın başlarında ise genital sırtlara ulaşırlar. Primordiyal germ hücrelerinin göçü fragilis, stella ve BMP-4 genleri tarafından düzenlenir (Sadler 2015; Moore ve ark. 2016).

Primordiyal germ hücreleri primitif gonadlara ulaşmadan önce ve ulaştıkları anda genital sırttaki epitel hücreleri proliferasyon olarak altlarındaki mezenşim içine gömülürler ve düzensiz biçimde olan primitif cinsiyet kordonlarını oluştururlar. Bu

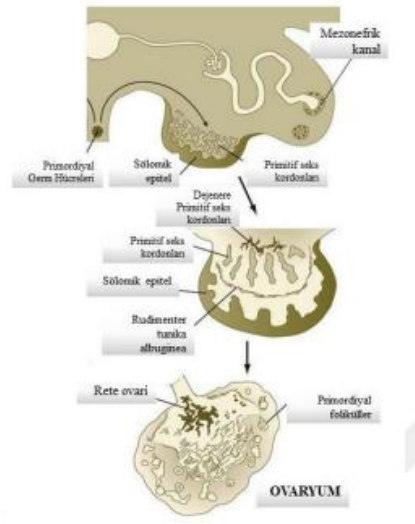
evredeki gonad, dişi ve erkekte ayırt edilemediği için farklılaşmamış gonad adını alır (Şekil 5) (Sadler 2015). Bu gonadlar üç farklı yerden köken alırlar;

1. Posterior karın duvarını kaplayan mezotel (Mezodermal Epitel)
2. Mezenşim (Embriyonik bağ dokusu)
3. Primordiyal Germ Hücreleri (Moore ve ark. 2016).

2.3.1 Farklılaşmamış Gonadlar

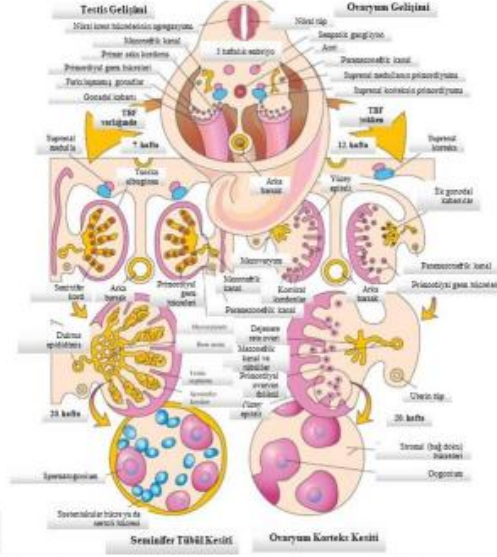
Gonadal gelişimin ilk safhası mezoteldeki kalınlaşma, mezonefrozun medial kısmında gelişir ve beşinci haftada meydana gelir. Primer seks kordonları, epitelin ve alttaki mezenşimin proliferasyonu, gonadal sırtın mezonefrozunun medialinde bir çıkıntı ile oluşur. Gonadal kordlar (parmak benzeri epitel kordlar) kısa sürede alttaki mezenşime doğru gelişir. Primer hücre kordonlarındaki hücreler altıncı haftada dejenere olur ve yerlerini oogoniyumların etrafını çevreleyen sekonder seks kordonları alır (Şekil 4 ve 5) (Kierszenbaum 2016; Moore ve ark. 2016).

Farklılaşmamış gonadlar; dışta korkteks ve içte medullayı meydana getirir. XX kromozomlu embriyolarda ovaryumu, farklılaşmamış gonadların korkteksini oluşturur. Dişi embriyolarda, primitif cinsiyet kordonu düzensiz hücre kümelerine ayrılarak overin medullar bölgesinde yerleşirler. Bu hücre kümeleri bir süre sonra kaybolarak yerlerini vasküler bir stroma olan ovarian medullaya bırakırlar (Şekil 6 ve 7) (Sadler 2015).



Şekil 5. Primordiyal germ hücrelerinin göçü ile ovaryum gelişim süreci. (Carlson 2014).

Gelişimin yedinci haftasına kadar gonadlar, cinsiyete özgü morfolojik özelliklere sahip değildirler. Embriyonun cinsiyet farklanmasından sorumlu olan SRY geni Y kromozomunda taşınmaktadır. Embriyo; SRY geninin proteini olan testis belirleyici faktörün (TBF) varlığında erkek, yokluğunda ise dişi olarak gelişmektedir (**Şekil 6**) (Kierszenbaum 2016; Moore ve ark. 2016; Sadler 2015).



Şekil 6. Beş haftalık bir embriyoda farklılaşmamış gonadların ovaryum veya testise farklılaşması. Solda testis belirleyici faktörün (TBF) varlığında testis gelişimi gösterilirken sağda ise TBF yokluğunda ovaryum gelişimi gösterilmektedir (Moore ve ark. 2016).

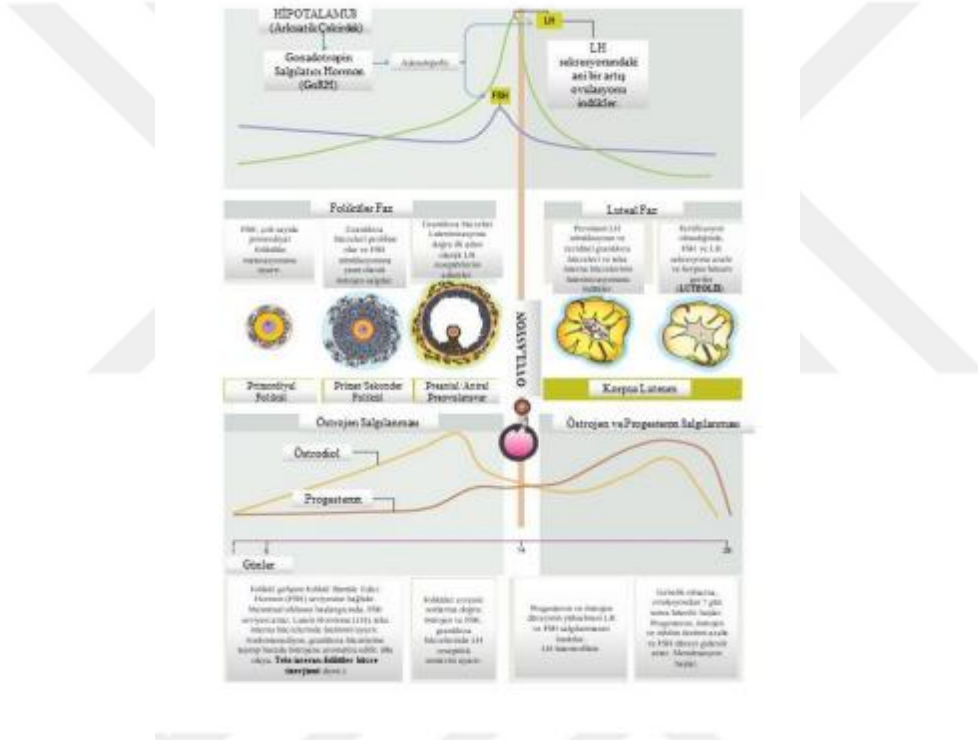
Gonadal gelişim dişi embriyolarda, erkek embriyolara göre daha yavaş gerçekleşir. Over gelişimi için X kromozomunda bulunan otozomal genlerin over organogenezinde de rol oynadığı görülmüştür. Overler yaklaşık 10 haftalık olana kadar histolojik olarak saptanamaz. Gonadal kordlar belirgin hale gelmez, ancak medulla içine uzanır ve temel bir rete ovariiyi oluştururlar. Bu yapı ve gonadal kordlar genellikle dejenere olur ve daha sonra kaybolur (**Şekil 5 ve 6**) (Moore ve ark. 2016).

2.4. OVARYAN SIKLUS

Ovaryan siklus;

1. Foliküler faz,
2. Ovulatuvar faz,
3. Luteal faz olmak üzere üç evreden oluşmaktadır.

Foliküler evrede gonadotropik hormonların etkisiyle primordiyal foliküllerden olgun graaf folikülleri gelişir (Şekil 7) (Kierszenbaum 2016).

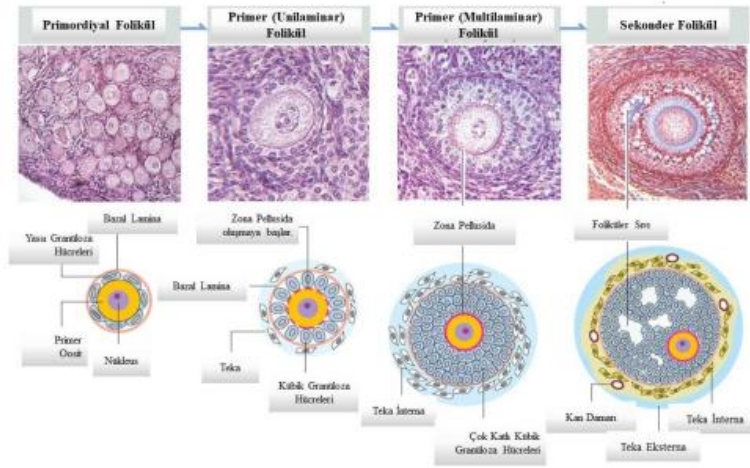


Şekil 7. Ovaryan siklus (Kierszenbaum 2016).

2.4.1. Folikül Gelişimi

Ovaryum folikülleri, ovaryumun korteks kısmında görülür ve histolojik olarak gelişim evrelerine göre dört tiptir:

1. Primordiyal Foliküller
2. Primer Foliküller
 - a. Tek Tabakalı Primer Foliküller
 - b. Çok Tabakalı Primer Foliküller
3. Sekonder Foliküller
4. Graaf ya da Olgun Foliküller (Şekil 8) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



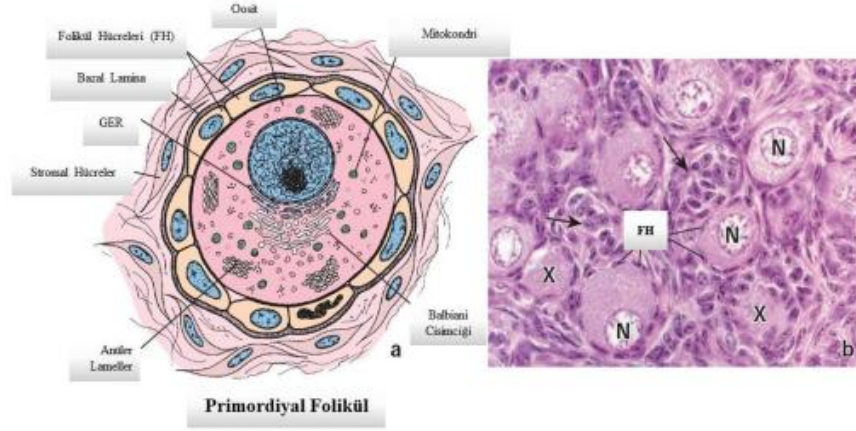
Şekil 8. Folikülogenez ile primordiyal folikülün matürasyonu.

2.4.1.1. Primordiyal Foliküller

Primordiyal foliküller, fetal dönemin üçüncü haftasında ve erken gelişimleri gonadotropin stimülasyonundan bağımsız olarak ortaya çıkmaktadır. Aynı zamanda bu foliküller, olgun ovaryumlarda tunika albugineanın hemen altında korteks stromasında en çok yer alan foliküldür (Şekil 8 ve 9) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

Oosit yaklaşık olarak 30µm çapındadır ve ince büyük eksantrik bir nükleus ve ooplazma olarak adlandırılan golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulumun, birçok mitokondriyonun ve lizozomların oluşturduğu bir küme olan Balbiani cisimciği içeren bir sitoplazmaya sahiptir. Oositin etrafını, dış yüzeyi bazal

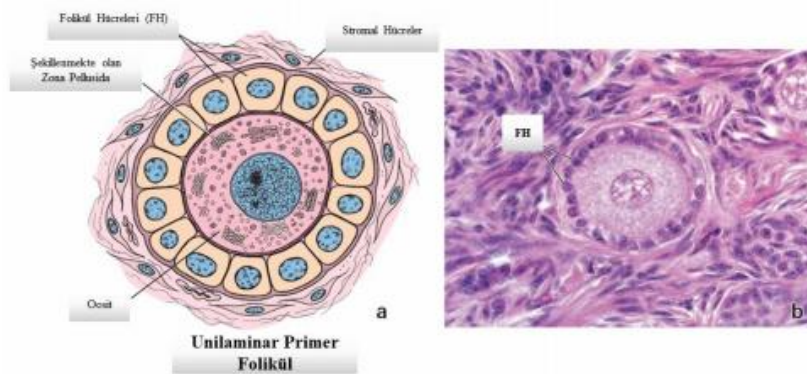
lamina ile sınırlandırılmış yassı folikül hücreleri tek bir tabaka halinde çevreler (Şekil 9) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



Şekil 9. Primordiyal folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi. (Ross ve Pawlina 2016)

2.4.1.2. Primer Foliküller

Primordiyal foliküller gelişirken, ilk olarak oosit büyür. Oositin etrafındaki yassı folikül hücreleri proliferasyonla kübik şekil alırlar. Tek tabakalı kübik folikül hücreleriyle çevrili olan primer oosite sahip foliküle tek tabakalı (unilaminar) primer folikül denir (Şekil 10) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

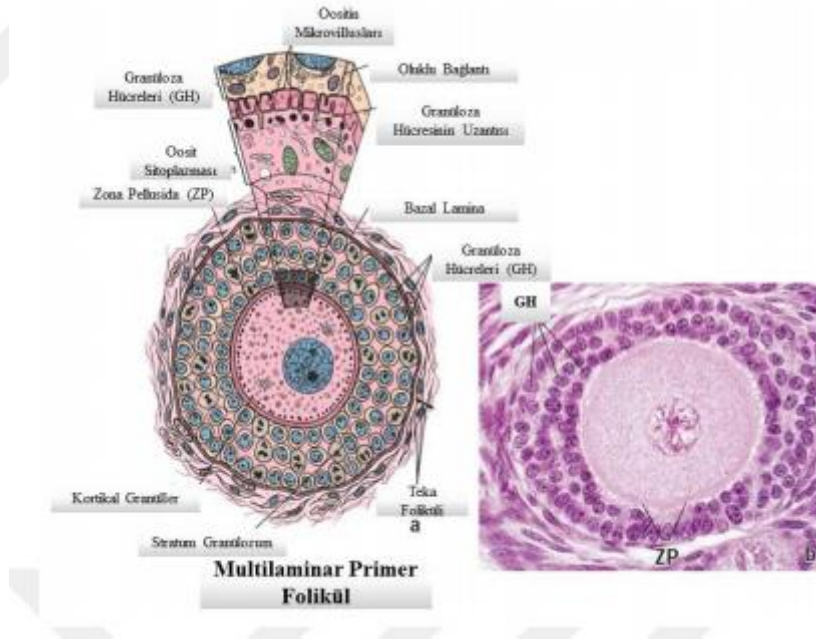


Şekil 10. Unilaminar primer folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi. (Ross ve Pawlina 2016)

Oosit büyüdükçe, oositin salgıladığı özel proteinler bir araya gelerek folikül hücreleri ile oosit arasında ekstrasellüler bir örtü olan zona pellusida'yı meydana

getirir (**Şekil 10**). Zona pellusida, foliküler hücrelerini oositin ayırır. Foliküler hücreler, zona pellusidayı ince sitoplazmik uzantıları ile deler ve oositin mikrovillusları ile temasa geçer. Temas noktalarında oluklu bağlantılar (gap junction) bulunur. İnsandaki zona pellusida, sülfatlı üç asidik zona pellusida glikoprotein sınıfından meydana gelmektedir (ZP-1, ZP-2, ZP-3). Bu sınıfın en önemli üyesi olan ZP-3, spermatozoa-bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyonu indükleyicisidir. ZP-2'nin, sekonder spermatozoa-bağlanma reseptörü olarak işlev gördüğü bilinmekte, ZP-1'in ise fonksiyonu henüz bilinmemektedir (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

Oositi çevreleyen tek tabakalı folikül hücreleri hızlı mitotik proliferasyon geçirerek oositi çevreleyen çok katlı epitel bir tabaka olan stratum granulozumu oluştururlar. Bu evrede artık folikül çok tabakalı (multilaminar) primer folikül olarak adlandırılır. Folikül hücrelerine de granuloza hücreleri denir. Testisteki sertoli hücrelerinin aksine, granuloza hücrelerinin bazal tabakaları karmaşık sıkı bağlantılara sahip değildir. Bu durum kan-folikül bariyerinin bulunmadığını göstermektedir (**Şekil 11**) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



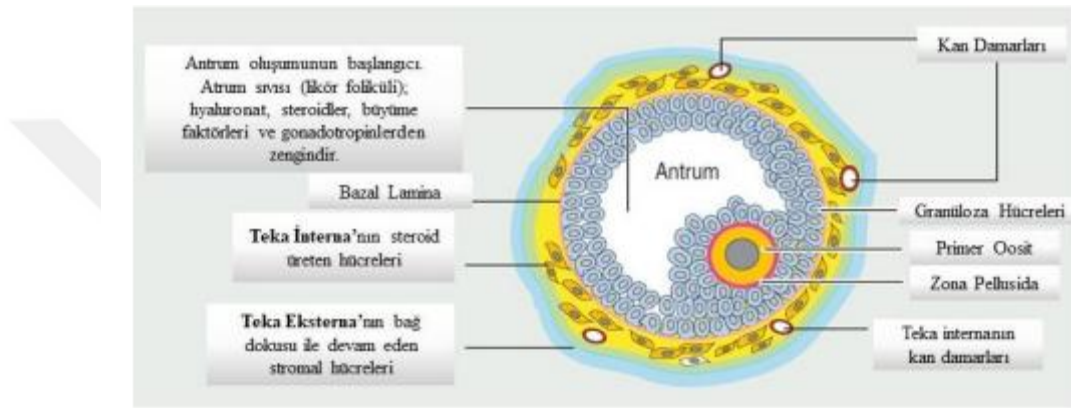
Şekil 11. Multilaminar primer folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi. (Ross ve Pawlina 2016).

2.4.1.2.1. Teka Hücreleri

Granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile folikülün etrafındaki stromal hücreler, bazal laminanın hemen dışında teka folikülü olarak bilinen bağ doku hücre kılıfı oluşturur. Bu teka folikülü iki tabakaya ayrılır:

Teka İterna; gelişmekte olan folikülün bazal laminasına komşu, vaskülaritesi yüksek olan kübik salgı hücrelerinden oluşan iç tabakadır.

Teka Eksterna; düz kas hücreleri ile kollajen lif demetlerinin ve bağ dokusu hücrelerinin oluşturduğu kapsül benzeri dış tabakadır (**Şekil 12**) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

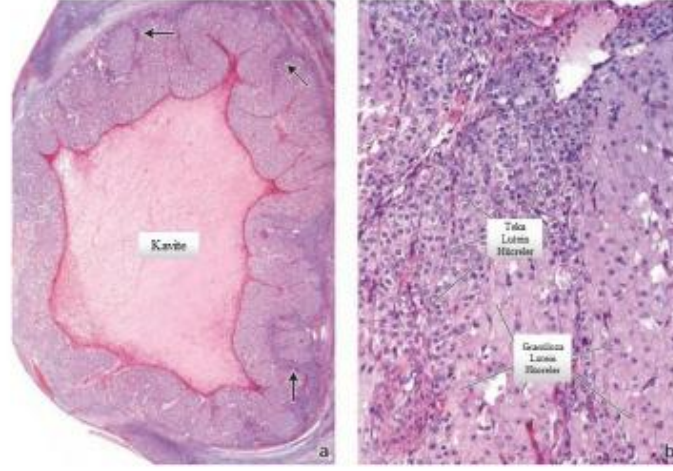


Şekil 12. Teka hücrelerinin Graaf folikülündeki şematik gösterimi. (Kierszenbaum 2016).

Teka internanın tamamen farklılaşmamış hücrelerinin ince yapısı, steroid üreten hücrelerin özelliklerine sahiptir ve bu tabakanın hücreleri çok sayıda Luteinizan Hormon (LH) reseptörleri içermektedir. Östrojen prekürsörleri olan androjenler, LH stimülasyonuna yanıt olarak sentezlenir ve salgılanırlar. Foliküler hücreler, östrojenlerin doğrudan üretimi için gerekli enzimlere sahip değildir. Bu nedenle folikülogenez sırasında steroid prekürsörlerini üretemezler. Teka internanın hücreleri bir androjen prekürsörü olan androstenediyonu salgılar. Androstenediyon, testosteron üretimi için folikül hücrelerine taşınır. Daha sonra testosteron, aromataz tarafından östradiyole çevrilir. Teka hücrelerinin androstenediyon üretimi, LH tarafından düzenlenir (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

Teka interna, salgı hücrelerine ek olarak fibroblastlar, kollajen demetleri ve endokrin organların tipik özelliği olan zengin küçük damar ağına sahiptir. Teka interna ile granüloza hücreleri arasında kesin bir sınır oluşturan bazal lamina, folikül

geliştikçe avasküler granüloza hücre tabakası ile teka internanın zengin kapiller yatağını birbirinden ayırır (**Şekil 13**) (Ross ve Pawlina 2016).



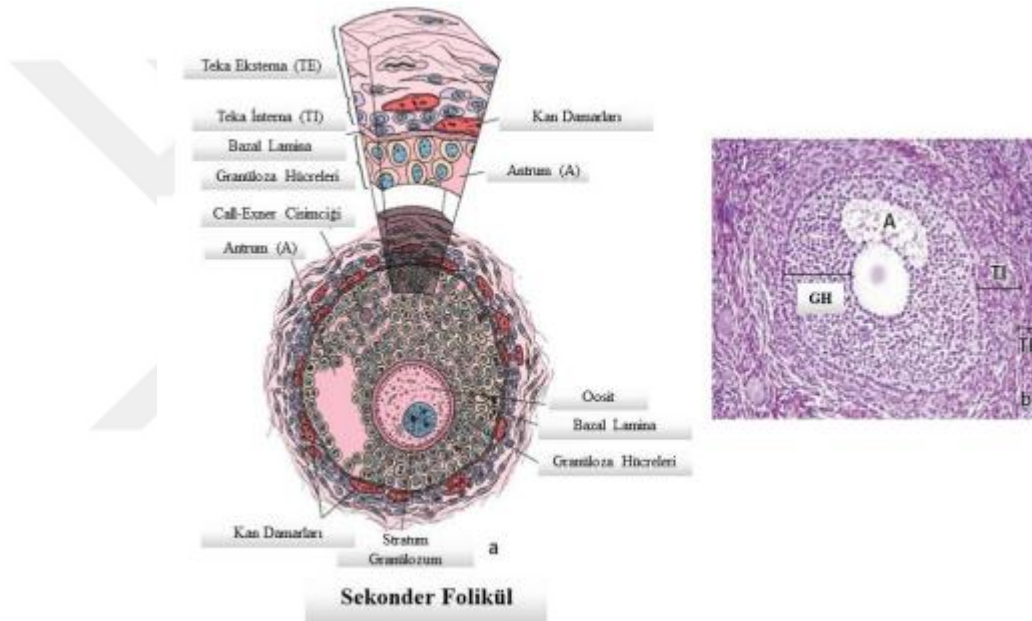
Şekil 13. İnsan Korpus Luteum histolojik kesiti. (a) Granüloza ve teka hücrelerini içeren kollabe olmuş folikül duvarı. Foliküler kavitenin (Kav) çevresinde kalın bir katlantı halinde granüloza lutein hücreleri, katlantıların içinde de teka interna hücreleri (oklar) bulunmaktadır. (b) Daha büyük büyütmede teka ve granüloza lutein hücreleri (Ross ve Pawlina 2016). Teka lutein hücrelerin nükleusları küre şeklinde olup granüloza lutein hücrelere kıyasla daha küçük hücrelerdir.

Primer folikülde, osit matürasyonu meydana gelir. Organellerin dağılımı oosit olgunlaştıkça değişime uğrar. Golgi aygıtı sitoplazmaya dağılır, serbest ribozomların, mitokondrilerin, küçük veziküllerin ve multiveziküller cisimlerin sayısı ve granüllü endoplazmik retikulumun sayısı artar. Birçok türün oositler kortikal granül denilen özelleşmiş salgı vezikülleri içerir. Bu veziküller oolemmmanın yani oosit plazma membranının hemen altındadır. Granüller, ovum, sperm tarafından aktive edildiğinde ekzositoz ile serbest hale gelen ve proteazları içeren özelleşmiş salgı granüllerine sahiptir (**Şekil 11**) (Ross ve Pawlina 2016).

Oosit ile onu çevreleyen granüloza hücreleri arasında zona pellusidanın biriktiği, oositten çok sayıda mikrovillusun uzandığı, aynı zamanda granüloza hücrelerinde ince uzantılarının oosite doğru uzandığı perivitellin aralık bulunur. Granüloza hücrelerinin uzantıları oositin mikrovillusları ile iç içe girerken bazıları da plazma membranının içine doğru invajine olurlar. Uzantılar plazma membranı ile temas etseler de hücreler arasında sitoplazmik devamlılık sağlayamazlar (Ross ve Pawlina 2016).

2.4.1.3.Sekonder Folikül

Sıvı içeren bir antrum ile karakterizedir. Stratum granulozum 6-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştığında, granuloza hücreleri arasında sıvı dolu kaviteler oluşmaya başlamaktadır. Granuloza hücreleri arasında hyaluronan zengin olan likör folikülü yani antrum sıvısı biriktikçe kaviteler birleşir ve sonunda hilal şeklinde olan tek kavite antrum oluşur. Bu foliküle, sekonder folikül veya antral folikül denir (Şekil 14) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016). Granuloza hücreleri tarafından salgılanan hyaluronan ve proteoglikan içeren Call-Exner cisimcikleri, foliküler hücreler arasında küçük hücreler arası boşluklarda bulunan, koyu boyanan PAS pozitif ekstrasellüler materyallerdir.

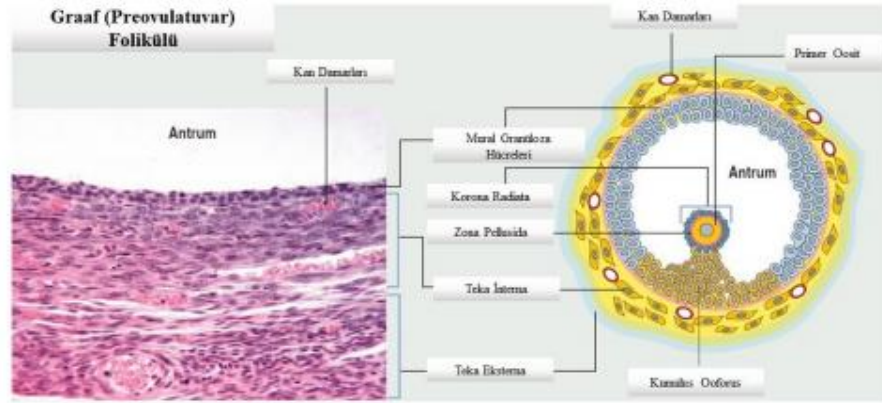


Şekil 14. Sekonder folikül histolojik ve şematik gösterimi. (Ross ve Pawlina 2016).

Oosit ve foliküllerin gelişimi için; Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH), büyüme faktörleri (epidermal büyüme faktörü [EGF], insülin benzeri büyüme faktörü-I [IGF-I] gibi) ve kalsiyum iyonları gereklidir. Zona pellusida ile çevrelenmiş ve eksantrik yerleşimli 125 µm çapındaki primer oosit daha fazla büyüyemez. Mayotik profaz aşamasını tamamlamasını engellemek ve büyümenin inhibisyonu sağlamak için 1-2 kilodaltonluk küçük peptit olan Oosit Matürasyon İnhibitörü (OMI), granuloza hücreleri tarafından antral sıvıya salgınır. Daha sonra oosite oluklu bağlantılar aracılığıyla ulaşır. Sekonder folikül ile OMI konsantrasyonu arasındaki direkt korelasyondan dolayı konsantrasyon, küçük foliküllerde en yüksek iken olgun foliküllerde ise en düşüktür. Sıvının ilk ortaya çıktığı erken sekonder folikülde çapı

0.2 mm olan folikül, büyüyerek 10 mm'ye kadar hatta daha fazlasına ulaşır (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

Granüloza hücre tabakası ile döşenen antrum, sekonder folikülün boyutu arttıkça genişler. Stratum granulozum, oosit ile ilişkili olduğu bölgede antruma doğru çıkıntı yaparak bir tümsek oluşturur. Buradaki granüloza hücrelerine kumulus ooforus denmektedir. Oositin hemen etrafını çevreleyen ve ovulasyonda kumulus ooforus hücrelerine korona radiata adı verilir (**Şekil 15**). Korona radiatayı oluşturan kumulus hücrelerinin mikrovillusları zona pellusidayı penetre eder. Bu mikrovilluslar oluklu bağlantılar aracılığıyla oositin mikrovillusu ile iletişime geçerler. Foliküler maturasyon sırasında granüloza hücrelerinin yüzeyindeki mikrovillusların sayısının artması ile serbest antral yüzeydeki LH reseptörlerinin sayısında da bir artış olmaktadır (Ross ve Pawlina 2016).

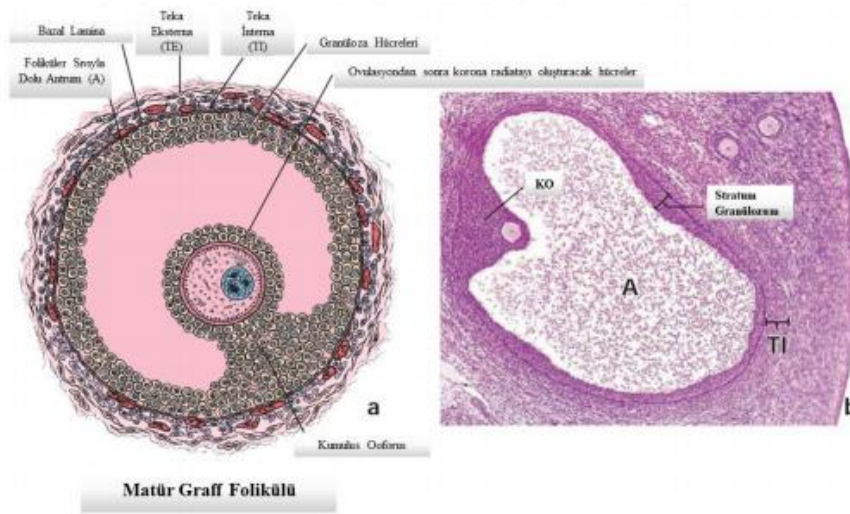


Şekil 15. Graaf (Preovulatuvar) Folikülün histolojik ve şematik gösterimi (Kierszenbaum 2016).

2.4.1.4.Graaf Folikülü

10-20mm çapındaki graaf folikül ya da olgun folikül, büyük bir antrum ve matür sekonder oositi içermektedir. Boyutunun büyük olmasından dolayı ovaryum korteksi boyunca uzanarak yüzeyde çıkıntı oluşturur. Granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi folikülün maksimum boyutuna yaklaştıkça azalma gösterir. Antrumun boyutu arttıkça da stratum granulozum tabakası incelir. Granüloza hücrelerinin arasındaki boşluk genişlemeye devam ettikçe oosit ve kumulus hücreleri ile geri kalan granüloza hücreleri arasındaki yakınlık gevşer ve ovulasyona hazırlanılır. Oositin hemen çevresindeki kumulus hücreleri korono radiatanın tek tabakasını oluşturur. Bu hücreler ve onlara gevşekçe bağlanan kumulus hücreleri ovulasyonda oositle kalmaktadır.

Bu sırada teka hücreleri daha belirgin hale gelir. Teka interna hücrelerinin sitoplazmalarında lipid damlacıkları ortaya çıkar ve hücreler steroid üreten hücrelerle aynı ince yapısal özellikleri gösterirler (Şekil 15 ve 16) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina2016).



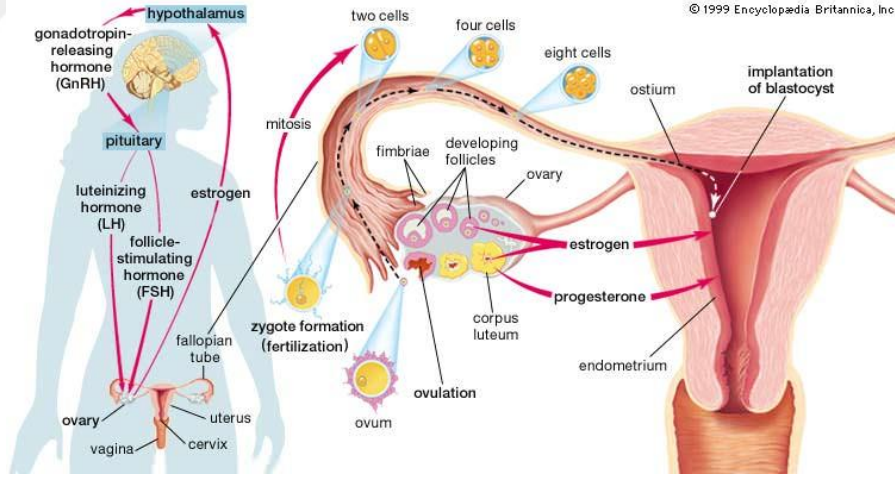
Şekil 16. Matür graaf folikülün histolojik (a) ve şematik (b) gösterimi (Ross ve Pawlina 2016).

İnsandaki LH, teka internayı östrojen prekürsörü olan androjen salgılamak üzere stimüle eder. Bazı androjenler, granüloza hücrelerinin granülsüz endoplazmik retikulumlarına(aER) taşınır ve granüloza hücreleri FSH'a yanıt olarak, androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizler. Östrojenler, granüloza hücrelerini folikül büyümesi için stimüle eder. Foliküler ve sistemik kaynaklardan gelerek artan östrojen düzeyleri, gonadotropların gonadotropin serbestleştirici hormona

duyarlılıklarındaki artışla ilişkilidir. Ovulasyondan yaklaşık olarak 24 saat önce adenohipofizde FSH ya da LH salıverilmesinde ani bir artış görülür. LH'nin ani artışına karşın granüloza hücrelerindeki LH reseptörleri azalır ve granüloza hücreleri LH'a yanıt olarak östrojen üretmezler. Primer oositin birinci mayotik bölünmesi tamamlanır. Bu olay LH'nin ani artışından 12-24 saat sonra gerçekleşir. Sekonder oosit ile birinci polar cisim oluşumu ve oosit ile zona pellusida arasındaki perivitellin aralığa atılması ile sonuçlanır. Granüloza ve teka hücreleri daha sonra lutenizasyona uğrar ve progesteron üretirler (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

2.4.2.Ovulasyon

Ovulasyon; gonadotropik hormonların aracılığıyla matür sekonder oositin graaf folikülünden atıldığı bir süreçtir. Menstrual siklusun ilk birkaç günü ovulasyona uğrayacak olan folikül, birkaç primer oositten oluşan bir grup içinden seçilir. Olgun folikülün ovaryum yüzeyine doğru germinal epitel de dahil olmak üzere tüm foliküler duvarı delerek yaptığı çıkıntı bölgesine stigma adı verilir. Bu alandan oosit ve korona radiata hücreleri atılır (Şekil 7 ve 17) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



Şekil 17. Endokrin hormonların kontrolünde süren ovaryan siklus ve ovulasyon aşamasının gösterimi.

<https://2nlsnb2fe1ed2nm0us28io0z-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2015/08/ovulation1.jpg>.

LH düzeyinin artması ile uyarılan teka eksterna ve tunika albugineadaki proteolitik aktivite, olgun folikülün yırtılmasını kolaylaştırır. 28 günlük bir menstrual siklusun ortasında yani 14. gününde, sekonder oositin atılmasından hormonal

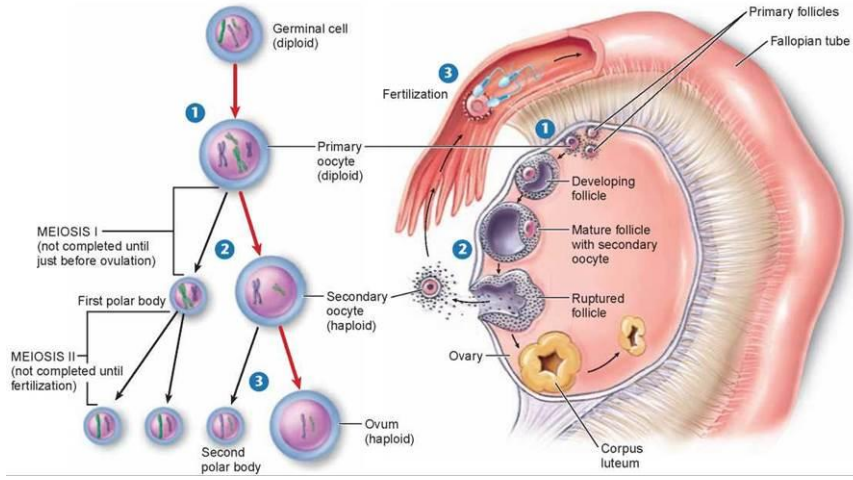
değişiklikler ve enzimatik etkiler kombinasyonu sorumludur (**Şekil 7 ve 17**) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016). Bu faktörler:

- Foliküler sıvı hacminin ve basıncının artması
- Folikül duvarının aktive plazminojen tarafından enzimatik proteolizisi
- Oosit-kumulus kompleksi ile stratum granulozum arasında hormonal yönlendirmeyle glikozaminoglikanların biriktirilmesi
- Teka eksterna tabakasındaki düz kas liflerinin prostaglandinler tarafından tetiklenerek kasılması (Ross ve Pawlina 2016).

Ovulasyondan hemen önce folikül çıkıntısının üzerindeki ovaryan yüzeyin küçük bir alanındaki kan akışı durur. Germinal epitelin foliküler stigma ya da makula pellusida olarak bilinen bölümü yükselir ve sonra rüptüre olur. Korona radiata ve kumulus ooforus hücreleri tarafından çevrelenen, oosit rüptüre olan folikülden atılır. Ovulasyonda kumulus kütlesi tuba uterinanın fimbriaları tarafında abdominal ostiumuna doğru süpürülür. Kumulus kütlesi, tuba uterinayı döşeyen silyumlu hücreler tarafından aktif olarak taşınır ve peritoneal boşluğa geçişi engellenir (**Şekil 17**) (Ross ve Pawlina 2016).

Ovulasyondan birkaç saat önce, teka interna ve foliküler hücre tabakası korpus luteuma dönüşmeye başlar. Ovulasyondan yaklaşık 24 saat sonra sekonder oosit canlı kalır. Bu süreçte fertilizasyon gerçekleşmezse, sekonder oosit tuba uterinadan geçerken dejenere olur (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

Primordiyal foliküller içindeki primer oositler birinci mayotik bölünmenin diploten evresinde arreste uğrar. Birinci mayotik profaz ovulasyon öncesine kadar tamamlanamaz ve diploten evresinde 12-50 yıl kadar dururlar. Ovulasyondan hemen önce birinci mayoz bölünmeyi tamamlayarak sekonder oositi oluşturur. Olgun folikülde birinci mayoz bölünme sırasında oluşan kardeş hücreler eşit miktarda sitoplazma içerir ancak biri daha fazla sitoplazma alarak yaklaşık 150µm çapındaki sekonder oositi oluştururken az miktarda sitoplazma alan kardeş hücre birinci polar cismi oluşturmaktadır. Sekonder oosit ovulasyondan hemen önce ikinci mayoz bölünmeye başlar ve metafaz evresinde arrestte kalır ve sadece spermatozoon ile penetre olduğunda ikinci mayotik bölünme tamamlanır. Fertilizasyon gerçekleşirse sekonder oosit ikinci mayoz bölünmeyi tamamlar ve maternal pronükleuslu bir ovum oluşur. Bu bölünmede oluşan diğer hücre ise ikinci polar cisimdir (**Şekil 18**) (Ross ve Pawlina 2016).

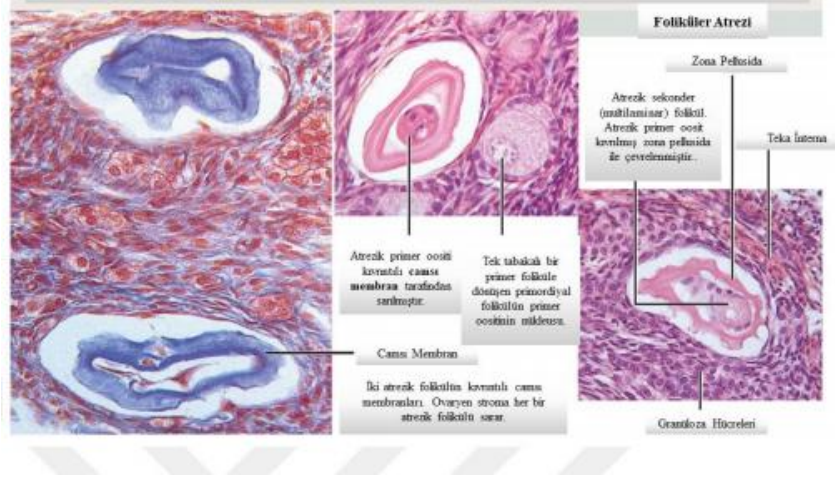


Şekil 18. Oosit maturasyonunda mayoz bölünmeler sonucunda birinci ve ikinci polar cisim oluşumu.

<https://schoolbag.info/biology/living/living.files/image906.jpg>

2.5. FOLİKÜLER ATREZİ

Doğumda overlerdeki yaklaşık 2 milyon primer oositten sadece 40.000'i puberteye kadar hayatta kalır. Pubertede bu durum yaklaşık olarak 400'e (her menstrual siklus için bir folikül) kadar iner (Carlson 2014; Kierszenbaum 2016). Puberteden sonra foliküller her menstrual siklusa olgunlaşmaya başlar ve normalde sadece bir folikül olgunlaşmasını tamamlar. Ovaryum foliküllerinin çoğu granüloza hücrelerinin apoptozunun aracılık ettiği ovaryan foliküler atrezi ile dejenere olup kaybolur. Hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz foliküler atrezi süresince görülmekte ve inflamatuvar bir yanıt oluşturmadan follikülün gerilemesini sağlamaktadır. Foliküler atrezi hem fetal hem de postnatal dönemdeki ovaryumlarda yani foliküller gelişimlerinin herhangi bir evresinde atreziye uğrayabilirler. Puberteden sonra her menstrual siklusa folikül grupları olgunlaşır ve normal olarak sadece bir folikül olgunlaşmayı tamamlar. Folikül olgunlaşmaya doğru ilerledikçe atrezi süreci karmaşılaşmaktadır (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



Şekil 19. Atrezik foliküllerin histolojik görünümü (Kierszenbaum 2016).

Matür oositin dejenerasyonu gelişmekte olan büyük foliküllerin atrezisi sırasında gecikir. Bu dejenerasyon, folikül duvarındaki dejeneratif değişikliklere sekonder olarak gerçekleşiyor gibi görünür. Buradaki gecikme oosit olgunluğa ve yeterliliğe erişmişse, granuloza hücrelerinde atreziiyi başlatan stimuluslara artık duyarlı olmadığını göstermektedir. Foliküler değişimler de şu şekildedir:

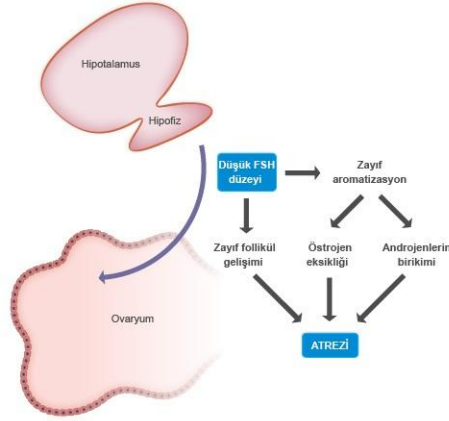
- Granuloza hücrelerinde endonükleazların ve diğer hidrolitik enzimlerin ekspresyonu ve mitoz bölünmenin durması ile granuloza hücrelerinde apoptozun başlaması,
- Granuloza tabakasının nötrofil ve makrofajlar tarafından invazyonu,
- Granuloza tabakasının vaskularize bağ dokusu kordonları tarafından invazyonu,
- Granuloza hücrelerinin folikülün antrumuna dökülmesi,
- Teka interna hücrelerinin hipertrofisi,
- Dejenerasyon devam ettikçe folikülün kollapsı,
- Folikülün kavitesine bağ dokusunun invazyonu (Ross ve Pawlina 2016).

Atrezik foliküller; çok fazla değişikliğe uğramamış zona pellusida, camısı membran denilen kalın ve kıvrılmış mebranöz bir materyal, dejenere olmuş oosit ve folikül hücrelerinin kalıntıları ve istila eden makrofajlar ile ayırt edilir (**Şekil 20**) (Kierszenbaum 2016).

Oositin, dejenerasyon ve otoliz ile oluşan kalıntılar, invazyon yapan makrofajlar tarafından fagosite edilir. Sülfatlı asidik glikoproteinlerden meydana gelen zona pellusida, hücre içi otolitik değişikliklere dayanıklı olduğu için katlanır ve kollabe olur. Zona pellusidanın ve dejenere hücrelerin kalıntılarının fagositozundan bağ

dokusundaki makrofaj hücreleri sorumludurlar. folikül hücreleri ve teka interna arasındaki bazal membran folikül hücrelerinden ayrılabilir ve kalınlığı artarak camı membran adı verilen dalgalı hyalin tabakayı oluşturur. Bu yapı atrezinin geç evresindeki foliküller için karakterizedir (**Şekil 19**) (Ross ve Pawlina 2016).

Birçok folikül folikülogenez sürecine girerken genellikle sadece bir tanesinin ovulasyona gitmesinin nedeni; fertilizasyon için en uygun kalitede oosit içeren canlı foliküllerin reproduktif süreçte etkin rol oynamasını sağlamaktır. Bunun yanında çok sayıda atretik folikül streoidojenik aktiviteyi koruyarak overde implantasyon için endometriyumu hazırlayan endokrin fonksiyonlara katkıda bulunur (**Şekil 20**). Klinik bir perspektiften bakıldığında foliküler atrezi, infertiliteye yol açan iki patolojik menapoz benzeri olay ile (prematüre ovaryan yetmezlik ve polikistik over sendromu) ilişkilidir (Kierszenbaum 2016).



Şekil 20. Foliküler atrezi sürecinde endokrin sistem ve ovaryumlar arasındaki ilişki.

<https://images.app.goo.gl/qt8YA241KNABwkSF9>

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'nun 05.07.2019 tarihli 77637435 karar numaralı onayı ile yapılmıştır. Çalışmamızda histokimyasal, immünohistokimyasal inceleme ve PCR analizleri değerlendirme için gerekli malzemelerin alınması Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2020-006 numaralı proje ile desteklenmiştir.

3.1. DENEY ve MODELİN OLUŞTURULMASI

Çalışmamızda 24 adet balb/c cinsi sağlıklı dişi fareler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi (MCBÜ-DEHAM)'nden temin edildi. Fareler adaptasyon için 3 gün boyunca herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı gözlendi. Dislokasyon öncesinde fareler stabil koşullarda (22° C sıcaklık ve %30-70 nem), 12: 12 saat aralığında aydınlık ve karanlık oda da (saat 07:00-7:00) tutuldu. Suya ve yiyeceğe istenildiği kadar erişimleri sağlandı.

Adaptasyon sürecinden sonra fareler 4 grup; kontrol grubu, sham grubu, düşük doz FSH+HCG uygulanan grup, yüksek doz FSH+HCG uygulanan grup ve her grupta 6 hayvan olacak şekilde ayrıldı (**Tablo 1**).

1.Kontrol grubu: Bu grupaki farelere herhangi bir işlem yapılmadı.

2.Sham grubu: Bu gruba sadece serum fizyolojik intraperitoneal olarak uygulandı.

3.Deney grubu 1: Bu gruptaki farelere önce düşük doz FSH (hor-285-a) (5 IU) ve 1gün sonra HCG (MSD, Pregnyl 1500IU i.M/S.C) (5 IU) intraperitoneal olarak uygulandı.

4.Deney grubu 2: Bu gruptaki farelere önce yüksek doz FSH (20 IU) ve 1 gün sonra HCG(20 IU) intraperitoneal olarak uygulandı (**Resim 1**).

GRUPLAR	FSH	HCG	SERUM FİZYOLOJİK
KONTROL	X	X	X
SHAM	X	X	100IU
DÜŞÜK DOZ	5IU	5IU	X
YÜKSEK DOZ	20IU	20IU	X

Tablo 1. Deney gruplarına verilen çözeltilerin miktarı



Resim 1. İntraperitoneal enjeksiyon

3.2. DENEYİN SONLANDIRILMASI İLE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Uygulamadan 48 saat sonra bütün farelere 10mg/kg ksilazin (Alfazyne, 0804125-11, Alfasan, Woerden, Hollanda) ve 75mg/kg ketamin (Ketalar, 002038, Eczabıbaşı Sağlık Ürünleri San. ve Tic. A.Ş., Lüleburgaz, Türkiye) uygulanarak servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Sakrifiye edildikten sonra overlerden biri PCR da kullanılmak üzere PBS içerisine alınırken diğer over de IHC için %10'luk formalin solüsyonu ile 24-48 saat süreyle oda sıcaklığında fikse edildi (**Resim 2**). Toplanan overler PCR da kullanılmak üzere etrafındaki yağ dokusu temizlendikten sonra üzerine 1ml PBS eklenerek 1000RPM'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası PBS çekilip atıldı ve overler -80°C'ye kaldırıldı.



Resim 2. Ovaryumların cerrahi olarak çıkarılması.

3.3. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

3.3.1. Dokuların Takibi, Parafin Gömme ve Kesit Alma

Histopatolojik değerlendirme için fareler sakrifiye edildikten sonra over dokuları hızlı bir şekilde alınarak %10'luk formalin solüsyonu (2014P6, Ostim O.S.B., Ankara) içerisinde 24-48 saat tespit edildi. 24-48 saatin sonunda tespit edilen doku örnekleri, rutin parafin takip prosedürüne uygun şekilde her bir doku etiketlenip bohçalanarak tespit solüsyonunun uzaklaştırılması için bir gece akarsu altında yıkandı. Dokular, derecesi giderek artan etil alkol (1.00983.2511, Merck, Darmstadt, Almanya) serileri ile (%60-%70-%80-%90-%96) dehidratasyonları yapıp, iki değişim ksilen (Surgipath, BM) ile şeffaflaştırmaları sağlandıktan sonra, parafine emdirme aşaması uygulanıp etiketlenerek parafine (Surgipath, Cambridgeshire, UK) gömüldü. (**Tablo 2**). Elde edilen parafin bloklardan rotary mikrotomla (RM2245, Leica Microsystems, Almanya) polilizin ile kaplı lamlara dokunun başladığı ilk kesitten itibaren herhangi bir atlama yapılmadan doku bitene kadar 5 µm kalınlığında alınan seri kesitler histokimyasal ve indirekt immünohistokimyasal yöntemler uygulanarak incelendi.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
A. FİKSASYON	%10 FORMALİN	24-48 SAAT
	AKARSU	1 GECE
B. DEHİDRATASYON	%60 ETİL ALKOL	30 DAKİKA
	%70 ETİL ALKOL	30 DAKİKA
	%80 ETİL ALKOL	30 DAKİKA
	%100 ETİL ABSOLÜ ALKOL	60 DAKİKA
	%100 ETİL ABSOLÜ ALKOL	60 DAKİKA
C. ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL – KSİLEN	15DAKİKA
	KSİLEN – I	15DAKİKA (MAX)
	KSİLEN - II	15 DAKİKA(MAX)
D. İNFİLTRASYON	KSİLEN – PARAFİN (1:1)	30 DAKİKA
	PARAFİN I	60 DAKİKA
	PARAFİN II	60 DAKİKA
E. GÖMME	PARAFİN	

Tablo 2. Parafin takip prosedürü.

3.3.2. Hematoksilen ve Eozin Boyaması

Tüm gruplara ait ovaryum dokularının ilk seri kesitinden başlanarak her beş kesitte bir tanesi seçilip hematoksilen ve eozin boyaması (**Tablo 3**) için öncelikle etüvde (FN400, Ankara) 56°C de bir gece bekletildi, ardından 1 saat ksilene (Surgipath, Birleşmiş Milletler) alınarak deparafinizasyonu sağlandı. Bu işlemten sonra derecesi azalan etil alkol (1.00983.2511, Merck, Darmstadt, Almanya) serilerinin (%96-80-70-60) her birinde ikişer dakika tutularak rehidratasyon işlemi yapıldı. Fazla alkolün uzaklaştırılması için beş dakika akarsu altında yıkandıktan sonra çekirdek boyaması için hematoksilende (Harris Hematoksilen, Histo-med Medikal Lab. Sis., Ankara) 3 dakika tutularak, fazla boyanın uzaklaştırılması için 5 dakika akarsu altında yıkama yapıldı. Diferansiyasyon için 1 saniye asit alkole batırılan kesitler tekrar akarsuda 5 dakika yıkandıktan sonra sitoplazma boyaması için eozinde (05-11007/L Bio-optica 20134 Milano, İtalya) 2 dakika bekletildi. Fazla boyanın uzaklaştırılması için akarsuda 5 dakika yıkanan kesitler dehidratasyon için sırasıyla %80'lik ve %96'lık etil alkolde birer dakika bekletildikten sonra şeffaflaştırma işlemi için 1 saat ksilende bekletildi. Bir saatin sonunda entellan (107961.0500, MERCK, Darmstadt, Almanya) ile kapatılarak kurumaya bırakılan lamalar ışık mikroskobunda (OLYMPUS BX43, Tokyo, Japonya) incelenerek fotoğraflandı.

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C ETÜVDE	1 GECE
	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	%96 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
	%80 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ETİL ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKARSU	5 DAKİKA
	%80 ETİL ALKOL	1 DAKİKA
	%96 ETİL ALKOL	1 DAKİKA
KURUTMA	HAVADA	1-2 DAKİKA
	KSİLEN	30 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	

Tablo 3. Hematoksilen – eozin boyama protokolü

3.3.3. İndirekt İmmunohistokimya Protokolü

İndirekt İmmunohistokimyasal yöntem için avidin-biyotin-peroksidaz tekniğinde; formalin (2014P6, Ostim O.S.B., Ankara) ile tespit edilip parafine gömüldükten sonra rotary mikrotom (RM2245, Leica Microsystems, Almanya) ile her bir over için 1 rodajlı ve 3 polilizin kaplı lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki seri kesitler alındı. Ovaryum kesitleri deparafinizasyon için 1 gece 60°C etüvde (FN400, Ankara) tutulduktan sonra iki kez değişen ksilen (Surgipath, BM) ile muamele edildi. Rehidratasyon için, azalan etil alkol (1.00983.2511, Merck, Darmstadt, Almanya) serilerinden (%96-%80-%70-%60) geçirildi. Distile su ile 10 dakika yıkandıktan sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS- 00-3002, Invitrogen, Life Technologies, Amerika) ile 3kez 5'er dakika yıkandı. Kesitler %0,5'lik tripsin (TSS155, ScyTek Lab, Logan Utah Amerika) solüsyonu içinde 37°C de 10 dakika tutuldu. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit (H2O2-1.08597.2500, MERCK, Darmstadt, Almanya) uygulandıktan sonra kesitler 3

kez 5'er dakika PBS ile yıkandı. Bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

Alınan kesitler otofaji ile ilgili LC3B (orb395265, biorbyt), apoptoz ile ilgili VDAC2 (orb632500, biorbyt) ve folikül gelişimi inhibe edilmesi mekanizmasının varlığını belirtmek için SIRT6 (orb631202, biorbyt) primer antikorları ile (**Tablo 4**) 18 saat +4°C'de inkübe edildi. Primer antikor ile inkübasyondan sonra PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkanan kesitler biotinlenmiş hidrojen peroksidad sekonder antikor (SHP125, ScyTek Lab, Logan, Utah, Amerika) ile 30 dakika boyandı ve tekrar PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandıktan sonra kesitlere 30 dakika streptavidin (SHP125, ScyTek Lab, Logan, Utah, Amerika) uygulandı. İmmunoreaktivitenin görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB) (DABACK125, SkyTek Lab, Logan, Utah, Amerika) ile 5 dakika boyanan kesitlerin, artalan boyaması ise Mayer's hematoksilen (HMM999, ScyTek Lab, Logan, Utah, Amerika) ile sağlandı. %80 ve %95'lik alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler, 30 dakika ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (107961.0500, MERCK, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldıktan sonra ışık mikroskobu (OLYMPUS BX43, Tokyo, Japonya) ile incelenerek fotoğrafları çekildi (**Tablo 4**).

3.3.3.1. Primer Antikorlar

- Anti-LC3B (Kat No: orb395265, biorbyt)
- Anti-VDAC2 (Kat No: orb632500, biorbyt)
- Anti-SIRT6 (Kat No: orb631200, biorbyt)

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 gece
	Ksilen I	30 dakika
	Ksilen II	30 dakika
REHİDRATASYON	%96 etil alkol	2 dakika
	%80 etil alkol	2 dakika
	%70 etil alkol	2 dakika
	%60 etil alkol	2 dakika
YIKAMA	Distile su	10 dakika
	Hidrofobik kalemle dokuların etrafının çizilmesi	
YIKAMA	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 dakika
PERMEABİLİZASYON	%0,5'lik Tripsin Solüsyonu	37°C de 10 dakika
YIKAMA	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 dakika
ENDOJEN PEROKSİDAZ İNHİBASYONU	%3'lük Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	5 dakika
YIKAMA	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 dakika
BLOKLAMA	Non-immun solüsyonu	bloklama 1 saat
İNKÜBASYON	Primer antikor	18 saat +4°C'de
YIKAMA	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 dakika
	Biotinlenmiş Antikor	Sekonder 30 dakika
YIKAMA	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 dakika
KAPAMA	Streptavidin	30 dakika
İMMUNOREAKTİVİTE	Diaminobenzidine (DAB)	5 dakika
YIKAMA	Distile su	3x5 dakika
ARTALAN BOYAMA	Mayer's hematoksilen	3 dakika
YIKAMA	Distile su	3x5 dakika
DEHİDRATASYON	%80'lik Etil Alkol	1 dakika
	%96'lık Etil Alkol	1 dakika
KURUTMA	Havada	1-2 dakika
ŞEFFAFLAŞTIRMA	Ksilen	30 dakika
KAPAMA	Entellan	

Tablo 4. İndirekt İmmunohistokimya Protokolü

3.4. PCR ANALİZİ

3.4.1. Ovaryumlardan RNA İzolasyonu

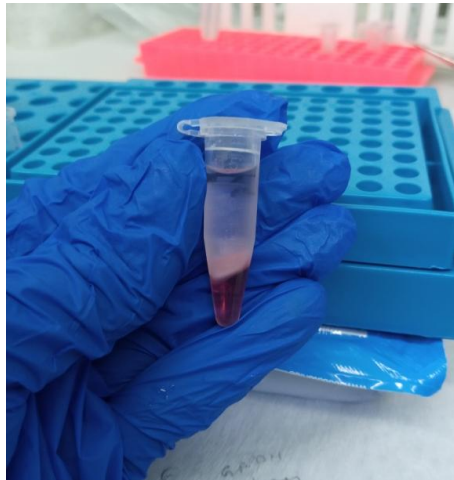
Steril bistüri yardımıyla mekanik olarak küçük parçalara homojenize edilen ovaryumlar besiyeri ile birlikte steril 1.5 mL'lik ependorf tüpler içerisine alınarak 1000g de 2 dakika santrifüj edildi.

Süpernatant atılarak, ependorf tüpü içerisinde kalan pelletin üzerine; Ca^{2+} ve Mg^{2+} içermeyen PBS eklendi ve 1.000g de 2 dakika santrifüj yapılarak yıkama işlemi gerçekleştirildi. Bu işlem 2 defa tekrarlandı. Yıkama işlemi sonrasında ovaryumlardan total RNA izolasyonu PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen, Kat. No: 12183018A) kullanılarak yapıldı.

Kit içerisinde bulunan Lysis Buffer'dan 600 μ l alındı ve üzerine 10 μ l 2-Merchптоethanol eklenerek lizis karışımı oluşturuldu. Ovaryumlar lizis karışımı içerisine alınarak, 2.600 g de oda ısısında 20 dakika santrifüj edildi.

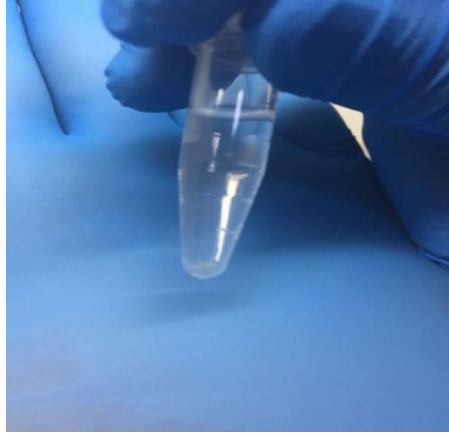
Nükleoprotein komplekslerinin tamamen ayrıştırılması için santrifügasyon sonrası lizat üzerine 750 μ l Trizol eklenerek oda ısısında 5 dakika bekletildi. Ardından 0.2 mL kloroform eklenerek 15 saniye elde çalkalama işlemi gerçekleştirildi ve lizat oda ısısında 3 dk. bekletildi. 12.000'de 4°C'de 15dakika santrifüj edildi.

Santrifügasyon sonrası lizat tüp içerisinde; en altta kırmızı fenol-kloroform fazı, ara faz ve RNA içeren renksiz üst faz olmak üzere 3 faza ayrıldı (**Resim 3**).



Resim 3. Trizol ve Faz Oluşumu

RNA içeren renksiz üst fazdan ~600 µl alınarak yeni RNaz içermeyen steril ependorf tüpü içerisine aktarıldı. Üzerine aynı miktarda %70'lik Etanol (EtOH) eklenerek pipetaj yapıldı ve vorteks yardımıyla iyice karışması sağlandı (**Resim 4**).



Resim 4. RNA içeren saydam faz + EtOH

700 µl lizat alınarak spin kolona aktarıldı ve 12.000 g de oda ısısında 15 saniye santrifüj edildi. Bu işlem tüm lizatın spin kolondan geçirilmesine kadar tekrar edildi.

Santrifügasyon sonrası spin kolona bağlanan RNA üzerine 700 µl Wash Buffer I eklenerek 12.000 g de oda ısısında 15 saniye santrifüj edildi.

Daha sonra Wash Buffer II'den 500 µl eklenerek 12.000 g de oda ısısında 15 saniye santrifüj edildi. Yıkama işlemleri iki kez tekrar edildi.

Spin kolon boş bir şekilde 12.000 g de oda ısısında 1 dakika santrifüj edilerek RNA bağlanmış olan membranın kuruması sağlandı.

Spin kolona 100 µl RNaz içermeyen su eklenerek oda ısısında 1 dakika bekletildi. Ardından 12.000 g de oda ısısında 2 dakika santrifüj yapılarak membrana bağlanmış olan RNA'nın toplama tüpü içerisine geçmesi sağlandı.

Ovaryumlardan elde edilen RNA'nın kalitatif ve kantitatif analizleri spektrofotometrik olarak MaestroGen cihazı kullanılarak yapıldı.

3.4.2. Total RNA'dan Komplementer DNA (cDNA)'nın Sentezi

Elde edilen RNA'ların hemen The High Capacity RNA-to-cDNA™ (4368814, Invitrogen) kiti kullanılarak cDNA çevirimleri gerçekleştirildi. Kit protokolüne göre; 2 µl 10X RT tamponu, 2 µl 10X Random primer, 0.8 µl 25X dNTP, 1 µl Multiscribe enzim, 4.2 µl ultra saf su ve 10 µl total RNA kullanılarak 20 µL hacimde reaksiyon kuruldu (**Tablo 5**).

Kullanılan Madde	Miktarı (μL)
10X RT buffer	2
10X Random primer	2
25X dNTP	0.8
Multiscribe enzim	1
Ultra saf su	4.2
Total RNA	10

Tablo 5. cDNA sentezi için hazırlanan reaksiyon karışımı.

Her reaksiyon başına 1 μg total RNA eklenerek 25°C de 10 dakika, 37 °C de 120 dakika, 85°C de 5 dakika bekletildi ve tüm RNA örneklerinden cDNA çevrimleri yapıldı (**Tablo 6**).

	1. Basamak	2. Basamak	3. Basamak	4. Basamak
Sıcaklık (°C)	25	37	85	4
Süre (dakika)	10	120	5	

Tablo 6. cDNA sentez basamakları.

3.4.3. qRT-PCR Analizi

Elde edilen cDNA'lar PCR reaksiyonlarında eşit konsantrasyonlarda (10 ng) kalıp olarak kullanılarak total hacim 20 μl olacak şekilde Power SYBR™ Green PCR Master Mix (4367659, Thermo scientific), 500 nM'lik forward ve reverse primer karışımı (**Tablo 7**) ve ultra saf su eklenerek reaksiyon karışımı hazırlandı (**Tablo 8**).

Gen	Forward primer dizi (5'-3')	Reverse primer dizi (5'-3')
VDAC2	AGAGAAGTGGAACACCGATAAC	CAGCCCTCGTAACCAAAGACA
LC3B	TTATAGAGCGATACAAGGGGGAG	CGCCGTCTGATTATCTTGATGAG
SIRT6	ATGTCGGTGAATTATGCAGCA	GCTGGAGGACTGCCACATTA

Tablo 7. qRT-PCR için kullanılan primerler.

Kullanılan Madde	Miktar (μL)
Power SYBR™ Green PCR Master Mix	10
Forward-reverse primer	1.5
Cdna	2
Ultra saf su	6.5

Tablo 8. qPCR için hazırlanan reaksiyon karışımı

Her bir gen için hazırlanan karışımlar MicroAmp™ Fast Optical 96-Well Reaction Plate (4346906, Applied Biosystems) üzerindeki kuyucuklara konularak amplifikasyon işlemi yapıldı (**Tablo 9**). Amplifikasyonun sonunda gen ekspresyonunda meydana gelen değişikliklerin miktarını (kat cinsinden) belirlemek amacıyla GAPDH referans geni kullanılarak relatif kantitasyon analizleri StepOnePlus qPCR (4376600, Applied Biosystems) cihazı ile gerçekleştirildi.

Basamak	AmpliTaq Gold		
	DNA Polimeraz		PCR
	aktivasyonu		
	İlk denatürasyon	Döngü (40)	
		Denatürasyon	Bağlanma/Uzama
Sıcaklık (°C)	95	95	60
Zaman	10 dakika	15 saniye	1 dakika

Tablo 9. qPCR amplifikasyon basamakları

4. BULGULAR

4.1. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Deneylerin sonlandırılmasından sonra, servikal dislokasyon ile sakrifiye edilen hayvanlardan alınan ovaryum dokularının immünohistokimyasal ve histopatolojik değerlendirmeleri ışık mikroskobu altında yapıldı. Hiç boyanmayan (0), hafif boyanan (1), orta boyanan (2) ve şiddetli boyanan (3) olarak değerlendirilmesi yapıldıktan sonra H-skor hesaplaması sonucundan elde edilen verilere göre istatistiksel analiz yapıldı ($H\text{-skor} = \sum_{i=1}^n P_i (i+1)$).

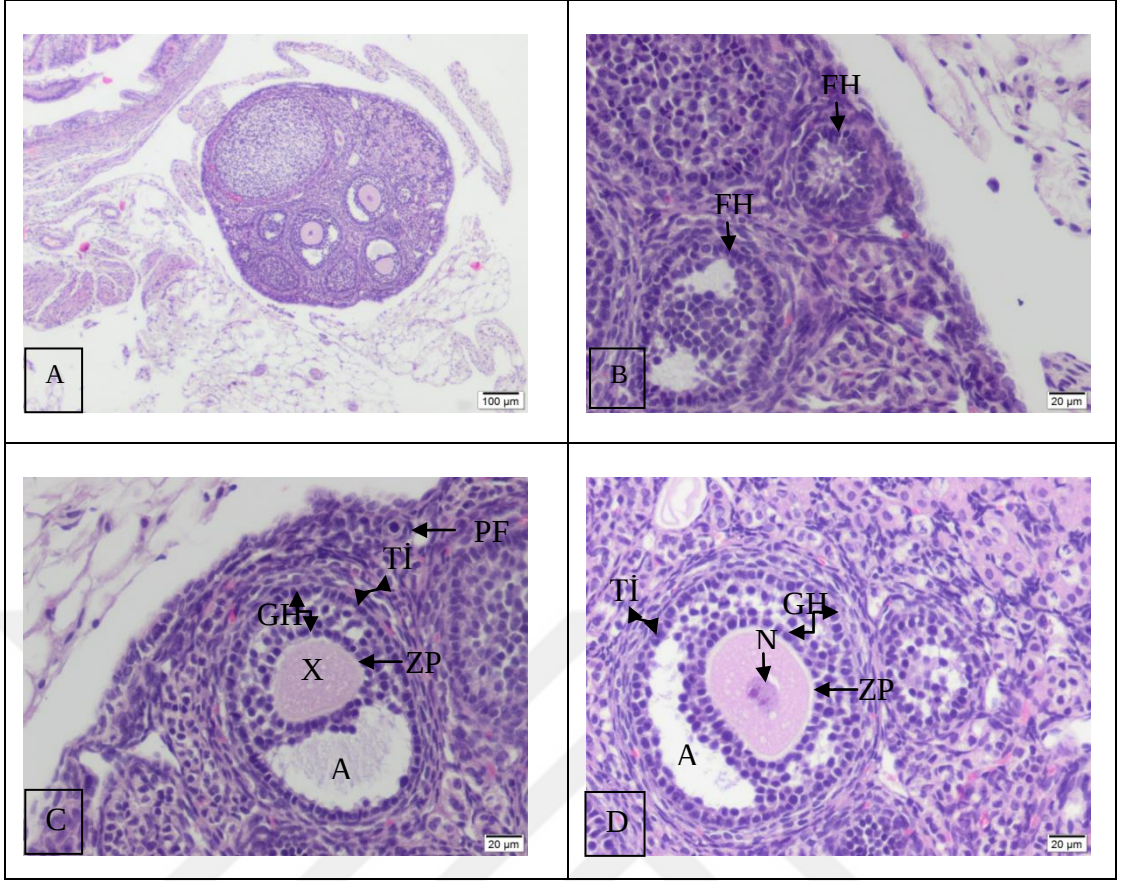
4.1.1. Hematoksilen Eozin Bulguları

Kontrol, sham, düşük doz ve yüksek doz gruplarına ait ovaryum dokularının hematoksilen eozin boyamaları ışık mikroskobu altında incelendi.

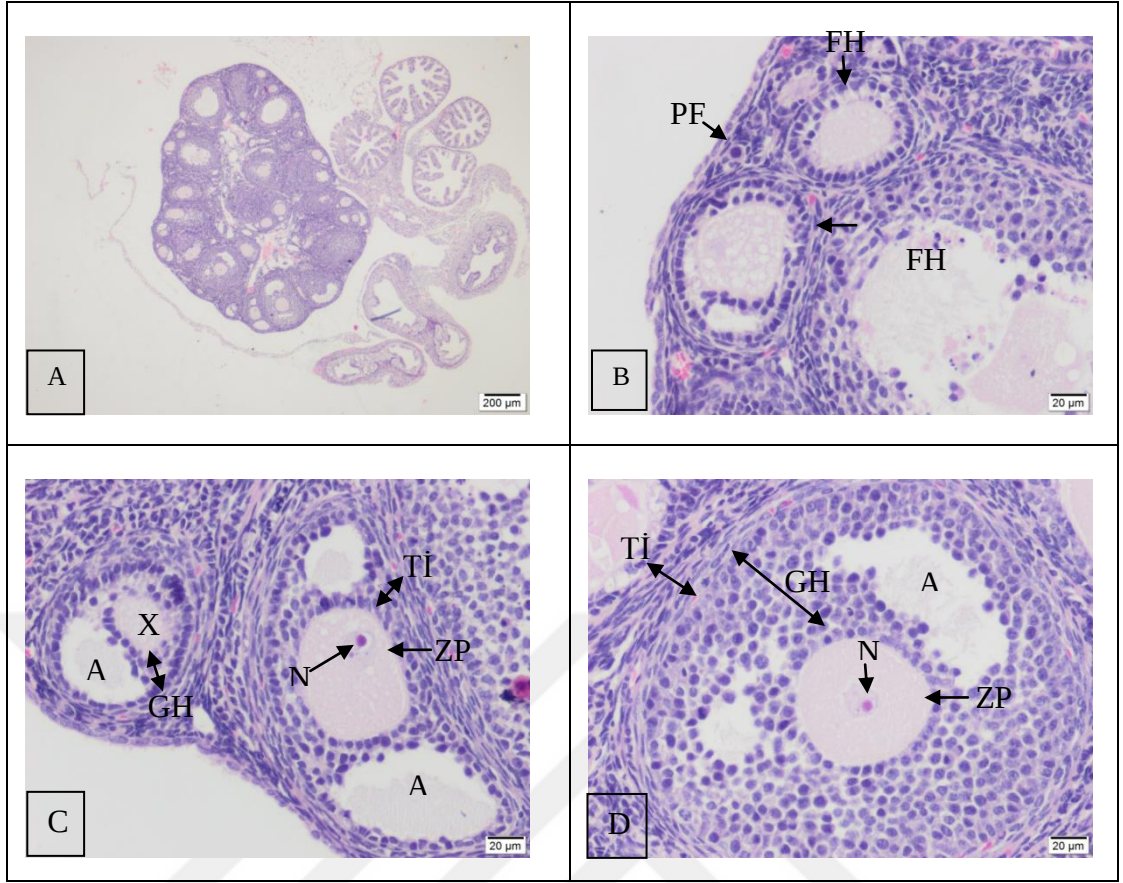
Kontrol (**Resim 5**), sham (**Resim 6**), düşük FSH+HCG (**Resim 7**), ve yüksek doz FSH+HCG (**Resim 8**) gruplarında ovaryum dokusu dışarıdan (korteks) tek katlı kübik germinal epitel ile sarılı, hemen altında gevşek bağ dokusu yapısında tunika albugineanın yer aldığı izlenmektedir.

Ovaryumun korteks tabakasında gelişen foliküllerden; en dışta oositin etrafını tek katlı yassı epitel ile çevrili primordiyal foliküller, tek katlı kübik epitelle çevrili primer foliküller, iki tabakalı teka hücreleri ile çevrili ve antruma sahip sekonder foliküller, belirgin bir antrum yapısı, korona radiata ve kumulus ooforus ile karakterize olan graaf folikülleri yer almaktadır.

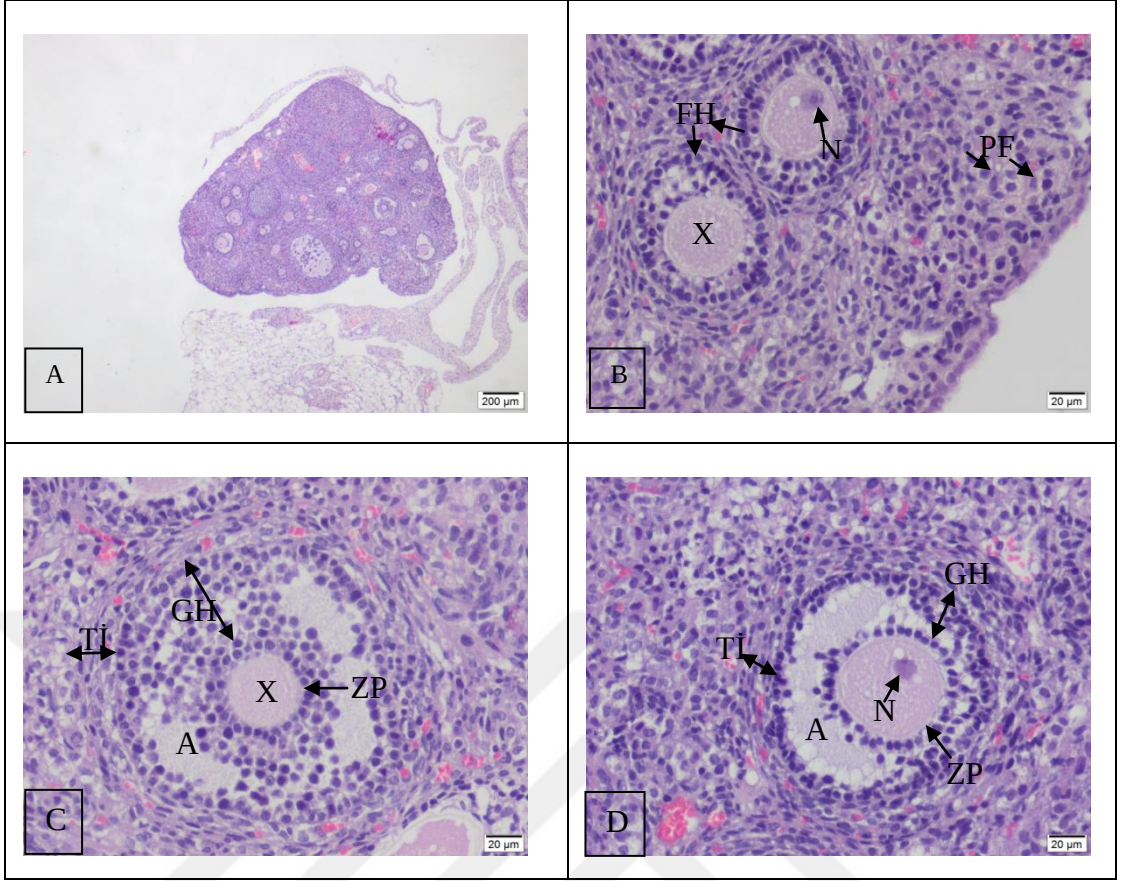
Ovaryumun medulla kısmında ise kan damarları ile ovaryum stroması ayırt ediliyordu.



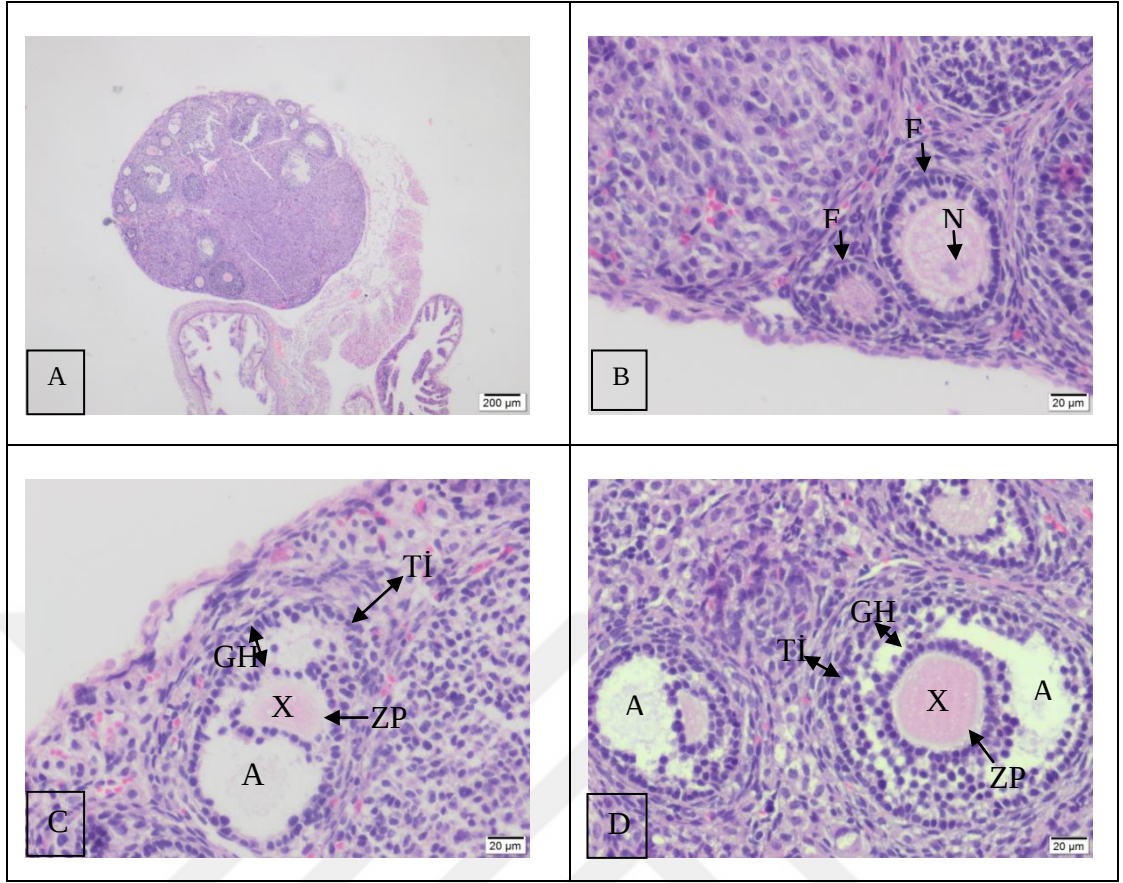
Resim 5. Kontrol grubu foliküllerin hematoxilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü. A: Ovaryumdaki foliküllerin panoramik görüntüsü (100µm). B: Ovaryumdaki primer folikül ve folikül hücrelerinin (FH) görünümü (20µm). C: Tek tabakalı yassı foliküllerden oluşan primordiyal foliküllerin(PF) ve sekonder foliküldeki granüloza hücreleri (GH), zona pellusida (ZP), teka interna (Tİ), antrum (A) ve nükleusu olmayan oositin (X) görünümü (20µm). D: Graaf folikül ve granüloza hücreleri (GH), teka interna (Tİ), zona pellusida (ZP), antrum (A) ve nükleuslu oositin (N) görünümü (20µm).



Resim 6. Sham grubu foliküllerin hematoksilin eozin boyamasının histolojik görüntüsü. A: Ovaryumdaki foliküllerin panoramik görüntüsü (200µm). B: Ovaryumdaki tek tabakalı yassı foliküllerden oluşan primordiyal foliküllerin(PF) ve primer folikül hücrelerinin (FH) görünümü (20µm). C: Sekonder folikül ve foliküldeki granüloza hücreleri (GH), zona pellusida (ZP), teka interna (Tİ), antrum (A), nükleusu olmayan oosit (X) ve nükleuslu ositin(N) görünümü (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücreleri (GH), teka interna (Tİ), zona pellusida (ZP), antrum (A) ve nükleuslu oositin (N) görünümü (20µm).

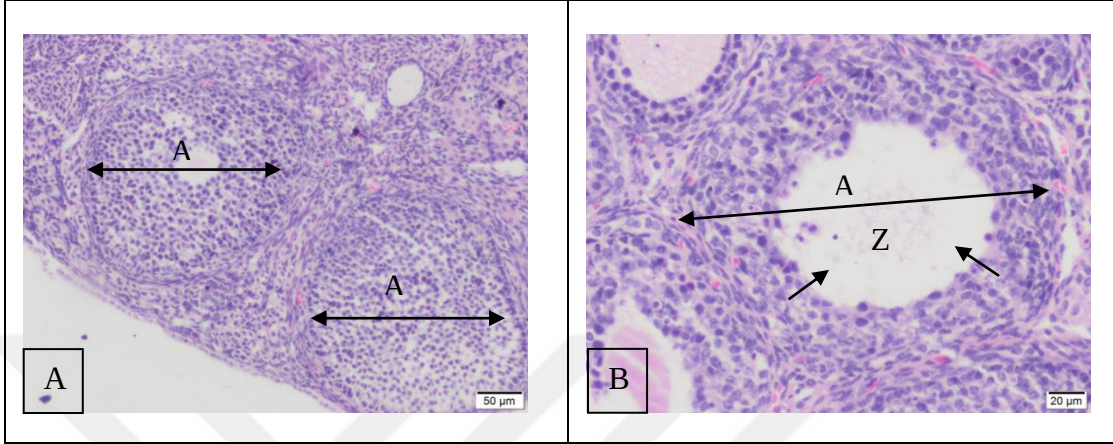


Resim 7. Düşük doz FSH+HCG grubu foliküllerin hematoxilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü. A: Ovaryumdaki foliküllerin panoramik görüntüsü (200µm). B: Ovaryumdaki tek tabakalı yassı foliküllerden oluşan primordiyal foliküllerin(PF) ve primer folikül hücreleri (FH), nükleusu olmayan (X) ve nükleuslu oositin görünümü (20µm). C: Sekonder folikül ve foliküldeki granüloza hücreleri (GH), zona pellusida (ZP), teka interna (Tİ), antrum (A), nükleusu olmayan oosit (X) görünümü (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücreleri (GH), teka interna (Tİ), zona pellusida (ZP), antrum (A) ve nükleuslu oositin (N) görünümü (20µm).

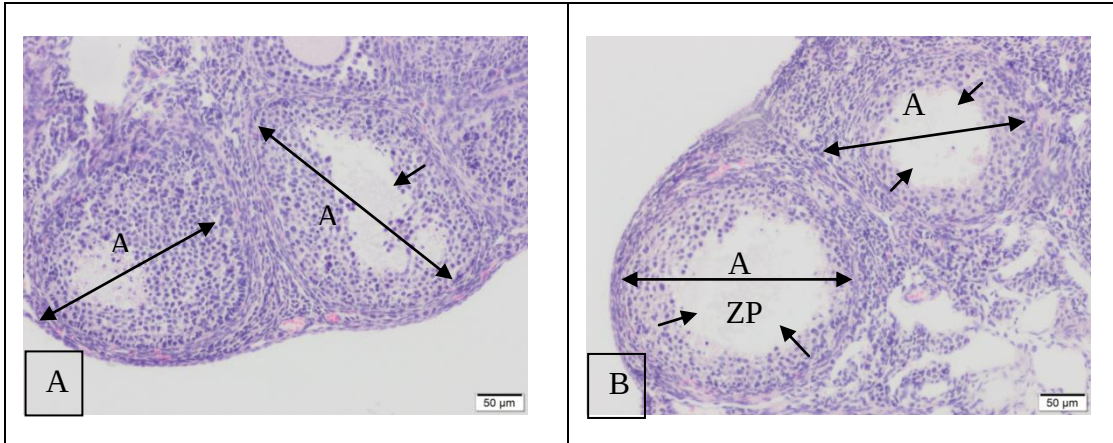


Resim 8. Yüksek doz FSH+HCG grubu foliküllerin hematoxilen eozin boyamasının histolojik görüntüsü. A: Ovaryumdaki foliküllerin panoramik görüntüsü (200µm). B: Ovaryumdaki primer folikül hücreleri (FH) ve nükleuslu oositin görünümü (20µm). C: Sekonder folikül ve foliküldeki granüloza hücreleri (GH), zona pellusida (ZP), teka interna (Tİ), antrum (A), nükleusu olmayan oosit (X) görünümü (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücreleri (GH), teka interna (Tİ), zona pellusida (ZP), antrum (A) ve nükleusu olmayan oositin (N) görünümü (20µm).

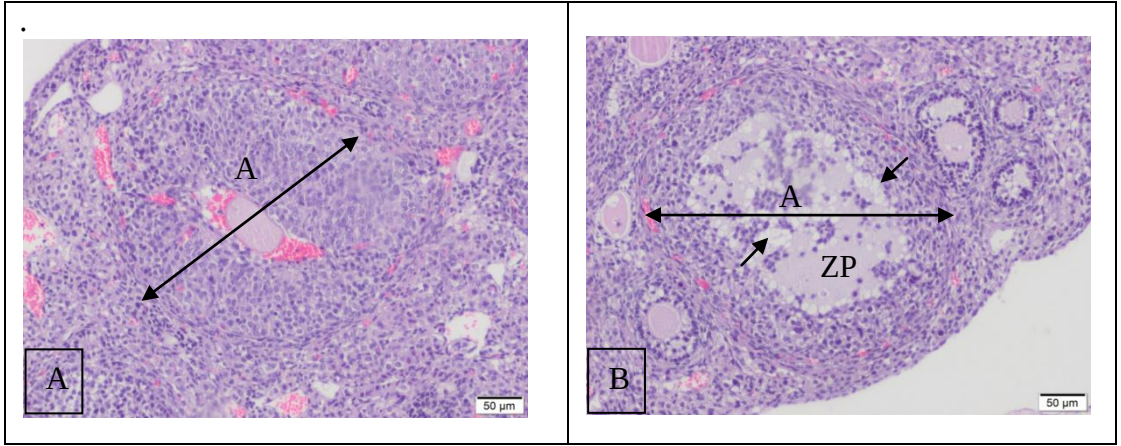
Kontrol (**Resim 9**), sham (**Resim 10**), düşük doz FSH+HCG (**Resim 11**) ve yüksek doz FSH+HCG (**Resim 12**) gruplarındaki ovaryum foliküllerinin çoğunun granüloza hücre apoptozunun aracılık ettiği ovaryan foliküler atrezi ile dejenere olup kaybolduğu görüldü. Sekonder folikül ve Graaf foliküllerde apoptoz sonucunda foliküler atrezi meydana geldi.



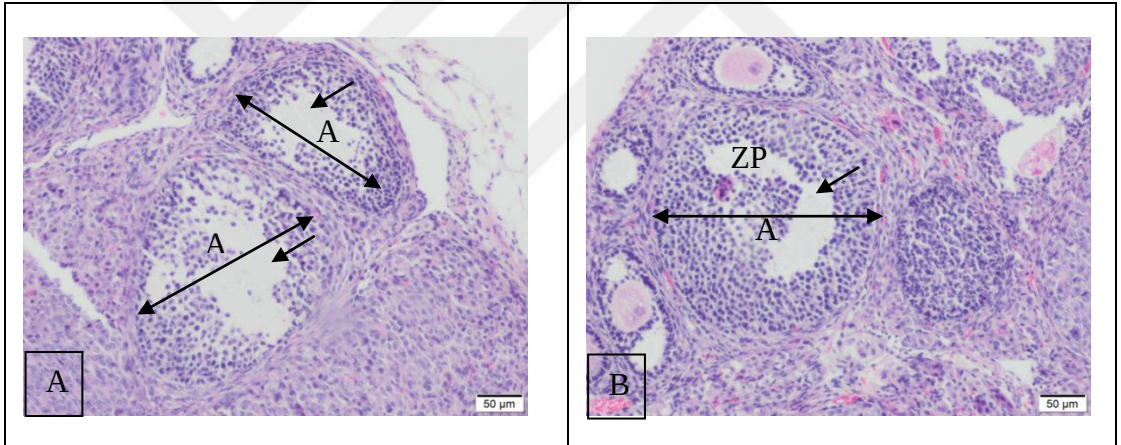
Resim 9. Kontrol grubundaki sekonder folikül ve Graaf foliküllerdeki atretik foliküllerin hematoksilin eozin boyamasının histolojik görüntüsü. A: Folikülün zona pellusida kalıntıları bulunmamakta (50µm). B: Zona pellusida(ZP) kalıntıları ve camsı membran (→) bulunmakta (20µm).



Resim 10. Sham grubundaki sekonder folikül ve Graaf foliküllerdeki atretik foliküllerin hematoksilin eozin boyamasının histolojik görüntüsü. A: Folikülün zona pellusida kalıntıları görülmekte (50µm). B: Zona pellusida(ZP) kalıntıları ve camsı membran (→) bulunmakta (50µm).



Resim 11. Düşük doz FSH+HCG grubundaki sekonder folikül ve Graaf foliküllerdeki atretik foliküllerin hematoksilin eozin boyamasının histolojik görüntüsü. A: Folikülün zona pellusida kalıntıları görülmekte (50µm). B: Zona pellusida(ZP) kalıntıları ve camısı membran (→)bulunmakta (50µm).

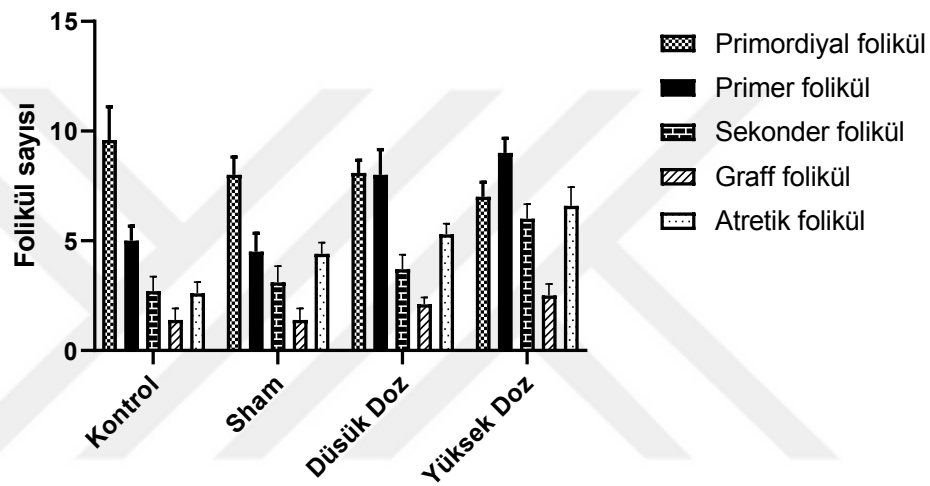


Resim 12. Yüksek doz FSH+HCG grubundaki sekonder folikül ve Graaf foliküllerdeki atretik foliküllerin hematoksilin eozin boyamasının histolojik görüntüsü. A: Folikülün zona pellusida kalıntıları görülmekte (50µm). B: Zona pellusida(ZP) kalıntıları ve camısı membran (→)bulunmakta (50µm).

4.1.2. Folikül Sayısı Bulguları

Kontrol, sham, düşük doz ve yüksek doz gruplarına ait ovaryum dokularının hematoxilen eozin boyamalarının ışık mikroskobu altında incelemesi sonucunda, kontrol ve sham grubunda gelişen folikül tiplerinin hemen hemen hepsi gözlenirken, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG grubuna ait ovaryumlarda gelişen foliküllerin daha az olduğu görüldü.

Seri kesitlerden yapılan toplam folikül sayımı sonuçlarına göre; istatistiksel olarak kontrol, sham, düşük doz ve yüksek doz grupları karşılaştırıldı (**Şekil 21**) (**Tablo 10**).

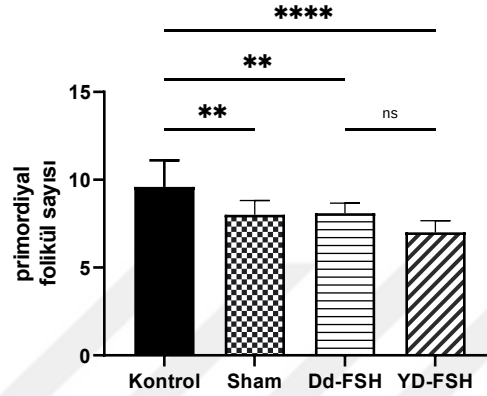


Şekil 21. Ovaryumlardaki toplam folikül sayısı grafiği.

	Kontrol	Sham	Düşük doz FSH+HCG	Yüksek doz FSH+HCG
Primordiyal folikül	9,6 ± 1,43	8 ± 0,77	8,1 ± 0,54	7 ± 0,63
Primer folikül	5 ± 0,63	4,5 ± 0,81	8 ± 1,10	9 ± 0,63
Sekonder folikül	2,7 ± 0,64	3,1 ± 0,70	3,7 ± 0,63	6 ± 0,64
Graaf folikül	2,5 ± 0,50	2,1 ± 0,30	1,4 ± 0,49	1,4 ± 0,49
Atretik folikül	2,6 ± 0,49	4,4 ± 0,49	5,3 ± 0,45	6,6 ± 0,80

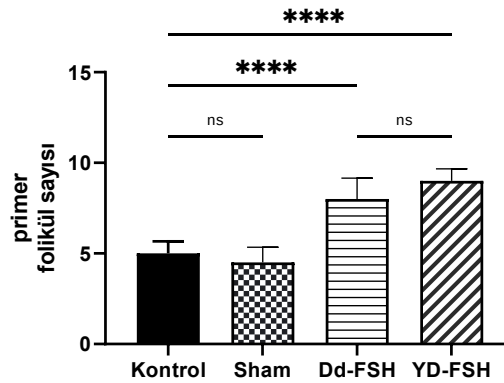
Tablo 10. Kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarındaki folikül sayılarının H-skor değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.

Ovaryumlardaki primordiyal folikül sayısı sonuçlarına göre; kontrol grubu ($9,6 \pm 1,42$) ile sham grubu ($8 \pm 0,77$) ve düşük doz FSH+HCG grubu ($8,1 \pm 0,53$) kıyaslandığında az bir fark gözlemlendi. Kontrol grubu ($9,6 \pm 1,42$) ile yüksek doz FSH+HCG grubu ($7 \pm 0,63$) kıyaslandığında da anlamlı bir fark olduğu görüldü. Fakat düşük doz FSH+HCG ($8,1 \pm 0,53$) ve yüksek doz FSH+HCG grupları ($7 \pm 0,63$) kıyaslandığında anlamlı bir değişim olmadığı görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 22).



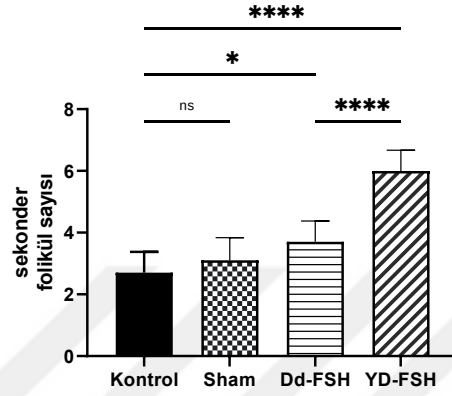
Şekil 22. Ovaryumlardaki primordiyal folikül sayısının grafiği.

Primer folikül sayısı sonuçlarına göre; kontrol grubu ($5 \pm 0,63$) ile sham grubu ($4,5 \pm 0,80$) arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Düşük doz FSH+HCG ($8 \pm 1,09$) ve yüksek doz FSH+HCG gruplarında ($9 \pm 0,63$), kontrol grubuna ($5 \pm 0,63$) kıyasla anlamlı bir artış olduğu görüldü. Fakat düşük doz FSH+HCG ($8 \pm 1,09$) ve yüksek doz FSH+HCG grupları ($9 \pm 0,63$) arasında fark olmadığı görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 23).



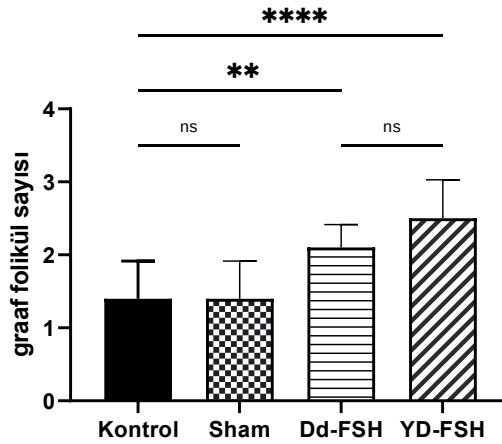
Şekil 23. Ovaryumlardaki primer folikül sayısının grafiği.

Sekonder folikül sayısı sonuçlarına göre; kontrol ($2,7 \pm 0,64$) ve sham grubu ($3,1 \pm 0,7$) arasında fark gözlenmedi. Düşük doz FSH+HCG grubunda ($3,7 \pm 0,63$) kontrol grubuna ($2,7 \pm 0,64$) kıyasla az bir artış olduğu gözlenirken, yüksek doz FSH+HCG grubu ($6 \pm 0,64$) ile kontrol grubu ($2,7 \pm 0,64$) arasında anlamlı bir artış gözlemlendi. Yüksek doz FSH+HCG grubunda ($6 \pm 0,64$) düşük doz FSH+HCG grubuna ($3,7 \pm 0,63$) kıyasla anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p < 0,05$) (Şekil 24).



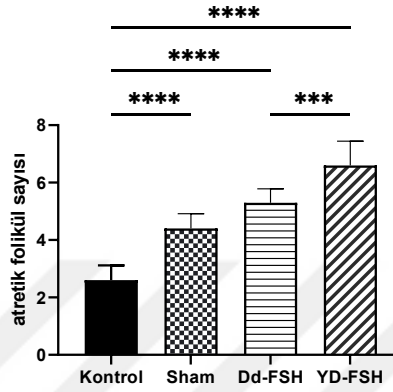
Şekil 24. Ovaryumlardaki sekonder folikül sayısı grafiği.

Graaf folikül sayısı sonuçlarına göre; kontrol grubu ($1,4 \pm 0,49$) ile sham grubu ($1,4 \pm 0,49$) arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Düşük doz FSH+HCG grubunda ($2,1 \pm 0,30$) kontrol grubuna ($1,4 \pm 0,49$) kıyasla anlamlı bir artış gözlemlendi. Yine yüksek doz FSH+HCG grubu ($2,5 \pm 0,50$) ile kontrol grubu ($1,4 \pm 0,49$) kıyaslandığında anlamlı bir artış olduğu görüldü. Düşük doz FSH+HCG ($2,1 \pm 0,30$) ve yüksek doz FSH+HCG grupları ($2,5 \pm 0,50$) kıyaslandığında ise bir fark gözlenmedi ($p < 0,05$) (Şekil 25).



Şekil 25. Ovaryumlardaki Graaf folikül sayısı grafiği.

Ovaryumlardaki atretik folikül sayısı sonuçlarına göre; kontrol ($2,6 \pm 0,48$) ile düşük doz FSH+HCG ($5,3 \pm 0,45$) ve yüksek doz FSH+HCG grubu ($6,6 \pm 0,8$) kıyaslandığında anlamlı bir artış ve yine düşük doz FSH+HCG ($5,3 \pm 0,45$) ile yüksek doz FSH+HCG grubu ($6,6 \pm 0,8$) kıyaslandığında anlamlı bir şekilde artış olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 26).



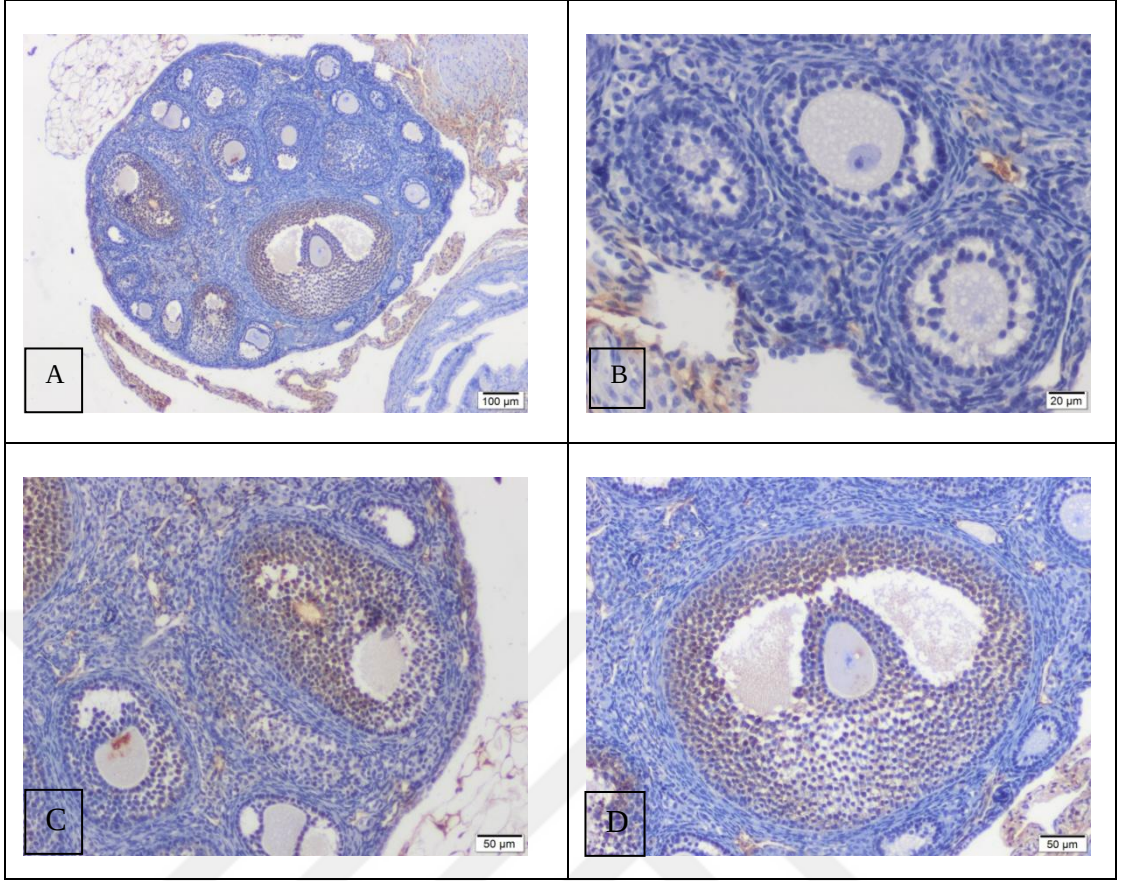
Şekil 26. Ovaryumlardaki atretik folikül sayısı grafiği.

4.2. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULARI

Tüm gruplara ait dişi farelerden alınan ovaryum dokularının immünohistokimyasal incelemesi sonuçları değerlendirildi.

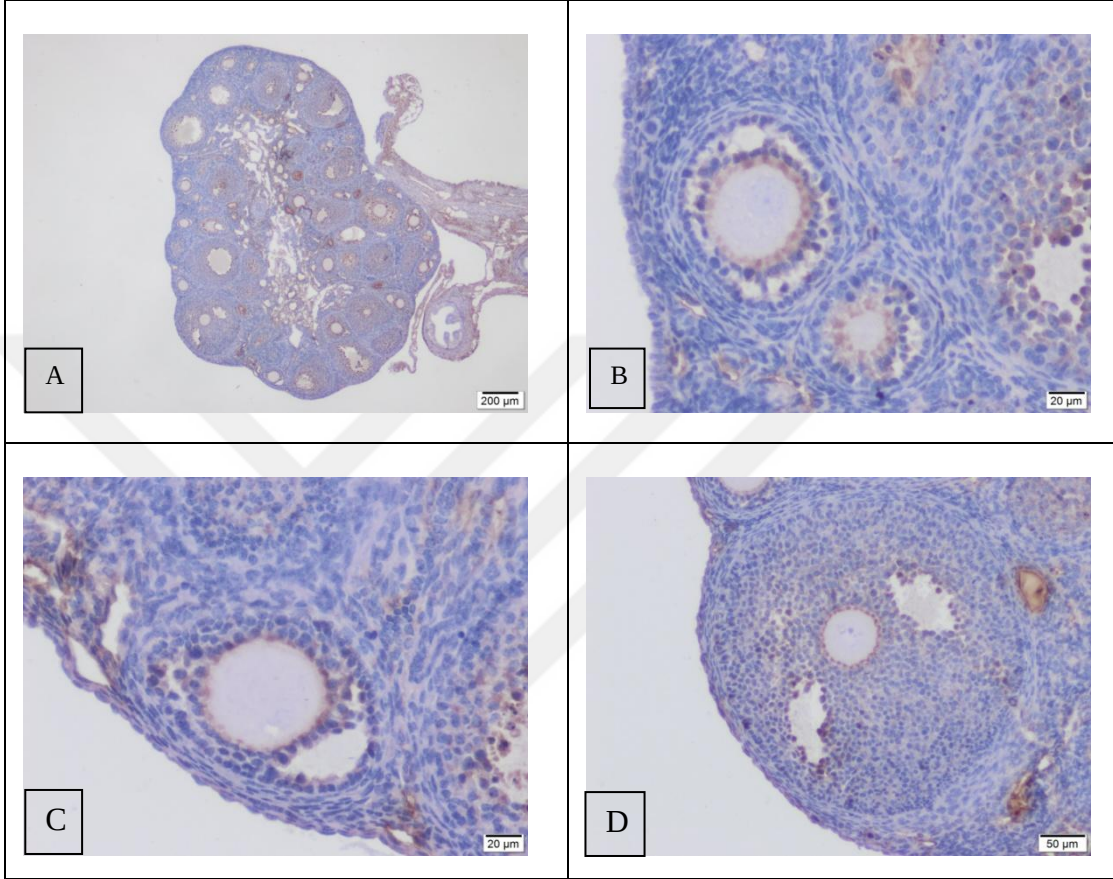
4.2.1. LC3B İmmünoreaktivitesi

Kontrol grubundaki LC3B immünoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (Şekil 27) granüloza hücrelerinde ($245,5 \pm 21,98$) Graaf foliküldeki (Şekil 28) granüloza hücrelerine ($252,4 \pm 24,79$) oranla ekspresyonun daha az olduğu gözlemlendi (Resim 13) (Tablo 11).



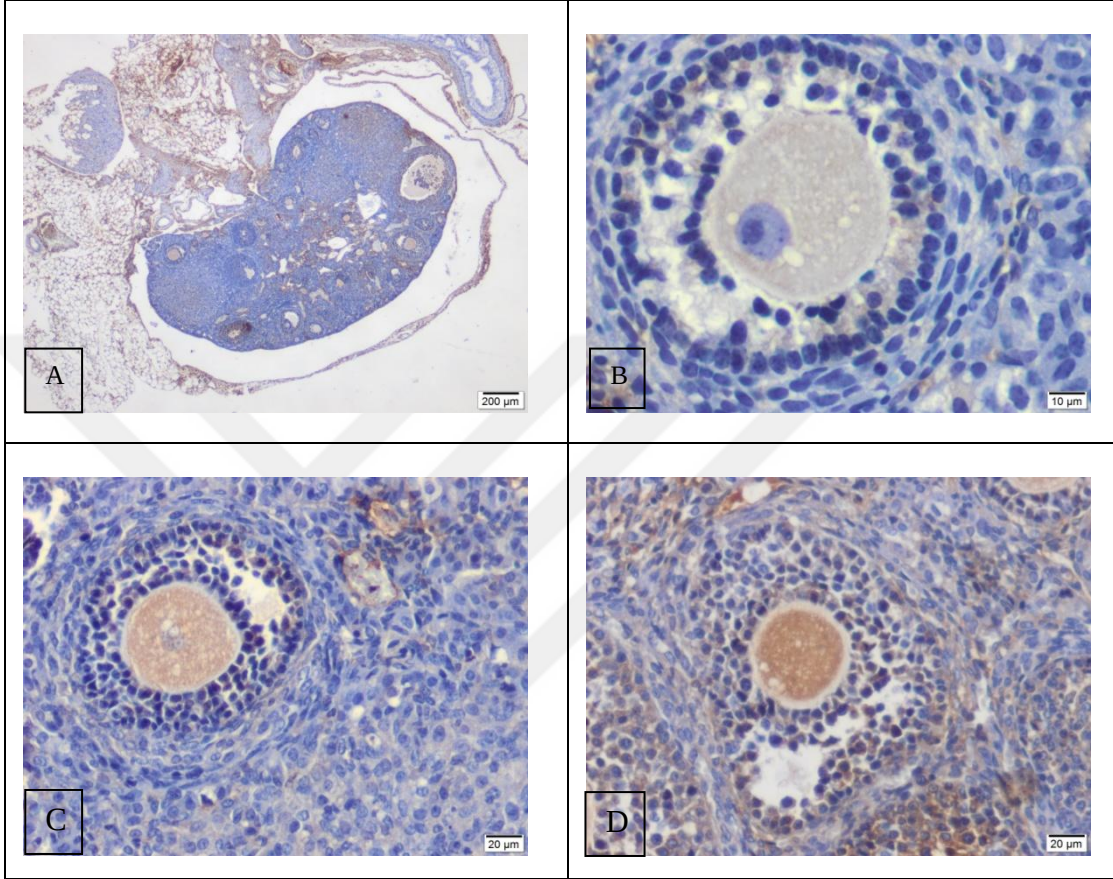
Resim 13. Kontrol grubu LC3B immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (100µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (20µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (50µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (50µm).

Sham grubundaki LC3B immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (Şekil 27) granüloza hücrelerinde ($220,4 \pm 16,85$) Graaf foliküldeki (Şekil 28) granüloza hücrelerine ($221,4 \pm 22,49$) oranla ekspresyonun daha az olduğu gözlemlendi (Resim 14) (Tablo 11).



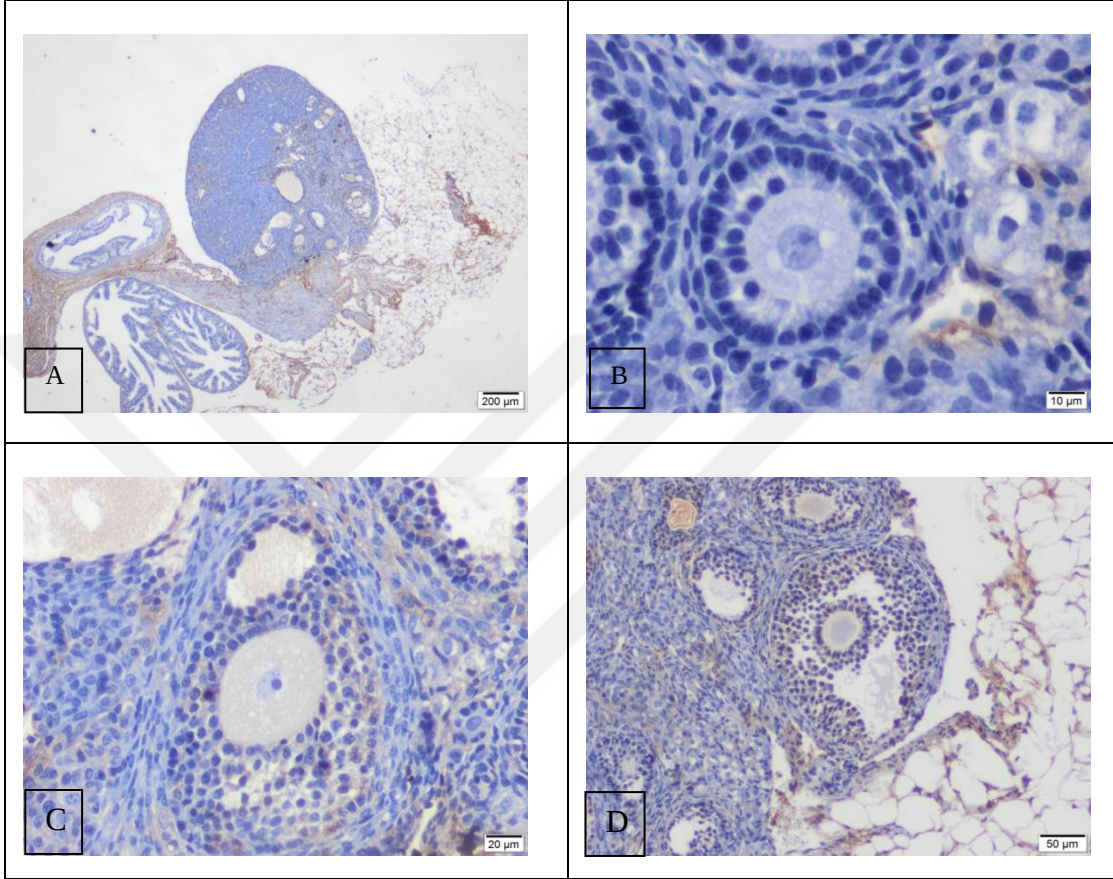
Resim 14. Sham grubu LC3B immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (200µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (20µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (50µm).

Düşük doz FSH+HCG grubundaki LC3B immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (Şekil 27) granüloza hücrelerinde ($225,6 \pm 9,80$) Graaf foliküldeki (Şekil 28) granüloza hücrelerine ($200,1 \pm 9,39$) oranla ekspresyonun artmış olduğu gözlemlendi (Resim 15) (Tablo 11).

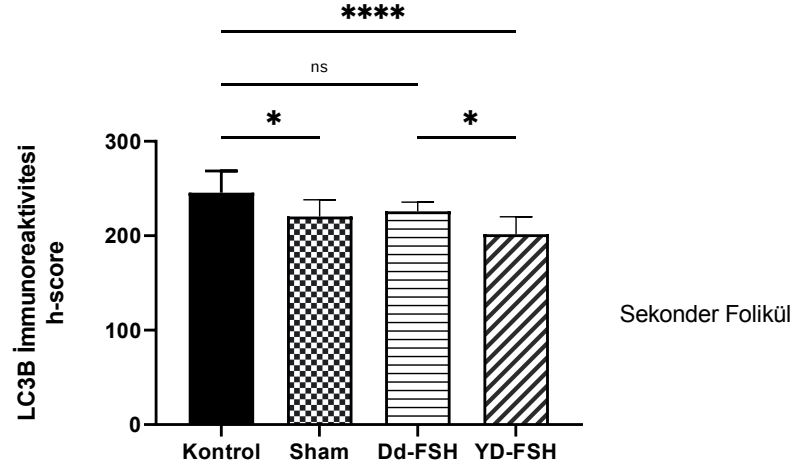


Resim 15. Düşük doz FSH+HCG grubu LC3B immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (200µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (10µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm).

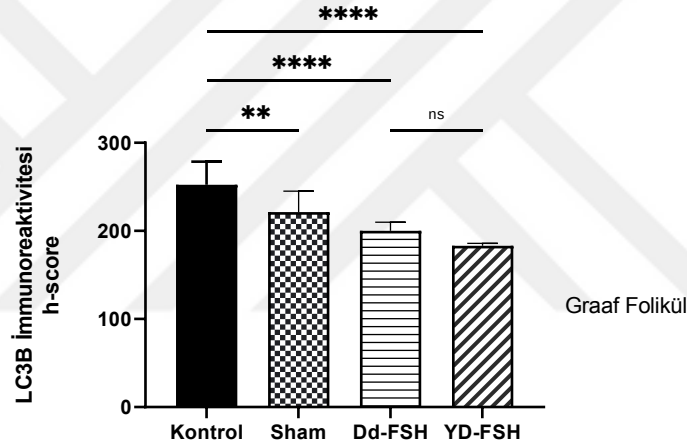
Yüksek doz FSH+HCG grubundaki LC3B immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (Şekil 27) granüloza hücrelerinde ($201,6 \pm 17,47$) Graaf foliküldeki (Şekil 28) granüloza hücrelerine ($183,2 \pm 2,52$) kıyasla ekspresyonun artmış olduğu gözlemlendi (Resim 16) (Tablo 11).



Resim 16. Yüksek doz FSH+HCG grubu LC3B immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (200µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (10µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (50µm).



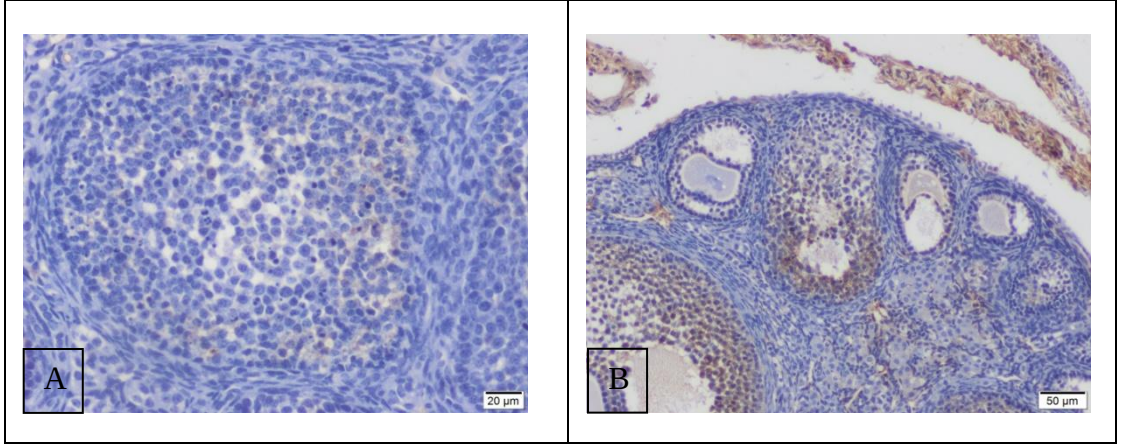
Şekil 27. LC3B immunoreaktivitesi sekonder folikül analiz grafiği.



Şekil 28. LC3B immunoreaktivitesi graaf folikül analiz grafiği.

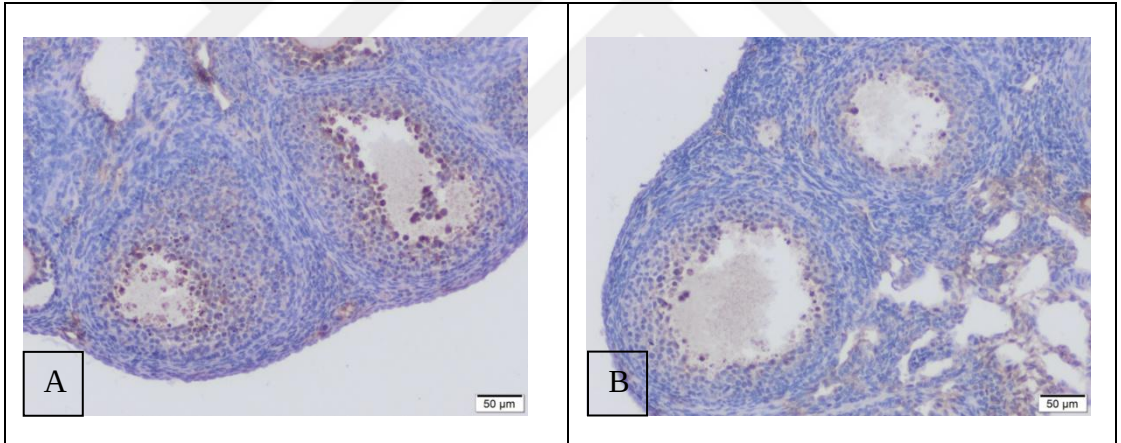
LC3B immunoreaktivitesi kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarında sekonder ve graaf foliküllerdeki granüloza hücrelerinin apoptozu sonucunda atreziye gittiği görüldü.

Kontrol grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($252,4 \pm 24,79$) (Şekil 30) ekspresyonun, atretik sekonder foliküllerdeki (Şekil 29) ($245,5 \pm 21,98$) ekspresyona kıyasla artmış olduğu gözlemlendi (Resim 17) (Tablo 11).



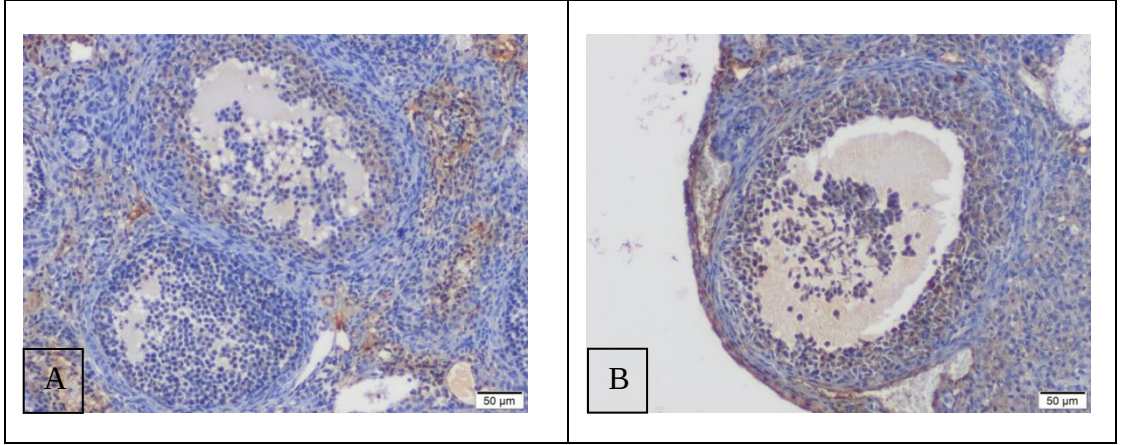
Resim 17. Kontrol grubu atretik foliküllerin LC3B immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (20µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm).

Sham grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($151,6 \pm 0,66$) (**Şekil 30**) ekspresyonun, atretik sekonder foliküllerdeki ($164,5 \pm 1,86$) (**Şekil 29**) ekspresyona kıyasla azalmış olduğu gözlemlendi (**Resim 18**) (**Tablo 11**).



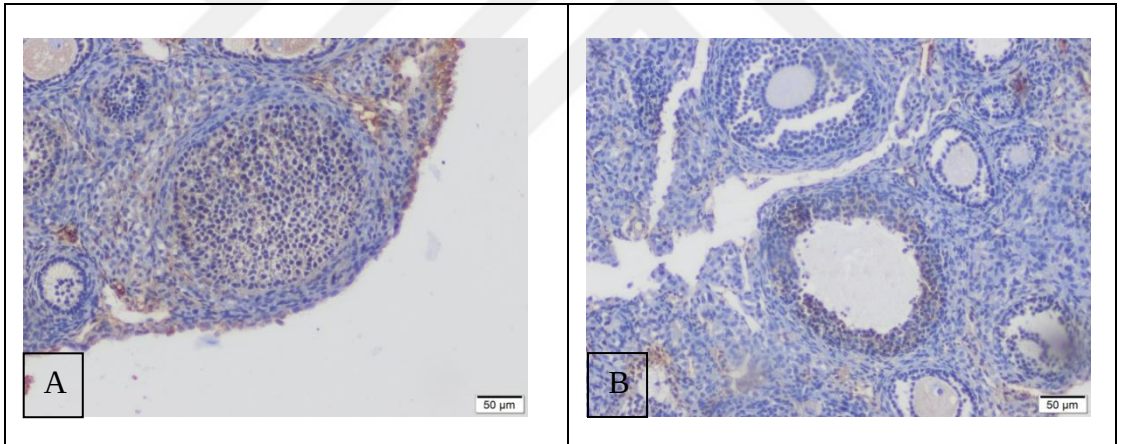
Resim 18. Sham grubu atretik foliküllerin LC3B immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm).

Düşük doz FSH+HCG grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($169,7 \pm 1,90$) (**Şekil 30**) ekspresyon, atretik sekonder foliküllerdeki ($153,6 \pm 0,92$) (**Şekil 29**) ekspresyona kıyasla artmış olduğu gözlemlendi (**Resim 19**) (**Tablo 11**).

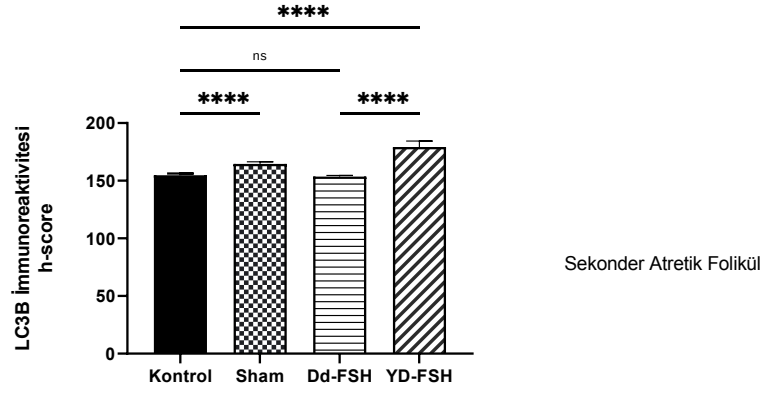


Resim 19. Düşük doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin LC3B immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm).

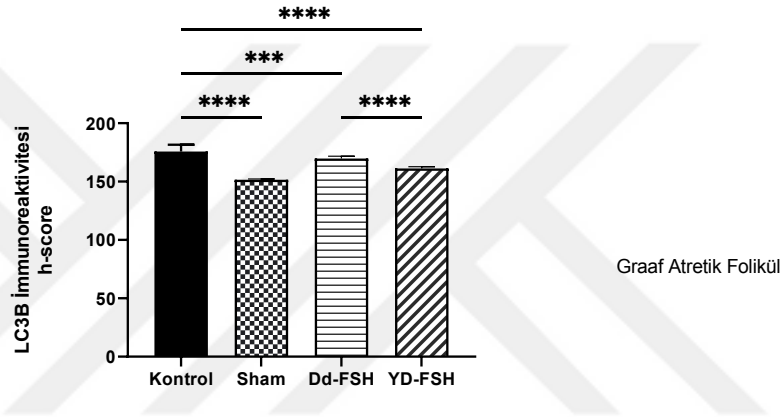
Yüksek doz FSH+HCG grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($161,3 \pm 1,42$) (**Şekil 30**) ekspresyon, atretik sekonder foliküllerdeki ($179,2 \pm 5,02$) (**Şekil 29**) ekspresyona kıyasla azalmış olduğu gözlemlendi (**Resim 20**) (**Tablo 11**).



Resim 20. Yüksek doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin LC3B immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm).



Şekil 29. LC3B immunoreaktivitesi sekonder atretik folikül analiz grafiği.



Şekil 30. LC3B immunoreaktivitesi Graaf atretik folikül analiz grafiği.

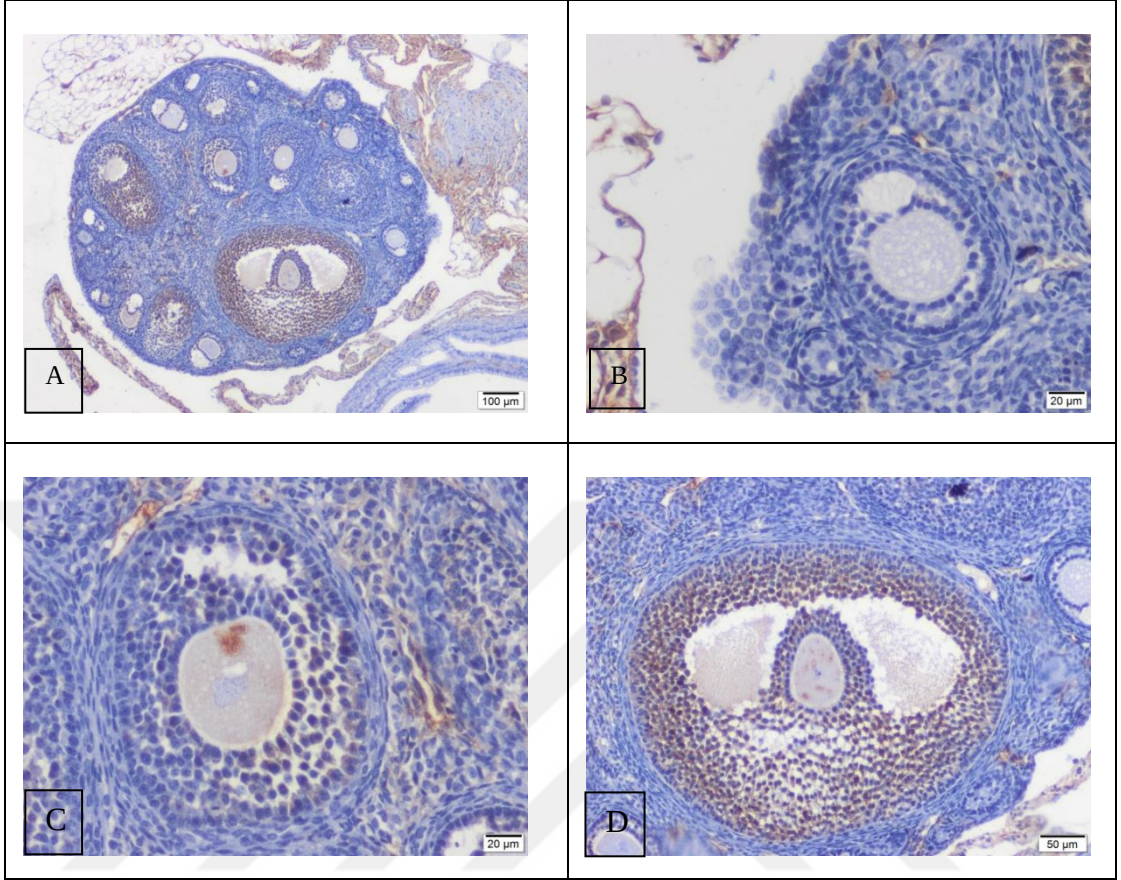
Foliküller		Kontrol	Sham	Düşük doz FSH+HCG	Yüksek doz FSH+HCG
LC3B	Sekonder	245,5 ± 21,98	220,4 ± 16,85	225,6 ± 9,80	201,6 ± 17,47
	Graaf	252,4 ± 24,79	221,4 ± 22,49	200,1 ± 9,39	183,2 ± 2,52
	Sekonder	154,8 ± 1,40	164,5 ± 1,86	153,6 ± 0,92	179,2 ± 5,02
	Graaf	175,7 ± 5,53	151,6 ± 0,66	169,7 ± 1,90	161,3 ± 1,42

Tablo 11. LC3B immunoreaktivitesinin kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarındaki sekonder, graaf ve atretik foliküllerin H-skor değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.

4.2.2. VDAC2 İmmünoreaktivitesi

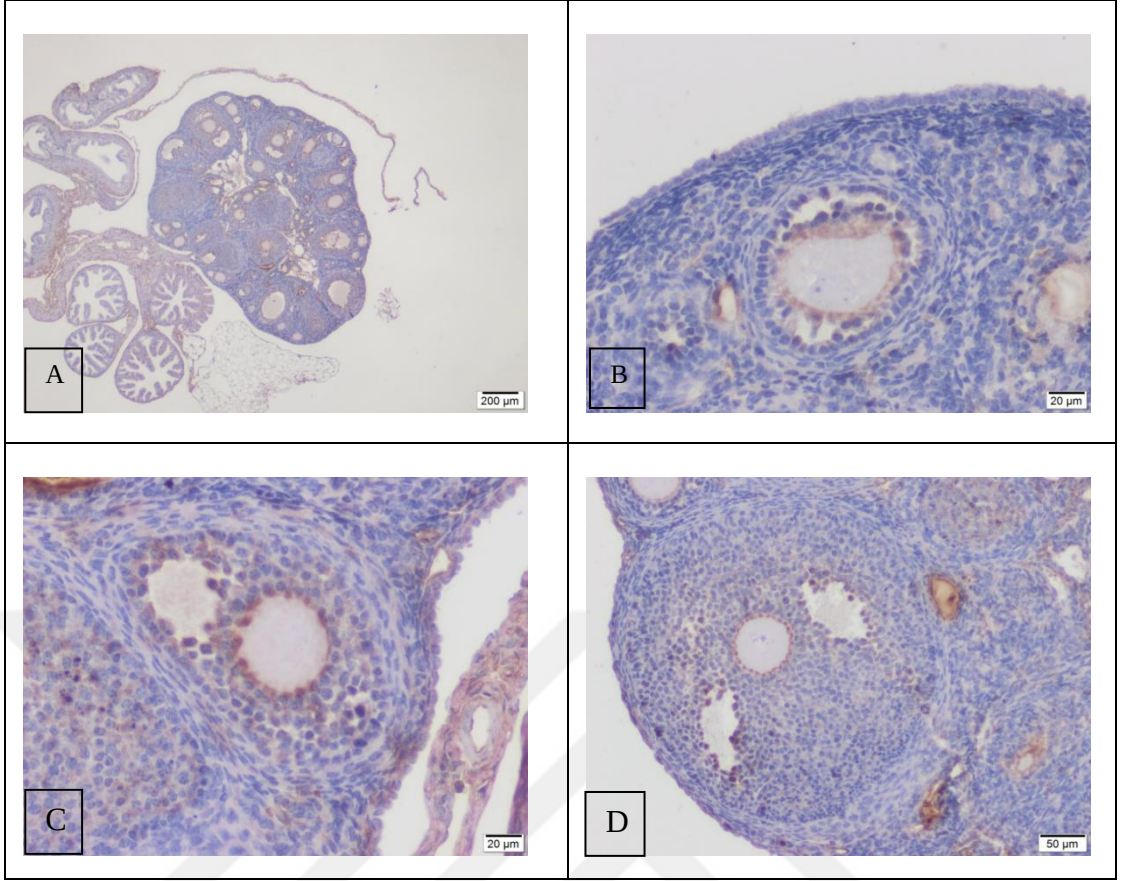
Kontrol grubundaki VDAC2 immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (**Şekil 31**) granüloza hücrelerinde ($270,2 \pm 7,72$) Graaf foliküldeki (**Şekil 32**) granüloza

hücrelerine ($271,6 \pm 12,08$) oranla ekspresyonun daha az olduğu gözlemlendi (**Resim 21**) (**Tablo 12**).



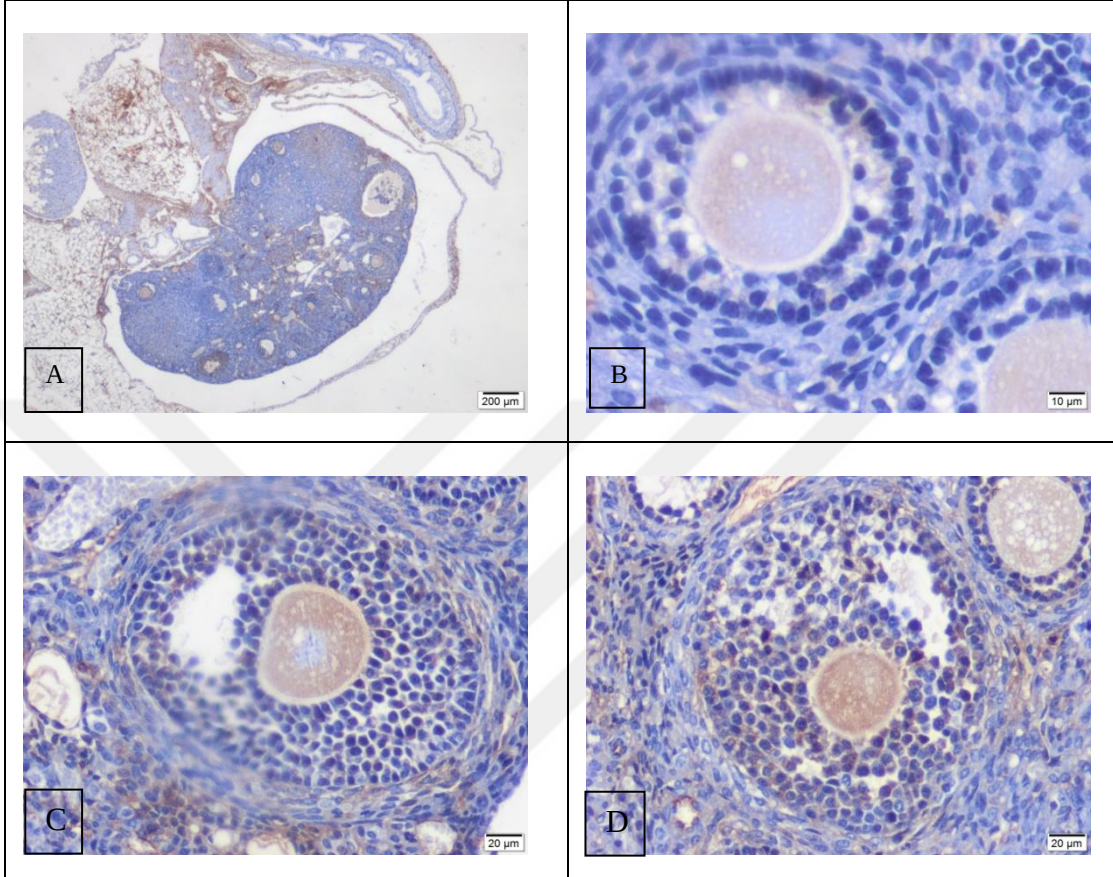
Resim 21. Kontrol grubu VDAC2 immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (100µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (20µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (50µm).

Sham grubundaki VDAC2 immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (**Şekil 31**) granüloza hücrelerinde ($269,7 \pm 12,99$) Graaf foliküldeki (**Şekil 32**) granüloza hücrelerine ($241,2 \pm 14,41$) oranla ekspresyonun artmış olduğu gözlemlendi (**Resim 22**) (**Tablo 12**).



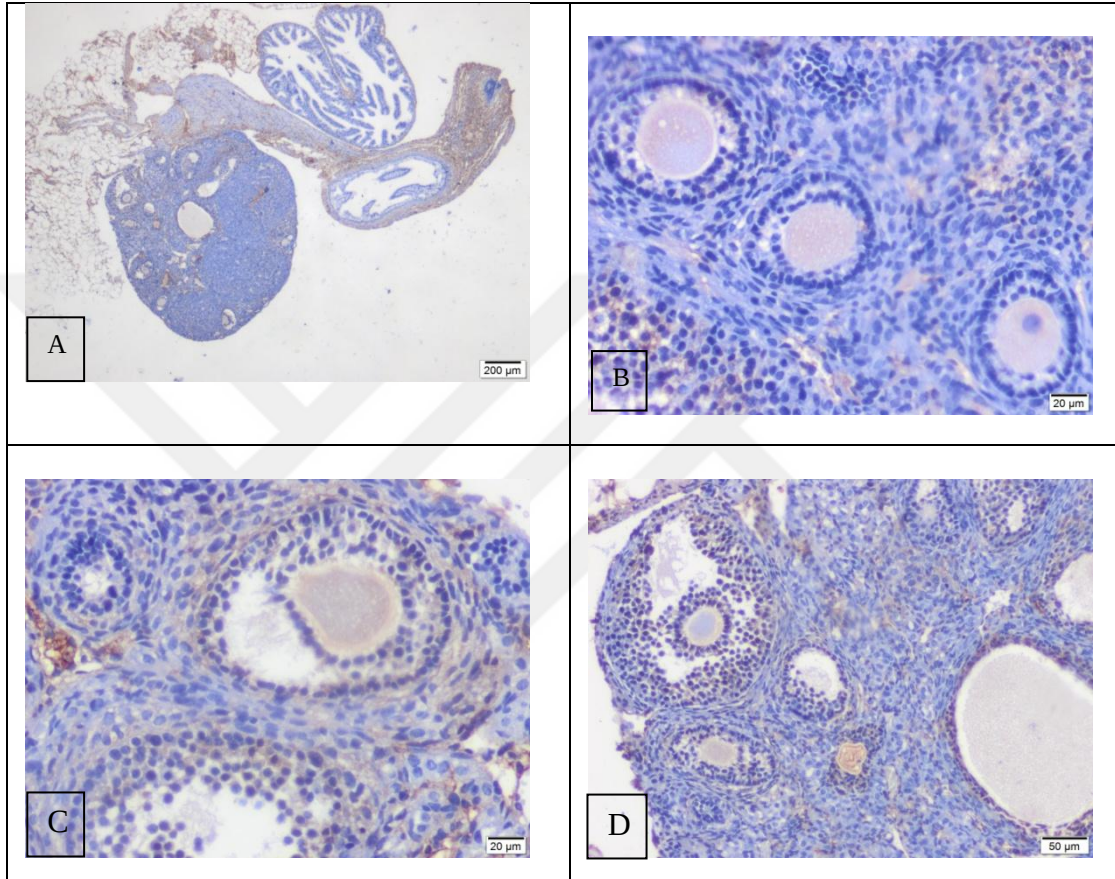
Resim 22. Sham grubu VDAC2 immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (200µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (20µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (50µm).

Düşük doz FSH+HCG grubundaki VDAC2 immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (Şekil 31) granüloza hücrelerinde ($230,1 \pm 6,93$) Graaf foliküldeki (Şekil 32) granüloza hücrelerine ($241 \pm 6,94$) oranla ekspresyonun azalmış olduğu gözlemlendi (Resim 23) (Tablo 12).

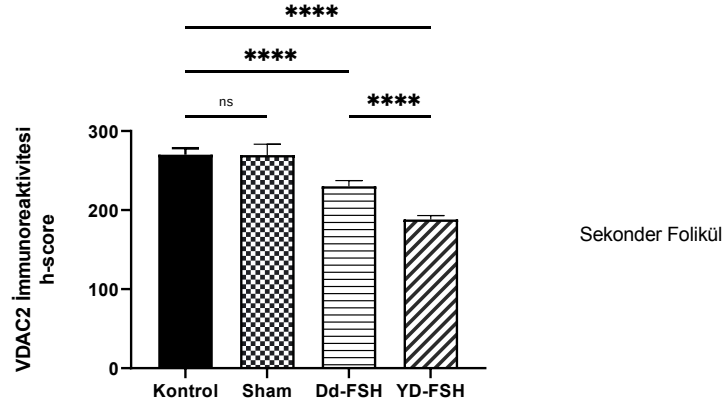


Resim 23. Düşük doz FSH+HCG grubu VDAC2 immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (200µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (10µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm).

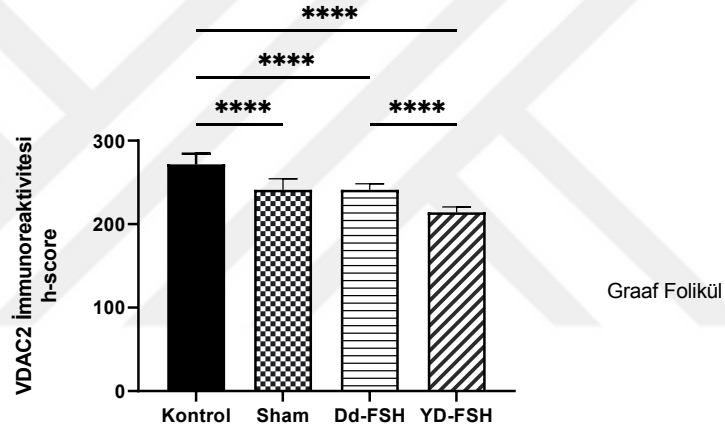
Yüksek doz FSH+HCG grubundaki VDAC2 immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (Şekil 31) granüloza hücreleri ($188,2 \pm 4,60$) Graaf foliküldeki (Şekil 32) granüloza hücrelerine ($214,2 \pm 6,10$) kıyasla ekspresyonunun anlamlı bir şekilde artmış olduğu gözlemlendi (Resim 24) (Tablo 12).



Resim 24. Yüksek doz FSH+HCG grubu VDAC2 immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (200µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (20µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (50µm).



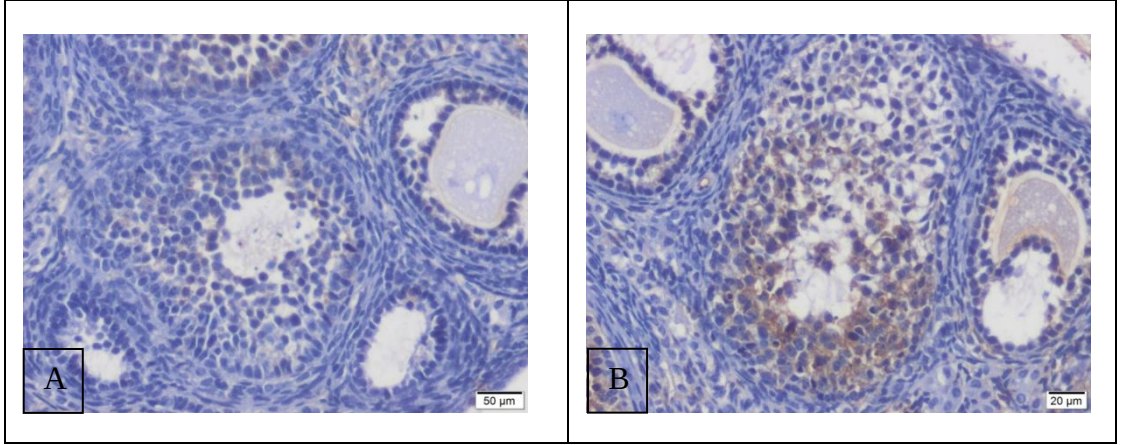
Şekil 31. Sekonder folikülde VDAC2 immunoreaktivesi analiz sonuçları.



Şekil 32. Graaf folikülde VDAC2 immunoreaktivesi analiz sonuçları.

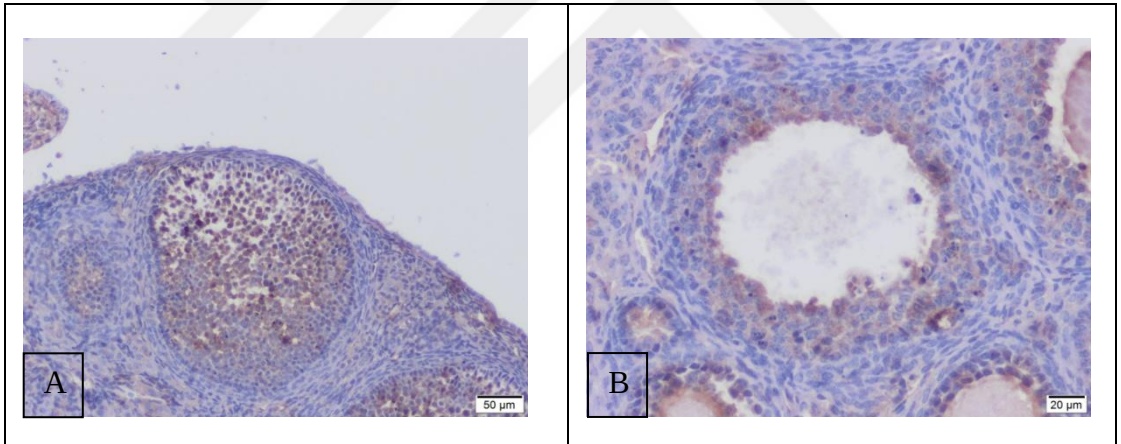
VDAC2 immunoreaktivesi kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarında sekonder ve Graaf foliküllerdeki granüloza hücrelerinin apoptozu sonucunda atreziye gittiği görüldü.

Kontrol grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($194,7 \pm 1,73$) (Şekil 34) ekspresyonun, atretik sekonder foliküllerdeki ($192,1 \pm 2,26$) (Şekil 33) ekspresyona kıyasla artmış olduğu gözlemlendi (Resim 25) (Tablo 12).



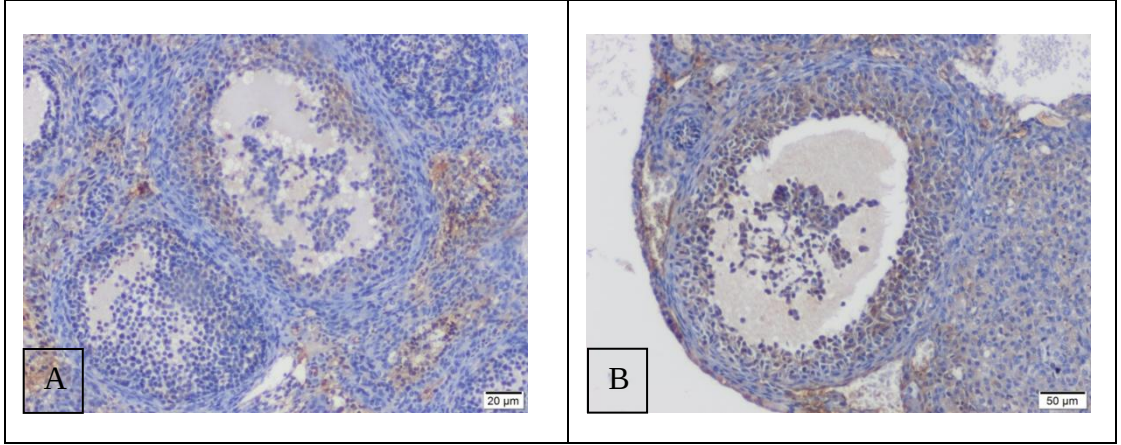
Resim 25. Kontrol grubu atretik foliküllerin VDAC2 immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (20µm).

Sham grubu atretik graaf foliküllerdeki ($231,8 \pm 2,32$) (**Şekil 34**) ekspresyonun, atretik sekonder foliküllerdeki ($233,2 \pm 3,28$) (**Şekil 33**) ekspresyona kıyasla azalmış olduğu gözlemlendi (**Resim 25**) (**Tablo 12**).



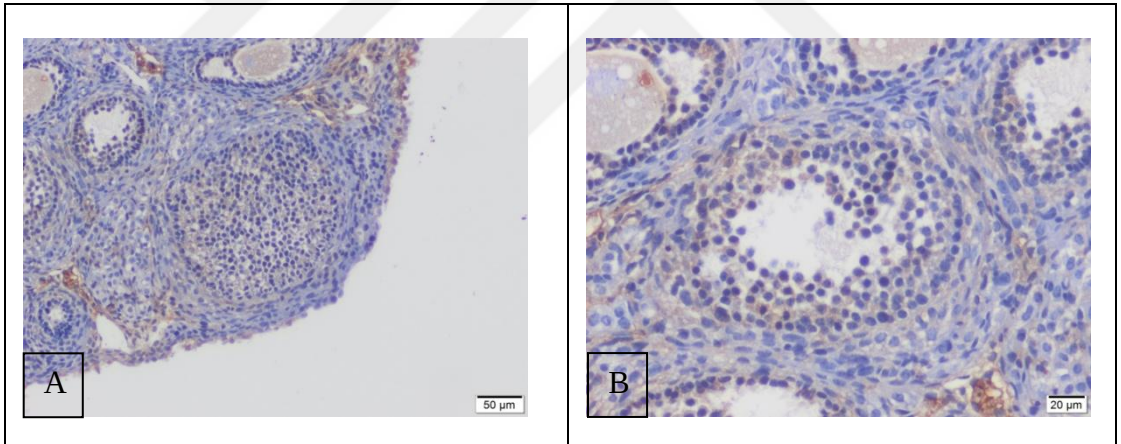
Resim 26. Sham grubu atretik foliküllerin VDAC2 immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (20µm).

Düşük doz FSH+HCG grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($226,8 \pm 1,33$) (**Şekil 34**) ekspresyon, atretik sekonder foliküllerdeki ($230,3 \pm 1,85$) (**Şekil 33**) ekspresyona kıyasla azalmış olduğu gözlemlendi (**Resim 27**) (**Tablo 12**).

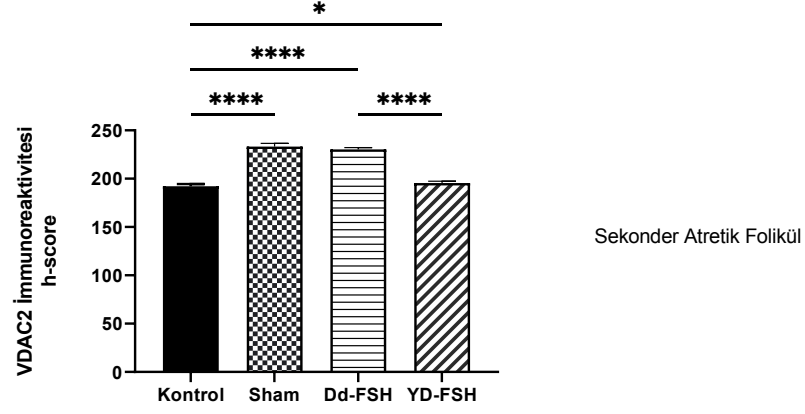


Resim 27. Düşük doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin VDAC2 immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (20µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm).

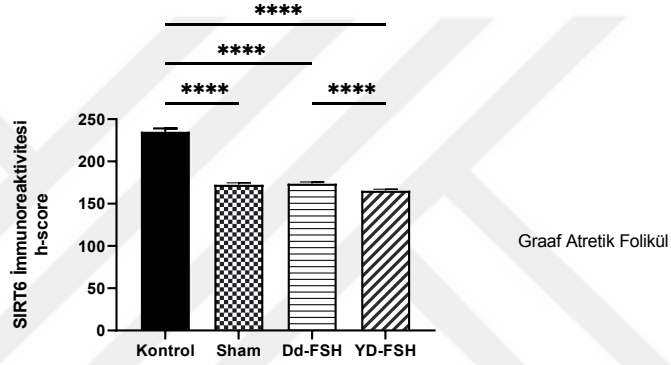
Yüksek doz FSH+HCG grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($174,6 \pm 2,76$) (**Şekil 34**) ekspresyon, atretik sekonder foliküllerdeki ($195,5 \pm 1,75$) (**Şekil 33**) ekspresyona kıyasla azalmış olduğu gözlemlendi (**Resim 28**) (**Tablo 12**).



Resim 28. Yüksek doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin VDAC2 immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (20µm).



Şekil 33. VDAC2 immunoreaktivitesi sekonder atretik folikül analiz grafiği.



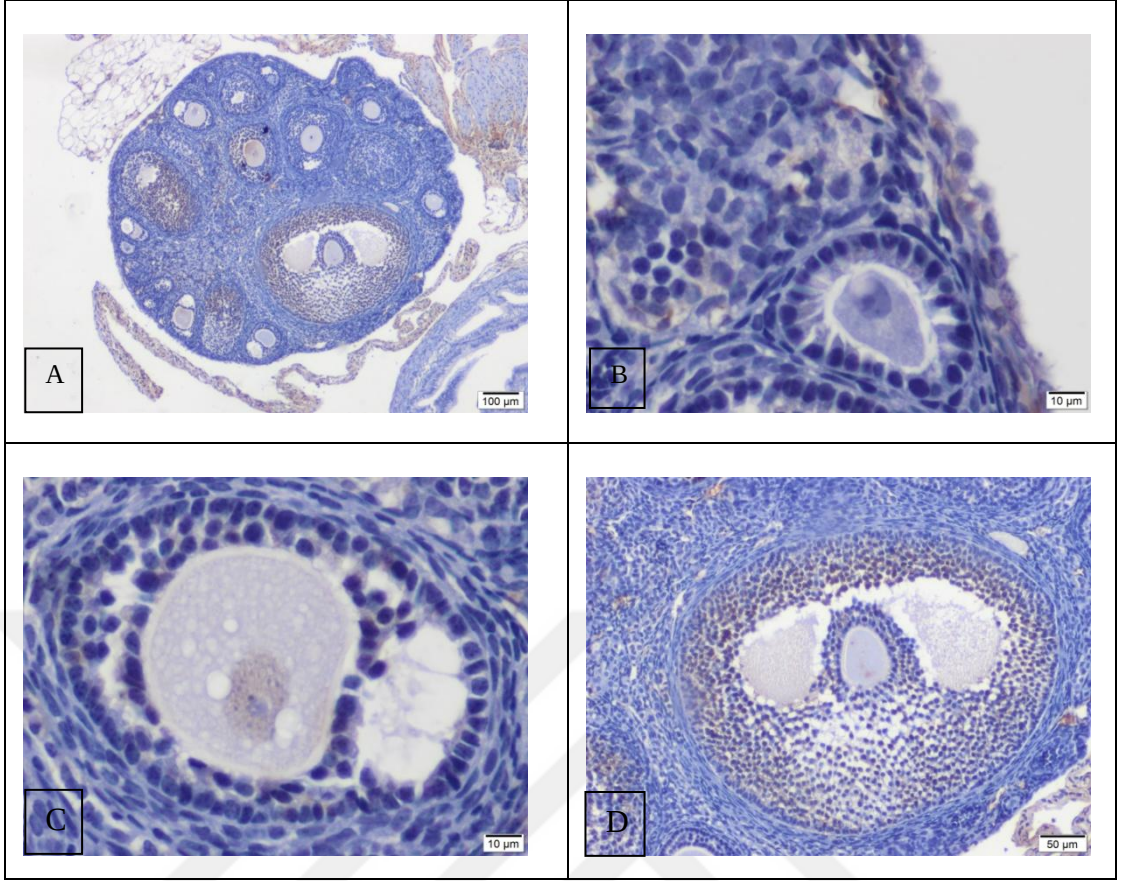
Şekil 34. VDAC2 immunoreaktivitesi Graaf atretik folikül analiz grafiği.

Folikül		Kontrol	Sham	Düşük doz FSH+HCG	Yüksek doz FSH+HCG
VDAC2	Sekonder	270,2±7,72	269,7±12,99	230,1±6,93	188,2±4,60
	Graaf	271,6±12,08	241,2±14,41	241±6,94	214,2±6,10
	Atretik Sekonder	192,1±2,26	233,2±3,28	230,3±1,85	195,5±1,75
	Graaf	194,7±1,73	231,8±2,32	226,8±1,33	174,6±2,76

Tablo 12. VDAC2 immunoreaktiviteesinin kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarındaki sekonder, graaf ve atretik foliküllerin H-skor değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.

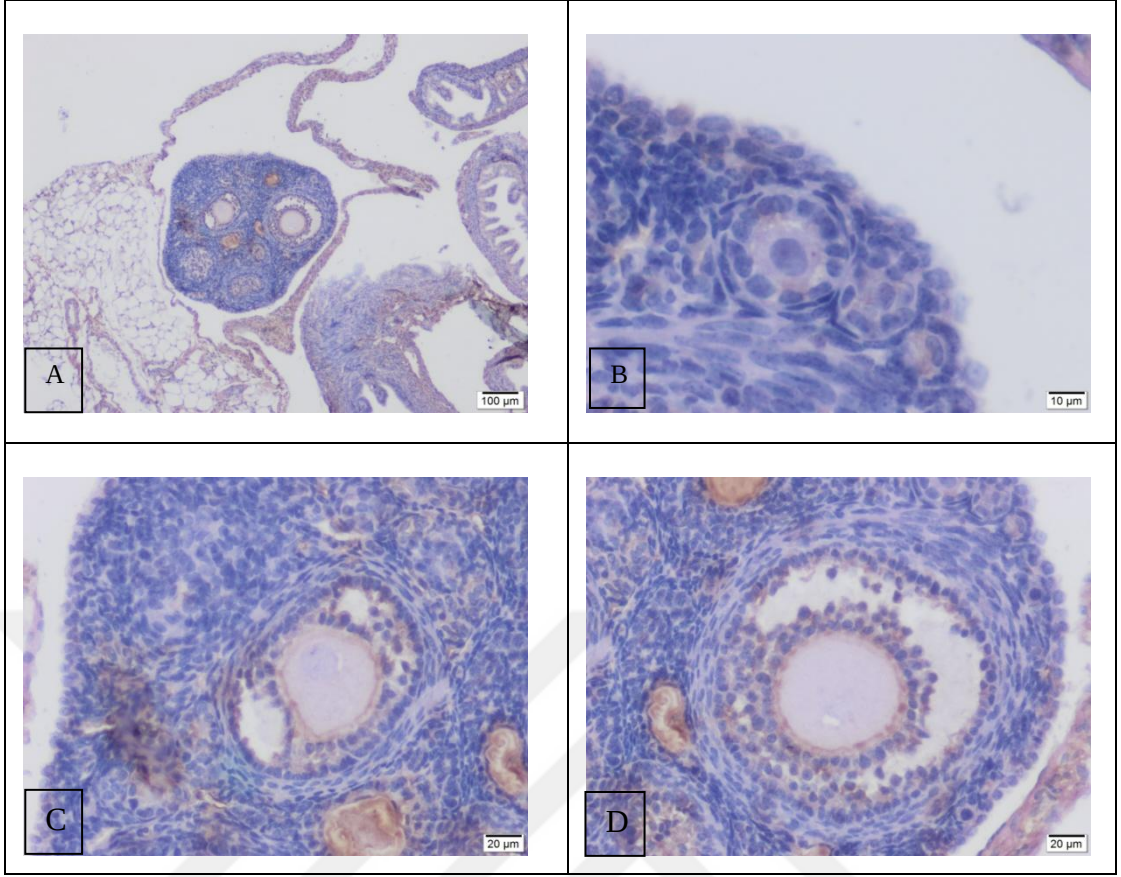
4.2.3. SIRT6 İmmünoreaktivitesi

Kontrol grubundaki SIRT6 immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (Şekil 35) granüloza hücrelerinde (252,4 ± 6,07) Graaf foliküldeki (Şekil 36) granüloza hücrelerine (265,9 ± 8,28) oranla ekspresyonunda azalma olduğu gözlemlendi (Resim 29) (Tablo 13).



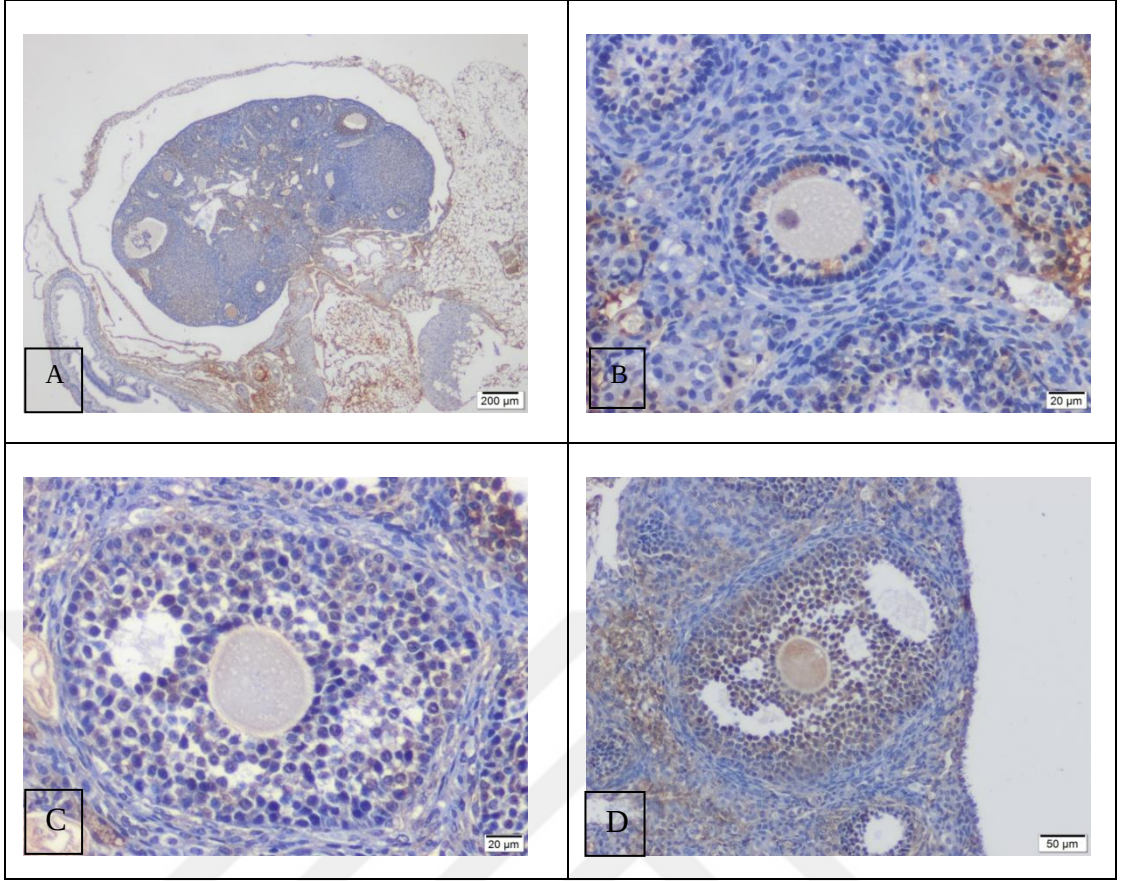
Resim 29. Kontrol grubu SIRT6 immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (100µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (10µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (10µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (50µm).

Sham grubundaki SIRT6 immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (Şekil 35) granüloza hücrelerinde (191,5 ± 5,87) Graaf foliküldeki (Şekil 36) granüloza hücrelerine (243,1 ± 2,07) oranla ekspresyonun anlamlı bir şekilde azaldığı gözlemlendi (Resim 30) (Tablo 13).



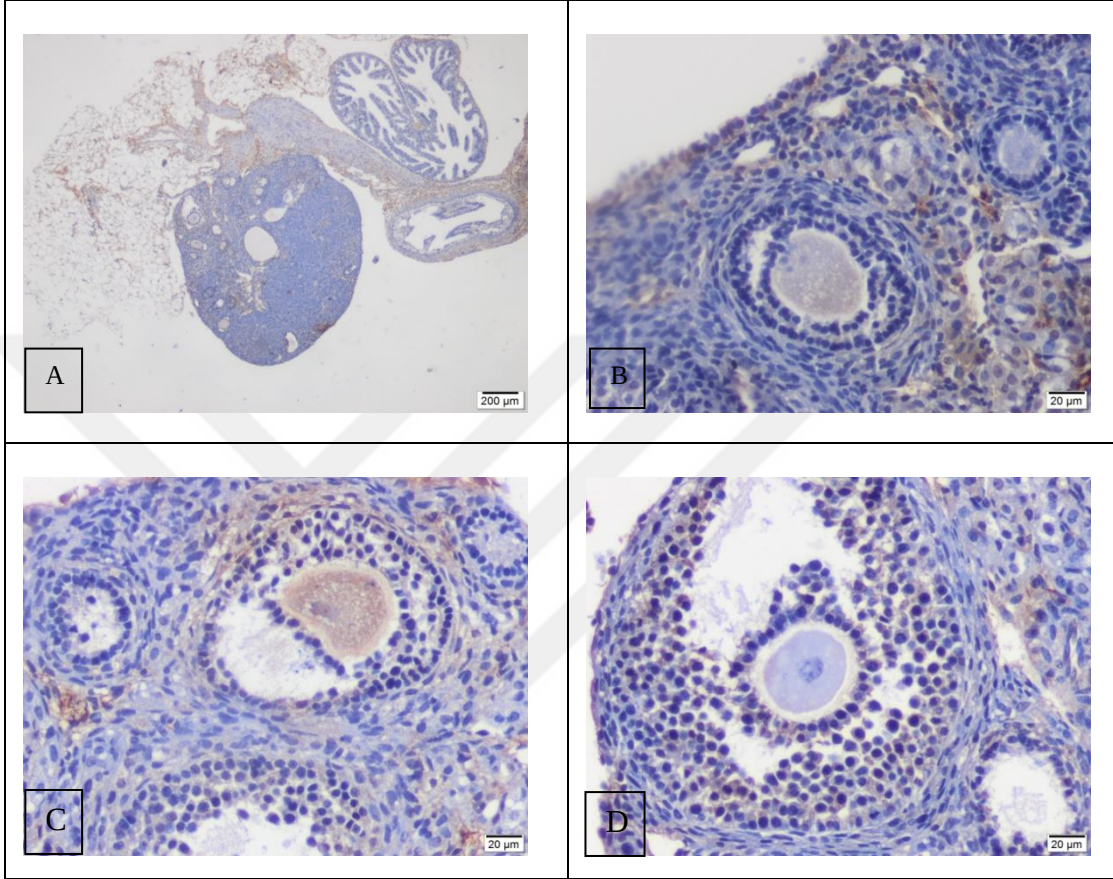
Resim 30. Sham grubu SIRT6 immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (100µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (10µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm).

Düşük doz FSH+HCG grubundaki SIRT6 immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (**Şekil 35**) granüloza hücrelerinde ($202,4 \pm 4,98$) Graaf foliküldeki (**Şekil 36**) granüloza hücrelerine ($232,2 \pm 1,66$) kıyasla ekspresyonun azalmış olduğu gözlemlendi (**Resim 31**) (**Tablo 13**).

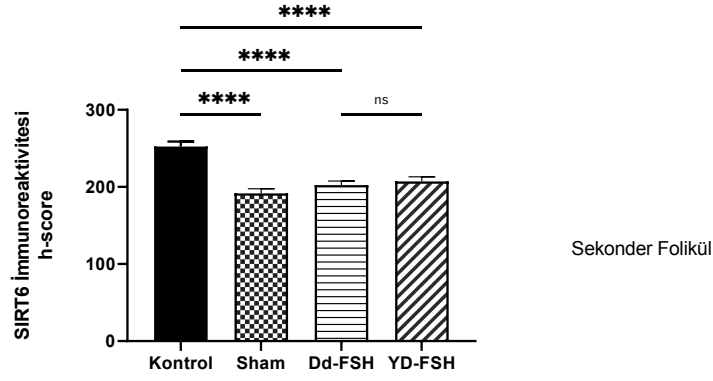


Resim 31. Düşük doz FSH+HCG grubu SIRT6 immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (200µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (20µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (50µm).

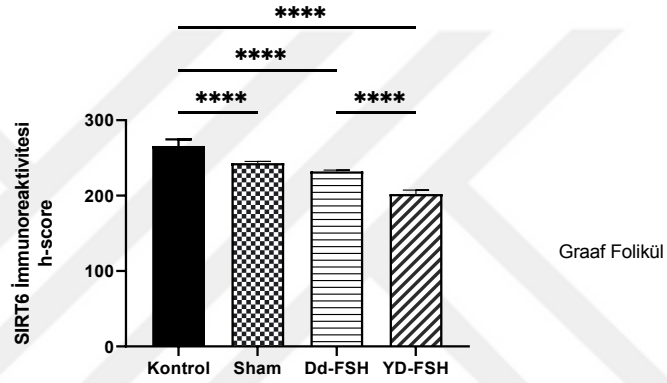
Yüksek doz FSH+HCG grubundaki SIRT6 immunoreaktivitesi sonucu primordiyal ve primer folikül hücrelerinde ekspresyon olmadığı gözlemlendi. Sekonder foliküldeki (Şekil 35) granüloza hücrelerinde ($207,1 \pm 5,82$) Graaf foliküldeki (Şekil 36) granüloza hücrelerine ($202 \pm 5,04$) kıyasla ekspresyonun artmış olduğu gözlemlendi (Resim 32) (Tablo 13).



Resim 32. Yüksek doz FSH+HCG grubu SIRT6 immünohistokimyasal boyaması. A: Ovaryumdaki foliküllerin genel görüntüsü (200µm). B: Primer foliküllerin boyama sonucu görüntüsü (20µm). C: Sekonder foliküllerdeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm). D: Graaf foliküldeki granüloza hücrelerinin boyaması (20µm).



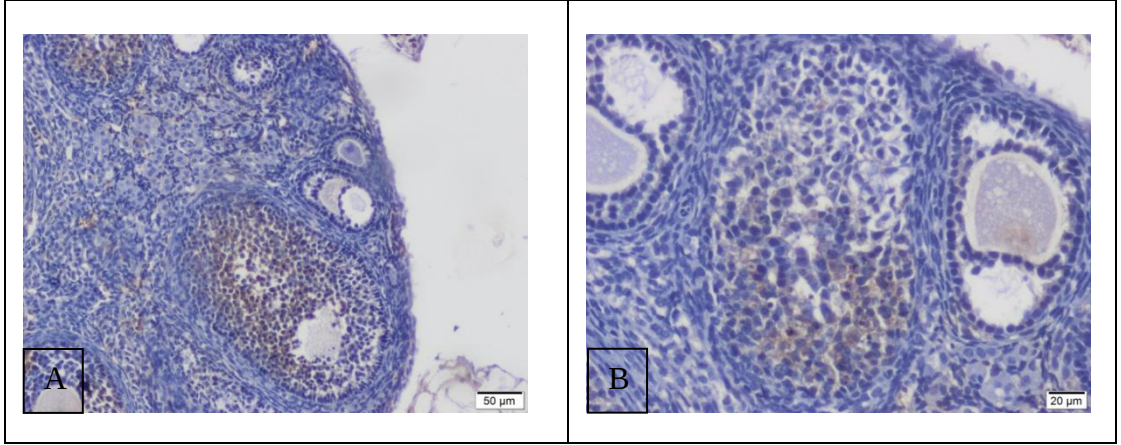
Şekil 35. SIRT6 immunoreaktivitesi sekonder atretik folikül analiz grafiği.



Şekil 36. SIRT6 immunoreaktivitesi Graaf atretik folikül analiz grafiği.

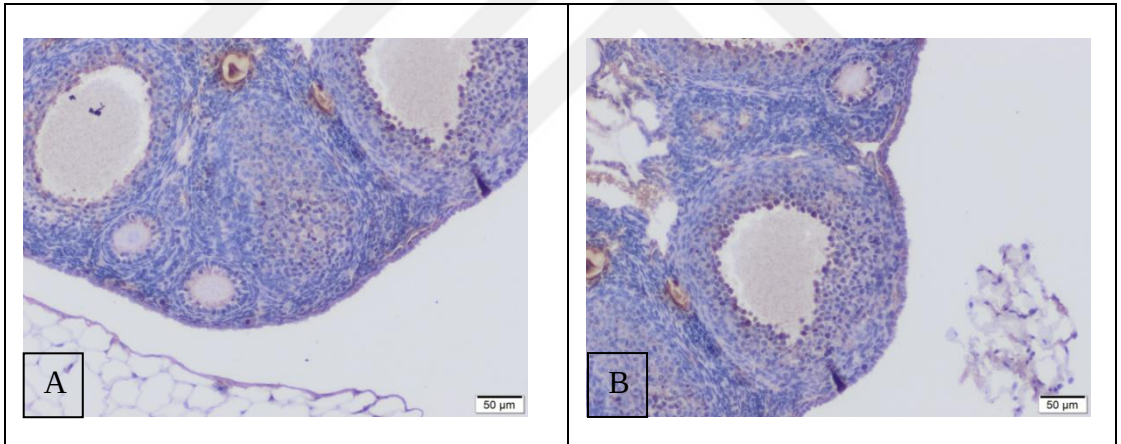
SIRT6 immunoreaktivitesi kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarında sekonder ve graaf foliküllerdeki granüloza hücrelerinin apoptozu sonucunda atreziye gittiği görüldü.

Kontrol grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($235 \pm 3,87$) (**Şekil 38**) ekspresyonun, atretik sekonder foliküllerdeki ($173,7 \pm 2,10$) (**Şekil 37**) ekspresyona kıyasla anlamlı şekilde artmış olduğu gözlemlendi (**Resim 33**) (**Tablo 13**).



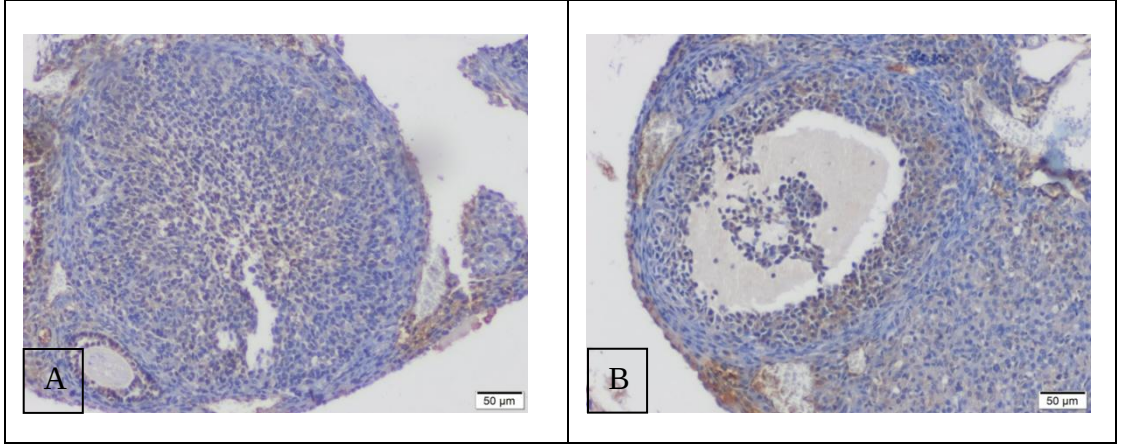
Resim 33. Kontrol grubu atretik foliküllerin SIRT6 immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (20µm).

Sham grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($172,3 \pm 2,24$) (**Şekil 38**) ekspresyonun, sekonder foliküllerdeki ($154,7 \pm 1,49$) (**Şekil 37**) ekspresyona kıyasla artmış olduğu gözlemlendi (**Resim 34**) (**Tablo 13**).



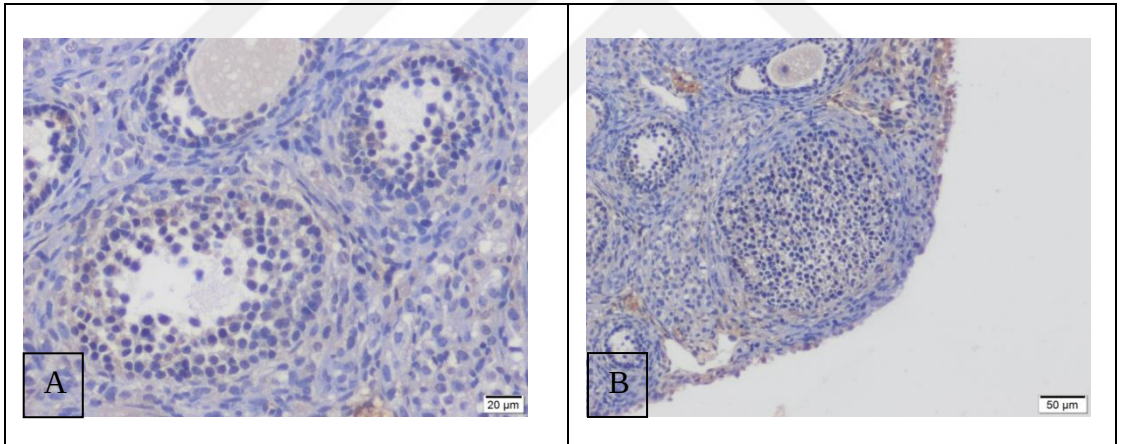
Resim 34. Sham grubu atretik foliküllerin SIRT6 immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm).

Düşük doz FSH+HCG grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($173,7 \pm 1,90$) (**Şekil 38**) ekspresyon, atretik sekonder foliküllerdeki ($141,9 \pm 1,30$) (**Şekil 37**) ekspresyona kıyasla artmış olduğu gözlemlendi (**Resim 35**) (**Şekil 37, 38**) (**Tablo 13**).

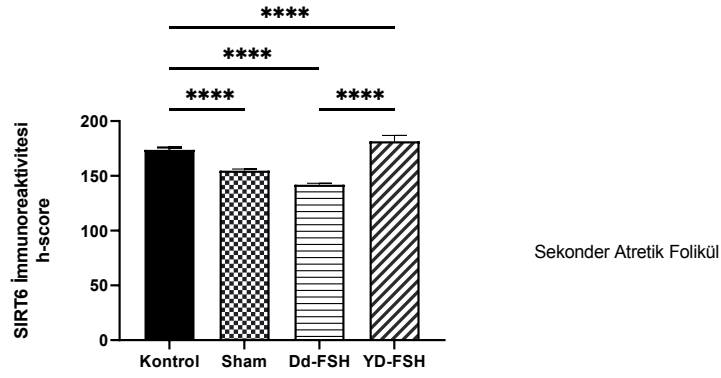


Resim 35. Düşük doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin SIRT6 immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm).

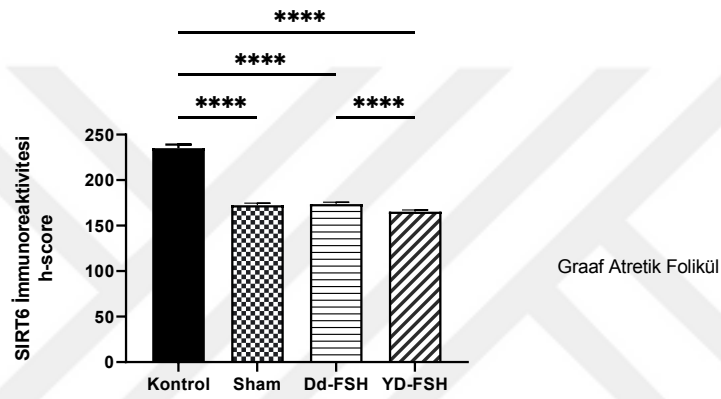
Yüksek doz FSH+HCG grubu atretik Graaf foliküllerdeki ($165,3 \pm 1,79$) (**Şekil 38**) ekspresyon, atretik sekonder foliküllerdeki ($181,6 \pm 5,02$) (**Şekil 37**) ekspresyona kıyasla azalmış olduğu gözlemlendi (**Resim 36**) (**Tablo 13**).



Resim 36. Yüksek doz FSH+HCG grubu atretik foliküllerin SIRT6 immünohistokimyasal boyaması. A: Sekonder folikülün atreziye uğraması sonucu (20µm). B: Graaf folikülün atreziye uğraması sonucu (50µm).



Şekil 37. SIRT6 immunoreaktivitesi sekonder atretik folikül analiz grafiği.



Şekil 38. SIRT6 immunoreaktivitesi Graaf atretik folikül analiz grafiği.

Folikül		Kontrol	Sham	Düşük doz FSH+HCG	Yüksek doz FSH+HCG
SIRT6	Sekonder	252,4±6,07	191,5±5,87	202,4±4,98	207,1±5,82
	Graaf	265,9±8,28	243,1±2,07	232,2±1,66	202 ± 5,04
	Atretik Sekonder	173,7±2,10	154,7±1,49	141,9±1,30	181,6±5,02
	Graaf	235±3,87	172,3±2,24	173,7±1,90	165,3±1,79

Tablo 13. SIRT6 immunoreaktiviteesinin kontrol, sham, düşük doz FSH+HCG ve yüksek doz FSH+HCG gruplarındaki sekonder, graaf ve atretik foliküllerin H-skor değerlerinin ortalama ve standart sapmaları.

4.3. qRT - PCR BULGULARI

Çalışmada tüm gruplarda toplanan ovaryumların VDAC2, LC3B ve SIRT6 genlerinin zaman bağımlı ifadeleri ve konsantrasyonlarını incelemek için qRT-PCR analizi gerçekleştirildi. qRT-PCR analizi sonrasında gen ekspresyonlarında meydana

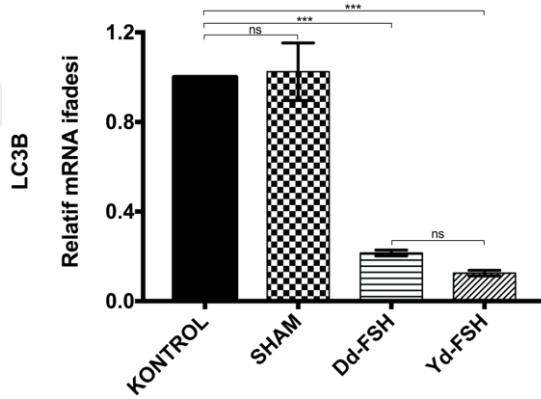
gelen değişiklikler için $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanıldı. Sonuçlar GAPDH referans genine göre normalize edilerek, sonuçlar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

4.3.1. LC3B Bulguları

Analiz sonuçlarına göre LC3B gen ifadesinin düşük doz FSH+HCG (Dd-FSH) grubunda kontrol grubuna göre $4,665 \pm 0,279$ ($0,215 \pm 0,013$) kat azalış ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Yüksek doz FSH+HCG (Yd-FSH) grubunda LC3B gen ifadesi de kontrol grubuna kıyasla $8,050 \pm 0,864$ ($0,125 \pm 0,012$) kat azalış ve yine bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 14, Şekil 39).

	Kontrol	Sham	Düşük doz FSH+HCG	Yüksek doz FSH+HCG
LC3B	1 ± 0	$1,025 \pm 0,128$	$0,215 \pm 0,013$	$0,125 \pm 0,012$

Tablo 14. Ovaryum dokusunun LC3B gen ifadeleri ve istatistiksel analizleri.



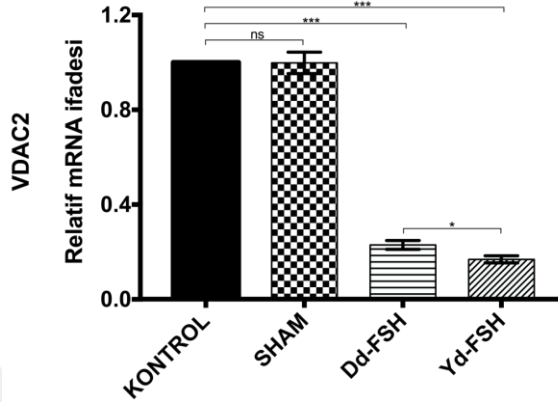
Şekil 39. Ovaryum dokularının yapılan uygulamalar sonucunda LC3B gen ifadeleri. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ 'ten küçük değerler anlamlı kabul edildi.

4.3.2. VDAC2 Bulguları

Yapılan analiz sonuçlarına göre VDAC2 gen ifadesinin düşük doz FSH+HCG (Dd-FSH) grubunda kontrol grubuna göre $4,386 \pm 0,349$ ($0,229 \pm 0,019$) kat azalış ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Yüksek doz FSH+HCG (Yd-FSH) grubunda VDAC2 gen ifadesi de kontrol grubuna kıyasla $5,974 \pm 0,504$ ($0,168 \pm 0,015$) kat azalış ve yine bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edildi ($p < 0,05$) (Tablo 15, Şekil 40).

	Kontrol	Sham	Düşük doz FSH+HCG	Yüksek doz FSH+HCG
VDAC2	1±0	1,109±0,045	0,229±0,019	0,168 ± 0,015

Tablo 15: Ovaryum dokusunun VDAC2 gen ifadeleri ve istatistiksel analizleri.



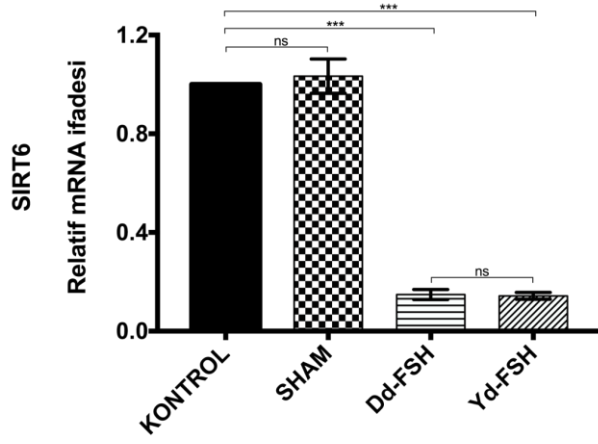
Şekil 40. Ovaryum dokularının yapılan uygulamalar sonucu VDAC2 gen ifadeleri. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ 'ten küçük değerler anlamlı kabul edildi.

4.3.3. SIRT6 Bulguları

Analiz sonuçlarına göre SIRT6 gen ifadesinin düşük doz FSH+HCG (Dd-FSH) grubunda kontrol grubuna göre $6,839 \pm 0,879$ ($0,148 \pm 0,020$) kat azalış ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi ($p < 0,05$). Yüksek doz FSH+HCG (Yd-FSH) grubunda SIRT6 gen ifadesi de kontrol grubuna kıyasla $7,022 \pm 0,449$ ($0,143 \pm 0,009$) kat azalış ve yine bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edildi ($p < 0,05$) (**Tablo 16, Şekil 41**).

	Kontrol	Sham	Düşük doz FSH+HCG	Yüksek doz FSH+HCG
SIRT6	1 ± 0	1,034 ± 0,069	0,148 ± 0,020	0,143 ± 0,009

Tablo 16. Ovaryum dokusunun SIRT6 gen ifadeleri ve istatistiksel analizleri.



Şekil 41. Ovaryum dokularının yapılan uygulamalar sonucunda SIRT6 gen ifadeleri. İstatistiksel olarak $p < 0,05$ 'ten küçük değerler anlamlı kabul edildi.

5. TARTIŞMA

Foliküler atrezi, fetal dönemde başlayan ve menopoza kadar süren, follikül gelişimin her aşamasında gözlenen bir olaydır. Oositlerin, granüloza hücrelerinin ve teka hücrelerinin foliküler atrezide görev aldığı bilinmektedir (Young ve McNeilly 2010; Inoue ve ark. 2011). Bu süreçte ile ilgili çalışmalarda, apoptoza odaklanıldığından, atrezideki otofajinin rolü son yıllarda anlaşılmaktadır. Uzun yıllar FSH'nin dominant folikül gelişimini sağladığı, folliküler atreziyi önlediği bilinmesine rağmen, son yıllarda FSH uygulamalarının, folliküler atreziyi arttırdığı da ileri sürülmektedir. Bu çalışmada, farelere farklı dozlardaki FSH uygulamaları ile foliküller atrezide oynadığı rolün otofaji ile ilişkisi, otofoji ilgili SIRT6, VDAC2 ve LC3B proteinlerin immunohistokimyal ve mRNA seviyelerinin qRT-PCR tekniği ile incelenmesi amaçlanmıştır.

Over folikülleri, hormon ve oosit üretme fonksiyonuna sahiptir. Kadınlarda menstrual siklusun, foliküler gelişme aşamalarında, çok sayıda folikül atrezi sonucunda ortadan kaldırılırken, bir adet follikül olgunlaşmaya devam eder ve ovulasyon ile oositin tuba uterinaya aktarılmasına aracılık etmektedir. Over follikülleri gelişme aşamalarında sayısal olarak azalmaktadır. Primordial folliküllerde gözlenen atrezinin büyük kısmı, doğumdan sonra gözlenmekte birlikte, gelişme aşamalarında olan sekonder ve tersiyer folliküllerde de folliküler atrezi görülmektedir. (Flaws ve ark. 1997 ; Slot ve ark 2006). Preantral ve antral foliküller, sağlıklı bir oosit ve proliferasyon gösteren ve organize biçimde düzenlenmiş granüloza tabakası içerdiklerinde, sağlıklı olarak tanımlanmaktadır. Atretik foliküller dejenere bir oosit, düzensiz granüloza hücre tabakasının varlığı ile tanınmaktadır. Foliküler atrezinin hormonal kontrolü özellikle de GC'lerinin apoptotik süreçleri ile ilişkilendirilmektedir (Kaipia ve Hsueh 1997). Granüloza hücrelerinin % 5'inden fazlası morfolojik apoptoz belirtileri gösterdiğinde, antral foliküllerin atretik olduğu kabul edilmektedir (Meng ve ark. 2016). Atrezi ilerledikçe, granüloza hücrelerinin tamamen kaybolduğu, oositin dejenere olduğu geriye zona pellucida kalıntıları ve hipertrofik teka hücreleri kaldığı görülmüştür (Li Meng ve ark. 2018). Foliküler

atreside TNF- α , Fas ligand, TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), APO-3 ligand, PFG-5 ligand, ve reseptörlerinin rol oynadığı ileri sürülmektedir (Manabeve ark. 2008).

Bu çalışmada ovaryum doku örneklerinin, Hematoksilen-Eozin (H-E) ile boyanmış preparatlarında kontrol ve sham gruplarında gelişen folikül tiplerinin hepsinde folliküler atrezinin varlığı gözlemlendi. Foliküler gelişim sırasında, çok sayıda folikülün dejenerasyona uğradığı bilinmektedir. Foliküler atrezi, sağlıklı üreme fonksiyonu gerçekleştirilmesi için gereklidir. Gonadotropinler dominant follikül seçiminde rol oynamakta ve folikül büyümesinin devamlılığını sağlayarak ovulasyonu gerçekleştirmektedir (Binelli ve Murphy 2010). Normal gelişim aşamasında, FSH'ın follikül atreziyi inhibe ettiği ve folikül gelişimi için faydalı etkisi olduğu bilinmekle beraber (Choi ve ark. 2010) özellikle IVF tedavilerinde oosit sayısını artırmak için uygulanan yüksek dozda FSH'ın ovarian foliküler üzerinde olumsuz etkileri konusunda tam bir fikir birliği bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, düşük ve yüksek doz FSH uygulamasından (sırasıyla $2,1 \pm 0,30$; $2,5 \pm 0,50$) sonra kontrol ve sham grubuna (sırasıyla $1,4 \pm 0,49$; $1,4 \pm 0,49$) göre daha fazla graaf folikülü geliştiği ve FSH'ın gelişen folikül sayısında artışa neden olduğu tespit edildi. FSH hassas bir denge içerisinde foliküler gelişmeyi kontrol etmektedir. Hipofizden salgılanan FSH seviyesi artışı folikül gelişimi ile paralel seyretmektedir. Normal siklus sırasında gelişen follikülden salınan östrojen ve inhibin, hipofizden FSH'ın baskılanmasına neden olarak, FSH'ın aşırı yükselmesini engellemekte ve tek bir folikül gelişmesine izin vermektedir (Manabe 2004).

IVF tedavileri sırasında, başarı şansının artırılması için çok sayıda oosit elde edilmesi amacı ile fazla sayıda folikül elde edilmesi amaçlanmaktadır. FSH verilerek, dominant follikülden salgılanan östrojen ile FSH seviyesinin düşüşüne izin verilmemekte, çok sayıda folikül gelişmesi sağlanmaktadır. Sığır granülosa hücrelerine, hücre kültürü ortamında FSH uygulaması ile granüloza hücrelerinin proliferasyonu arttığı ayrıca CYP19A1 ve FSHR mRNA seviyesini arttırdığı gösterilmiştir (Albonico ve ark. 2017). Granüloza hücrelerinde FSHR ve CYP19 ekspresyonu artışı, östrojen salgılanması ve granülosa hücrelerinin devamlılığını sağlamasında ve önemli fonksiyon göstermektedir FSH dozunun östrojen ve progesteron miktarı ile ilişkisi, yeni yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada düşük dozda uygulanan (0.1 ng/ml) FSH'nun E2 ve P4 üzerine etkisini

olmadığı, 1-10 ng/ml verildiğinde E2 miktarını arttırdığı, yüksek doz uygulamalarda ise (10-100 ng/ml) P4 miktarını arttırdığı gösterilmiştir (Tang 2021).

FSH'ın yüksek doz kullanımının oosit kalitesini, embriyo gelişimini bozduğu, ve foliküler atresiye neden olduğu ileri sürülmektedir (Tang 2021). Bu çalışmada, düşük doz ve yüksek doz FSH uygulamasının (sırasıyla $5,3 \pm 0,45$; $6,6 \pm 0,80$) foliküller atresiyi kontrol ve sham gruplarına göre hafif derecede attırdığı (sırasıyla $2,6 \pm 0,49$; $4,4 \pm 0,49$), yüksek doz FSH gruplarında ise artışın daha belirgin olduğu olduğu gözlemlendi. FSH uygulamasının foliküler atreziye neden olabileceği düşünüldü. FSH'ın over üzerine etkisi, foliküldeki kayıpta apoptozun rol oynadığı Tang ve arkadaşlarının 2021 yılında yaptıkları çalışmada gösterilmiştir (Tang 2021). 100 ng/mL FSH uygulamasının sıgır granüloza hücrelerinde FSHR, CYP19, StAr ve BCL-2 ekspresyonunu azalttığı ve BAX mRNA miktarını ise arttırdığı ve bu belirtilerin hücrelerde apoptoza yol açtığını bildirmişlerdir. FSH'ın domuz granüloza hücrelerinde bir pro-apoptotik protein olan BimEL seviyesini azaltarak yaşam sürelerini artırdığı (Wang et al., 2013), granüloza hücrelerinde otofajiyi düzenlediği (Choi et al., 2014) de bilinmektedir.

Foliküler atrezi, over gelişimi aşamasında da gözlenen bir olaydır. Neonatal periotta primordial ve primer foliküllerin massif dejenerasyonunda atrezinin dominant mekanizma olduğu gösterilmiştir (Hulas-Stasiak ve Gawron 2011). FSH'ın HIF-1 α upregülasyonu yaparak granüloza hücrelerinin otofajiyi uyardığı (Zhou 2017) bildirilmiştir. Bununla beraber bu konuda tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. Shen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada FSH'ın oksidatif hasar nedeni ile ortaya çıkan otofajiden koruduğunu da ileri sürülmektedir (Shen 2016).

Bu çalışmada yüksek doz FSH uygulaması ile atrezik folikül sayısında artış tespit edildi ve yüksek doz FSH'ın folikül gelişimini olumsuz etkilediği düşünüldü. Uygulanan FSH dozunun folikül gelişiminin arttırmasının yanısıra, atreziye de neden olabileceği ileri sürülmektedir. En yüksek foliküler atrezi insidansı, foliküllerin erken antral folikül evresinde FSH'a bağımlı hale gelmesiyle gözlenmektedir. Preantral ve preovulatar foliküller nadiren atreziye uğramaktadır (Chun ve ark. 1996). Tang ve arkadaşları 2021 yılında yaptıkları çalışmada sıgır granüloza hücrelerinde düşük doz (1 ng/ml) FSH uygulamasında hücrelerin survivalını arttırırken, 100 ng/ml FSH uygulanmasında hücre viabilitesini azaltmış olduğunu tespit etmiştir. Shen'in sonuçları ile farklılığını türe ve doz farklılığına bağlı olabileceğini ileri sürmüştür.

Foliküler atrezide, çok sayıda farklı hücre ölüm programlarını kullanıldığı bilinmektedir (Escobar ve ark. 2015). Yapılan çalışmalarda oositlerde otofajik moleküllerin varlığı gösterilememiş olup, granüloza hücrelerinde otofajik sinyallerin varlığı gösterilmiş ve otofajiden daha çok granüloza hücrelerinin sorumlu olduğu bildirilmiştir (Choi ve ark. 2009). Follikül gelişiminde insan overinde GC'lerine oxidized low-density lipoprotein (OxLDL) uygulaması sonrası otofagozom miktarında artış ve folliküler atreside otofajinin rolü olduğu ileri sürülmektedir. (Nowicki 2006), normal fizyolojik ve patolojik olayların gerçekleşmesinde esansiyel rol oynamaktadır ve iki zıt fonksiyonu gerçekleştirmektedir. Otofajide yaşlanan veya hasar görmüş organeller ortadan kaldırılarak hücrenin canlılığının devamlılığını sağlarken, otofaji apoptoz uyarıcısı da olabilmektedir. Otofaji sırasında ortadan kaldırılan metabolitler hücre tarafından yeniden kullanılabilmesi nedeni ile foliküler gelişim sırasında da otofaji önemli rol oynamaktadır (Nakashima ve ark. 2017).

Kemoterapi uygulamaları ve aşırı hormon değişikliklerinin gerçekleştiği durumlarda, GC'lerinin apoptozu regule edemediği, apoptoza gittiği ve folikül atrezisine neden olduğu bildirilmiştir (Choi ve ark. 2011) apoptoza giden GC'lerinde otofagozomların biriktiği, apoptotik hücre ölümüne neden olan Bcl-2 ekspresyonunu azaltmakta ve sonrasında kaspaz aktivitesini artırarak foliküler atreziye neden olmaktadır (Choi ve ark. 2011). FSH'nın majör survival faktör olduğu oksidatif strese karşı GC'lerini koruduğu ayrıca (Shen ve ark. 2014). FSH'nın oksidatif strese karşı GC'lerinde otofajiyi suprese ederek gösterdiği rapor edilmiştir (Shen ve ark. 2014).

Memeli ovaryumlarında foliküllerin yaklaşık olarak %99'u atreziye uğramaktadır. Otofaji ve apoptozun hem primordiyal folikül gelişiminde hem de atrezinin düzenlenmesinde rol aldığı önceki çalışmalarda gösterilmiştir. Otofagozomların hücrede birikmesinin değerlendirilmesinde kullanılan ve bir otofagozom belirteci olarak kabul edilen "endogenous microtubule-associated lightchain protein 3 (LC3)", kontrol ve sham grubunda primordial foliküllerde ve primer foliküllerde gözlenmedi. Buna karşılık LC3B'nin kontrol grubunda ve sham gruplarına ait sekonder foliküllerde ve tersiyer foliküllerde ise fazla miktarda gözlemlendi. Oositlerde ise immunoreaktivite gözlenmedi. Yapılan LC3B mRNA ölçümlerinde bu sonucumuzu destekler niteliktedir ve LC3B mRNA düzeyleri kontrol grubunda ve sham grubunda oldukça yüksek bulundu. Choi ve arkadaşları yaptığı çalışmada, LC3 ekspresyonunu primordial folikül hücrelerinde çok zayıf bulunduğunu, primer ve preantral foliküllerin granüloza hücrelerinde LC3

aktivitesinin yoğun olduğunu, antral folikül aşamasında da LC3 aktivitesinin devam ettiğini, oositlerde ise LC3 ekspresyonunu gözlenmediğini bildirmişlerdir.(Choi ve ark. 2009). Otofaji sırasında LC3-I'in LC3-II dönüştüğü ve LC3-II'nin otofajik marker olduğu bilinmektedir. Granüloza hücrelerinin atrezisi ile foliküler atrezi birbiri ile ilişkilidir. LC3 immünoreaktivitesinin sağlıklı granüloza hücrelerinde de bulunabileceğini, ancak varlığın otofaji göstermediği ileri sürülmektedir. Bununla beraber LC3 ekspresyonu araştırıldığı sıçan modelinde, foliküler gelişim ve atrezide önemi ortaya konulmuştur(Choi ve ark. 2011). LC3 ekspresyonu, ovaryum oositlerinde tespit edilirken, foliküler gelişimin tüm aşamaları boyunca GC'lerinde büyük miktarda LC3 immünoreaktivitesi mevcut olduğu gösterilmiştir (Zhou ve ark. 2019) ve LC3 aktivitesi ile cleaved caspase-3 aktivitesinin paralel olması atresinin bir belirtisi olarak değerlendirilmektedir. Primordial, primer ve preantral foliküllerde cleaved caspase-3 artışının olmadığı durumlarda otofajinin ortaya çıkmadığı bildirilmiştir (Choi ve ark. 2011).

FSH verilen gruplarda ise LC3B immnoreaktivitesinin doz ile birlikte azaldığı tespit edildi. LC3B, mRNA ölçümleride FSH verilen gruplarda düşük seviyede olduğu tespit edildi. Choi ve arkadaşları (2010), ratlarda yaptıkları çalışmada LC3II ekspresyonunu deneyin başlangıç aşamasında (0. gün) yüksek olduğunu, 15 IU PMSG verilmesinden sonra ilk 2 gün ekspresyonun anlamlı derecede düştüğünü ve 3. günden itibaren artış gösterdiğini tespit etmişlerdir(Choi ve ark. 2010). Aynı çalışmada 15 IU PMSG sonrası granüloza hücreleri toplanmış ve 2 gün 100 ng/mL FSH ile muamele etmişler ve 2. günde LC3-II ekspresyonunun FSH ilave edilmeyen gruba göre artmış olduğunu tespit etmişlerdir. Granüloza hücrelerindeki otofajiyi apoptoz ile birlikte olduğunu gonadotropin uygulamasından sonra LC3II ve caspas-3 ekspresyonun azaldığını, gonadotropinin metabolik olarak temizlenmesi sırasında apoptozun arttığını rapor etmişlerdir (Choi ve ark. 2010). Bizim çalışmamızda da düşük ve yüksek FSH uygulamasından sonra 2. gün hayvanlar sakrifiye edildiği için sonuçlarımız bu çalışma ile uyumluluk göstermektedir. Buna karşılık, Zhou 2017 yılında yaptığı çalışmada mouse granüloza hücrelerinde FSH uygulaması sonucunda endojenöz LC3 seviyesinin arttığını göstermiştir. Bu çalışmada FSH uygulamasının 1,5 saat içinde mTOR ekspresyonu arttırdığını, LC3-I'in hücre içindeki akümüleyonunu arttırdığı, 3 saat sonra mTOR ekspresyonun azaldığı, otofaji sinyallerinin arttığı ve FSH'ın mTOR inaktivasyonu yolu ile otofajiyi regüle ettiği ileri sürülmektedir. Yüksek doz FSH uygulamasının LC3 immnorektivitesini

artırdığı, aynı zamanda ATG3, ATG7, BECN-1, BNIP-3 mRNA düzeylerinin artmış olduğu bildirilmiştir. ATG3'ün, otofagozomlar üzerinde ATG7'ye bağlanan LC3'ün formasyonunu sağlamaktadır (Zhou ve ark. 2019).

FSH'in otofaji üzerine olan etkilerinde farklı mekanizmalar görev aldığı ileri sürülmektedir. FSH'in otofaji üzerine etkilerinde GC'lerinin PI3K/AKT yolunun aktive olduğu bildirilmiştir (Qiang Liu ve ark. 2021). Class I PI3K in heterodimerik bir molekül olduğu, p110 katalitik subunit (α , β , γ , or δ) AKT-mTOR yolu aracılığı ile otofajiyi inhibe ederken, bir regülatör subunit (p55, p85, veya p101), Vps34-Vps15-beclin1-Atg14L aracılığı ile otofajiyi uyarmaktadır (Dou et al., 2011). Qiang Liu ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada LY2940002 kullanarak PI3K yolağını inhibe ettiğinde FSH'ın GC'lerdeki otofaji etkisi ortadan kalmış ve FSH'ın otofaji üzerine etkisinin PI3K/AKT yolu üzerinden olduğunu bildirmiştir. Ayrıca FSH'ın aşırı proliferasyonuna bağlı olarak hipoksiye neden olduğu HIF-1 α birikiminin arttığı da ileri sürülmektedir. FSH uygulaması sonrası HIF-1 α ekspresyonunda artış, hem in vivo hem in vitro olarak gösterilmiştir (Zhou 2017).

Bu çalışmada FSH uygulaması ile LC3B seviyesinin kontrol grubuna göre azalmış olması, FSH'ın otofajiden koruyucu etkisine veya uygulama süresinin kısa olmasına bağlı olabileceği sonucuna varıldı.

VDAC (voltageja bağlı anyon kanalı) ailesi 3 üyeden oluşur: VDAC1, VDAC2 ve VDAC3. VDAC2, BCL2L1 ve BAK1 gibi BCL2 ailesinin birkaç üyesiyle birlikte apoptozda çok önemli roller oynayan mitokondriyal bir dış zar kanal proteindir. (Cheng ve ark. 2003 ; Sarioglu ve ark. 2008). VDAC2, foliküler gelişimin düzenlenmesinde rol oynayan otofaji ve apoptozun düzenlenmesinde çift fonksiyonlu bir faktör olduğu ileri sürülmektedir (Jia Yuan ve ark 2015). VDAC2, oligomerizasyonunu inhibe etmek için BAK1 ile doğrudan etkileşime girerek hücre apoptozunu baskılar (Cheng ve ark. 2003). Ek olarak, başka bir BCL2 aile üyesi, kesilmiş BID/tBID (kesilmiş BH3 etkileşimli etki alanı ölüm agonisti), VDAC2 yoluyla apoptozu düzenleyebilir (Roy ve ark. 2009). Yaptığımız PCR çalışmasında da kontrol ve sham gruplarında VDAC2 mRNA seviyesinin yüksek olduğu tespit edildi. İmmunohistokimyasal bulgularımızda benzer biçimde, kontrol ve sham gruplarının sekonder ve tersiyer foliküllerinde ekspresyonun fazla olduğu gözlemlendi ve VDAC2'nin folikül gelişiminde önemli rol oynadığı düşünüldü. VDAC2 ekspresyonu dominant foliküllerde çok miktarda eksprese edildiği gösterilmiştir. (Zielak ve ark. 2009). Sığır overlerinde yapılan çalışmada dominant foliküllerden

VDAC2 ekspresyonunun artmış olduğu gösterilmiştir (Zielak ve ark. 2007). VDAC2'nin mitokondrial porin proteini olduğu mitokondrial küçük proteinlerin mitokondrial dış membrandan geçişini sağlamaktadır. VDAC2'nin fazla olduğu hücrelerde BAK aktivasyonunun engellendiği ve apoptozun inhibe edildiği bilinmektedir. VDAC2'nin granüloza hücrelerinde bulunduğu, granüloza hücrelerinde bulunan BCL2L1 ve BECN1 bağlanmasını sağlayarak, overlerde otofajiyi inhibe etmektedir. Zielak AF ve arkadaşları yaptıkları çalışmada VDAC2 ekspresyonunun dominant folikülerde artmış olduğunu, VDAC2'nin pro-apoptotik olan mitokondrial ribozomal protein L41 (MRPL41)'in anti-apoptotik faktör Bcl-2'ye bağlanarak, p53'ün pro-apoptotik etkisini arttırdığını dominant folikül seçiminde rol oynadığını rapor etmişlerdir. VDAC2'nin over anti-apoptotik etkisi in vitro mouse embriyonik fibroblastlarında yapılan çalışmada da gösterilmiştir. Bu çalışmada VDAC2 ile pro-apoptotik BCL2L1 ile doğrudan bir etkileşime girdiği ve VDAC2 aşırı ekspresyonu BCL2L1 ile indüklenen apoptozu etkili bir şekilde inhibe ettiği gösterilmiştir. (Plotz ve ark. 2012). Benzer olayın foliküler gelişim içinde rol oynayabileceğini ileri sürülebilir. Normal gelişim sırasında sekonder ve Graaf foliküllerde eksprese edilen VDAC2 ekspresyonunun otofajiyi inhibe ederek ve apoptotik ölümden koruduğu düşünüldü.

VDAC2 nin embriyonik over gelişiminde de rolü bulunmaktadır. VDAC2 ekspresyonunun over gelişiminde de rol oynadığı GATA1 ve MYBL2'nin, VDAC2'ye bağlanarak aktive ettiği gösterilmiştir (Jia Yuan 2015). Gelişen overde, primer follikülünden sekonder folliküle geçişin en önemli aşmasında (14dpp) VDAC2 ekspresyonu pik yapmaktadır (Jia Yuan 2015). Zielak ve ark., yaptıkları çalışmada VDAC2 mRNA seviyesini dominant foliküllerde diğer folliküllere göre artmış bulmuş ve Bak aktivasyonundan ve mitokondrial apoptotik yoldan koruduğunu, gelişen foliküllerde düşük düzeydeki ekspresyonunu ise BAK aktivasyonu ile apoptozu neden olduğunu ileri sürmüştür (Zielak ve ark. 2007).

Düşük doz ve yüksek doz FSH uygulanan gruplarda, kontrol ve sham gruplarına göre VDAC2 mRNA seviyesinde ve immünohistokimyasal ekspresyonunda düşüş dikkat çekici bulundu. Yüksek doz FSH uygulamasının folikül gelişiminde olumsuz etkisinin VDAC2 üzerinden yapabileceği düşünüldü. VDAC2'nin folikül gelişimi ile ilgili az sayıda makale olmasına rağmen, FSH ile ilişkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Transjenik fare overlerinde VDAC2'nin LC3+ otofagozom oluşumunu engelleyerek otofajiyi inhibe ederken, VDAC2 knockout yapılan

farelerde otofajiyi arttırdığı gösterilmiştir (Yuan 2015). VDAC2'nin folikül gelişiminde BECN1 ve BCL2L1 ile ilişkisini arttırarak otofajiyi inhibe etmektedir. BECN1 (+/-) farelerin overlerinde, germ hücrelerinde önemli bir azalma olduğu gösterilmiştir (Gawriluk 2011). Yüksek doz FSH uygulması ise VDAC2 ekspresyonun azalmasının, hücrelerin apoptozdan koruyucu etkisinin ortadan kalmasına bağlı atreziye doğru gidişin nedeni olabilir. VDAC2'nin apoptozu attırmasının yanı sıra, steroidjenik hormonlar üzerine etkisi atrezide rol oynayabileceğini düşündürdü. VDAC2'nin mitokondri ile bağlantısı endoplazmik membran üzerinde steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Prasad ve ark. 2014). Star, steroidjenezin başladığı mitokondrionlarda dış membrandan iç membrana kolesterol taşınmasını sağlayarak steroid sentezini düzenlemektedir. Mitokondri içinde kolesterol (CYP11A) enzimi aracılığı ile pregnenolona dönüşmektedir. Pregnenolon ise androjen, progesteron ve östrojen hormonlarının prekürsörüdür (Ostini ve ark. 2018). StAR ekspresyonu non atrezik folliküllerde azalmakta ve artması durumunda atrezi görülmektedir (Sahmi ve ark. 2004). FSH uygulamasının StAR mRNA ekspresyonunu azalttığı bilinmektedir (Stapp ve ark. 2014). Bu bilgiler ışığında, yüksek doz FSH uygulamasının folliküler atrezi üzerine etkisinin VDAC2 üzerinden Star ekspresyonu azaltarak da etki gösterdiği ileri sürülebilir.

SIRT'ler hücresel metabolizmayı, redoks durumunu, stres sinyalinin, hücre döngüsünü, hücrenin hayatta kalmasını ve genom stabilitesini düzenlemektedir (Sato ve ark. 2014; Mostoslavsk ve ark. 2006; Sebastian ve ark. 2012; Onn ve ark. 2020). SIRT'lerin diş üreme fonksiyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Tatone ve ark. 2015). Diş üremesinin işlevi ile ilgili nükleer olarak SIRT1 ve SIRT6, mitokondriyal olarak SIRT3 en kapsamlı incelenen SIRT'lerdir. SIRT6 bir sirtuin ailesi üyesi ve hücresel fizyoloji ve tümörögenez düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Sebastian ve ark. 2012). SIRT6 en çok hücresel proliferasyon, enerji metabolizması, yaşlanma ve DNA hasar onarımının düzenlenmesindeki rolleriyle bilinmektedir Kadın yaşı ilerledikçe ovaryum folikül havuzunun boyutunda, oosit veriminde ve oosit kalitesinde kademeli bir azalma olmaktadır. Bu sürece ovaryum yaşlanması denilmektedir. Ovaryum yaşlanmasının fare modellerini uygulayan araştırmalar SIRT1, SIRT3 ve SIRT6'nın ovaryum rezerviyle yakından ilişkili olduğunu ve ovaryum yaşlanmasının belirteçleri olarak kabul edilebileceği gösterilmiştir (Zhang ve ark. 2013). Fare oositlerinde, SIRT6

tükenmesi, yetersiz histon deasetilasyonu, kromozomların yanlış gruplaşması ve embriyonik gelişimdeki kusurlarla birlikte anöploidi ile sonuçlanmaktadır. (Akiyama ve ark. 2015).

SIRT6'nın koruyucu fonksiyon gösterdiği bilinmektedir, antienflamatuvar, antioksidan ve antiapoptotik etkileri bildirilmiştir. Bununla beraber, SIRT6'nın uyarılması ile otofajinin uyarıldığı ve otofaji ile ilişkili ölümlerin gerçekleştiği de rapor edilmiştir (Lachettini ve ark. 2018). İnsanlarda, SIRT6'nın germinal vezikül aşamasındaki oositlerde eksprese edildiği ve *in vivo* oositlerde oldukça yüksek olmasına rağmen *in vitro* mature edilen oositlerde SIRT6'nın daha düşük düzeyde eksprese edildiği bildirilmiştir (Zhao ve ark. 2016). Bizde bu çalışmada kontrol ve sham grubunda sekonder ve graaf foliküllerinde SIRT6 immünoaktivitesinin granüloza hücrelerinde orta derecede olduğunu tespit ettik. SIRT6 foliküler gelişim aşamasında önemli rol oynadığının bir göstergesi olarak değerlendirildi. SIRT6'nın foliküler gelişimi ile birbirine zıt görüşte iki çalışma 2019 yılında yayınlanmıştır. Cao z. Ve ark., SIRT6'nın over folikül üzerine pozitif etkilerinin olduğunu, folikül genişlemesi ve oosit maturasyonunu düzenlediğini ileri sürerek, kümülüs genişlemesi ve oosit maturasyonunu sağlayan oositler ile kümülüs hücreleri arasında gap junction iletimini düzenlemede önemli rol oynadığı, SIRT6 inhibisyonunda bu fonksiyonların bozulduğunu göstermişlerdir. SIRT6 inhibisyonunun kümülüs gelişmesini sağlayan MAPK1/3 ve CDK1 seviyesini azaltarak etki oluşturduğu bildirmişlerdir (Cao ve ark. 2019). Gorczyca 2019 ise SIRT6'nın granüloza hücrelerinde apoptosisi arttırdığı yönündedir. Bir antifungisit olan vinclozolinin domuzlar üzerinde yaptığı çalışmada, overlerden toplanan granüloza hücrelerinde SIRT6, mRNA ve protein ekspresyonunu arttığını tespit etmiş ve granüloza hücrelerinde apoptoza neden olabileceğini ileri sürmüştür (Gorczyca ve ark. 2019). Bu çalışmada sağlıklı foliküllerde SIRT6 ekspresyonun fazla olması, SIRT6'nın genomik stabiliteyi sağladığı göz önüne alındığında foliküler gelişim aşamalarında granüloza hücrelerinin stabilitesini sağlamada görev alabileceğini de ileri sürmüştür. Bu çalışmada SIRT6 ekspresyonunun sağlıklı foliküllerde düşük seviyede olduğu, atrezik foliküllerde ise ekspresyonun fazla olduğu mRNA seviyesinde atrezik foliküllerde arttığı gösterilmiştir. Ayrıca resveratrol vererek SIRT6 aktivasyonunu artırmışlar ve doz artışı ile birlikte apoptozun arttığını göstermişlerdir (Zhao ve ark. 2014). Bununla beraber, SIRT6 ekspresyonunun primordiyal ve primer foliküllerin oositlerinde, nükleuslarında ve sitoplazmasında bulunduğunu, luteal hücrelerde belirgin olduğunu,

kalori kısıtlaması sonrası SIRT6 ekspresyonunun arttığını corpora luteal korunmasını sağladığını ve böylece üreme çağında faydalı etki yaptığı bildirilmiştir (Luo. Ve ark. 2017).

FSH verilen grupta SIRT6 mRNA seviyelerinin düşük olduğu tespit edildi. SIRT6 mRNA ekspresyonun azalması, FSH'nin zararlı etkisine bağlı olabileceği düşünüldü. SIRT6 ilgili kanserler üzerine yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Ancak kanser üzerine etkileri tartışmalıdır. Bazı tümörlerde (kolorektal, meme, yumurtalık, karaciğer, akciğer ve pankreas tümörleri) SIRT6 ekspresyonun azalması kötü prognoz belirtisi olarak değerlendirilirken; diğer bazı kanserlerde (deri kanseri, hepatokarsinoma, multipl miyelom, ve akut miyeloid lösemi) SIRT6 aşırı ekspresyonu kötü sonuçlar ile ilişkilendirilmektedir (Lachettini ve ark. 2018). Bununla beraber, SIRT6'nın kanser hücrelerini apoptoz ile ortadan kaldırdığı buna karşılık normal hücrelere etkisinin olmadığı ileri sürülmektedir. Kanser hücrelerinde SIRT6'nın aşırı artışının mono-ADP ribosiltransferaz aktivitesine neden olduğu, daha sonra p53 ve p73 apoptotik yollarının etkisi ile apoptoza neden olduğu ileri sürülmektedir. Kanser hücresinde hızlı proliferasyonun büyük miktarlarda DNA hasarına neden olması SIRT6'nın aşırı ekspresyonunun kanser hücrelerini DNA hasarına duyarlı hale getirmesine neden olabileceği ileri sürülmektedir (Van M. ve ark. 2011).

Bu çalışmada FSH verilen gruplarda SIRT6 immunoreaktivitesinin oldukça düşük olduğu bu gruplarda SIRT6 mRNA seviyesinde düşük olduğu tespit edildi. SIRT6'nın follikül gelişimi ile ilgili literatürde bilgi bulunmamaktadır. İnfertil kadınların granüloza / lutein hücreleri üzerinde yapılan çalışmada, endometriozis vakalarında FSH dozu ile SIRT6 ekspresyonunun arttığı bunun dışında kontrol grubu olarak kullanılan oosit donör kadınlarda düşük olduğunu ve SIRT6 ekspresyonun en fazla “zayıf yanıt veren” grup olarak tespit etmişler, bu hastalarda birikmiş olan DNA hasarının tamirini sağlamaya çalışıldığının bir belirtisi olarak değerlendirmişlerdir (González-Fernández ve ark. 2019).

Bu çalışmada oosit donör grubuna ovarian indüksiyon tedavisi uygulanmış ve SIRT6 ekspresyonu diğer hasta grubuna göre düşük bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da FSH verilen grupta SIRT6 ekspresyonunun FSH dozu ile azalmış olduğu tespit edildi ve otofaji ile foliküler atresi üzerinde etkisinin olmadığı düşünüldü.

Düşük doz FSH verilen grupta Graaf foliküllerinde SIRT6 ekspresyonu oldukça güçlü olduğunu tespit ettik.

Yüksek doz FSH verilen grupta graft folliküllerinde SIRT6 ekspresyonu oldukça orta derecede olduğunu tespit ettik.



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Ovaryum granüloza hücrelerinde görülen foliküler atrezide, birçok hücre ölüm sürecinin rol oynadığı bilinmektedir. Hücrelerin ölümü, genetik olarak belirlenmiştir. Foliküller atrezi, dişi memeli üreme sisteminde önemli fizyolojik birçok fonksiyona sahiptir. Ovaryumdaki birçok faktörden etkilenir ve hücre apoptozuna dayanmaktadır. Bununla birlikte FSH, foliküller için en kritik hayatta kalma faktörü olabilir.

Çalışmamızda IVF tedavilerinde yaygın olarak yüksek dozda kullanılan gonadotropinlerin over atreziye neden olup olmadığı araştırıldı ve otofajik markerlar olan LC3B ve SIRT6 ile mitokondrial ilişkisi marker olarakta VDAC2 ile hem immunohistokimyasal hem de moleküler olarak incelendi.

Çalışmamızda hematoksilin eozin boyaması sonucu olarak;

- gruplarda genel olarak bütün foliküllerin varlığı gözlemlendiği,
- foliküler gelişim esnasında bazı foliküllerin dejenerasyona uğradığı,
- özellikle düşük doz ve yüksek doz FSH gruplarında Graaf foliküllerin geliştiği,
- FSH'ın bu gelişen folikül sayısında artışa sebep olduğu,
- yüksek doz FSH'ın oosit kalitesini bozduğu, foliküler atreziye neden olduğu
- sonucuna varıldı.

LC3B immunoreaktivitesi ile;

- FSH uygulaması ile LC3B seviyesinin kontrol grubuna göre azalması FSH'ın otofajiden koruyucu etkisinin olduğu,
- LC3B mRNA düzeylerinin kontrol grubunda ve sham grubunda yüksek olduğu,
- ekspresyonunun primordial folikül hücrelerinde çok zayıf bulunduğu,
- primer ve preantral foliküllerin granüloza hücrelerinde LC3B aktivitesinin yoğun olduğu,
- antral folikül aşamasında da LC3 aktivitesinin devam ettiği,
- oositlerde ise LC3 ekspresyonunun gözlenmediği sonucuna varıldı.

VDAC2 immunoreaktivitesi ile;

- VDAC2'nin FSH ile olan ilişkisi hakkında net bir çalışma olmadığı,
- Düşük doz ve yüksek doz FSH uygulanan gruplarda, kontrol ve sham
- gruplarına göre immunohistokimyasal ekspresyonda azalma olduğu,
- immunohistokimyasal sonuca benzer şekilde düşük doz ve yüksek doz FSH uygulanan gruplarda VDAC2 mRNA seviyesinde azalma olduğu,
- VDAC2'nin folikül gelişiminde önemli rol oynayabileceği sonucuna varıldı.

SIRT6 immunoreaktivitesi ile;

- ekspresyonunun sağlıklı foliküllerde düşük seviyede olduğu,
- atrezik foliküllerde ise ekspresyonun fazla olduğu mRNA seviyesinde atrezik foliküllerde arttığı,
- doz artışı ile birlikte apoptozun arttığı,
- aynı şekilde FSH verilen grupta mRNA seviyelerinin düşük olduğu,
- FSH verilen grupta ekspresyonunun FSH dozu ile azalmış olduğu ve otofaji ile foliküler atresi üzerinde etkisinin olmadığı sonucuna varıldı.

Çalışmamızda yapılan hematoksilin-eozin boyaması, LC3B immunoreaktivitesi, VDAC2 immunoreaktivitesi ve SIRT6 immunoreaktivitesi, RT-PCR sonuçları bilimsel çalışmalar ve istatistiksel veri analiziyle desteklenmiştir.

Bu çalışma ile foliküler atrezide rol oynayan ana hücre ölüm mekanizmaları olan apoptoz ve otofajın foliküler atreziye sebep olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte IVF tedavilerinde kullanılan yüksek doz gonadotropinlerin over foliküler atreziye neden olabileceği sonucu da yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

6. KAYNAKLAR

Akiyama T, Nagata M, Aoki F. Inadequate histone deacetylation during oocyte meiosis causes aneuploidy and embryo death in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 7339–7344.

Baran V., Fabian D., Rehak P. Akt/PKB plays role of apoptosis relay on entry into first mitosis of mouse embryo. *Zygote*. 2013 Nov;21(4):406-16. doi: 10.1017/S0967199413000178. Epub 2013 May 9.

Binelli M., Murphy B.D., Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reprod Fertil Dev*. 2010;22(1):1-12. doi: 10.1071/RD09218.

Cao, Z., Zhang, D., Tong, X., Wang, Y., Qi, X., Ning, W. Zhang, Y. Cumulus cell-derived and maternal SIRT6 differentially regulates porcine oocyte meiotic maturation. *Theriogenology*. 2020 Jan 15;142:158-168. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.09.048. Epub 2019 Sep 28.

Carla Tatone C., Giovanna Di Emidio G. D., Maurizio Vitti M., Michela Di Carlo M. D., Jr S. S., D'Alessandro A. M., Falone S., Amicarelli F. Sirtuin functions in female fertility: possible role in oxidative stress and aging. *Oxid Med Cell Longev*. 2015;2015:659687. doi: 10.1155/2015/659687. Epub 2015 May 5.

Carlson B.M., *Human Embryology and Developmental Biology*. 5th Edition ed. 2014: Saunders.

Cheng E.H., Sheiko T.V., Fisher J.K., Craigen W.J., Korsmeyer S.J. VDAC2 inhibits BAK activation and mitochondrial apoptosis. *Science*. 2003 Jul 25;301(5632):513-7. doi:10.1126/science.1083995.

Choi J., Jo M, Lee E., Choi D. Induction of apoptotic cell death via accumulation of autophagosomes in rat granulosa cells. *Fertil Steril*. 2011 Mar 15;95(4):1482-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.06.006. Epub 2010 Jul 14.

Choi, J. Y., Jo, M. W., Lee, E. Y., Yoon, B.-K., & Choi, D. S. (2010). The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 93(8), 2532–2537. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.11.021.

Chun S-Y, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJW. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: Follicles-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 1996; 17:1447-1456.

Çelik Ö. (Edt.) Yardımcı Üreme Teknikleri Temel Klinik ve Embriyolojik Uygulamalar. Nobel Tıp Kitabevi, 2011.

Duerrschmidt N., Zabirnyk O., Nowicki M. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1-mediated autophagy in human granulosa cells as an alternative of programmed cell death. *Endocrinology*. 2006 Aug;147(8):3851-60. doi: 10.1210/en.2006-0088. Epub 2006 May 11.

Eroschenko VP, diFiore's Atlas of histology with functional correlations. 12th Edition 2013: Wolters Kluwer.

Escobar M.L., Echeverria O.M., Garcia G. Immunohistochemical and ultrastructural study of the lamellae of oocytes in atretic follicles in relation to different. *Eur J Histochem*. 2015 Aug 12;59(3):2535. doi: 10.4081/ejh.2015.2535.

Fernández R.G., Ramírez R.M., Rotoli D., Hernández J., Naftolin F., Vasallo P. M., Palumbo A., Ávila J. Granulosa-Lutein Cell Sirtuin Gene Expression Profiles Differ between Normal Donors and Infertile Women. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 31;21(1):295. doi: 10.3390/ijms21010295.

Flaws JA, Abbud R, Mann RJ, Nilson JH, Hirshfield AN. Chronically elevated luteinizing hormone depletes primordial follicles in the mouse ovary. *Biol Reprod*. 1997 Nov;57(5):1233-7. doi: 10.1095/biolreprod57.5.1233.

Gawriluk T. R., Hale A. N., Flaws A. J., Dillon C. P., Green D. R., Rucker E.B. 3rd . Autophagy is a cell survival program for female germ cells in the murine ovary. *Reproduction*. 2011 Jun;141(6):759-65. doi: 10.1530/REP-10-0489. Epub 2011 Apr 4.

Giblin W., Skinner M.E., Lombard D.B. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. *Trends Genet*. 2014 Jul;30(7):271-86. doi: 10.1016/j.tig.2014.04.007. Epub 2014 May 28.

Gorczyca G., Wartalski K., Tabarowski Z., Duda M.J. Effects of vinclozolin exposure on the expression and activity of SIRT1 and SIRT6 in the porcine ovary. *Physiol Pharmacol*. 2019 Feb;70(1). doi: 10.26402/jpp.2019.1.15.

Han L, Ge J, Zhang L, et al. Sirt6 depletion causes spindle defects and chromosome misalignment during meiosis of mouse oocyte. *Sci Rep* 2015; 5: 15366.

<http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M700258-MCP200>

<http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>

<https://2nlsnb2fe1ed2nm0us28io0z-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2015/08/ovulation1.jpg>

<https://images.app.goo.gl/qt8YA241KNABwkSF9>

<https://schoolbag.info/biology/living/living.files/image906.jpg>

Hulas-Stasiak M., Gawron A. Follicular atresia in the prepubertal spiny mouse (*Acomys cahirinus*) ovary. *Apoptosis*. 2011 Oct;16(10):967-75. doi: 10.1007/s10495-011-0626-9.

Iachettini S., Trisciuglio D., Rotili D., Lucidi A., Salvati E., Zizza P., Leo L. D., Bufalo D. D., Ciriolo M. R., Leonetti C., Steegborn C., Mai A., Rizzo A., Biroccio A. Pharmacological activation of SIRT6 triggers lethal autophagy in human cancer cells. *Cell Death Dis*. 2018 Sep 24;9(10):996. doi: 10.1038/s41419-018-1065-0.

Inoue N., Matsuda F., Goto Y., Manabe N. Role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary. *J Reprod Dev*. 2011 Apr;57(2):169-75. doi: 10.1262/jrd.10-198e.

Junqueira L. C., Carneiro J. (Çeviri Ed.; Aytakin Y., Solakoğlu S.) *Temel Histoloji*. Nobel Tıp Kitabevleri, 2005.

Kaipia A., Hsueh A.J. Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol*. 1997;59:349-63. doi: 10.1146/annurev.physiol.59.1.349.

Kierszenbaum A. L. (Çeviri Edt.; Demir R.) *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*. Palme Yayıncılık, 2006.

Kierszenbaum A.L., Tres L. L. *Histology and Cell Biology*. 4th Edition 2016: Saunders.

Liu Q., Gao H., Yang F., Zhang H., Zeng S. FSH Promotes Progesterone Synthesis by Enhancing Autophagy to Accelerate Lipid Droplet Degradation in Porcine Granulosa Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2021 Feb 16;9:626927. doi: 10.3389/fcell.2021.626927. eCollection 2021.

Lombard D.B., Schwer B., Alt F.W., Mostoslavsky R. SIRT6 in DNA repair, metabolism and ageing. *J Intern Med*. 2008;263(2):128–41. doi: 10.1111/j.1365-2796.2007.01902.x.

Luo Q., Yin N., Zhang L., Yuan W., Zhao W., Luan X., Zhang H. Role of SDF-1/CXCR4 and cytokines in the development of ovary injury in chemotherapy drug induced premature ovarian failure mice. *Life Sci.* 2017 Jun 15;179:103-109. doi: 10.1016/j.lfs.2017.05.001. Epub 2017 May 3.

Manabe N., Matsuda-Minehata F., Goto Y. Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries. *Reprod Domest Anim.* 2008 Jul;43 Suppl 2:268-72. doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01172.x.

Manabe N., Goto Y., Matsuda-Minehata F., Inoue N., Maeda A., Sakamaki K., Miyano T. Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *J Reprod Dev.* 2004 Ekim;50(5):493-514. doi: 10.1262/jrd.50.493.

Meng L., Rijntjes E., Swarts H., Bunschoten A., van der Stelt I., Keijer J., Teerds K. Dietary-induced chronic hypothyroidism negatively affects rat follicular development and ovulation rate and is associated with oxidative stress. *Biol Reprod.* 2016 Apr;94(4):90. doi: 10.1095/biolreprod.115.136515. Epub 2016 Mar 9.

Meng L., Jan S. Z., Hamer G., Pelt A. M. V., Stelt I. V. D., Keijer J., Teerds K. J. Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biol Reprod.* 2018 Oct 1;99(4):853-863. doi: 10.1093/biolre/iroy116.

Meter M. V., Mao Z., Gorbunova V., Seluanov A. SIRT6 overexpression induces massive apoptosis in cancer cells but not in normal cells. *Cell Cycle.* 2011 Sep 15;10(18):3153-8. doi: 10.4161/cc.10.18.17435. Epub 2011 Sep 15.

Moore KL, Persaud TVN; Torchia MG. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology.* 10th Edition 2016: Elsevier Mostoslavsky R., Chua K.F., Lombard D.B., Pang W.W., Fischer M.R., Gellon L., Liu P., Mostoslavsky G., Franco S., Murphy M.M. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006;124(2):315–29. doi: 10.1016/j.cell.2005.11.044.

Nakashima A., Aoki A., Kusabiraki T., Shima T., Yoshino O., Cheng S. B., Sharma S., Saito S. Role of autophagy in oocytogenesis, embryogenesis, implantation, and pathophysiology of pre-eclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 2017 Apr;43(4):633-643. doi: 10.1111/jog.13292.

Onn L., Portillo M., Ilic S., Cleitman G., Stein D., Kaluski S., Shirat I., Slobodnik Z., Einav M., Erdel F., Akabayov B., Toiber D. SIRT6 is a DNA double-strand break sensor. *Elife*. 2020 Jan 29;9:e51636. doi: 10.7554/eLife.51636.

Ostuni A., Faruolo M. P., Sileo C., Petillo A., Boni R. Online ahead of print. Effect of follicle size and atresia grade on mitochondrial membrane potential and steroidogenic acute regulatory protein expression in bovine granulosa cells. *Zygote*. 2018 Dec 18;1-9. doi: 10.1017/S0967199418000564.

Perego CM, Luis F Schutz, Caloni , Cortinovic C., Albonico M., Leon J Spicer. Evidence for direct effects of glyphosate on ovarian function: glyphosate influences steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa but not theca cells in vitro. *J. Appl Toxicol*. 2017 Jun;37(6):692-698. doi: 10.1002/jat.3417. Epub 2016 Dec 5.

Plotz M., Gillissen B., Hossini A.M., Daniel P.T., Eberle J. Disruption of the VDAC2-Bak interaction by Bcl-x(S) mediates efficient induction of apoptosis in melanoma cells. *Cell Death Differ* 2012; 19:1928-38; PMID:22705850; <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2012.71>.

Prasad M., Kaur J., Pawlak K. J., Bose M., Whittal R. M., Bose H. S. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) regulates steroidogenic activity via steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) interaction. *J Biol Chem*. 2015 Jan 30;290(5):2604-16. doi: 10.1074/jbc.M114.605808. Epub 2014 Dec 10.

Ross M.H., Pawlina W.P. *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology* 7th Edition: 2016 Wolters Kluwer.

Roy S.S., Ehrlich A.M., Craigen W.J., Hajnoczky G. VDAC2 is required for truncated BID-induced mitochondrial apoptosis by recruiting BAK to the mitochondria. *EMBO Rep* 2009; 10:1341-7; PMID:19820692; <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2009.219>.

Sadler T. W. (Çeviri Edt.; Başaklar A. C.) *Langman's Medikal Embriyoloji*, 11. baskıdan çeviri. Palme Yayıncılık, 2011.

Sahmi, M., Nicola, E., Silva, J. and Price, C. (2004) Expression of 17 β - and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenases and steroidogenic acute regulatory protein in non-luteinizing bovine granulosa cells in vitro. *Mol Cell Endocrinol*. 2004 Aug 31;223(1-2):43-54. doi: 10.1016/j.mce.2004.05.010.

Sarioglu H, Brandner S, Habegger M, Jacobsen C, Lichtmannegger J, Wormke M, Andrae U. Analysis of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced proteome changes in 5L rat hepatoma cells reveals novel targets of dioxin action including the mitochondrial apoptosis regulator VDAC2. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Feb;7(2):394-410. doi: 10.1074/mcp.M700258-MCP200. Epub 2007 Nov 12.

Satoh A., Stein L., Imai S. The role of mammalian sirtuins in the regulation of metabolism, aging, and longevity. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;206:125-62. doi: 10.1007/978-3-642-21631-2_7.

Sebastian C., Zwaans B.M., Silberman D.M., Gymrek M., Goren A., Zhong L., Ram O., Truelove J., Guimaraes A.R., Toiber D., Cosentino C., Greenson J. K., MacDonald A. I., McGlynn L., Maxwell F., Edwards J., Giacosa S., Guccione E., Weissleder R., Bernstein B. E., Regev A., Shiels P. G., Lombard D. B., Mostoslavsky R. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell*. 2012;151(6):1185–99. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.047.

Shen M., Jiang Y., Guan Z., Cao Y., Sun S.C., Liu H. FSH protects mouse granulosa cells from oxidative damage by repressing mitophagy. *Sci Rep*. 2016 Nov 30;6:38090. doi: 10.1038/srep38090.

Shen M., Liu Z., Li B., Teng Y., Zhang J., Tang Y., Sun S.C., Liu H. Involvement of FoxO1 in the effects of follicle-stimulating hormone on inhibition of apoptosis in mouse granulosa cells. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1475; PMID:25321482; <https://doi.org/10.1038/cddis.2014.400>.

Shen M., Jiang Y., Guan Z., Cao Y., Li L., Liu H., Sun C. Protective mechanism of FSH against oxidative damage in mouse ovarian granulosa cells by repressing autophagy. *Autophagy*. 2017 Aug 3;13(8):1364-1385. doi: 10.1080/15548627.2017.1327941. Epub 2017 Jun 9.

Slot K. A., Kastelijn J., Bachelot A., Kelly P. A., Binart N., Teerds K. J. Reduced recruitment and survival of primordial and growing follicles in GH receptor deficient mice. *Reproduction*. 2006 Mar;131(3):525-32. doi: 10.1530/rep.1.00946.

Stapp D.A., Gifford A.C., Hallford A. M., Hernandez Gifford A. J. Evaluation of steroidogenic capacity after follicle stimulating hormone stimulation in bovine granulosa cells of Revalor 200® implanted heifers. *J. Anim Sci Biotechnol* . 2014 Jan 7;5(1):2. doi: 10.1186/2049-1891-5-2.

Tang X, Ma L, Guo S, Liang M, Jiang Z. High doses of FSH induce autophagy in bovine ovarian granulosa cells via the AKT/mTOR pathway. *Reprod Domest Anim.* 2021 Feb;56(2):324-332. doi: 10.1111/rda.13869. Epub 2020 Dec 10.

Wang Y., Tian C., Zheng J. C. FoxO3a contributes to the reprogramming process and the differentiation of induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.* 2013 Nov 15;22(22):2954-63. doi: 10.1089/scd.2013.0044. Epub 2013 Aug 9.

Young J. M., McNeilly A. S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction.* 2010 Oct;140(4):489-504. doi: 10.1530/REP-10-0094. Epub 2010 Jul 13.

Yuan J., Zhang Y., Sheng Y., Fu X., Cheng H, Zhou R. MYBL2 guides autophagy suppressor VDAC2 in the developing ovary to inhibit autophagy through a complex of VDAC2-BECN1-BCL2L1 in mammals. *Autophagy.* 2015 Jul; 11(7): 1081–1098. Published online 2015 Jun 10. doi: 10.1080/15548627.2015.1040970.

Zhang C. X., Zhang Q., Xie Y. Y., He XY, Xiang C., Hou X. S., Zhou Y., Chen L., Zhang G. X., Liu G. Mouse Double Minute 2 Actively Suppresses p53 Activity in Oocytes during Mouse Folliculogenesis. *Am J Pathol.* 2017 Feb;187(2):339-351. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.09.023. Epub 2016 Nov 29.

Zhang X. M., Li L., Xu J. J., Wang N., iu W. J., Lin X. H., Fu Y. C., Luo L. L. Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression. *Gene.* 2013 Jul 1;523(1):82-7. doi: 10.1016/j.gene.2013.03.039. Epub 2013 Apr 6.

Zhao F., Zhao W., Ren S., Fu Y., Fang X., Wang X., Li B. Roles of SIRT1 in granulosa cell apoptosis during the process of follicular atresia in porcine ovary. *Anim Reprod Sci.* 2014 Dec 10;151(1-2):34-41. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.10.002. Epub 2014 Oct 14.

Zhao H. C., Ding T., Ren Y., Li T. J., Li R., Fan Y., Yan J., Zhao Y., Li M., Yu Y., Qiao J. Role of Sirt3 in mitochondrial biogenesis and developmental competence of human in vitro matured oocytes. *Hum Reprod.* 2016 Mar;31(3):607-22. doi: 10.1093/humrep/dev345. Epub 2016 Jan 18.

Zhou J., Peng X., Mei S. Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. Zhou J., Peng X., Mei S. *Int J Biol Sci.* 2019 Jan 29;15(4):726-737. doi: 10.7150/ijbs.30369. eCollection 2019.

Zielak A. E., Forde N., Park S. D. E., Doohan F., Coussens P. M., Smith G. W., Ireland J. J., Lonergan P., Evans A. C. O. Identification of novel genes associated with dominant follicle development in cattle. *Reprod Fertil Dev.* 2007;19(8):967-75. doi: 10.1071/rd07102.



8. EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 01.07.2019-E.54074



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü



Sayı : 28233352-302.14.01-
Konu : Meltem ÜÇÖZ'ün Tez Konusu Hk.

SBE HİSTOLOJİ-EMBRIYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Enstitümüz 28.06.2019 tarih ve 19/57 sayılı yönetim kurulu toplantısında, Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Tezli Yüksek Lisans Programı 171350001 numaralı öğrencisi Meltem ÜÇÖZ'ün tez konusunun, etik kurul onayı alınması kaydı ile "**Over Folliküler Atrezide FSH Uygulamasının Granulosa Hücreleri Mitokondrionları Üzerinden Etkisinin İncelenmesi**" olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.
Gereğini ve bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Bilal-i Habes GÜMÜŞ
Enstitü Müdürü V.

Adres: Tıp Fakültesi Dekanlığı Zemin Kat Uncubozköy Kampüsü Manisa
Telefon: (0 236) 2360989 Faks: (0 236) 2382158
E-Posta: saglik.sekreterlik@cbu.edu.tr Elektronik Ağ: saglikbe.cbu.edu.tr

Bilgi İçin: Çisem Tutan (Ayşe Ertük
Vekaletıyla)
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BASKANLIĞINA

18.05.2021

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR.
(Prof. Dr. M. Kemal ÖZELÇİBN)

98

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİHİ / NO	02 / 07 / 2019 / 77.837.025		
ARAŞTIRMANIN ADI	Over folliküler atrezide FSH uygulamasının granüloza hücreleri mitokondrionları üzerinden etkisinin incelenmesi		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Prof. Dr. M. Kemal ÖZBİLGİN		
ARAŞTIRMA EĞİTİ	Tezli Yüksek Lisans Öğrencisi Meltem ÜÇÖZ		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi ☐	Yüksek Lisans/Doktora ☒	Akademik ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	01 / 07 / 2019 / Tarih ve 28550 sayılı; araştırma dosyası		
KARAR BELGELERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.		
Unvanı / Adı / Soyadı	İmza	Araştırma ile İlgili Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Emin KURT Gözetmen AD		☐	☐
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestesi ve Reanimasyon AD		☐	☐
Prof. Dr. Erbuğra TATUSUNAK Anatomi AD		☐	☐
Prof. Dr. Kıvanç GÜRHANLI DEHANIM AD		☐	☐
Dr. Öğr. Üyesi Selma ALTAN Tıp Tarihi ve Etik AD		☐	☐
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		☐	☐
Sakir ÖZKAYA Sivri Toplum Üyesi		☐	☐
Etik Kurulumuzun karar yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Tashihname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuzun zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim. Prof. Dr. Emin KURT Başkan			

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Meltem	Soyadı	ÜÇÖZ
Uyruğu	Türk Vatandaşı	Tel	-

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	2017 - halen
Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Boğazlıyan Lisesi	2005

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl – Yıl)
Biyolog (stajyer)	Alanya Help Medical	2011-2012
SKS	Celal Bayar Üniversite Hastanesi	2012-2013
Biyoloji Öğretmeni (ücretli)	Manisa Lisesi	2015-2016
İngilizce Öğretmeni (ücretli)	Karakoç İlk-OrtaOkulu	2016-2017
Biyoloji Öğretmeni	Etüd Merkezi	2017-2018
Rehber (SKS)	Tıp Tarihi Müzesi	2018-2019
Bursiyer	TUBİTAK Projesi	2018-2020

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Orta	Orta	İyi

Yabancı Dil Sınav Notu								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Office Word	Çok iyi
Microsoft Office Excell	Çok iyi
Microsoft Office Powerpoint	Çok iyi

Bilimsel Faaliyetler

Bilimsel Çalışma	Yayın yapılan dergi
Cyclophosphamide Suppresses Spermatogenesis in The Testis of Mice Through Down-Regulation of miRNA-34b and miRNA-34c	Andrologia