



T.C.

**TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI**

**GLİSİN İLE GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE NİGERİSİN-
ARACILI PİROPTOZ SONRASI LİTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE
KARŞI HÜCRE CANLILIĞININ KORUNMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Umut Samet ŞENOL

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Çağlar BERKEL

TOKAT-2026

ETİK SÖZLEŞME

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre Dr. Öğr. Üyesi Çağlar BERKEL danışmanlığında hazırlamış olduğum “Glisin ile Granüloza hücrelerinde Nigirisin-aracılı Piroptoz Sonrası Litik Hücre Ölümüne Karşı Hücre Canlılığının Korunması” adlı Yüksek Lisans tezinin bilimsel etik değerlere ve kurallara uygun, özgün bir çalışma olduğunu, aksinin tespit edilmesi halinde her türlü yasal yaptırımını kabul edeceğimi beyan ederim.

.../.../...

Umut Samet ŞENOL

JÜRİ KABUL VE ONAY

Umut Samet ŞENOL tarafından hazırlanan “Glisin ile Granüloza hücrelerinde Nigerisin-aracılı Piroptoz Sonrası Litik Hücre Ölümüne Karşı Hücre Canlılığının Korunması” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 24.04.2026 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen Jüri tarafından Oy Birliği ile Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri (Unvanı, Adı Soyadı)

İmzası

Üye (Danışman): Dr. Öğr. Üyesi Çağlar BERKEL

.....

Üye (Başkan): Doç. Dr. Oğuz ÖZBEK

.....

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Merve Nur AYDEMİR

.....

ONAY

...../...../.....

Prof. Dr. Ercan ÇAÇAN

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Bilimin ışığında ilerlediğim bu yolda, yoğun akademik ve idari sorumluluklarına rağmen desteğini hiçbir zaman esirgemeyen; engin bilgi birikimi ve kıymetli yönlendirmeleriyle çalışmama yol gösteren, karşılaşılan her problemde pratik ve hızlı çözümler sunan ayrıca akademik bakış açısını örnek aldığım değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Çağlar BERKEL'e sonsuz saygı ve minnetlerimi sunarım.

Sadece bu yüksek lisans eğitimim değil tüm öğrenim hayatım boyunca bana desteklerini hiç esirgemeyen ve her zaman yanımda duran, başta annem Şerife ŞENOL, babam Ümit ŞENOL' a, sonsuz teşekkürlerimi ve minnetlerimi sunarım. Ayrıca benden desteğini hiç eksik etmeyen kıymetli eşim Rümeyza ŞENOL' a çok teşekkür ediyorum.

Eğitim ve öğrenim hayatımda bana destek veren tüm hocalarıma ve arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Umut Samet
ŞENOL

ÖZET

GLİSİN İLE GRANÜLOZA HÜCRELERİNDE NİGERİSİN-ARACILI PİROPTOZ SONRASI LİTİK HÜCRE ÖLÜMÜNE KARŞI HÜCRE CANLILIĞININ KORUNMASI

Şenol, Umut Samet

Yüksek Lisans, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Çağlar BERKEL

Mayıs 2026, xii + 54 sayfa

Pro-inflamatuar bir hücre ölüm mekanizması olan piroptoz, gasdermin-aracılı hücre zarı por oluşumu, hücre şişmesi ve nihai litik hücre zarı parçalanması ile karakterizedir. PKOS (polikistik over sendromu)'ta granüloza hücrelerinin artan piroptotik ölümleri gözlemlenir. Granüloza hücreleri, oosit gelişimi ve hormon üretimi için kritik öneme sahip hücrelerdir. Bir aminoasit olan glisin'in, önceki piroptotik basamakları engellemeden, bir hücre zarı-yırtıcı protein olan NINJ1'in oligomerizasyonunu engelleyerek hücre zarı yırtılmasını baskıladığı ve litik hücre ölümüne karşı koruyucu olduğu (sitoprotektif olduğu) önceki çalışmalarda başka hücre tiplerinde gösterilmiştir. PKOS'lu kadınların kan serumlarında glisin seviyelerinin düşük olduğu da önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Bu glisin seviyesi düşüklüğü durumu, çeşitli hücrelerde, NINJ1-aracılı hücre zarı yırtılmasına karşı sensitiviteyi arttırabilir. Bu bağlamda, glisin eksikliği, granüloza hücrelerinin litik hücre ölümüne karşı duyarlı hale gelmelerine sebep olabilir. Glisin seviyelerinin arttırılarak (örn. foliküler sıvıda) granüloza hücrelerinin litik ölümünün baskılanması, PKOS'ta yeni bir terapötik strateji oluşturabilir. NINJ1 oligomerizasyonunu inhibe ederek glisin, granüloza hücrelerini aşırı litik hücre ölümünden koruyabilirken, piroptoz sinyalinin devam etmesine izin vererek (örn. gasdermin porlarını engellemeyerek) potansiyel olarak foliküler bütünlüğe ve yumurtalık fonksiyonuna olumlu etki yapabilir. Bu çalışmada, KGN insan granüloza hücre hattı kullanılarak nigerisin ile piroptoz'un tetiklendiği hücrelerde, glisin'in sitoprotektif potansiyeli ve inflammatuar yanıt üzerindeki etkileri, hücrelerden salınan PGE2 miktarları analiz edilerek değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgular, tek başına belirgin bir değişim oluşturmayan glisin ve nigerisin uygulamalarının birlikte kullanıldığında, PGE₂ salınımının anlamlı düzeyde artırdığı göstermiştir. Ayrıca SDS-PAGE ve Commassie boyaması analizleri ile granüloza hücrelerinden total protein salınımı tüm deneysel durumlar arasında karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. Glisin ile NINJ1-aracılı hücre zarı parçalanmasının baskılandığı granüloza hücrelerinde, piroptoz'un tetiklenmesi sonrası PGE₂ salınımının artması, litik hücre ölümünün engellendiği hücrelerde gasdermin porlarının sayısındaki olası artışa hipotetik olarak bağlanmıştır. Bu çalışma ile, granüloza hücrelerinde litik hücre ölümünün ve glisin'in buradaki rolünün daha iyi anlaşılması için ön veriler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Glisin, Nigerisin, *NINJ1*, PKOS, Granüloza Hücresi

ABSTRACT

PROTECTION OF CELL VIABILITY AGAINST NIGERICIN-MEDIATED PYROPTOSIS LYTIC CELL DEATH IN GRANULOSA CELLS WITH GLYCINE

Şenol, Umut Samet

Master's Thesis, Department of Molecular Biology and Genetics

Thesis Advisor: Dr. Assoc. Prof. Çağlar BERKEL

May 2026, xii + 54 pages

Pyroptosis, a pro-inflammatory cell death mechanism, is characterized by gasdermin-mediated cell membrane pore formation, cell swelling, and eventual lytic cell membrane rupture. Increased pyroptotic cell death of granulosa cells is observed in PCOS (polycystic ovary syndrome). Granulosa cells are critical for oocyte development and hormone production. Previous studies have shown that glycine, an amino acid, suppresses cell membrane rupture and is cytoprotective against lytic cell death by inhibiting the oligomerization of NINJ1, a cell membrane-rupturing protein, without inhibiting the preceding pyroptotic steps. Previous studies have also determined that glycine levels are low in the blood serum of women with PCOS. This low glycine level may increase the sensitivity of various cells to NINJ1-mediated cell membrane rupture. In this context, glycine deficiency may cause granulosa cells to become more susceptible to lytic cell death. Suppressing the lytic death of granulosa cells by increasing glycine levels (e.g., in follicular fluid) may constitute a novel therapeutic strategy in PCOS. By inhibiting NINJ1 oligomerization, glycine can protect granulosa cells from excessive lytic cell death, while allowing the persistence of pyroptosis signaling (e.g., by not blocking gasdermin pores), potentially positively impacting follicular integrity and ovarian function. In this study, the cytoprotective potential of glycine and its effects on the inflammatory response in cells where pyroptosis was induced by nigericin using the KGN human granulosa cell line were evaluated by analyzing the amounts of PGE₂ released from the cells. The findings showed that when glycine and nigericin applications were used together, PGE₂ release was significantly increased, whereas neither produced a significant change individually. In addition, total protein release from granulosa cells was analyzed comparatively across all experimental conditions using SDS-PAGE and Commassie staining analyses. In granulosa cells where glycine suppresses NINJ1-mediated cell membrane disruption, the increased PGE₂ release following the initiation of pyroptosis is hypothetically linked to a possible increase in the number of gasdermin pores in cells where lytic cell death is prevented. This study provides preliminary data for a better understanding of lytic cell death in granulosa cells and the role of glycine in this process.

Keywords: Glycine, Nigericin, *NINJ1*, PCOS, Granulosa Cell

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
YÜKSEK LİSANS TEZİ.....	i
ETİK SÖZLEŞME.....	ii
JÜRİ KABUL VE ONAY.....	iii
ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR.....	iv
ÖZET	v
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar LİSTESİ	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ	x
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xi
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER.....	2
2.1. Granüloza hücreleri	2
2.2. Granüloza Hücresinde Programlanmış Hücre Ölümü.....	3
2.3. Apoptoz.....	5
2.4. Otofaji	6
2.5. Ferroptoz.....	7
2.6. Nekroptoz.....	8
2.7. Piroptoz.....	9
2.8. Piroptozun Moleküler Temelleri	10
2.8.1. Üreme Bozukluklarında Granüloza Hücrelerinin Piroptozu	12
2.8.2. PKOS: Genel Bakış ve Patogenez.....	13
2.9. Gasdermin Porları ve NINJ1 Aracılı Hücre Zarı Yırılması	15
2.9.1. NINJ1 Aracılı Hücre Zarı Yırılması Moleküler Olarak Düzenlenmesi ..	17
2.9.2. NINJ1'in Yapısal Temeli ve Aktivasyon Mekanizmaları.....	18
2.9.3. NINJ1 Aracılı Hücre Zarı Parçalanmasının Aktivasyon Tetikleyicileri ..	19
2.9.4. NINJ1 Ekspresyonunun Düzenlenmesi	20
2.10. Nigerisin.....	21
2.11. Glisin.....	23
2.12. Glisin, NINJ1 Aracılı Membran Yırılmasını Engeller.....	25
2.13. Granüloza Hücrelerinde Glisinin Önerilen Sitoprotektif Rolü	26
2.14. Prostaglandin E ₂	27

2.15.	PKOS, Glisin Eksikliği ve Granüloza Hücresinin Yaşamı	28
3.	MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1.	Araştırma Materyali	32
3.2.	Hücre Kültürü	32
3.2.1.	Medya ve Kültür Parametreleri;	32
3.2.2.	Plaka Ekim'i ve Deney Öncesi Hazırlık	33
3.3.	Reaktiflerin Hazırlanması.....	33
3.4.	Deney Protokolü	33
3.5.	Uygulama Takvimi	34
3.6.	SDS-PAGE Jel Hazırlama	35
3.6.1.	Örnek Hazırlama ve Elektroforez Koşulları.....	35
3.6.2.	Elektroforez Sonrası Görselleştirme.....	35
3.7.	PGE ₂ Salınımının Analizi (ELISA)	36
3.7.1.	Örnek Hazırlığı ve Ön İşlemler	36
3.7.2.	Plaka Ekim'i ve İnkübasyon	36
3.7.3.	Yıkama İşlemi:	36
3.7.4.	Renk Gelişimi ve Reaksiyonun Durdurulması:	36
3.7.5.	Okuma ve Veri Analizi:	37
4.	SONUÇLAR	38
4.1.	Piroptoz'un Uyarıldığı Granüloza Hücrelerinde, Glisin Uygulaması Sonrası Hücre Zarı Parçalanmasının ve Hücre Dışına PGE ₂ Salınımının Ölçülmesi ile Analizi.....	38
4.2.	Piroptoz'un Uyarıldığı Granüloza Hücrelerinde, Glisin Uygulaması Sonrasında Hücre Zarı Parçalanmasının, Hücre Dışına Salınan Total Protein Miktarlarının Karşılaştırılması (SDS-PAGE veCoomassie Boyaması) ile Analizi	39
5.	TARTIŞMA	42
6.	KAYNAKLAR	46

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo No	Sayfa
Tablo 2.1. Ferroptoz, apoptoz, otofaji, nekroptoz ve piroptozun temel özellikleri (Mou ve ark., 2019)	3



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil No

Sayfa

Şekil 2.1. Granüloza hücrelerinde farklı uygulama gruplarına bağlı olarak hücrelerden salınan relatif PGE ₂ düzeylerinin karşılaştırılması	5
Şekil 2.2. Piroptoz sırasında hücre zarında meydana gelen yapısal değişimlerin şematik gösterimi	16
Şekil 2.3. Nigerisin'in etki mekanizması	22
Şekil 2.4. Glisinin granüloza hücreleri üzerindeki sitoprotektif etkisi	26
Şekil 4.1. Granüloza hücrelerinde farklı uygulama gruplarına bağlı olarak hücrelerden salınan relatif PGE ₂ düzeylerinin karşılaştırılması	38
Şekil 4.2. Farklı gruplardaki hücrelerden salınan toplam protein miktarlarının SDS-PAGE analizi ile karşılaştırılması	40



KISALTMALAR LİSTESİ

Kısaltma	Açıklama
3-MA	3-Metiladenin (otofaji inhibitörü)
AKT	Protein Kinaz B
AP-1	Aktivatör Protein-1
ASC	Apoptozla İlişkili, CARD İçeren Speck-Benzeri Protein
ATG	Anti-Timosit Globulin
ATG5	Otofaji ile ilişkili protein 5
ATG7	Otofaji ile ilişkili protein 7
ATP	Adenozin trifosfat
BAPTA	1,2-Bis(O-Aminofenoksietan)-N, N, N', N'-Tetraasetik Asit
BAPTA-AM	Bapta Asetoksimetil Ester
Bax	Pro-apoptotik protein
Bcl-2	Anti-apoptotik protein
BECN1	Beclin-1
CARD	Kaspaz Aktivasyon ve Bağlanma Bölgesi
ChIP	Hsc70 ile Etkileşen Proteinin Karboksil Ucu
c-IAP	Hücrel Apoptoz İnhibitör Proteini
c-Jun	Jun Proto-Onkogeni
COX-2	Siklooksijenaz-2
DAMP	Hasar İlişkili Moleküler Örüntüler
DCC	Kolorektal Kanserde Silinmiş Gen (reseptör)
DHT	Dihidrotestosteron
DMSO	Dimetil Sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DRAM3	Hasar Düzenlemeli Otofaji Modülatörü 3
E2	Estradiol
Ecto-CRT	Hücre yüzeyine taşınmış Kalretikulin
ELK1	Ets Domeni İçeren Elk-1 Proteini
FAS	Apoptoz Antijen 1
FASL	Fas Ligandı
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GPX4	Glutasyon Peroksidaz 4

GSDM	Gasdermin
GSDMD	Gasdermin D
GSDMD-NT	Gasdermin D'nin N-Ucu Fragmanı
GSDME	Gasdermin E
GSH	Glutasyon
HMGB1	Yüksek Hareketli Grup B1 Proteini
IL-18	İnterlökin-18
IL-1 β	İnterlökin-1 beta
in vitro	Hücre Kültüründe Yapılan Deneyler
in vivo	Hayvan Deneyleri veya Klinik Çalışmalar
Keap1	Kelch-benzeri ECH ilişkili protein 1 (Nrf2 inhibitörü)
Kriyo-EM	Kriyo-Elektron Mikroskobu
LC3	Mikrotübül İlişkili Protein 1 Hafif Zinciri 3
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LH	Lüteinleştirici Hormon
LPS	Lipopolysakkarit
LSH	Lenfoid Spesifik Helikaz (kromatin düzenleyici protein)
MAPK	Mitojen Aktive Edilmiş Protein Kinaz yolu
MLKL	Karma Soylu Kinaz Alanı Benzeri Psödo Kinaz
MMP-9	Matriks Metalloproteinaz-9
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
mTOR	Memeli rapamisin hedefi (hücre büyümesi ve metabolizma düzenleyici yolak)
Nec-1	(Necrostatin-1) RIPK1 inhibitörü
NINJ1	Nerve Injury-Induced Protein 1 Yani Ninjurin-1
NLRP3	NOD-Benzeri Reseptör, Pirin Domaini İçeren 3
Nrf2	Nükleer faktör eritroid 2 ile ilişkili faktör 2 (antioksidan yanıt düzenleyici)
NT	N-Terminal (Proteinlerin N-Ucu)
p53	Tümör baskılayıcı protein 53
p62	Sekestrozom 1 (otofaji adaptör proteini)
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3K	Fosfatidilinozitol 3-kinaz

PKOS	Polikistik Over Sendromu
POI	Prematür Over Yetmezliği
PRR	Desen Tanıma Reseptörleri
RIPK1	Reseptör ile Etkileşen Protein Kinaz-1
RIPK3	Reseptör Etkileşimli Protein Kinaz 3
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RSL3	GPX4 inhibitörü
SIGLEC12	Sialik asit bağlayan immünoglobulin benzeri lektin-12
SLC7A11	Taşıyıcı Aile 7 Üye 11
STAT	Sinyal Aktarıcı ve Transkripsiyon Aktivatörü
TFEB	Transkripsiyon Faktörü EB (lizozomal biyogenez düzenleyici)
TFR1	Transferrin Reseptörü 1 (demir alım reseptörü)
TLR3	Toll-benzeri reseptör 3 (bağışıklık reseptörü)
TM1	Transmembran Bölge 1
TMPRSS4	Transmembran Serin Proteaz 4
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
TNF α	Tümör Nekroz Faktörü Alfa
ULK1	Unc-51 Benzeri Otofaji Başlatıcı Kinaz 1
WT	Vahşi Tip
Xc ⁻	Sistein/Glutamat Antiporter Sistemi
xCT	Sistin–glutamat taşıyıcısı
XIAP	X-bağlantılı Apoptoz İnhibitör Proteini
ZnO-NP'ler	Çinko Oksit Nanoparçacıkları
ZVAD-fmk	Pan-kaspaz inhibitörü

1. GİRİŞ

Granüloza hücreleri, yumurtalık foliküllerindeki oositi çevreleyen somatik hücrelerdir ve yumurtalıktaki birincil steroidojenik ve destekleyici hücre tipini ifade eder (Berkel, 2024). Östrojen ve foliküler olgunlaşma, oosit sağlığı ve doğurganlık için gerekli diğer faktörleri açığa çıkarırlar (Berkel, 2024). Granüloza hücrelerinin kaybı veya işlev bozukluğu; folikülogenezi ve doğurganlığı bozabilir. Son çalışmalar, düzenlenmiş hücre ölümünün inflamatuvar formlarının, özellikle piroptoz, PKOS (polikistik over sendromu) ve erken yumurtalık yetmezliği gibi durumlarda granüloza hücreleri kaybına katkıda bulunduğunu saptamaktadır (Berkel, 2024). Piroptoz, inflamasyon tarafından aktive edilen kaspazların gasdermin (GSDM) proteinlerini parçalayarak zarı deldiği, doğuştan gelen bağışıklık sistemi tarafından tetiklenen, litik programlanmış bir hücre ölümüdür (Liu ve ark., 2024; Vajihala ve ark., 2012). Bu süreç tipik olarak hücre şişmesi, zar yırtılması ve proinflamatuvar sitokinlerin; IL-1 β (İnterlökin-1 beta), IL-18 (İnterlökin-18) ve DAMP'lerin (Hasar ilişkili moleküler örüntüler) hücre dışı boşluğa salınmasıyla sonuçlanır (Liu ve ark., 2024; Vajihala ve ark., 2012). Bu nedenle, piroptoz sürecinin moleküler mekanizmalarını ve özellikle NLRP3 (NOD-benzeri reseptör, pirin domaini içeren 3) inflamazomunun aktivasyonunu tetikleyen faktörleri anlamak açısından, nigerisin gibi potasyum çıkışı indükleyen ajanlar önemli bir deneysel araç olarak öne çıkmaktadır. Nigerisin, hücre içinden potasyum çıkışına neden olarak NLRP3 inflamazom aktivasyonunu güvenilir biçimde tetiklediği için birçok hücre tipinde piroptozun deneysel olarak modellenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Berkel, 2024). Bununla birlikte, piroptozun terminal aşaması olan hücre zarı yırtılması, plazma membranını fiziksel olarak parçalamak üzere oligomerize olan transmembran protein *NINJI* (Nerve Injury-Induced Protein 1 yani Ninjurin-1) ile yakından ilişkilidir (Broz, 2025). Daha da önemlisi, tarihsel olarak iskemik veya travmatik hücre lizisini önlediği bilinen glisinin, *NINJI* aracılı plazma membranı yırtılmasının spesifik bir inhibitörü olduğu gösterilmiştir (Borges ve ark., 2022). Bu çalışmada, piroptozun, *NINJI* aracılı lizisin ve glisinin sitoprotektif etkilerinin biyokimyasal ve hücresel temelleri incelenmiş; ayrıca glisinin, nigerisin kaynaklı piroptotik hücre ölümüne karşı yumurtalık granüloza hücrelerini korumadaki potansiyel rolü analiz edilmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Granüloza hücreleri

Granüloza hücreleri, yumurtalık foliküllerindeki baskın somatik hücrelerdir ve oositin etrafındaki destekleyici katmanları oluştururlar. Ayrıca en büyük yumurtalık hücre popülasyonunu oluştururlar ve menstrüel döngüyü düzenleyen yumurtalık steroidlerinin (örneğin östrojen) birincil kaynağıdır (Berkel, 2024). Bununla birlikte parakrin sinyal iletimi ve besin desteği aracılığıyla granüloza hücreleri, oosit büyümesini, olgunlaşmasını ve yumurtlamasını kolaylaştırır (Berkel, 2024). Sonuç olarak, granüloza hücrelerinin sağlığı doğurganlık için çok önemliken, herhangi bir hücre ölüm mekanizmasıyla granüloza hücrelerinin kaybı, folikül gelişimini olumsuz yönde etkiler. Normal fizyolojik koşullar altında bazı granüloza hücreleri folikül atrezisi sırasında programlı olarak apoptoza uğrar; ancak bu hücre ölümünün aşırı ya da düzensiz gerçekleşmesi, oosit kalitesini ve hormonal dengeyi olumsuz yönde etkileyebilir. Örneğin, PKOS ve POI (Prematür Over Yetmezliği) gibi durumlarda granüloza hücrelerinin işlev bozukluğu ve ölümü, anovülasyona (yumurtlamanın gerçekleşmemesi) ve subfertiliteye (doğurganlığın azalması yani kısırlığa) katkıda bulunur (Berkel, 2026). Son araştırmalar, dikkat çekici bir şekilde, bu bozukluklarda inflamatuvar granüloza hücresi ölümünü piroptoz ile ilişkilendirmiştir (Berkel, 2024; Cai ve ark., 2022). Klinik veriler, PKOS hastalarının yumurtalıklarında inflamasyon belirteçlerinin seviyelerinin yükseldiğini ve PKOS hayvan modellerinde granüloza hücrelerinin çoğunun kaspaz-1'e bağlı hücre ölümü sergilediğini göstermektedir (Cai ve ark., 2022).

PKOS oluşturulmuş fare modelinde gerçekleştirilen bir çalışmada, granüloza hücrelerinde hücre lizisinin bir göstergesi olan LDH salınımının belirgin şekilde arttığı; bu artışın deney grubunda yaklaşık %80 düzeyine ulaştığı, buna karşılık kontrol grubunda ise yaklaşık %20 seviyesinde kaldığı bildirilmiştir (Cai ve ark., 2022).

LDH, hücre sitoplazmasında bulunan ve glikoliz sırasında pirüvatın laktata dönüşümünü katalizleyen bir enzimdir (Bergmeyer ve ark., 1974; Kumar ve ark., 2018). Hücre zarı bütünlüğü bozulduğunda LDH hücre dışına salınır. Bu nedenle LDH salınımı, hücre zarı hasarının ve hücre lizisinin bir göstergesi olarak yaygın şekilde kullanılan bir biyokimyasal belirteçtir. Hücre kültürü çalışmalarında artmış LDH düzeyleri, genellikle hücre membranı bütünlüğünün kaybını ve sitotoksiteyi göstermektedir. Bu artışın, kaspaz-1 veya NLRP3'ü inhibe eden ajanlarla engellenebilmesi, granüloza hücrelerinde

baskın ölüm mekanizmasının inflamazom aracılı piroptoz olduğunu ortaya koymaktadır (Cai ve ark., 2022). Dolayısıyla, piroptoz patolojik granüloza hücresi kaybında merkezi bir öneme sahiptir. İnflamazom aktivasyonu sırasında granüloza hücrelerinin bütünlüğünü koruyan ve normal sitokin sinyallemesine izin veren herhangi bir strateji, yumurtalık fonksiyonu için terapötik değere sahip olabilir.

2.2. Granüloza Hücresinde Programlanmış Hücre Ölümü

Tablo 2.1. Ferroptoz, apoptoz, otofaji, nekroptoz ve piroptozun temel özellikleri (Mou ve ark., 2019).

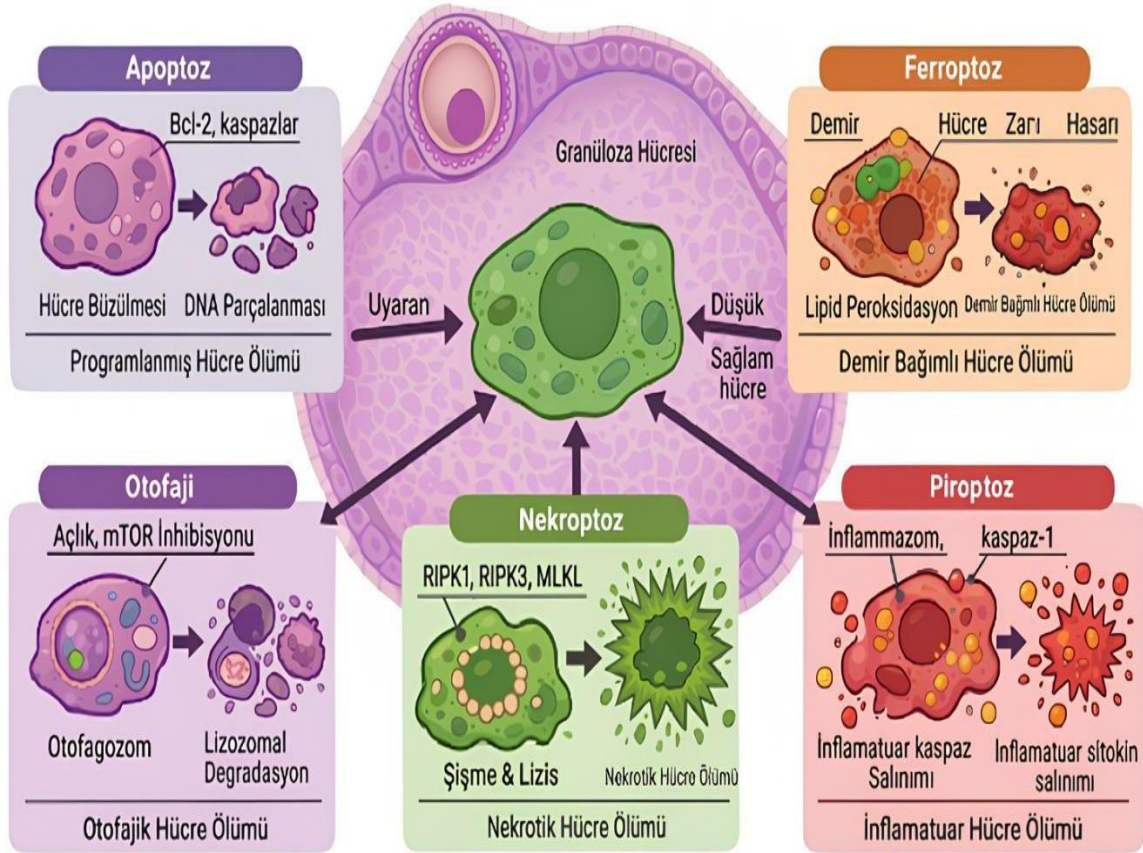
Hücre ölümü	Ferroptoz	Apoptos	Otofaji	Nekroptoz	Piroptoz
Biyokimyasal özellikler	xCT inhibisyonu ve indirgenmiş GSH, GPX4 inhibisyonu. Demir birikimi ve lipid peroksidasyonu	Kaspazların aktivasyonu, oligonükleozomal DNA parçalanması	Artmış lizozomal aktivite	ATP seviyelerinde düşüş; RIPK1, RIPK3 ve MLKL'nin aktivasyonu	Kaspaz-1 ve proinflamatuar sitokin salınımına bağlıdır
Morfolojik özellikler	Yoğunlaşmış mitokondriyal zar kabarcık oluşumu; yoğunluğuna sahip küçük mitokondriler, krista kaybı	Plazma zarında hücre çekirdek hacminde azalma; çekirdek parçalanması	Çift zarlı otofagozom oluşumu	Plazma zarının yırtılması; organel şişmesi; kromatin yoğunlaşması	Karyopiknoz, hücre ödemi ve membran yırtılması
Anahtar genler	GPX4, Nrf2, LSH, TFR1, xCT	Kaspaz, P53, Fas, Bcl-2, Bax	ATG5, ATG7, DRAM3, TFEB	RIP1, RIP3, MLKL	Kaspaz-1, IL-1 β , IL-18

Tablo 2.1. (Devam) Ferroptoz, apoptoz, otofaji, nekroptoz ve piroptozun temel özellikleri (Mou ve ark., 2019).

Düzenleyici yollar	xCT ve GPX4, p62–Keap1–Nrf2 yolu	Ölüm reseptörü, mitokondriyal yol	PI3K–AKT–mTOR, MAPK yolu	TNF α , TLR3, ROS aracılı yol	Kaspaz-1, NLRP3 inflammasom yolu
DAMP Serbest bırakımı	HMGB1	Ecto-CRT, HMGB1 ve ATP	HMGB1	DNA ve IL-6	HMGB1, ATP, IL-1 β ve IL-18
Bağışıklık özellikleri	İltihap tetikleyici	Çoğunlukla iltihap önleyici	Çoğunlukla iltihap önleyici	Çoğunlukla iltihap tetikleyici	Pro-enflamatuar
Uyarıcılar	Erastin, RSL3, sorafenib	FASL, DCC	Rapamisin, lityum	TNF α , ZVAD-fmk	ZnO-NP'ler, ivermektin
İnhibitörler	Deferoksamin, EXIAP, c-IAP vitamini, ferrostatin-1		3-MA, Wortmannin	Nec-1	Nekrosülfonamidler

Granüloza hücreleri ölümü, sadece klasik bir programlanmış hücre ölümü olan apoptozu değil, aynı zamanda ferroptoz ve piroptoz gibi farklı hücre ölüm mekanizmalarını da içermektedir. Granüloza hücrelerinde nekroptoz (programlanmış nekrotik hücre ölümü) gerçekleşebilmektedir; ancak bu hücre ölüm biçiminin yumurtalık fizyolojisindeki rolü hâlen sınırlı düzeyde tanımlanmıştır. Her ölüm şeklinin kendine özgü tetikleyicileri ve moleküler etkenleri faktörleri bulunur.

Granüloza Hücresinde Programlanmış Hücre Ölümleri



Şekil 2.1. Granüloza hücrelerinde farklı hücre ölümü mekanizmalarının şematik gösterimi.

Bu figür, BioRender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.

Şekil 2.1.'de granüloza hücrelerinde apoptoz, otofaji, ferroptoz, nekroptoz ve piroptoz gibi farklı programlanmış hücre ölüm mekanizmalarının kendine özgü moleküler yollarla nasıl gerçekleştiğini özetlemektedir.

2.3. Apoptoz

Apoptoz terimi ilk olarak 1972'de Kerr ve arkadaşları tarafından ökaryotik hücrelerin intrinsik (mitokondriyal) ölüm mekanizmasını tanımlamak için kullanılmıştır. Ayrıca programlanmış hücre ölümünün inflamasyon oluşturmeyen bir şeklidir. Bu nedenle, apoptoz sırasında hücre içi hasar kontrol altında tutulur ve çevre dokuda belirgin bir inflamatuvar yanıt oluşmadan ölüm süreci tamamlanır. Apoptotik sürece giren hücrede

DNA'da (Deoksiribonükleik Asit) çok sayıda kırılma meydana gelir ve bu hasarın onarımı mümkün değildir. Hücreler DNA hasarını onarabilen mekanizmalara sahip olmasına rağmen hasarın şiddetli olduğu durumlarda apoptoz mekanizmaları aktive olur ve hücre ölümü gerçekleşir (Nagata, 2000).

Apoptoz süreci iki temel hücre ölüm mekanizması üzerinden gerçekleşmektedir. Bunlar intrinsik hücre ölüm mekanizması ve ekstrinsik (ölüm reseptörü aracılı) hücre ölüm mekanizmasıdır (Elmore, 2007). İntrinsik hücre ölüm mekanizması genellikle DNA hasarı, oksidatif stres veya büyüme faktörü eksikliği gibi hücre içi stres sinyalleri ile başlatılır. Bu süreçte mitokondriyal membran geçirgenliği artar ve sitokrom c sitoplazmaya salınır. Sitokrom c, *Apaf-1* ve prokaspaz-9 ile birleşerek apoptosom kompleksini oluşturur ve bu kompleks aracılığıyla kaspaz-9 aktive edilir. Ekstrinsik hücre ölüm mekanizmasında ise hücre yüzeyinde bulunan ölüm reseptörlerinin [örneğin Fas (Apoptoz Antijen 1) ve TNF (Tümör Nekroz Faktörü) reseptörleri] ligandlarına bağlanmasıyla başlatılır ve kaspaz-8 aktivasyonu ile sonuçlanır. Her iki hücre ölüm mekanizması da yürütücü kaspazlar olan kaspaz-3, kaspaz-6 ve kaspaz-7'nin aktivasyonu aracılığıyla birleşir ve hücre ölüm süreci tamamlanır (Taylor ve ark., 2008).

Apoptoz sırasında hücrede çeşitli morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler meydana gelir. Bunlar arasında hücre küçülmesi, kromatin yoğunlaşması, DNA fragmentasyonu, hücre zarında bleb (kabarcık) oluşumu ve apoptotik cisimciklerin meydana gelmesi yer almaktadır. Bu apoptotik cisimcikler daha sonra fagositik hücreler tarafından temizlenir ve böylece çevre dokuda inflamatuvar yanıt oluşması engellenir (Elmore, 2007). Bu süreç, hücrelerin kontrollü bir şekilde ortadan kaldırılmasını sağlayarak doku homeostazının korunmasına katkıda bulunur.

2.4. Otofaji

Otofaji, hücrenin sitoplazmasındaki bileşenleri lizozomlar aracılığıyla parçalayarak geri dönüştürdüğü bir hücresel süreçtir (Mizushima ve Komatsu, 2011). Bu mekanizma normal koşullarda hücresel homeostazın korunmasına katkı sağlarken, aşırı veya düzensiz aktivasyonu durumunda hücre ölümüne yol açabilmektedir. Bununla birlikte, bazal veya kontrollü otofaji, hücre için genellikle koruyucu bir mekanizmadır. Bu süreç; hasarlı organellerin ve yanlış katlanmış proteinlerin uzaklaştırılmasını sağlayarak hücresel bütünlüğün sürdürülmesine yardımcı olur (Levine ve Kroemer, 2008; Mizushima ve Komatsu, 2011).

Otofaji; besin eksikliği, enerji yetersizliği, oksidatif stres, hipoksi, enfeksiyonlar ve DNA hasarı gibi çeşitli hücrel stres koşulları tarafından tetiklenebilir. Bu süreçte hücre, sitoplazmik bileşenleri çift zar yapısına sahip otofagozom adı verilen veziküller içerisinde çevreler. Otofagozomlar, daha sonra lizozomlarla birleşerek otolizozom yapısını oluşturur; bu yapının içinde yer alan hücrel içerikler, hidrolitik enzimler tarafından parçalanır (Mizushima ve ark., 2011).

Otofajinin düzenlenmesinde birçok protein görev almaktadır. Bu süreç özellikle *ATG* (*Anti-timosit globulin*) proteinleri, *ULK1* (Unc-51 benzeri otofaji başlatıcı kinaz 1) kompleksi, *BECN1* (Beclin-1), *LC3* (*Mikrotübül ilişkili protein 1 hafif zinciri 3*) ve mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) sinyal yolları tarafından kontrol edilmektedir. Besin açısından zengin koşullarda mTOR otofajiyi baskımlarken, besin eksikliği veya stres durumlarında mTOR aktivitesi azalır ve ULK1 kompleksinin aktivasyonu ile otofaji başlatılır. Ardından Beclin-1 aracılığıyla otofagozom oluşumu başlar ve LC3 proteininin lipidasyonu otofagozom zarının genişlemesini sağlar (Levine ve Kroemer, 2008; Mizushima ve Komatsu, 2011). Oluşan bu çift katlı zar yapısı, hücre içindeki istenmeyen materyalleri çevreleyerek onları sindirim için izole eder ve böylece dinamik bir temizlik süreci başlatılmış olur. Bu süreç sırasında hücrede hasarlı mitokondrilerin uzaklaştırılması (mitofaji), protein agregatlarının parçalanması ve metabolik bileşenlerin geri kazanımı gibi olaylar gerçekleşir. Bu nedenle otofaji başlangıçta sitoprotektif bir yanıt olarak işlev görürken, uzun süreli veya kontrolsüz aktivasyonu hücrel bileşenlerin aşırı parçalanmasına yol açarak otofaji ile ilişkili hücre ölümüne neden olabilmektedir (Levine ve Kroemer, 2008)

2.5. Ferroptoz

Ferroptoz, lipid peroksidasyonu ile karakterize edilen demir bağımlı bir litik hücre ölümüdür (Dixon ve ark., 2012). Ayrıca 2012 yılında demir bağımlı, apoptoz dışı bir hücre ölüm mekanizması olarak literatüre kazandırılmıştır (Dixon ve ark., 2012).

Bu süreçte hücre zarındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu sonucu lipid peroksitler birikir ve hücre zarı bütünlüğü bozulur. Ferroptozun düzenlenmesinde özellikle *GPX4* (glutatyon peroksidaz-4), *SLC7A11* (Taşıyıcı Aile 7 Üye 11) içeren sistem *Xc⁻* (Sistein/Glutamat Antiporter Sistemi), hücrel demir metabolizması ve lipid peroksidasyonu önemli rol oynamaktadır (Stockwell ve ark., 2017). Glutatyon düzeylerinin azalması veya GPX4 aktivitesinin inhibe edilmesi lipid peroksitlerin

birikmesine ve hücre ölüm mekanizmasının açılarak ferroptotik hücre ölümünün tetiklenmesine neden olabilir (Dixon ve ark., 2012; Stockwell ve ark., 2017). Bu ölüm şekli, demir bağımlı lipid peroksidasyonu ve membran hasarı ile karakterize edilir (Ramos ve ark., 2024; Dixon ve ark., 2012). PKOS'ta demir homeostazının bozulması, örneğin metabolik sendrom nedeniyle serbest demirin yükselmesi, yumurtalıkları ferroptozla hazırlayabilir. Bunu desteklemek amacıyla yapılan PKOS granüloza hücrelerinin analizleri; reaktif oksijen türleri metabolizması ve demir işlenmesinde rol oynayan genlerde gen ekspresyonunun arttığını ortaya koymuştur (Huang ve ark., 2024). Hayvan modellerinde ferroptoz inhibitörlerinin, örneğin ferrostatin-1'in, PKOS benzeri kemirgen modellerinde yumurtalık fonksiyonunu kısmen geri kazandırdığı gösterilmiştir (Li ve ark., 2024). Bu bulgu, ferroptozun granüloza hücreleri kaybına katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Li ve ark., 2024).

Önemli olarak, son çalışmalar ferroptotik hücrelerin ayrıca *NINJI* aracılı hücre zarı yırtılmasına da uğradığını göstermektedir. Ferroptoz sırasında *NINJI* oligomerleşerek plazma membranının yırtılmasını ve DAMP'ların salınımını indükler; ancak *NINJI* eksikliği olan hücreler, lipid peroksidasyonu devam etse bile ferroptozla bağlı son litik hücre zarı yırtılmasına direnç gösterir (Ramos ve ark., 2024). Bu nedenle, PKOS'ta granüloza hücrelerinde ferroptoz meydana geldiğinde sürecin *NINJI*'e bağlı hücre lizisi ile sonuçlanabileceği düşünülmektedir. Granüloza hücreleri ferroptozunun PKOS'ta önemli bir hücre ölüm mekanizması olup olmadığı hâlâ araştırma aşamasındadır; ancak transkriptomik çalışmalar ve yakın tarihli bir inceleme, ferroptozu PKOS yumurtalıklarında potansiyel bir patojenik faktör olarak vurgulamaktadır (Huang ve ark., 2024)

2.6. Nekroptoz

Nekroptoz, RIPK1 (reseptör ile etkileşen protein kinaz-1), RIPK3 (reseptör ile etkileşen protein kinaz-3) ve MLKL (karma soylu kinaz alanı benzeri psödo kinaz) aracılığıyla gerçekleşen düzenlenmiş bir litik hücre ölümü biçimidir. Bu süreç genellikle TNF gibi proinflamatuvar sitokinler tarafından tetiklenir ve RIPK1–RIPK3 kompleksinin oluşumu ile başlar. Ardından MLKL fosforile olur, oligomerleşir ve plazma zarına transloke olarak membran geçirgenliğini artırır.

Piroptoz ve ferroptozdan farklı olarak nekroptoz sırasında hücre zarının nihai parçalanması *NINJI* proteinine bağımlı değildir. Bu durum, nekroptozun zar bütünlüğünü bozmak için

kendine özgü alternatif moleküler aktörler kullandığını göstermektedir. Son çalışmalar, nekroptotik hücre lizisinin yürütülmesinde SIGLEC12 (Sialik asit bağlayan immünoglobulin benzeri lektin-12) proteininin kritik bir rol oynadığını göstermiştir. Nekroptoz sırasında SIGLEC12, MLKL ile etkileşir ve TMPRSS4 (Transmembran Serin Proteaz 4) tarafından proteolitik olarak kesilerek plazma membranının yırtılmasına aracılık eden aktif bir fragman oluşturur. Bu mekanizma, nekroptozun membran yırtılma basamağının piroptoz ve ferroptozdan moleküler olarak farklı olduğunu ortaya koymaktadır (Noh ve ark., 2026).

Bu mekanistik farklılık, bazı sitoprotektif moleküllerin hücre ölümü tiplerine özgü etkilerini de açıklamaktadır. Örneğin glisin, piroptoz ve ferroptoz sırasında *NINJI* aracılı hücre zarı yırtılmasını inhibe ederek koruyucu etki gösterebilirken, nekroptozda hücre zarının parçalanması SIGLEC12 aracılı mekanizmalarla gerçekleştiğinden glisinin bu hücre ölüm mekanizmasına karşı belirgin bir koruyucu etkisi bulunmamaktadır (Kayagaki ve ark., 2021; Borges ve ark., 2022). Bu nedenle, hücre ölüm yollarının dokulara özgü etkilerini anlamak, özellikle yumurtalıkta nekroptotik sinyalleşmenin polikistik over sendromu üzerindeki potansiyel rolünü incelemek açısından büyük önem taşımaktadır. Yumurtalık dokusunda nekroptotik sinyalleşmeye dair bazı bulgular rapor edilmiş olmakla birlikte, bu mekanizmanın polikistik over sendromu bağlamındaki rolü henüz yeterince araştırılmamıştır ve mevcut kanıtlar sınırlıdır (Pasparakis ve Vandenabeele, 2015).

2.7. Piroptoz

Piroptoz; hücre şişmesi, membran porlarının oluşumu ve lizisi; proinflamatuvar hücre içi içeriklerin (IL-1 β ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinler, ATP (adenozin trifosfat), HMGB1 (Yüksek hareketli grup B1 proteini) ve çeşitli DAMP molekülleri) salınımı ile karakterize, programlanmış, inflamatuvar bir hücre ölümü biçimidir (Huston ve ark., 2023). Bu süreç ilk olarak çeşitli patojenlerle enfekte makrofajlarda gözlemlenmiş, ancak daha sonra apoptotik kaspazlar yerine inflamatuvar kaspazlara (kaspaz-1, kaspaz-4, kaspaz -5, kaspaz -11) bağlı olarak gerçekleştiğinin ortaya konmasıyla diğer hücre ölüm şekillerinden ayırt edilmiştir (Broz, 2025). Piroptoz, inflamatuvar kaspazlar tarafından proteolitik olarak aktive edilen GSDM ailesi proteinleri, özellikle GSDMD (Gasdermin D) aracılığıyla gerçekleşen bir hücre ölümü biçimidir. Aktive olan GSDMD hücre zarında porlar oluşturarak iyonik dengesizliğe, hücresel şişmeye ve nihayetinde hücre zarı yırtılmasına neden olur (Shi ve ark., 2015; Broz ve Dixit, 2016). Bu süreç, kaspaz-1

aktivasyonunu ve IL-1 β ile IL-18'in olgunlaşmasını ve salınmasını sağlayan inflamazom aktivasyonu (örneğin, NLRP3) ile sıkı bir şekilde bağlantılıdır (Pinzón-Fernández ve ark., 2025). Piroptoz, hücre içi patojenleri ortadan kaldırmaya ve bağışıklık sistemini uyarmaya yardımcı olan önemli bir doğal bağışıklık efektör mekanizmasıdır; *in vitro* (Hücre kültüründe yapılan deneyler) ve *in vivo* (Hayvan deneyleri veya klinik çalışmalar) olarak çok çeşitli PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) ve DAMP'ler tarafından aktive edilebilir (Liu ve ark., 2024). Piroptoz, patojenlerin ortadan kaldırılmasında önemli bir savunma mekanizması oluşturmaya rağmen, aşırı inflamatuvar yanıtı tetikleyerek doku hasarına yol açabilmesi nedeniyle “iki ucu keskin bir kılıç” olarak değerlendirilmektedir (Yu ve ark., 2021). Bu dengenin bozulması, piropozun kontrolsüz şekilde aktive olmasına yol açarak çeşitli hastalıkların gelişimi ve ilerlemesine katkıda bulunabilmektedir. Doğuştan gelen bağışıklık ve inflamatuvar hastalıkların kesişim noktasındaki merkezi rolü nedeniyle piropoz; bulaşıcı hastalıklar, otoimmünite, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi birçok patolojik süreçte etkileri bulunan ve son yıllarda giderek artan ilgi gören önemli bir araştırma alanı hâline gelmiştir (Rao ve ark., 2022).

2.8.Piropozun Moleküler Temelleri

Piropozun yumurtalık patolojisindeki önemi, yeni çalışmalarla daha güçlü bir şekilde ortaya konmaktadır. Piroptoz, sitozolik PRR (desen tanıma reseptörlerinin); patojenle ilişkili veya tehlike sinyallerine yanıt olarak inflamazomların, örneğin NLRP3 ile ASC [Apoptozla ilişkili, CARD (Kaspaz aktivasyon ve bağlanma bölgesi) içeren speck-benzeri protein] kompleksleriyle etkileşime girmesi sonucu tetiklenir (Vajjhal ve ark., 2012).

Piropozda patojen veya tehlike sinyalleri sitoplazmik inflamazomları, özellikle NLRP3 inflamazomunu aktive eder ve bu durum kaspaz-1'in aktivasyonu ile hücre ölüm mekanizmasına yol açar.

İnflamazom oluşumu, kaspaz-1'in aktivasyonuna yol açarak IL-1 β ve IL-18'in pro formlarının kesilmesini sağlar; ayrıca kanonik olmayan yollarda kaspaz-4, kaspaz-5 ve kaspaz-11'in aktivasyonu da gerçekleşebilir (Vajjhal ve ark., 2012). Aktive olan kaspaz-1, aynı zamanda GSDMD'yi parçalayarak por oluşturma kapasitesine sahip N-terminal (NT) fragmanını serbest bırakır (Kayagaki ve ark., 2015; Shi ve ark., 2015).

Serbest kalan GSDMD-NT (Gasdermin D'nin N-ucu Fragmanı) fragmanı, plazma

membranına yerleşip oligomerize olarak yaklaşık 20 nm çapında porlar oluşturur (Kayagaki ve ark., 2015; Shi ve ark., 2015). Bu porlar, olgun IL-1 β ve IL-18 başta olmak üzere çeşitli sitokinlerin, iyonların ve küçük proteinlerin hücre dışına çıkışına izin verirken, hücre zarının geçirgenliğini de önemli ölçüde artırır. Artan geçirgenlik sonucunda hücre içine su girişi olur, bu da hücrede şişmeye ve ozmotik dengesizliğe yol açar. Sürecin ilerleyen aşamasında hücre zarı bütünlüğünü kaybeder ve litik parçalanma meydana gelir (Kayagaki ve ark., 2015; Shi ve ark., 2015). Bu parçalanma sırasında hücre içeriğinde bulunan DAMP'ler hücre dışına salınır ve güçlü bir inflammatuar yanıt tetiklenir. Bu nedenle piroptoz, membran bütünlüğünü bozması ve inflamasyon sinyallemesini aktive etmesi bakımından apoptozdan belirgin şekilde ayrılan, pro-inflammatuar bir hücre ölüm şeklidir (Broz, 2025).

Bu özellikleri nedeniyle, piroptozun granüloza hücrelerinde tetiklenmesi, özellikle PKOS bağlamında inflammatuar yanıtın artmasına ve hücre fonksiyonlarının bozulmasına yol açabilir. PKOS'da görülen hormonal düzensizlikler, özellikle granüloza hücrelerinde piroptoz ve inflammatuar yanıtın tetiklenmesine zemin hazırlayan önemli bir faktör olarak öne çıkmaktadır. Hiperandrojenizm, kadınlarda testosteron, DHT (dihidrotestosteron) gibi androjen hormonlarının normalden fazla olması durumu olarak tanımlanır ve örneğin DHT uygulaması granüloza hücrelerinde oksidatif stresi tetikleyerek NLRP3 inflamazomunu ve ilişkili hücre ölüm mekanizmalarını aktive edebilir (Cai ve ark., 2022). Nitekim PKOS hastalarının yumurtalık dokularında NLRP3, aktif (kesilmiş) kaspaz-1 ve GSDMD ekspresyonunda artış ve buna bağlı olarak IL-1 β ile IL-18 düzeylerinde yükselme saptanmıştır (Wang ve ark., 2023; Berkel, 2024). DHT ile indüklenen PKOS modeli farelerde ise yumurtalıklarda NLRP3, ASC ve aktif kaspaz-1 ekspresyonu belirgin şekilde artmış, bunun sonucunda GSDMD proteini aktive olmuş ve GSDMD-NT fragmanı serbest kalarak granüloza hücrelerinde piroptotik ölümüne yol açmıştır (Wang ve ark., 2023). Bu farelerde, hücre zarı porları ve piroptotik morfolojiye sahip çok sayıda granüloza hücresi gözlenmiştir (Zhang ve ark., 2025). Öte yandan, PKOS hayvan modellerinde kaspaz-1'in genetik veya farmakolojik olarak inhibe edilmesi, granüloza hücrelerinin hayatta kalma oranını artırmış ve çeşitli yumurtalık fonksiyonlarını iyileştirmiştir. Bu gözlemler, piroptozun PKOS patogenezindeki rolünü açıkça ortaya koymaktadır (Berkel, 2024).

Hiperandrojenemi yalnızca hormonal dengesizliğe yol açmakla kalmaz, aynı zamanda granüloza hücrelerinde piroptozu teşvik eder. PKOS modeli farelerde androjenlerin

düşürülmesi (örneğin letrozol veya spironolakton uygulamasıyla) yumurtalıklarda kaspaz-1 aktivasyonunu ve granüloza hücreleri piroptozunu önemli ölçüde azaltarak folikül fonksiyonlarını iyileştirmiştir.

Özetle, PKOS hastalarında ve hayvan modellerinde granüloza hücreleri sadece apoptoz yoluyla değil, aynı zamanda NLRP3-kaspaz-1-GSDMD eksenini aracılığıyla inflamatuvar piroptoz yoluyla da ölebilmektedir. Bu mekanizma, foliküler atrezi ve yumurtalık inflamasyonuna katkıda bulunarak PKOS'un patofizyolojisinde kritik bir rol oynamaktadır (Berkel, 2024; Xiang ve ark., 2023; Yu ve ark., 2021; Wang ve ark., 2023).

2.8.1. Üreme Bozukluklarında Granüloza Hücrelerinin Piroptozu

Önceki çalışmalar, granüloza hücrelerinde gerçekleşen piroptotik hücre ölümünün bazı kadın üreme hastalıklarının gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini ortaya çıkarmaktadır (Tan ve ark., 2021). Özellikle PKOS bağlamında, bu hücrelerin inflamatuvar hücre ölümü mekanizmalarına karşı duyarlılığının arttığı anlaşılmaktadır. PKOS'ta metabolik ve hormonal stres faktörlerinin (örneğin yüksek glikoz düzeyleri ve artmış androjen konsantrasyonlarının) granüloza hücrelerinde NLRP3 inflamazomunu aktive ederek piroptozu tetiklediği düşünülmektedir.

İnflamazom aktivasyonunu takiben kaspaz-1'in aktif hale gelmesi, gasdermin proteinlerinin proteolitik olarak kesilmesine yol açar. Bu süreçte özellikle GSDMD, kaspaz-1 tarafından parçalanarak hücre zarında por oluşturan N-terminal fragmanını açığa çıkarır ve böylece piroptotik hücre ölümü başlatılır. Bununla birlikte, piroptozun yalnızca kaspaz-1 ve GSDMD ile sınırlı olmadığı; kaspaz-4, kaspaz-5 ve kaspaz-11 gibi diğer inflamatuvar kaspazların da benzer mekanizmalarla sürece katkıda bulunabildiği gösterilmiştir. Ayrıca bazı durumlarda GSDME (Gasdermin E) gibi diğer gasdermin ailesi üyelerinin de piroptotik morfolojiye neden olabildiği bildirilmektedir. Granüloza hücrelerinde özellikle inflamatuvar stres altında NLRP3, kaspaz-1, GSDMD ekseninin belirgin şekilde aktive olduğu ve bunun sitokin salınımı ile birlikte hücre ölümünü hızlandırdığı görülmektedir.

DeneySEL PKOS modelleri, granüloza hücre kaybının önemli bir kısmının piroptozla ilişkili olduğunu desteklemektedir. Bu modellerde, granüloza hücrelerinin yaklaşık %80'inde inflamazom aktivasyonuna bağlı LDH salınımı gözlenirken, sağlıklı kontrollerde bu oran yaklaşık %20 düzeyinde kalmaktadır. Artmış LDH salınımı, hücre

membran bütünlüğünün bozulduğunu ve piroptotik hücre ölümünün gerçekleştiğini gösteren önemli bir biyokimyasal göstergedir.

Granüloza hücreleri, folikül gelişimi, steroid hormon üretimi ve oositin desteklenmesi açısından kritik öneme sahiptir. Bu nedenle bu hücrelerin aşırı kaybı, foliküler gelişimin bozulmasına ve atreziye yol açabilir. PKOS'ta artan inflamatuvar hücre ölümü, yumurtalık mikroçevresinde inflamasyonu derinleştirerek hem folikül sağkalımını hem de ovulasyon kapasitesini olumsuz etkiler. Dolayısıyla granüloza hücrelerinde piroptozun aşırı aktivasyonu, PKOS'un karakteristik endokrin ve ovulatuvar bozukluklarının gelişiminde önemli bir mekanizma olarak değerlendirilmektedir.

Öte yandan, inflamazom sinyalleşmesinin baskılanmasının granüloza hücre canlılığını koruyabildiği gösterilmiştir. Örneğin plumbagin, NLRP3 inflamazom aktivasyonunu inhibe ederek kaspaz-1 aktivitesini azaltır ve GSDMD aracılı piroptozu sınırlar. Aynı zamanda oksidatif stresin ve inflamatuvar sitokin üretiminin azalmasına katkıda bulunur. Benzer şekilde resveratrol, kurkumin ve kuersetin gibi polifenolik bileşiklerin de NLRP3 aktivasyonunu baskılayarak inflamatuvar yanıtı zayıflattığı ve granüloza hücre fonksiyonunu koruduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Bu tür bileşikler, inflamatuvar sinyal yollarını modüle ederek piroptotik hücre ölümünü azaltabilir ve PKOS'a bağlı yumurtalık disfonksiyonunun hafifletilmesine katkı sağlayabilir.

Sonuç olarak, mevcut veriler granüloza hücrelerinde piroptozun PKOS patofizyolojisinde merkezi bir rol oynadığını ve inflamazom–kaspaz–gasdermin ekseninin bu süreçte temel düzenleyici olduğunu göstermektedir. Bu nedenle piroptozu hedefleyen farmakolojik ya da besinsel yaklaşımlar, PKOS'ta yumurtalık fonksiyonunun korunması ve foliküler gelişimin desteklenmesi açısından umut verici stratejiler olarak değerlendirilmektedir.

2.8.2. PKOS: Genel Bakış ve Patogenez

PKOS, dünya genelinde üreme çağındaki kadınların %10-18'ini etkileyen yaygın bir endokrin-metabolik bozukluktur (Xu ve ark., 2025; Qiu ve ark., 2020). Klinik olarak PKOS; hiperandrojenizm, kronik anovülasyon veya düzensiz sikluslar (menstrüel döngü/adet döngüsü), polikistik over morfolojisi ve ilişkili metabolik bozukluklar (örneğin, insülin direnci) ile karakterize edilir (Xu ve ark., 2025; Xiong ve ark, 2011; Berkel, 2024). PKOS'un etiyolojisi çok faktörlüdür; genetik yatkınlık ve çevresel faktörler, normal hipotalamus, hipofiz, ovaryen sinyalleşmesini ve over fonksiyonunu

bozmak için bir araya gelir. PKOS'lu kadınlarda, genellikle düşük dereceli kronik inflamasyon (IL-18 gibi sitokinlerin yüksek seviyeleri) gözlemlenir. Androjen (erkeklik hormonu) fazlalığını teşvik eden bozulmuş intra-ovaryen (yumurtalık içi) sinyalleşme, LH (luteinleştirici hormon) ve insülin sinyallerinde artışa, hücre ölüm mekanizmalarına yol açar (Singh ve ark., 2023; Wang ve Li, 2023). Granüloza hücreleri, yumurtalık foliküllerinin östrojen üreten somatik hücreleridir.

Sağlıklı foliküler gelişim sırasında granüloza hücreleri, folikülün steroidogenezinde temel bir rol oynar. Teka hücreleri tarafından sentezlenen androjenler, granüloza hücrelerinde FSH (folikül uyarıcı hormon) kontrolü altında aromataz enzimi aracılığıyla E2 (estradiol) dönüştürülür. Bu süreç; folikül büyümesinin sürdürülmesi, oosit maturasyonu ve normal ovulasyon için gerekli olan hormonal mikroçevrenin oluşmasına katkıda bulunur (Qiu ve ark., 2020). Bununla birlikte, PKOS foliküler gelişim sıklıkla erken aşamalarda durur. Yumurtalıklarda çok sayıda küçük antral folikül (folikül içinde sıvı dolu bir boşluğun bulunduğu gelişim evresi) birikmesine rağmen, bu foliküllerin yalnızca çok azı preovulatuvar (ovulasyondan önceki) aşamaya ilerleyebilir. Bunun sonucunda klinik olarak oligomenore (adet döngülerinin seyrek veya düzensiz olması) veya anovülasyon (ovulasyonun gerçekleşmemesi) ortaya çıkar (Lizneva ve ark., 2016).

PKOS patogenezinde granüloza hücrelerinin yapısal ve fonksiyonel bozuklukları merkezi bir rol oynamaktadır (Azziz ve ark., 2016; Diamanti-Kandarakis ve Dunaif, 2012). Granüloza hücrelerinin steroidogenez kapasitesindeki bozulma, büyüme faktörü sinyalleşmesindeki değişiklikler ve inflamatuvar yanıtın artması; foliküler mikroçevrenin dengesini bozarak folikül gelişimini olumsuz etkileyebilir (Huang ve ark., 2024). Nitekim PKOS'ta granüloza hücre fonksiyonunun bozulması; insülin direnci, hiperandrojenizm ve lokal inflamasyon gibi faktörlerle birlikte, hücre stresinin artmasına ve çeşitli düzenlenmiş hücre ölümü yollarının aktive olmasına yol açabilmektedir (Berkel, 2024; Lizneva ve ark., 2016).

PKOS'lu bireylerde granüloza hücrelerinde düzenlenmiş hücre ölümü oranının arttığı gösterilmiştir. Bu durum folikül yapısının erken dönemde bozulmasına ve foliküler atrezi gelişimine katkıda bulunur. Granüloza hücreleri, oosit ile yoğun bir parakrin ve metabolik iletişim ağı kurarak oositin büyümesini ve metabolik ihtiyaçlarının karşılanmasını sağlar. Bu hücreler aynı zamanda enerji substratlarının sağlanması, steroid hormon üretimi ve büyüme faktörlerinin salgılanması yoluyla oosit gelişimini destekler. Dolayısıyla

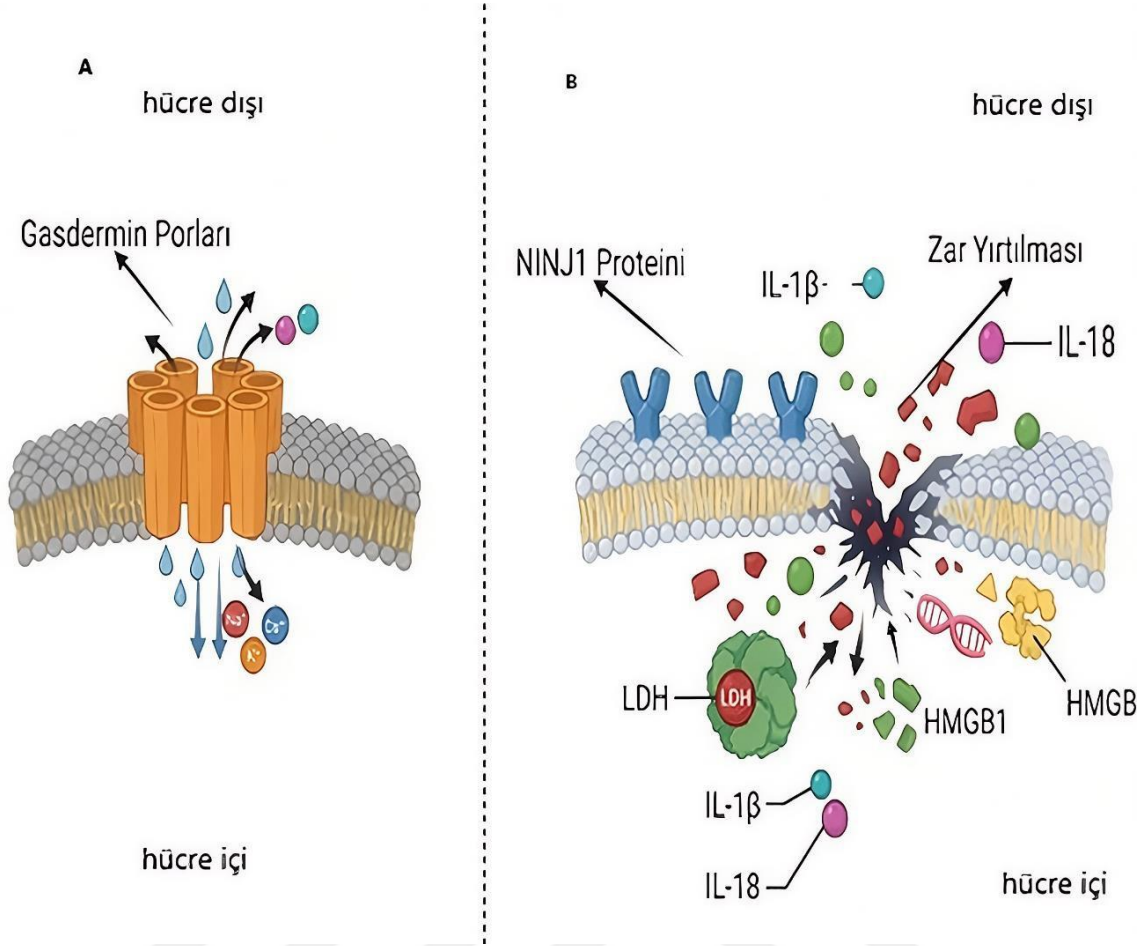
granüloza hücrelerinin erken kaybı, oositin beslenmesi ve sinyal iletimi için gerekli mikroçevrenin bozulmasına neden olur. Bunun sonucunda oosit matürasyonu yetersiz kalabilir ve oosit kalitesi düşebilir (Huang ve ark., 2024; Qiu ve ark., 2020). Deneysel ve klinik çalışmalar, granüloza hücrelerinde artmış hücre ölümü ile oosit gelişimindeki bozulma ve fertilite potansiyelindeki azalma arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir (Berkel, 2024).

PKOS'un patofizyolojisi yalnızca hormonal dengesizliklerle sınırlı değildir; aynı zamanda hiperandrojenizm, metabolik disfonksiyon ve kronik düşük dereceli inflamasyonun birleşimi ile karakterizedir. Bu faktörler granüloza hücrelerinde oksidatif stres, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamatuvar sinyal yollarının aktivasyonu gibi süreçleri tetikleyerek çeşitli düzenlenmiş hücre ölümü mekanizmalarının ortaya çıkmasına yol açabilir. Artmış granüloza hücre kaybı ise folikülün yapısal bütünlüğünü bozarak folikül gelişiminin ilerlemesini engeller ve sonuçta foliküler atrezi ile ovülatuvar disfonksiyona katkıda bulunur (Berkel, 2024; Huang ve ark., 2024). Bu nedenle granüloza hücre sağkalımının korunması, PKOS'ta folikül gelişiminin sürdürülebilmesi ve oosit kalitesinin korunması açısından kritik bir öneme sahiptir.

2.9. Gasdermin Porları ve NINJ1 Aracılı Hücre Zarı Yırılması

GSDM por oluşumu piroptotik şişmeyi başlatırken, plazma membranının nihai yırtılması

NINJ1'in aracılık ettiği, aktif olarak ilerleyen bir süreçtir (Kayagaki ve ark., 2021).



Şekil 2.2. Piroptoz sırasında hücre zarında meydana gelen yapısal değişimlerin şematik gösterimi.

Bu figür, BioRender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.

Şekil 2.2 A’da, GSDM porlarının hücre membranında oluşarak iyon ve su girişine neden olduğu ve hücrede ödemle sonuçlandığı gösterilmektedir. Şekil 2.2. B’de ise *NINJ1* proteinlerinin membran yırtılmasını tetikleyerek hücre içeriğinin dışarı salınmasına yol açtığı gösterilmektedir. Bu süreçler, inflamatuvar litik hücre ölümünün moleküler mekanizmalarını görselleştirmektedir.

NINJ1 ilk olarak sinir hasarı ile ilişkili süreçler kapsamında tanımlanmış küçük bir transmembran protein olup, istirahat halindeki hücrelerde otoinhibisyon özelliği gösteren dimerik yapılar halinde bulunduğu bildirilmektedir (Broz, 2025). GSDM kaynaklı ozmotik hücre şişmesinin ardından, bilinmeyen bir sinyal *NINJ1*’in hücre dışı sarmalında konformasyonel bir değişimi tetikleyerek *NINJ1*’in büyük filamentli yapılara dönüşerek kompleks oluşturmaya sebep olur (Broz, 2025). Kriyo-EM (Kriyo-Elektron Mikroskobu) çalışmaları, *NINJ1* oligomerlerinin membran kenarlarına stabil biçimde

yerleşebilen ve “çit benzeri” yapılar oluşturan amfipatik filamentler meydana getirdiğini ortaya koymuştur (Borges ve ark., 2022). NINJ1 yapıları ya genişleyerek büyük porlar oluşturmakta ya da membran parçalarını vezikül oluşturan disklere sıkıştırarak hücre zarı yırtılmasına ve sonuç olarak ciddi hücre hasara yol açmaktadır (Borges ve ark., 2022). Piroptotik hücre zarı parçalanması tamamen ozmotik bir patlama değil, *NINJ1* filamentasyonu tarafından yönlendirilen düzenlenmiş bir mekanizmadır. Bunu destekleyecek şekilde, *NINJ1*'den yoksun hücreler yine de inflammasom aktivasyonu ve GSDM por oluşumuna uğrarlar, propidyum iyodür gibi küçük boyalara geçirgen hale gelirler ancak LDH veya diğer büyük sitozolik enzimleri hücre dışına salmazlar (Broz, 2025). Dolayısıyla, *NINJ1* olmadan piropototik hücreler şişer ve metabolik bütünlüklerini kaybederler ancak membran bütünlüğünü koruduklarından lizis oluşumu gözlenmez (Broz, 2025). Özellikle, *NINJ1* aracılığıyla gerçekleşen hücre zarı parçalanması; nekroz ve apoptoz sonrası lizis gibi diğer litik hücre ölümlerinin son aşamasını kontrol eder (Borges ve ark., 2022; Zhu ve Xu, 2025). *NINJ1*'in inhibisyonu veya yokluğu hücre zarı parçalanmasını geciktirir ve inflammatuar yayılımı sınırlandırır; bu da *NINJ1*'in piropototik litik sonucunun temel "infazcısı" olduğunu gösterir (Zhu ve Xu, 2025; Broz, 2025).

2.9.1. NINJ1 Aracılı Hücre Zarı Yırtılması Moleküler Olarak Düzenlenmesi

NINJ1, litik hücre ölümü sırasında plazma membranının yırtılmasında kritik bir rol oynayan ve yakın zamanda tanımlanan transmembran bir adezyon molekülüdür (Kayagaki ve ark., 2021; Zhu ve Xu, 2025). Ayrıca apoptotik hücre ölümünün aksine membran bütünlüğü korunur, piropototik ve diğer litik hücre ölümü mekanizmaları plazma membranı yırtılması ile sonuçlanır; bu süreç, hücre içi proinflammatuar moleküllerin, özellikle de DAMP'lerin hücre dışına salınmasına yol açan bir hücre ölüm mekanizmasıdır (Dondelinger ve ark., 2023). *NINJ1*, Kayagaki ve ark. (2021) tarafından bu son yırtılma adımının ana düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. Piroptotik veya nekrotik uyaranlara maruz kalan *NINJ1*^{-/-} makrofajlarda, hücre membranı tamamen yırtılmamış, bunun yerine şişerek şişkin çıkıntılar oluşturmuş ve hücre dışına çok daha az DAMP salmıştır (Kayagaki ve ark., 2021). Bu nedenle, *NINJ1* aracılı plazma membran yırtılması, pasif ozmotik lizis yerine aktif, düzenlenmiş bir olaydır ve GSDM por oluşumunun ardından yeni bir düzenleyici kontrol mekanizması olarak ortaya çıkar (Degen ve ark., 2023). *NINJ1*, plazma membranının tam parçalanmasını sağlayarak hücre ölümünün inflammatuar etkilerini artırır ve böylece bağışıklık yanıtı ile hastalık patogenezi üzerinde önemli sonuçlar doğurur (Zhu ve Xu, 2025). Dolayısıyla, *NINJ1*'in kontrolsüz inflamasyonu sınırlamadaki potansiyel rolünün

anlaşılması, piroptoz kaynaklı üreme bozukluklarının önlenmesi ve tedavisinde yeni bir terapötik hedef sunabilecektir.

2.9.2. NINJ1'in Yapısal Temeli ve Aktivasyon Mekanizmaları

Yapısal olarak, insan *NINJ1* proteini, ekstraselüler N- ve C-terminal alanlarıyla çevrili iki transmembran α -heliksine sahip küçük bir membran proteinidir. Yüksek çözünürlüklü mikroskopik incelemeler, *NINJ1*'in hücre ölümü sırasında inert (reaksiyona girmeyen) bir monomerden aktif bir oligomere nasıl dönüştüğünü açıklığa kavuşturmuştur (Zhu ve Xu, 2025). Sağlıklı hücrelerde, *NINJ1* esas olarak otoinhibe bir dimer olarak bulunur; kriyoelektron mikroskopi, hidrofilik membrana bakan yüzeyin üç düz sarmal tarafından izole edildiği, inaktif, yüz yüze bir homodimer varlığını ortaya koymuştur (Pourmal ve ark., 2025). Bu konfigürasyon, hücre zarı yırtılma yüzeyini gizleyerek ve baskılayarak istenmeyen membran yırtılmasını önler. Litik ölüm sinyali üzerine, bu dimer ayrışır; korunan TM1 (Transmembran bölge 1) sarmalı belirgin bir bükülme geçirir, hidrofilik yüzeyi açığa çıkarır ve daha ileri düzey kompleksleşmeyi mümkün kılar (Degen ve ark., 2023; David ve ark., 2024; Sahoo ve ark., 2025). Mutasyonla hücre ölüm mekanizmasıyla *NINJ1* dimerlerinin destabilize edilmesi, spontan TM1 bükülmesine ve kontrolsüz plazma membran yırtılması ile hücre ölümüne neden olurken, dimeri stabilize eden mutasyonlar *NINJ1* aktivitesini bloke eder (Pourmal ve ark., 2025). Bu nedenle, NINJ1 aktivasyonu, plazma membranı yırtılmasının yalnızca uygun koşullar altında gerçekleşmesini sağlayan iki aşamalı bir modelle açıklanmaktadır. Öncelikle, otoinhibitör durumun çözülmesinin ardından konformasyonel yeniden düzenlenme, ayrışma ve bükülme meydana gelir; bunu NINJ1'in polimerizasyonu veya oligomerizasyonu takip eder. Süper çözünürlüklü görüntüleme ve kriyoelektron mikroskopi, aktif NINJ1'in oligomerik mimarisini ortaya koyarken, aktivasyon sonrası monomerler hücre yüzeyinde doğrusal ve amfipatik filament benzeri yapılarda organize olmaktadır (Borges ve ark., 2022; Zhu ve Xu, 2025). Bu filamentlerin lipidlerle etkileşime giren bir hidrofobik yüzü ve açıkta kalan bir hidrofilik yüzü vardır; bu da onların membran kenarlarını sarmasına, lipid parçalarını çözmesine veya por oluşumunu mümkün kılmasına olanak tanır (Degen ve ark., 2023).

Piroptotik makrofajlarda, *NINJ1*, inflamasyon aktivasyonundan sonra dakikalar içinde hızla dimerler ve trimerler oluşturur ve kısa bir süre sonra megadalton ölçeğindeki polimerler dallanmış kümeler ve uzun filamentler halinde dışarı doğru uzanır (Degen ve ark., 2023). Bu filamentler, plazma zarını çevreler ve sıkıştırır, etkili bir şekilde parçalara

ayırır ve tamamen yırtılmasına sebep olur. Özellikle, rekombinant *NINJI* tek başına yapay lipozomları çözebilir ve halka benzeri yapılar oluşturabilir; bu da *NINJI*'in membranları aktif olarak parçalara ayırdığı bir modeli desteklemektedir (Zhu ve Xu, 2025). Özetle, *NINJI*'in α -sarmallarının benzersiz kendi kendine birleşme ve membrana bağlanma özellikleri, serbest bırakıldıktan sonra membran yırtılmasını gerçekleştirme yeteneğinin temelini oluşturmaktadır.

2.9.3. *NINJI* Aracılı Hücre Zarı Parçalanmasının Aktivasyon Tetikleyicileri

NINJI'in inaktif bir dimerden aktif bir multimere geçişi, hücre stres sinyalleriyle yakından bağlantılıdır. Klasik piroptozda, inflamozom aktivasyonu, NT parçaları plazma zarında porlar oluşturan GSDMD'nin çeşitli kaspazlar tarafından kesilip aktifleşmesine sebep olur (Kayagaki ve ark., 2021). Önemli olarak, *NINJI* polimerizasyonu ve plazma membran yırtılması, GSDM proteinlerinin aktifleşerek hücre zarında porlar oluşturmalarının ardından gerçekleşir. Zamana bağlı analizler, *NINJI* dimerleri ve trimerleri yalnızca GSDMD tamamen por oluşturmak için oligomerize olduktan sonra ortaya çıkar ve LDH salınımı, hücre zarı yırtılmasının bir göstergesi olarak *NINJI* oligomerizasyonu ile aynı zamana denk gelir (Degen ve ark., 2023). GSDM aracılı por oluşumu tam lizis için gereklidir ancak yeterli değildir (Kayagaki ve ark., 2021).

Diğer litik hücre ölüm şekilleri de benzer şekilde son aşamada *NINJI*'e bağlıdır. PANoptozda (birleşik bir piroptoz/apoptoz/nekroptoz hücre ölüm mekanizması), ferroptoz ve nekroptozda olduğu gibi, hücre şişmesi veya oksidatif membran hasarı gerilimi artırır ve *NINJI* oligomerleşmesini tetikler. Örneğin, Dondelinger ve ark. (2023) basit hipotonik şokun (hücre şişmesine neden olan) vahşi tip (WT) hücrelerde *NINJI*'in oligomerizasyonunun, plazma membranının yırtılmasını indüklemek için tek başına yeterli olduğu; buna karşın bu etkinin *NINJI* ekspresyonu bulunmayan hücrelerde gözlenmediği gösterilmiştir. Benzer şekilde, hücreye kalsiyum girişi güçlü bir *NINJI* aktivatörüdür: BAPTA-AM [BAPTA(1,2-bis(o-aminofenoksietan)-N, N, N', N'-tetraasetik asit) asetoksimetil ester] hücre içine girer, hücre içi Ca^{2+} 'yi bağlar, PANoptoz sırasında *NINJI* oligomerizasyonunu neredeyse tamamen ortadan kaldırır ve membranları stabilize eder (Zhou ve ark., 2025). Bu bulgular, hücre hacmi veya sitoplazmik Ca^{2+} düzeylerindeki değişikliklerin, por oluşumunun ortak alt etkileri olarak işlev gördüğünü ve *NINJI*'in otoinhibisyonunu hafifletmek için yakın tetikleyiciler rolü oynayabileceğini düşündürmektedir.

2.9.4. NINJI Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Akut aktivasyonun ötesinde, *NINJI* seviyeleri, çeşitli fizyolojik ve patolojik ortamlarda hücre ölüm mekanizmalarına bağlı transkripsiyonel programlar tarafından da düzenlenebilir. *NINJI* ilk olarak sinir hasarı kaynaklı bir gen olarak tanımlanmıştır; akson hasarı, nöronlarda ve Schwann hücrelerinde *NINJI* gen ekspresyonunu artırır ve burada akson büyümesini teşvik eder (Zhu ve Xu, 2025). Merkezi sinir sisteminde ve diğer dokularda, *NINJI* ekspresyonu tipik olarak düşüktür, ancak yaralanma veya inflamasyona yanıt olarak önemli ölçüde artış gösterir (Araki ve ark., 1997; Kayagaki ve ark., 2021).

Pro-inflamatuar sinyallerin *NINJI* transkripsiyonunu indüklediği görülmektedir (Kayagaki ve ark., 2021; Bergsbaken ve ark., 2009). TNF α (Tümör Nekroz Faktörü-alfa) uyarımı, *NINJI* promotöründe c-Jun (Jun proto-onkogeni) tarafından kodlanan ve AP-1 (Aktivatör Protein-1) kompleksinin bir bileşeni olarak gen transkripsiyonunu düzenleyen bir transkripsiyon faktörü olan AP-1 ve c-Jun'un bağlanmasına ve güçlü bir *NINJI* gen ekspresyonu artışına yol açarak hücre ölüm mekanizmasını tetikler. Meme kanseri hücrelerinde yapılan ChIP (Hsc70 ile etkileşen proteinin karboksil ucu) deneyleri, TNF α 'nın c-Jun'un *NINJI* promotörüne bağlanmasını indüklediğini ve *NINJI* mRNA'sını (Mesajcı Ribonükleik Asit) artırdığını, c-Jun'un baskılanmasının ise bu etkiyi ortadan kaldırdığını ortaya koymuştur (Qiao ve ark., 2016). Bu durum, TNF α /AP-1–*NINJI* eksenini, muhtemelen diğer inflammatuar hücrelerde de çalışarak sitokin sinyalini membran yırtılma mekanizmasına bağlar.

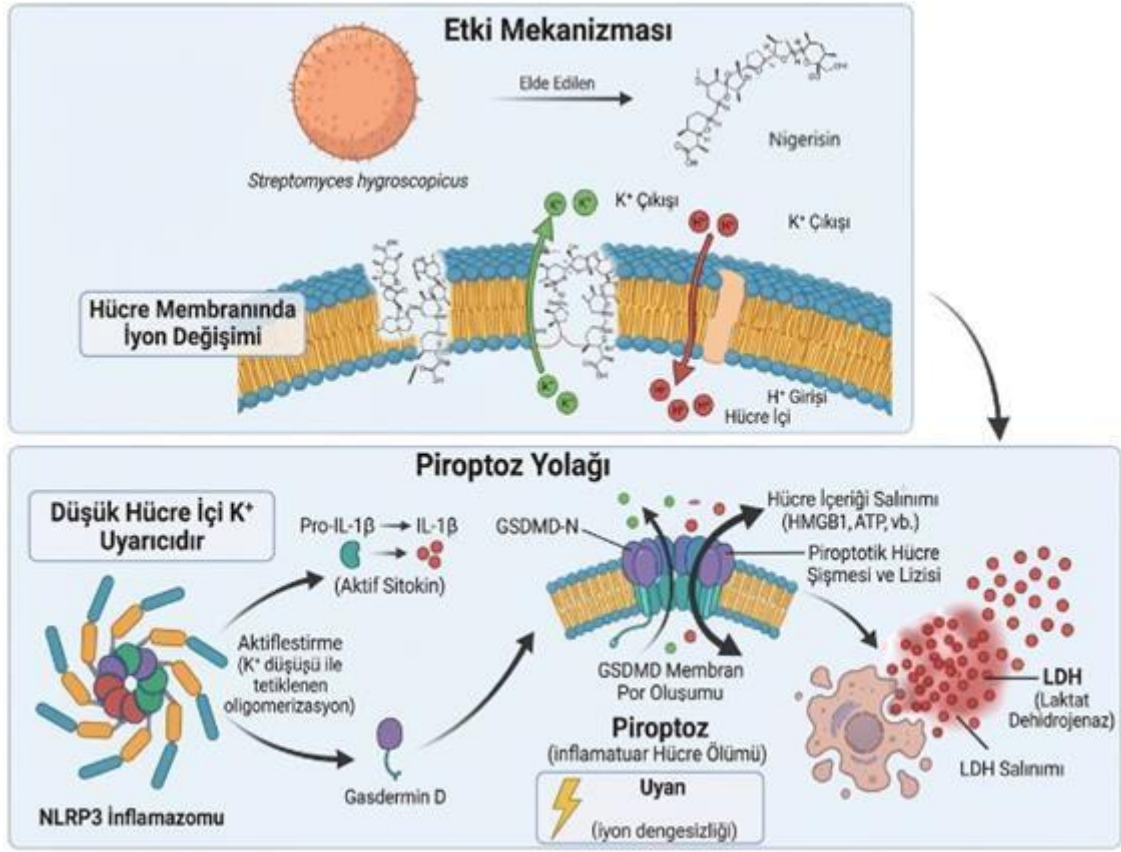
Tümör baskılayıcı p53 (Tümör Proteini p53) de *NINJI* ekspresyonunu etkiler (Levine ve Kroemer, 2008). Genotoksik stres modellerinde, p53 aktivasyonu bir geri bildirim döngüsü içinde *NINJI* transkripsiyonunu yönlendirirken, DNA hasarı p53'ü uyarır ve bu protein de *NINJI* promotörüne bağlanarak bu genin transkripsiyonunu artırır (Kang ve ark., 2020). Tersine, *NINJI* eksikliği p53 seviyelerini yükseltebilir; muhtemelen p53 mRNA transkripsiyonunu modüle ederek artırır (Kang ve ark., 2020). Bu nedenle, p53–*NINJI* çapraz etkileşimi, onkogenik veya stres koşulları altında hücre ölüm kararlarını koordine edebilir ve hücre yapışması, yaşlanma ve hücre ölümü mekanizmalarını etkileyebilir. *NINJI*'i düzenlediği bildirilen diğer transkripsiyon faktörleri arasında, belirli uyaranlar altında STAT (Sinyal İletici ve Transkripsiyon Aktivatörü) proteinleri ve ELK1 (ETS domeni içeren Elk-1 proteini) bulunur, ancak ayrıntılar hâlâ araştırma aşamasındadır (Zhou ve ark., 2025).

NINJI ekspresyonu yalnızca transkripsiyonel düzeyde değil, aynı zamanda post-transkripsiyonel ve post-translasyonel mekanizmalarla da düzenlenebilir. Özellikle

makrofajlarda *NINJI* proteininin hücre yüzeyinde proteolitik olarak işlenebildiği gösterilmiştir. Bu süreçte MMP-9 (Matriks Metalloproteinaz-9) tarafından gerçekleştirilen proteolitik kesim sonucunda *NINJI*'in NT bölgesinden türeyen küçük bir peptid fragmanı açığa çıkar (Kayagaki ve ark., 2021). Salınan bu NT fragmanının kemotaktik aktiviteye sahip olduğu ve bağışıklık hücrelerinin inflamasyon bölgesine yönlendirilmesine katkıda bulunabileceği bildirilmiştir. Bu durum, *NINJI*'in yalnızca hücre adezyonu ve membran bütünlüğü ile ilişkili bir protein olmadığını, aynı zamanda inflamatuvar yanıtın düzenlenmesinde parakrin sinyaller oluşturabilen bir molekül olarak da işlev görebileceğini göstermektedir (Araki ve ark., 1997; Iwata ve ark., 2010). Sonuç olarak, *NINJI* ekspresyonu dinamiktir ve inflamatuvar sitokinler, büyüme sinyalleri ve stres hücre ölüm mekanizmaları tarafından tetiklenebilir. Bu durum, gerektiğinde membran yırtılmasını sağlamak için yeterli *NINJI* proteininin mevcut olmasını sağlarken, gereksiz lizisi önlemek için ise homeostaz koşullarında bu genin ekspresyonunun düşük düzeyde kalmasını sağlar (Kayagaki ve ark., 2021; Araki ve ark., 1997).

2.10. Nigerisin

Nigerisin, *Streptomyces hygroscopicus* bakterisinden elde edilen ve potasyum iyonlarını membranlar arasında hidrojen iyonları ile değiştirerek iyonofor görevi gören, hücre zarından geçişi kolaylaştıran antibiyotik özellikte bir moleküldür (Munoz-Planillo ve ark., 2013; Evavold ve ark., 2018).



Şekil 2.3. Nigerisin'in etki mekanizması.

Bu figür, BioRender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.

Bu şematik gösterim, nigerisin'in hücre membranında iyon kanalı oluşturması sonucu hücre içi potasyum azalmasının NLRP3 inflamazom aktivasyonunu tetiklediğini, bunun da GSDMD'nin aktivasyonu ile hücre membranında porlar açarak inflamatuvar hücre ölümü olan piroptozun gerçekleşmesine yol açtığını Şekil 2.3. göstermektedir. Piroptoz, inflamasyonla birlikte doku hasarına ve immün yanıtın tetiklenmesine neden olur.

Nigerisin, seçici bir iyon taşıyıcı (iyonofor) olarak çalışır. Hücre zarındaki gradyanı kullanarak potasyum iyonlarını hidrojen iyonları ile takas eder. Hücre biyolojisinde nigerisin, NLRP3 inflamazomunu aktive etmek için yaygın olarak kullanılır (Muñoz-Planillo ve ark., 2013; Groß ve ark., 2016). NLRP3 için kanonik ikinci sinyallerden biri olan K⁺ dışı akımını tetikleyerek hızlı bir kaspaz-1 aktivasyonuna ve piroptozun tetiklenmesine neden olur (Munoz-Planillo ve ark., 2013; Groß ve ark., 2016). Deneysel uygulamalarda, hücreler (örneğin makrofajlar veya granüloza hücreleri) genellikle pro-IL-1β/NLRP3'ü indüklemek için LPS (Lipopolysakkarit) ile uyarılır ve ardından tam inflamazom aktivasyonunu tetiklemek için bu hücrelerin bulunduğu ortama nigerisin eklenir. Nigerisin kaynaklı piroptoz güçlüdür; hücrelerde

GSDMD porları gelişir, hücreler şişer ve dakikalar içinde *NINJI*'e bağlı yırtılma meydana gelir (Muñoz-Planillo ve ark., 2013). Özellikle, temel inflamatuvar bileşenlerinden yoksun bazı hücre tipleri farklı tepki verebilir; örneğin, bazı keratinositler nigerisine yanıt olarak alternatif bir litik hücre ölümüne uğrayabilir (Mi ve ark., 2025). Ancak, inflamazom ile uyumlu hücrelerde nigerisinin pirototik hücre ölümünü tutarlı bir şekilde indüklediği gösterilmiştir (Munoz-Planillo ve ark., 2013; Mariathasan ve ark., 2006). GSDMD oluşumu için gerekli olan inflamazom aktivasyonu nigerisin tarafından güçlü şekilde tetiklenir ve bu süreç piroptoz ile sonuçlanır. Bu nedenle, granüloza hücreleri gibi inflamatuvar yanıt verebilen hücrelerde nigerisinin inflamazom aktivasyonunu ve pirototik hücre ölümünü indüklemesi beklenir; dolayısıyla nigerisin, granüloza hücreleri ölüm mekanizmalarının incelenmesinde deneysel olarak yararlı bir model ajan olarak kullanılmaktadır (Evavold ve ark., 2018; Kayagaki ve ark., 2021).

2.11. Glisin

Glisin, memeli hücrelerinde metabolit ve nörotransmitter olarak yaygın olarak bulunan en basit amino asittir (Wu, 2009). Metabolik rollerinin yanı sıra, glisin uzun zamandır hücreleri ölümcül hasarlardan koruma yeteneğiyle de bilinmektedir. 30 yıldan uzun bir süre önce yapılan çalışmalar, hücre dışı glisinin milimolar konsantrasyonlarda hipoksi veya toksin kaynaklı hücre zarı yırtılmasını önleyebileceğini bulmuştur (Borges ve ark., 2022). Glisin kaynaklı sitoprotektif etki olarak da adlandırılan bu durum, çeşitli dokularda (böbrek, karaciğer, kalp vb.) ve deneysel lizis modellerinde gözlemlenmiştir (Weinberg ve ark., 1987; Dong ve ark., 2001). Daha da önemlisi, glisin birincil hasarı (örneğin, oksidatif stres veya kaspaz aktivasyonu) engellemez, ancak zar bozulmasına yol açan son ortak hücre ölüm mekanizmasını bloke eder (Borges ve ark., 2022). Piroptoz bağlamında, glisinin IL-1 β salgılanmasını etkilemeden LDH salınımını azalttığı yıllar önce bildirilmişti (DiPeso ve ark., 2017). Bu durum da glisin'in inflamazom aktivasyonundan ziyade membran lizisini engelleyebileceğine işaret etmektedir. Glisin'in kesin moleküler hedefi, yakın tarihli çalışmalara kadar belirsizliğini korumuştur. Ancak güncel bulgular glisinin sitoproteksiyonunun litik ölüm sırasında hücre membran bütünlüğünün düzenlenmesiyle ilişkili olduğunu açıkça ortaya koymaktadır (Wang ve ark., 2020). Glisin, amino asit taşıyıcıları aracılığıyla hücre membranlarına nüfuz edebilen küçük bir *zwitterion*'dur (yük taşıyan, ancak toplamda net yükü sıfır olan moleküldür); bu nedenle, etkisi basitçe ozmotik değildir (Miller ve Schnellmann, 1993). Mevcut anlayış, glisinin hücre zarı parçalanması mekanizmasına yani *NINJI* filamentlerinin oluşumuna müdahale

ederek, geride bulunan ölüm sinyalleri aktif olduğunda bile hücre bütünlüğünü koruduğudur (Borges ve ark., 2022). Daha da önemlisi, glisin uygulamasının kendisi, inflamazom oluşumunu veya GSDM por oluşumunu değiştirmez; bunun yerine, özellikle terminal hücre zarı yırtılma adımını engeller (Borges ve ark., 2022). Bu da tam hücre lizisine gerek kalmadan potansiyel olarak yararlı sitokin sinyalleme sürecinin devam etmesine olanak tanır; örneğin, GSDM porları aracılığıyla IL-1 β salınımını bu durumda devam edebilir.

Son çalışmalar bu mekanizmayı aydınlatmıştır; glisin, *NINJI*'in kümelenmesini/oligomerleşmesini bağlar veya başka bir şekilde engeller, böylece hücrelerde litik ölümü tetiklendiğinde plazma zarının bütünlüğünü korunur (Borges ve ark., 2022). Başka bir deyişle, glisin, geride bulunan ölüm sinyallerini (örn. inflamazomlar, kaspazlar, lipid peroksidasyonu) bloke etmez; ancak, son zar yırtılma adımını engeller. Örneğin, NLRP3 aracılı piroptoz (LPS + nigerisin) uğrayan makrofajlarda, glisin eklenmesi, LDH salınımını ve hücre lizisini tamamen önlemiştir (Borges ve ark., 2022). Glisin uygulanan hücreler, hâlâ kaspaz-1'i aktive ediyor ve GSDMD'yi parçalıyor ve IL-1 β salgılayabiliyorlar; ancak, membran bütünlüğü ve ATP salınımı bu hücrelerde korunur. Bu, glisinin küçük porların (örn. GSDM porları) oluşumunun sonrasında etki ettiğini ve *NINJI* oligomerleşmesini engelleyerek hücre zarı parçalanmasını baskıladığını göstermektedir (Borges ve ark., 2022).

Mevcut bulgular, glisinin koruyucu etkisinin sabit bir süreyle sınırlı olmadığını; aksine hücre tipi, maruz kalınan inflamatuvar uyarının niteliği ve deneysel koşullara bağlı olarak değişkenlik gösterdiğini düşündürmektedir.

İn vitro çalışmalar, glisinin hücre zarı bütünlüğünü dakikalar ile birkaç saat arasında koruyabildiğini ortaya koymakla birlikte, inflamatuvar sinyalleme sürecinin devam ettiği durumlarda bu etkinin zamanla azaldığını göstermektedir (Wheeler ve ark., 1999). Nitekim inflamazom aktivitesinin sürdüğü koşullarda, gecikmeli de olsa hücre zarı bütünlüğünün kaybının kaçınılmaz olduğu bildirilmektedir (Borges ve ark., 2022; Evavold ve Kagan, 2018).

Öte yandan, glisinin sitoprotektif etkisinin geri dönüşümlü nitelikte olduğu ve hücrel stresin ortadan kalkmasıyla birlikte daha belirgin hale geldiği ifade edilmektedir. Bu etkinin büyük ölçüde membran stabilizasyonunun sağlanması ve iyon dengesinin korunması ile ilişkili olduğu, ancak doğrudan inflamazom aktivitesini baskılamadığı

vurgulanmaktadır. Bu çerçevede glisin, pirototik hücre ölümünü tamamen ortadan kaldıran bir ajan olmaktan ziyade, hücre hasarını geciktiren ve inflamatuvar yanıtın şiddetini sınırlayan bir düzenleyici olarak değerlendirilmektedir (Wheeler ve ark., 1999; Borges ve ark., 2022).

2.12. Glisin, NINJ1 Aracılı Membran Yırtılmasını Engeller

Borges ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan çığır açıcı bir çalışma, glisinin piroptoz sonrasındaki sitoproteksiyon mekanizmasını açıklığa kavuşturmuştur. Glisinin, önceki moleküler olaylardan/süreçlerden ziyade, nihai hücre zarı yırtılması aracısı olan *NINJ1*'e etki ettiğini göstermişlerdir (Borges ve ark., 2022). Bu çalışmada, inflamazom aktivasyonu geçiren makrofajlara glisin eklenmesinin kaspaz-1 aktivitesi veya GSDMD por oluşumu üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır; ancak, LDH salınımı ile ölçülen hücre lizisini (hücre zarı parçalanmasını) önemli ölçüde azaltmıştır (Broz, 2025).

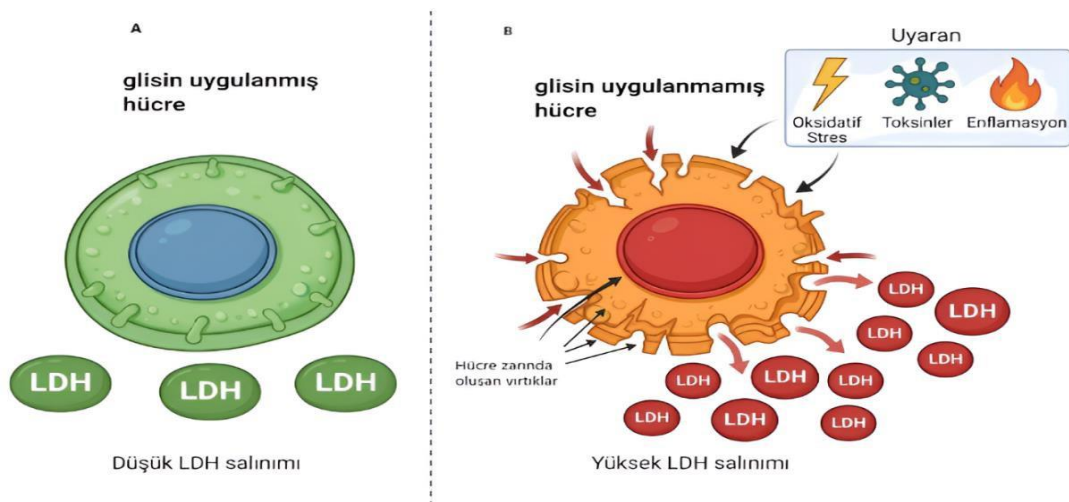
NINJ1'in genetik olarak silinmesi (*NINJ1*-KO; *NINJ1*-knockout) aynı fenotipi üretmiştir; hücreler hâlâ GSDMD porları oluşturmuş ve küçük boyalara geçirgen hâle gelmiştir; ancak, bu hücrelerde hücre lizisine bağlı LDH salınımı meydana gelmemiştir (Borges ve ark., 2022; Broz, 2025). Bu çalışma, *NINJ1*'in glisinin hedefi olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koymuştur. Daha ileri görüntülemeler, normalde *NINJ1*'in geç piroptoz sırasında plazma membranında büyük noktalar ve filamentler hâlinde kümелendiğini göstermiştir; glisin uygulamasının ise bu *NINJ1* kümelerinin oluşmasını engellediği gözlenmiştir (Borges ve ark., 2022). Glisin ile *NINJ1* arasındaki doğrudan biyokimyasal etkileşim henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, glisinin *NINJ1*'e bağlanarak ya da hücre zarının fiziksel özelliklerini değiştirerek bu proteini işlevsel olarak baskıladığı düşünülmektedir. Bu etki sonucunda *NINJ1* inaktif bir durumda tutulur. Dolayısıyla glisin uygulanan hücrelerde ozmotik şişme gözlenirse de hücre zarı bütünlüğü korunur ve piroptozun litik fazı ilerleyemez (Broz, 2025).

Bu bağlamda glisinin etkisi, inflamazom aracılı sinyallerden bağımsız olarak hücre zarı yırtılmasını engellemeye yöneliktir. Glisin varlığında, IL-1 β gibi küçük moleküllü sitokinler gasdermin porları aracılığıyla hücre dışına salınabilirken, büyük boyutlu DAMP'ler ve sitozolik enzimlerin salınımı gerçekleşmez. Sonuç olarak hücreler fonksiyonel olarak canlı olmasalar bile lizis meydana gelmez. Bu durum, doku bütünlüğünün korunmasına katkı sağlarken inflamatuvar hasarın da sınırlandırılmasına yardımcı olur (Borges ve ark., 2022).

2.13. Granüloza Hücrelerinde Glisinin Önerilen Sitoprotektif Rolü

Glisinin, NINJ1'i inhibe ederek hücreleri piroptotik lizise karşı koruyabileceği öne sürülen bir mekanizma olarak dikkat çekmektedir. Piroptozun klasik uyarıcıları olan LPS veya nigerisin ile uyarılan hücrelerde, NLRP3 inflamazomu aktive olmakta; bunu takiben kaspaz-1 aktivasyonu ve GSDMD başta olmak üzere GSDM ailesi proteinlerinin por oluşturuçu aktivitesi gerçekleşmektedir (Vajjhala ve ark., 2012).

GSDM porlarının oluşumu ile birlikte hücre içine su girişi artmakta ve hücrelerde ozmotik şişme meydana gelmektedir. Bu sürecin ilerleyen aşamasında, plazma membranı yırtılması genellikle NINJ1 aracılığıyla gerçekleşmektedir. Ancak, hücre dışı ortama eklenen ekzojen glisinin, NINJ1 oligomerizasyonunu inhibe ederek bu son aşamayı kısmen baskılayabildiği bildirilmektedir (Borges ve ark., 2022; Broz, 2025). Bu durumda, inflamazom aktivasyonu ve GSDM aracılı por oluşumu devam etmesine rağmen, hücre zarı yırtılması geciktirilebilmekte veya sınırlandırılabilir. Böylece hücreler fonksiyonel olarak kayıp yaşamış olsalar dahi, belirli bir süre boyunca yapısal bütünlüklerini koruyabilmektedir. Bu mekanizmanın fonksiyonel bir sonucu olarak, glisin uygulanan hücrelerde kontrol gruplarına kıyasla daha düşük LDH salınımı ve daha iyi korunmuş membran bütünlüğü gözlenmesi beklenmektedir. Buna karşın, IL-1 β ve IL-18 gibi proinflamatuvar sitokinlerin salınımı GSDM porları aracılığıyla devam edebilmekte; bu durum hücre lizisi gerçekleşmeden sınırlı bir immün sinyal iletimine olanak tanımaktadır (Borges ve ark., 2022).



Şekil 2.4. Glisinin granüloza hücreleri üzerindeki sitoprotektif etkisi.

Bu figür, BioRender uygulaması kullanılarak çizilmiştir.

Şekil 2.4 A'da glisin uygulanan hücrelerde, çeşitli uyaranlara rağmen zar bütünlüğünün korunduğu ve hücre dışı ortama düşük düzeyde LDH salınımı olduğu görülmektedir. Şekil 2.4 B'de glisin uygulanmamış kontrol grubunda ise oksidatif stres, toksinler ve enflamasyon gibi uyaranlar neticesinde hücre zarında yırtıklar oluşmakta; bu durum hücresel içeriğin dışarı sızmasına ve yüksek düzeyde LDH salınımına yol açarak litik hücre ölümünü karakterize etmektedir.

Yumurtalık bağlamında, granüloza hücrelerinde membran/hücre zarı bütünlüğünün korunmasının birçok klinik faydası olabilir. İlk olarak, membran bütünlüğünü koruyan granüloza hücreleri, metabolik aktivitelerini kaybetmiş olsalar dahi foliküler mimarinin sürdürülmesine katkıda bulunabilir ve böylece folikül bütünlüğünün ani yapısal çöküşünü geciktirebilir. İkinci olarak, hücre içeriğinin ekstrasellüler ortama kontrolsüz biçimde salınmasının sınırlandırılması, komşu foliküllerde inflamatuvar yanıtı tetikleyebilecek DAMP'ler yayılımını azaltabilir. Dolayısıyla litik hücre ölümü sırasında plazma membranının yırtılması, inflamatuvar içeriklerin salınımının temel belirleyicisidir (Kayagaki ve ark., 2021). Nitekim, *NINJI*'in hücre zarı yırtılmasının aktif bir aracısı olduğu gösterilmiş ve bu sürecin piroptoz, nekroz ve post-apoptotik lizis sırasında inflamatuvar yanıtı şekillendirdiği ortaya konmuştur (Kayagaki ve ark., 2021). Bunun yanı sıra, glisinin hücre şişmesi ve membran permeabilizasyonu (hücre zarı geçirgenliğini artışı) sırasında sitoprotektif etki gösterebildiği ve membran bütünlüğünü geçici olarak stabilize edebildiği uzun süredir bilinmektedir (Weinberg ve ark., 1987). Bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, glisinin, *NINJI*-aracılı hücre zarı yırtılması kinetiğini modüle ederek granüloza hücrelerinde litik hücre ölümünü ve inflamatuvar yayılımı sınırlandırabileceği düşünülmektedir.

Granüloza hücreleri üzerinde bu bağlamda doğrudan çalışmalar henüz mevcut olmasa da glisinin *NINJI* oligomerleşmesi üzerindeki etki mekanizmasının genelliği makrofajlarda, fibroblastlarda, endotel hücrelerinde vb. gösterilmiştir; bu durum, bunun granüloza hücreleri için de geçerli olması gerektiğini düşündürmektedir (Borges ve ark., 2022).

2.14. Prostaglandin E₂

Prostaglandin E₂ (PGE₂), yumurtalık granüloza hücreleri tarafından sentezlenen biyolojik olarak aktif bir lipid aracıdır ve foliküler büyüme, kümülüs genişlemesi ile ovülasyon süreçlerindeki temel düzenleyici rolleri nedeniyle kapsamlı biçimde karakterize edilmiştir (Richards ve ark., 2002). İnsan granüloza hücre hattı KGN'de, PGE₂ üretimi esas olarak;

gonadotropin (Gonadları uyaran hormon) uyarımı, oksidatif stres ve proinflatuar sitokinlere yanıt olarak yukarı regüle edilen siklooksijenazın indüklenabilir izoformu olan COX-2 (siklooksijenaz-2) tarafından kontrol edilir (Shimada ve ark., 2006). COX-2, araşidonik asidin prostaglandin H₂'ye dönüşümünde hız sınırlayıcı basamağı katalizler; oluşan prostaglandin H₂ ise daha sonra PGE sentazlar aracılığıyla PGE₂'ye dönüştürülür (Smith ve ark., 1996). COX-2/PGE₂ ekseninin bu indüksiyonu, yumurtalıklardaki endokrin ve immün sinyal yolları arasındaki sıkı koordineli etkileşimi yansıtan perioovulatuvar (ovülasyon çevresi dönemi) inflamatuvar ortamın ayırt edici bir özelliğidir (Richards ve ark., 2002; Espey, 1994). Bu bağlamda, COX-2/PGE₂ ekseninin aktive edilmesi, granüloza hücrelerinde inflamatuvar yanıtın ve programlanmış hücre ölümü mekanizmalarının, özellikle piroptozun, perioovulatuvar inflamasyonun şekillenmesinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Ortaya çıkan kanıtlar, özellikle piroptoz olmak üzere, düzenlenmiş inflamatuvar hücre ölümü biçimlerinin, stres veya hasar koşulları altında granüloza hücrelerinden inflamatuvar medyatörlerin salınımını etkileyebileceğini düşündürmektedir (Shi ve ark., 2017). Piroptoz, inflamozom aktivasyonu ve kaspaz-1 parçalanmasıyla başlatılır ve plazma zarında GSDMD aracılı por oluşumuna, hızlı hücre şişmesine ve nihayetinde lizise yol açar (Bergsbaken ve ark., 2009; Shi ve ark., 2017). Bu süreçte, IL-1 β gibi sitokinler, PGE₂ gibi lipid araçları ve DAMP'ler dahil olmak üzere sitoplazmik içerikler hücre dışı alana salınabilir ve böylece yerel inflamatuvar sinyalleşmeyi güçlendirebilir (Frank ve Vince, 2019). Granüloza hücre modellerinde, oksidatif veya inflamatuvar stresi taklit eden bozulmaların COX-2 ekspresyonunu ve PGE₂ salınımını artırdığı gösterilmiştir; bu da kısmen geleneksel inflamatuvar sinyalleşmeye ek olarak piroptotik hücre ölümü mekanizmalarının aktivasyonunu yansıtabilir.

Özetle, granüloza hücrelerindeki PGE₂ seviyelerindeki değişiklikler çok faktörlüdür ve hem geleneksel inflamatuvar aktivasyonun hem de potansiyel olarak piroptozla ilişkili membran bozulmasının bir göstergesi olarak hizmet edebilir. İnflamasyon sinyalinin COX-2'ye bağlı prostaglandin senteziyle nasıl etkileşim kurduğunu anlamak, inflamasyonun yumurtlama süreçlerini ve folikül kaderini nasıl etkilediğine dair mekanizmaları belirlemek için önemli olacaktır.

2.15. PKOS, Glisin Eksikliği ve Granüloza Hücresinin Yaşamı

PKOS hastalarında yapılan metabolik çalışmalar, dolaşımdaki glisin seviyelerinin

anormal derecede düşük olduğunu tekrar tekrar göstermiştir (Menni ve ark., 2013). Metabolomik profillemeye çalışmaları, PKOS'ta kan (serum/plazma), foliküler sıvı, idrar ve bazı çalışmalarda granüloza hücreleri gibi örneklerde glisin azaldığını, buna karşılık birçok amino asidin seviyesinin arttığını göstermektedir (Ye ve ark., 2022). PKOS'ta azalan glisin, insülin direnciyle ilişkilidir ve hatta gelecekteki diyabet riskini öngörebilir (Ye ve ark., 2022). Glisin tükenmesinin nedenleri belirsizdir; ancak PKOS'taki kronik inflamasyon ve değişmiş hepatik metabolizma, glisin depolarının tükenmesine yol açabilir; çünkü glisin, glukoneogenez ve glutatyon döngüsünde kullanılır (Wu, 2009; Lu, 2013; Navarro ve ark., 2015). Daha da önemlisi, PKOS hastalarında sistemik (kan dolaşımındaki) glisin daha düşükse, yumurtalık granüloza hücreleri glisinin koruyucu faydasından mahrum kalabilir.

In vitro olarak, sitoproteksiyon sağlamak için normal plazma seviyelerinin çok üzerinde (milimolar) glisin takviyesi gereklidir. Bu nedenle, göreceli bir glisin eksikliği, PKOS hastalarının yumurtalıklarında endojen *NINJI* inhibisyonunu sınırlayabilir. Glisinin litik hücre ölümünde membran stabilizasyonu sağladığı ve plazma hücre zarı yırtılmasını azalttığı yukarıda da bahsedildiği gibi önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Weinberg ve ark., 2016). *NINJI*'in ise inflamatuvar hücre ölümünde plazma hücre zarı yırtılmasının aktif bir yürütücüsü olduğu ortaya konmuştur (Kayagaki ve ark., 2021). Bu bağlamda, düşük glisin düzeylerinin, *NINJI* üzerindeki fonksiyonel baskıyı azaltarak piroptoz veya ferroptoz tetiklendiğinde (ya da nekroptoz dışında diğer hücre ölüm şekilleri uyarıldığında) granüloza hücrelerinin membranlarının yırtılmasına yatkınlığı artırabileceği hipotezi öne sürülebilir (Evavold ve ark., 2018). Diğer bir deyişle, düşük glisin seviyeleri, granüloza hücrelerinde *NINJI*-aracılı hücre zarı parçalanmasına karşı hücrelerin sensitivitesini arttırabilir ve de sonuç olarak bu hücrelerin litik olarak ölümlerini tetikleyebilir. Bunu destekleyen bir bulgu olarak, PKOS'ta granüloza hücresi ölümü, daha çok litik hücre ölüm mekanizmalarını aracılığı ile gerçekleşiyor gibi görünmektedir. PKOS modeli farelerin yumurtalıklarında, granüloza hücreleri düzgün apoptotik cisimler yerine yaygın zar yırtılması ve piroptotik kalıntılar göstermektedir (Shen ve ark., 2023; Amisi, 2022; Rashid ve ark., 2022; Li ve ark., 2023; Jiang ve ark., 2025). Dolayısıyla bu hücrelerin litik olarak öldüklerini (hücre zarlarının yırtıldığını) göstermektedir (Shen ve ark., 2023; Amisi, 2022; Rashid ve ark., 2022; Li ve ark., 2023; Jiang ve ark., 2025). PKOS'ta glisin uygulanmasının etkililiğine dair doğrudan bir kanıt bulunmamakla birlikte, bu bulgular potansiyel bir faydayı düşündürmektedir. Teorik olarak (hipotetik olarak), diyetteki glisin veya serin gibi öncüller aracılığıyla glisin

seviyelerini yükselterek granüloza hücre lizisini azaltmak mümkün olabilir. Nitekim, piroptoz modellerinde deneysel glisin uygulaması, hücre bütünlüğünü koruyarak birden fazla organı koruyabilmektedir (Borges ve ark., 2022). Özetle, PKOS hastalarının yumurtalıklarında düşük glisin ve yüksek inflamasyon aktivitesinin kesişimi, bu hastalıkta litik granüloza hücresi ölümünü desteklemektedir. Sonuç olarak, glisin takviyesi (ya da granüloza hücrelerinin maruz kaldığı glisin konsantrasyonlarının artışı) bu etkileşimi yeniden dengeleyebilir. Örneğin, foliküler sıvıdaki glisin konsantrasyonlarının artışı (örn. klinikte uygulanma ile artırılması), PKOS hastalarında yumurtalık granüloza hücrelerinin litik olarak ölümünü baskılayıcı (*NINJI* oligomerleşmesini engelleyerek) bir etki yaratabilir.

PKOS'ta, yumurtalık granüloza hücreleri, çeşitli hücre ölümü mekanizmalarını aktive eden çoklu stres faktörlerine; yani hormonal, metabolik ve inflamatuvar etkilere maruz kalırlar (Azziz ve ark., 2016; Dumesic ve ark., 2015; Escobar-Morreale, 2018; Xiong ve ark., 2011). İyi bilinen bir hücre ölüm şekli olan apoptoza ek olarak hem piroptoz hem de ferroptoz, PKOS'ta granüloza hücrelerinin kaybına önemli katkıda bulunan faktörler/hücre ölüm şekilleri olarak tanımlanmıştır (Cai ve ark., 2022). Kritik olarak, bu inflamatuvar ölüm modları, *NINJI*-aracılı membran yırtılmasıyla sonuçlanabilir, hücre içi (intraseküler) içeriğin hücre dışına sızmasına ve yumurtalık inflamasyon şiddetlenmesine yol açabilir. Glisin, bu son hücre zarı yırtılma aşamasını spesifik olarak hedef alan (*NINJI* oligomerleşmesini baskılayarak) bir sitoprotektan olarak ortaya çıkmıştır (Borges ve ark., 2022). Bu nedenle, glisin, hipotetik olarak, inflamasyon aktivasyonundan sonra bile *NINJI* oligomerizasyonunu bloke ederek ve böylece hücre lizisini önleyerek granüloza hücrelerinin canlılığını koruyabilir.

Birçok litik hücre ölümü mekanizmasının paylaştığı önemli bir moleküler olay, yakın zamanda transmembran protein *NINJI* atfedilen plazma zarının yırtılmasıdır (Kayagaki et al., 2021). *NINJI*'in piroptoz, ferroptoz ve diğer inflamatuvar düzenlenmiş hücre ölümü biçimlerinde (nekroptoz dışında) terminal hücre zarı yırtılmasını gerçekleştirdiği gösterilmiştir; ancak, bu protein MLKL-bağımlı nekroptozda gereksiz görünmektedir. Bu görünürdeki tutarsızlık, Noh ve ark. (2026) tarafından yapılan ve SIGLEC12'yi özellikle insan hücrelerinin nekroptozunda plazma zarı yırtılmasının daha önce bilinmeyen bir aracısı olarak tanımlayan yakın tarihli bir çalışma ile çözülmüştür. Bu çalışmada, SIGLEC12'nin genetik olarak silinmesi, MLKL aracılığıyla gerçekleşen nekroptotik hücre şişmesini ve plazma membranı hasarını engellerken, organel membranları veya

piroptotik/ferroptotik lizis üzerinde bir etkisi gözlenmemiştir; bu bulgu, SIGLEC12'nin nekroptotik hücre ölümü mekanizmasında spesifik olarak plazma membranı düzeyinde işlev gördüğünü göstermektedir (Noh ve ark., 2026). Bu bulgular, farklı litik hücre ölümü yöntemlerinin, tek bir evrensel aracı protein ile gerçekleşmektense, nihai membran parçalanmasını sağlamak için özel moleküler mekanizmalar kullandığını (farklı hücre zarı parçalayıcı proteinlerin farklı durumlarda fonksiyon üstlendiğini) düşündürmektedir. PKOS bağlamında, granüloza hücrelerinin kaybı/ölümü, *NINJ1* veya SIGLEC12 gibi farklı plazma membranı yırtılma efektörlerini kullanan birden fazla düzenlenmiş hücre ölümü mekanizması tarafından gerçekleştirilebilir. Bu mekanizmalar, bir kısmını telafi ederek birlikte yumurtalık disfonksiyonuna katkıda bulunabilirler, ancak her biri diğerinin yaptığı her şeyi yapamaz (Noh ve ark., 2026). PKOS patogeneğinde granüloza hücre kaybının altında yatan hücre ölümü mekanizmalarının ve bu süreçte rol alan özgül membran yırtılma efektörlerinin daha iyi anlaşılması, hastalığın moleküler temellerini aydınlatmak ve hedefe yönelik tedavi stratejileri geliştirmek açısından kritik önem taşımaktadır.

Bu çalışmada, glisin'in granüloza hücrelerinde nigerisin ile tetiklenen piroptoz sonrası gerçekleşen *NINJ1*-aracılı hücre zarı parçalanmasına karşı bir koruma sağlayıp sağlamadığının ortaya konması amaçlanmaktadır. Böylece, glisin'in, hem granüloza hücre ölümünü azaltmadaki rolü hem de aşırı inflamasyonu baskılamadaki potansiyelinin belirlenmesi hedeflenmektedir.

Granüloza hücrelerinin piroptotik ölümü PKOS gibi birçok endokrin hastalıkta gözlemlenmektedir (Cai ve ark., 2022; Li ve ark., 2025; Xiang ve ark., 2023). Örneğin, PKOS'ta yaygın bir şekilde kronik inflamasyon gözlemlenmektedir (Deng ve ark., 2024). Bu kronik inflamasyon artışına, granüloza hücrelerinin *NINJ1*-aracılı litik ölümleri katkı sağlıyor olabilir. Bu nedenlerle, granüloza hücrelerinin *NINJ1*-aracılı litik ölümlerinin engellenmesi PKOS gibi çeşitli hastalıklarda gözlemlenen kronik inflamasyonu engellenmeye yarayabilir. Böylece, PKOS patogeneğinde kritik rolü olan kronik inflamasyonun baskılanması ya da ortadan kaldırılmasıyla PKOS'ta klinikte tedavinin başarısı arttırılabilir. Bu çalışmanın amaçlarından bir diğeri de kronik inflamasyonun gözlemlendiği ve de granüloza hücrelerinin piroptotik ve litik hücre ölümünün katkı sağladığı PKOS gibi hastalıkların tedavisinde glisin'in potansiyelinin test edilmesidir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Araştırma Materyali

Derin dondurucu (VWR Symphony),

Buzdolabı (Vestel),

Çalkalamalı inkübatör (Labart Hassas

Terazi (Radwag),

İnkübatör (Memmert),

Otoklav (Hirayama),

Otomatik pipetler (Eppendorf),

Ultra saf su cihazı (Minipure),

Santrifüj (Hettich Universal),

Steril laminar flow kabin (Thermo Fisher Scientific),

Multiskan GO, (Thermo Scientific)

3.2.Hücre Kültürü

Deneylerimizde, insan over granüloza hücre tümöründen derive edilmiş olan KGN hücre hattı (Cellosaurus: CVCL_0375) kullanılmıştır. Steroidojenik fonksiyonlarını koruma ve FSH reseptörü eksprese etme özellikleriyle bilinen bu hücreler, sertifikalı bir tedarikçiden (Sigma-Aldrich) temin edilmiştir. Stok hücreler, uzun süreli koruma amacıyla üretici talimatları doğrultusunda -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.2.1. Medya ve Kültür Parametreleri;

Hücreler, aşağıda detayları belirtilen tam besiyeri kullanılarak kültüre edilmiştir:

Temel Medya: DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Gibco).

Serum: %10 Fetal Bovine Serum (FBS, Sigma-Aldrich).

Hücrelerin büyümesi, 37,0°C sıcaklıkta ve %5 CO₂ içeren nemli bir inkübatör atmosferinde sağlanmıştır. Deneylerin tekrarlanabilirliğini ve hücre fenotipinin korunmasını garanti altına almak adına, sadece düşük pasaj sayısına sahip (P3-P8 arası) hücreler kullanılmış; hücreler mikoplazma ve diğer kontaminasyon risklerine karşı düzenli olarak mikroskopik incelemeye tabi tutulmuştur.

3.2.2. Plaka Ekim'i ve Deney Öncesi Hazırlık

Hücreler, deney protokolüne uygun olarak 6 kuyucuklu plakalara (6-well plates) her bir kuyucukta yaklaşık 3×10^5 hücre bulunacak şekilde homojen bir yoğunlukta ekilmiştir. Hücrelerin yüzeye tam olarak yapışması ve logaritmik büyüme fazına geçmesi için %90 yoğunluk seviyesine ulaşana dek bir gece boyunca (yaklaşık 16-18 saat) inkübe edilmiştir. Bu sürenin sonunda hücreler, hedeflenen deneysel manipülasyonlar için hazır hale gelmiştir.

3.3.Reaktiflerin Hazırlanması

Koruyucu ajan olarak kullanılan Glisin, steril hücre kültürü sınıfı saf su içerisinde çözülerek 50 mM ana stok çözeltisi şeklinde hazırlandı. Deney gruplarında, glisinin membran stabilize edici ve sitoprotektif etkilerinden yararlanmak amacıyla literatürle uyumlu olacak şekilde 2 µM konsantrasyonda uygulama yapıldı (Wheeler ve ark., 1999).

Nigerisin ve İnflamazom İndüksiyonu; NLRP3 inflamazom aktivasyonunu ve piroptotik süreçleri tetiklemek amacıyla bir potasyum iyonoforu olan Nigerisin kullanıldı. Nigerisin, susuz DMSO (dimetil sülfoksit) içerisinde çözülerek 5 mM konsantrasyonda stoklandı ve -20°C'de muhafaza edildi. Hücelere uygulama aşamasında, stok çözelti çözündürülerek 2 µM konsantrasyonda uygulama yapıldı (Broz ve Dixit, 2016).

Kontrol grubuna Nigerisin uygulanan kuyucuklardaki ile eş değer hacimde DMSO ilave edildi. Bu oran, hücre canlılığı üzerinde toksik etkisi olmayan ve literatürde standart kabul edilen bir eşik değerdir.

3.4.Deney Protokolü

Bu çalışmada, Nigerisin kaynaklı piroptotik strese maruz bırakılan KGN hücreleri üzerinde glisinin sitoprotektif etkileri incelenmiştir. Deneyler, 96 kuyucuklu plak formatında, her grup üç tekrarlı (triplicate) olacak şekilde dört ana grup altında deneysel uygulama yapılmıştır:

Grup A (Kontrol): Sadece DMSO (çözücü kontrolü).

Grup B (Glisin): Sadece Glisin uygulaması (bazal etkilerin gözlemi).

Grup C (Nigerisin): Sadece Nigerisin uygulaması (piroptoz indüksiyonu).

Grup D (Glisin + Nigerisin): Glisin ön uygulaması sonrası Nigerisin maruziyeti (koruyucu etkinin değerlendirilmesi).

Deneyssel takvim ve uygulama sırası, Nigerisin tetiklemeli NLRP3 inflamazom aktivasyonu ve PGE2 salınımı üzerine kurulu yerleşik modellerden uyarlanmıştır (Evavold ve Kagan, 2019; Shi ve ark., 2015).

3.5.Uygulama Takvimi

1. Gün: Hücre ekimi KGN hücreleri, 96 kuyucuklu plakalara ekilerek bir gecelik inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin yüzeye tam yapışması ve deneyssel manipülasyon için uygun konfluense ulaşması sağlandı.

2. Gün: Glisin ön uygulaması ile belirlenen gruplara (Grup B ve D), hücre zarı stabilitesini artırmak ve sitoproteksiyon sağlamak amacıyla 2 µM final konsantrasyonda Glisin eklendi. Bu ön koşullandırma adımı ile glisinin, hücre zarı bütünlüğünü koruma ve PGE2 salınımını baskılama potansiyeli test edildi.

3. Gün: Nigerisin indüksiyonu ve örnek toplama yaklaşık 23 saatlik glisin uygulamasının ardından, ilgili gruplara (Grup C ve D) piroptozu indüklemek amacıyla 2 µM konsantrasyonda Nigerisin ilave edildi. Nigerisin uygulamasından bir saat sonra, her bir kuyucuktan alınan hücre kültürü süpernatantları (medya) dikkatlice toplandı. Toplanan bu örnekler, sitokin ve biyobelirteç stabilitesini korumak amacıyla ELISA analizlerine kadar -20°C'de muhafaza edildi.

4. Gün: PGE₂ ELISA Analizi Dondurulmuş süpernatantlar oda sıcaklığında çözöldü ve PGE₂ seviyeleri ELISA kiti (Cayman Chemical Human PGE₂ Express Kit) kullanılarak analiz edildi. Örnekler, üreticinin protokolüne uygun olarak herhangi bir ek saflaştırma işlemi gerektirmeden doğrudan ölçöldü. Çözölen süpernatantlar ELISA tamponu ile uygun oranlarda seyreltildi ve paralel olarak çalışılan standart eğri üzerinden değeriendirildi. Plaka okuyucuda 450 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerieleri kullanılarak, PGE₂ konsantrasyonları (pg/mL) hesaplandı.

3.6.SDS-PAGE Jel Hazırlama

Protein ayrımı, denatüre edici sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) kullanılarak gerçekleştirildi. Poliakrilamid ayırıcı jeller, dikey bir elektroforez odasında ara parçalarla birleştirilmiş cam plakalar arasına, son akrilamid konsantrasyonu %15 olacak şekilde elle dökülerek, boyut bazlı protein ayrımı için uygun çapraz bağlı bir jel matrisi oluşturuldu. Ayırıcı matrise girmeden önce proteinleri yoğunlaştırmak için ayırıcı jelin üzerine %5'lik bir istifleme jeli tabakası yerleştirildi. Jel çözeltileri; %30 akrilamid/bis-akrilamid, Tris-HCl tamponu (ayırıcı jel için 1,5 M; istifleme jeli için 0,5 M), SDS, amonyum persülfat (APS) ve TEMED'in deiyonize su ile karıştırılmasıyla hazırlandı; polimerizasyonu başlatmak için TEMED en son eklendi. Ayırıcı jel, düz bir yüzey sağlamak için izopropanol ile kaplandı ve jelin sertleşmesi için 20-30 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Sertleşince izopropanol alkol döküldü ve istifleme jeli eklendi. Numune kuyucuklarını oluşturmak için hemen taraklar yerleştirildi ve elektroforezden önce istifleme jelinin sertleşmesine izin verildi (~20-30 dakika).

3.6.1. Örnek Hazırlama ve Elektroforez Koşulları

Protein numuneleri; gliserol, bromofenol mavisi izleme boyası, Tris-HCl, SDS ve indirgeyici madde içeren eşit hacimde SDS-PAGE yükleme tamponu ile karıştırıldı, ardından 95 °C'de 5 dakika ısıtılarak denatüre edildi ve kısa bir santrifüj işlemi uygulandı. Numuneler, moleküler ağırlık belirteçleriyle birlikte jel kuyucuklarına yüklendi. Elektroforez, izleme boyası çözücü jelden yeterince geçene kadar sabit bir elektrik alanı altında 1× çalışma tamponunda (25 mM Tris, 200 mM glisin, %0,1 SDS) gerçekleştirildi.

3.6.2. Elektroforez Sonrası Görselleştirme

Elektroforezden sonra, ayrılmış protein bantlarını görselleştirmek için jeller Coomassie Brilliant Blue R-250 ile boyandı. Jeller metanol/asetik asit çözeltisinde sabitlendi, birkaç saat boyandı ve daha sonra net protein bantları net bir arka plana karşı görünene kadar etanol/asetik asit çözeltisinde renk giderildi bu işlem bantlar daha net görünene kadar tekrar edildi. Jeller daha sonra gerektiği gibi fotoğraflandı veya saklandı.

3.7. PGE₂ Salınımının Analizi (ELISA)

KGN hücre kültürü süpernatantlarındaki Prostaglandin E₂ (PGE₂) konsantrasyonları, üretici firma talimatlarına uygun olarak ticari bir ELISA kiti (Cayman Chemical)

kullanılarak Sandwich ELISA yöntemi ile belirlenmiştir. Analiz süreci, deneysel güvenilirliği sağlamak amacıyla standart protokol izlenerek gerçekleştirilmiştir.

3.7.1. Örnek Hazırlığı ve Ön İşlemler:

Analiz öncesinde -20°C’de saklanan hücre kültürü süpernatantları oda sıcaklığında çözündürülmüştür. Olası hücre kalıntılarının uzaklaştırılması amacıyla örnekler 10.000 × g’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Kit içerisinde bulunan standart çözeltiler ve reaktifler analiz öncesinde oda sıcaklığına getirilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.7.2. Plaka Ekim’i ve İnkübasyon:

Deney için 96 kuyucuklu mikrolaka düzeni oluşturulmuş ve her deney grubu için uygun kuyucuklar belirlenmiştir. Standart kuyucuklarına 50 µL standart çözelti, numune kuyucuklarına ise 40 µL hücre süpernatantı eklenmiştir. Numune kuyucuklarına ayrıca 10 µL spesifik antikor ilave edilmiştir. Ardından tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 µL Streptavidin-HRP eklenmiş ve plaka 37°C’de 60 dakika inkübasyona kondu. Bu süreçte antijen-antikor bağlanmasının gerçekleşmesi sağlanmıştır.

Numune kuyucuklarına ayrıca 10 µL spesifik antikor ilave edilmiştir. Ardından tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 µL Streptavidin-HRP eklenmiş ve plaka 37°C’de 60 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu süreçte antijen-antikor bağlanmasının gerçekleşmesi sağlanmıştır.

3.7.3. Yıkama İşlemi:

İnkübasyon sonrasında kuyucuklardaki sıvı boşaltılmış ve bağlanmamış bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla her kuyucuk 300 µL yıkama tamponu ile 5 kez yıkanmıştır. Her yıkama adımında tamponun kuyucuklarda yaklaşık 30–60 saniye beklemesine dikkat edilmiş ve son yıkamanın ardından plaka kurulanmıştır.

3.7.4. Renk Gelişimi ve Reaksiyonun Durdurulması:

Enzimatik reaksiyonun gerçekleştirilmesi için her kuyucuğa sırasıyla 50 µL Substrat A ve 50 µL Substrat B eklenmiştir. Plaka 37°C’de karanlık ortamda 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda reaksiyonun durdurulması amacıyla her kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenmiş ve oluşan mavi renk sarıya dönüştürülmüştür.

3.7.5. Okuma ve Veri Analizi:

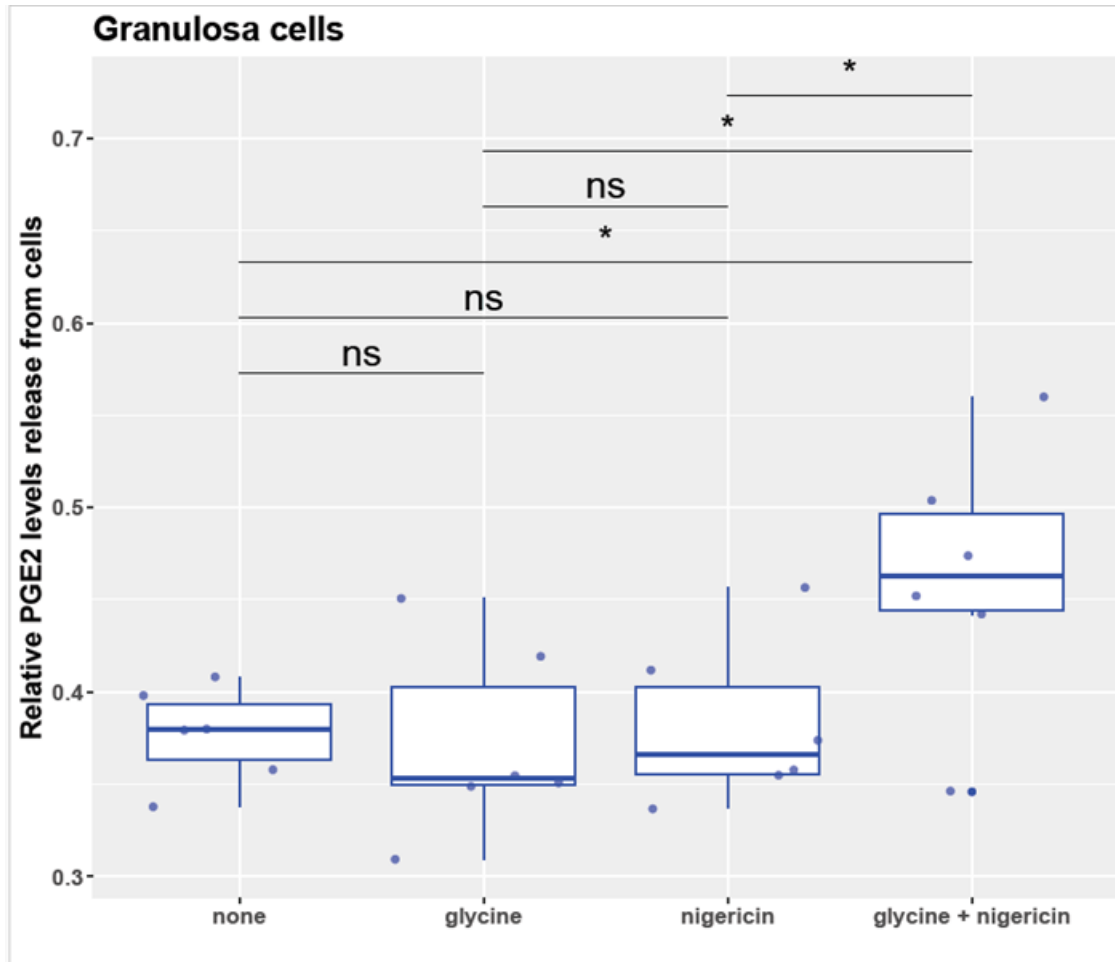
Stop solüsyonu eklendikten sonraki 10 dakika içerisinde mikropłaka okuyucu kullanarak 450 nm dalga boyunda optik yoğunluk (OD) değeri ölçülmüştür. Elde edilen OD değeri standart eğri kullanarak hesaplanmış ve PGE₂ konsantrasyonları pg/mL cinsinden belirlenmiştir.



4. SONUÇLAR

4.1. Piroptoz'un Uyarıldığı Granüloza Hücrelerinde, Glisin Uygulaması Sonrası Hücre Zarı Parçalanmasının ve Hücre Dışına PGE₂ Salınımının Ölçülmesi ile Analizi

PGE₂ tipik olarak plazma zarı geçirgen hale geldiğinde veya zarda porlar oluştuğunda salındığı için tedavilerin zar bütünlüğünü etkilemesi ve dolayısıyla PGE₂ salınımını değiştirmesi bekleniyordu.



Şekil 4.1. Granüloza hücrelerinde farklı uygulama gruplarına bağlı olarak hücrelerden salınan relatif PGE₂ düzeylerinin karşılaştırılması.

KGN hücre hattında farklı deneysel gruplar arasında gerçekleştirilen PGE₂ salınım analizi sonuçları, glisin ve nigerisin uygulamalarının lipid aracılığı üzerindeki etkilerini ortaya koymuştur (Şekil 4.1).

Kontrol ve Tekli Uygulama Gruplarının Karşılaştırılması: Sadece DMSO uygulanan

kontrol grubu ile kıyaslandığında, tek başına Glisin veya tek başına Nigerisin uygulanan granüloza hücrelerinde hücre dışı PGE₂ salınımında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim saptanmamıştır (* p > 0.05). Bu durum, belirtilen dozlarda her iki ajanın da bazal PGE₂ seviyelerini tek başlarına deklere edilecek düzeyde etkilemediğini göstermektedir.

Kombine Uygulamanın Etkisi: Buna karşın, DMSO kontrol grubuna göre, Glisin ve Nigerisin'in birlikte uygulandığı (Grup D) hücrelerde PGE₂ salınımının kayda değer miktarda arttığı gözlenmiştir (Şekil 4.1, * p < 0.05).

Glisin Ön Uygulamasının Karşılaştırmalı Analizi: Sadece Glisin uygulanan grup ile Glisin+Nigerisin uygulanan grup kıyaslandığında, kombine grupta PGE₂ seviyelerinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (* p < 0.05). Benzer şekilde, sadece Nigerisin uygulanan hücrelere kıyasla, Glisin+Nigerisin grubunda PGE₂ salınımında istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenmiştir (* p < 0.05).

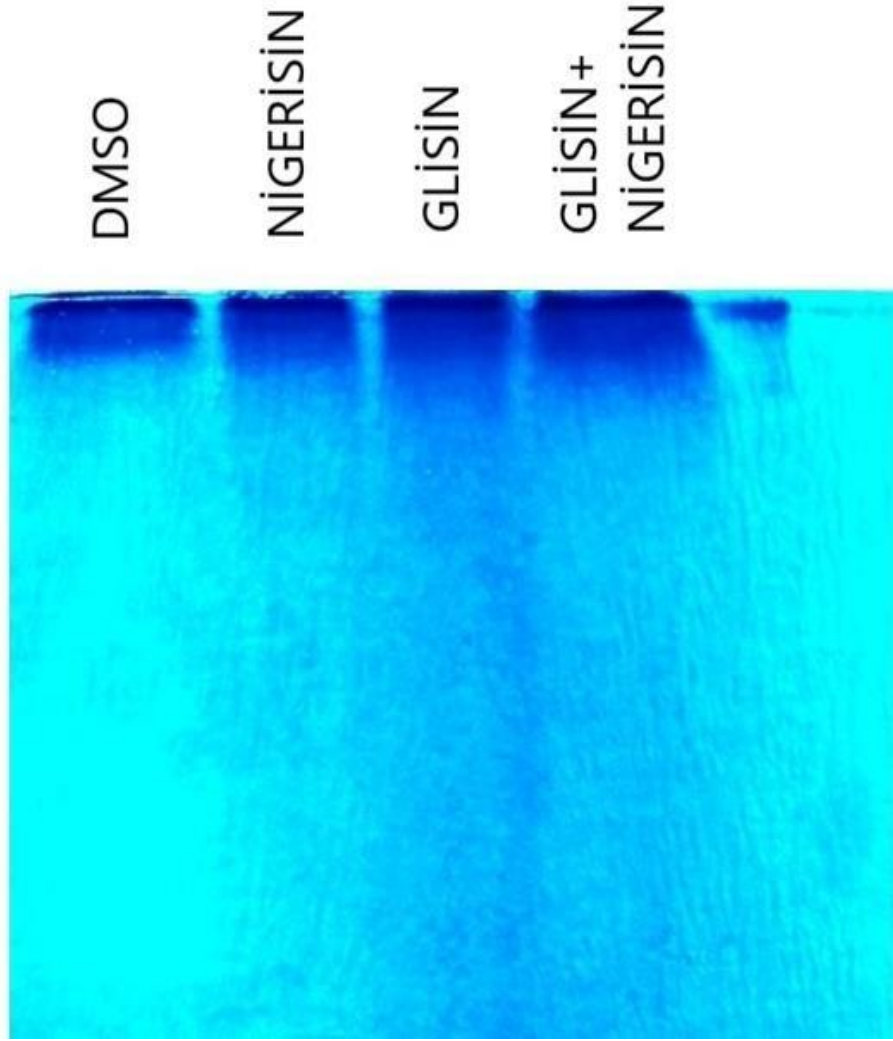
Glisin ve Nigerisin Grupları Arasındaki İlişki: Tek başına Glisin uygulanan hücreler ile tek başına Nigerisin uygulanan hücreler arasında PGE₂ salınımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (* p > 0.05).

4.2.Piroptoz'un Uyarıldığı Granüloza Hücrelerinde, Glisin Uygulaması Sonrasında Hücre Zarı Parçalanmasının, Hücre Dışına Salınan Total Protein Miktarlarının Karşılaştırılması (SDS-PAGE ve Coomassie Boyaması) ile Analizi

Hücre dışı alana salınan toplam protein miktarındaki değişimleri ve protein profillerini görselleştirmek amacıyla gerçekleştirilen SDS-PAGE analizi sonuçları Şekil 4.2'de sunulmuştur.

Farklı tedavi gruplarından (Kontrol, Nigerisin, Glisin, Glisin+Nigerisin) elde edilen ekstraselüler proteinlerin jel üzerindeki dağılımı. Bantların netliği ve arka plan boyanma yoğunluğu, toplam protein salınımındaki varyasyonları yansıtmaktadır.

SDS-PAGE jel görüntüsü incelendiğinde, örneklerin kuyucuklardan jelin ayırıcı matrisine doğru göç ettiği saptanmıştır. Ancak, spesifik protein bantları beklenen keskinlikte ve ayırt edilebilir formda gözlemlenememiştir. Jel genelinde gözlenen homojen ancak yoğun Coomassie Brilliant Blue boyanması, protein bantları ile arka plan arasındaki kontrastın azalmasına neden olmuştur. Buna rağmen, kuyucuk seviyelerinde sınırlı yoğunlaşmaların varlığı dikkat çekmiştir.



Şekil 4.2. Farklı gruptaki hücrelerden salınan toplam protein miktarlarının SDS-PAGE analizi ile karşılaştırılması.

Deney grupları arasındaki toplam protein salınımı (protein sızıntısı) karşılaştırıldığında şu bulgular elde edilmiştir:

Nigerisin Etkisi: Sadece Nigerisin uygulanan grupta, kontrol grubuna kıyasla toplam protein salınımında bir artış gözlenmiştir. Bu durum, Nigerisin tarafından tetiklenen hücre ölüm mekanizmalarının membran bütünlüğünü bozarak hücre içeriğinin dışarı sızmasına yol açtığını desteklemektedir.

Glisin Etkisi ve Koruyuculuk Potansiyeli: Tüm deneysel koşullar arasında en yüksek toplam protein salınımı, tek başına Glisin uygulanan grupta saptanmıştır. Bu bulgu, Glisin'in bu modelde protein dengesi üzerinde güçlü bir modülatör etkisi olduğunu

göstermektedir.

Kombine Uygulama (Glisin + Nigerisin): Glisin ve Nigerisin'in birlikte uygulandığı grupta, toplam protein salınımı kontrol grubuna kıyasla yüksek seyretmiştir.

Tek başına Nigerisin uygulandığında elde edilen protein salınımı, tek başına Glisin uygulanan gruba göre daha düşük seviyede kalmıştır.

Tek başına Nigerisin grubundaki protein salınımı, Glisin + Nigerisin kombine grubuna göre de daha az bulunmuştur.

Buna karşın, tek başına Glisin uygulaması, Glisin + Nigerisin kombinasyonuna oranla daha yoğun bir toplam protein salınımına yol açmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışma, glisin ve nigerisinin granüloza hücrelerinde PGE₂ salınımını nasıl etkilediğini, özellikle inflamasyon aktivasyonu ve plazma membran bütünlüğü arasındaki ilişkiye dikkat ederek araştırmıştır. Sonuçlar ne glisin ne de nigerisinin tek başına ekstraselüler PGE₂ seviyelerini önemli ölçüde artırmadığını, ancak kombine tedavinin belirgin bir yükselmeye hücre ölüm mekanizması açtığını göstermektedir. Bu bulgular, bu sistemde saptanabilir PGE₂ salınımının hem hücre içi inflamatuvar sinyalleşmeyi hem de aracı madde ihracatına izin veren membran koşullarını gerektirebileceğini düşündürmektedir.

Glisin tedavisi tek başına kontrol grubuyla karşılaştırıldığında PGE₂ seviyelerini önemli ölçüde değiştirmemiştir. Bu gözlem, glisinin iyi bilinen sitoprotektif özellikleriyle tutarlıdır. Glisinin tek başına PGE₂ düzeylerini değiştirmemesi, onun doğrudan inflamasyonu tetikleyen bir molekül olmadığını gösterir. Glisin daha çok hücre zarını stabilize eden ve iyon dengesini koruyan bir ajandır; bu sayede hücreyi strese karşı korur ama normal koşullarda inflamatuvar yolakları (örneğin COX–PGE₂ yolu) aktive etmez. Bu nedenle kontrol grubuna benzer PGE₂ seviyeleri görülmesi, glisinin “pasif koruyucu” yani sadece hasar durumunda etkisini gösteren sitoprotektif rolüyle uyumludur. Glisinin, nekrotik ve piroptotik süreçler de dahil olmak üzere çeşitli inflamatuvar hücre ölümü biçimleri sırasında plazma membranını stabilize ettiği ve hücre lizisini azalttığı bilinmektedir. Glisin, membran geçirgenliğini teşvik etmek yerine, genellikle membran hasarını sınırlar ve hücresel bütünlüğün korunmasına yardımcı olur (Fink ve Cookson, 2006). Glisin, NLRP3 inflamozomu gibi inflamatuvar sinyal hücre ölümü mekanizmalarını doğrudan aktive etmediği için, PGE₂ sentezi veya salınımı için gerekli moleküler olayları başlatması olası değildir. Bu grupta PGE₂'de ölçülebilir bir artışın olmaması, muhtemelen glisinin membran stabilize edici etkilerini ve doğrudan proinflamatuvar sinyal aktivitesinin olmamasını yansıtmaktadır.

Benzer şekilde, nigerisin tek başına hücre dışı PGE₂ seviyelerini önemli ölçüde artırmadı. Nigerisin, potasyum çıkışını indükleyerek hücre içi iyon homeostazını bozan bir potasyum iyonofordur ve bu da NLRP3 inflamozomunun aktivasyonu için iyi bilinen bir tetikleyicidir (Mariathasan ve ark., 2006; Muñoz-Planillo ve ark., 2013). Bu hücre ölümü mekanizmasının aktivasyonu, inflamatuvar sinyal kaskadlarını başlatabilir ve pro-inflamatuvar medyatörlerin işlenmesini teşvik edebilir. Ancak, inflamozom aktivasyonu

her zaman çözünür inflamatuvar moleküllerin hücre dışı alana anında veya önemli ölçüde salınmasına yol açmaz. Bazı durumlarda, özellikle uyarım geçici veya tam piroptotik yanıtları indüklemek için yetersiz ise, kapsamlı membran geçirgenliği veya aracı madde salınımı olmadan hücre içi sinyalizasyon meydana gelir (Bergsbaken ve ark., 2009). Bu çalışmada, nigerisin bu nedenle, saptanabilir PGE₂ salınımı için yeterli membran geçirgenliği oluşturmadan erken inflamozomla ilgili sinyalizasyon olaylarını tetiklemiş olabilir.

Buna karşılık, glisin ve nigerisin ile kombine tedavi, PGE₂ salınımında önemli bir artışa neden oldu. Bu gözlem, inflamatuvar sinyalizasyon ve membran dinamikleri arasındaki etkileşimin aracı madde salınımının düzenlenmesinde kritik bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Nigerisin muhtemelen potasyum çıkışı yoluyla inflamozom aktivasyonunu başlatırken, glisin hızlı hücre yırtılmasını önleyen ancak kontrollü geçirgenliğe izin veren bir şekilde membran stabilitesini etkilemiş olabilir. İnflamozom aktivasyonu sırasında, GSDMD gibi por oluşturan proteinler, hücre lizisine yol açmadan hücre içi inflamatuvar medyatörlerin salınmasına izin veren membran kanalları oluşturur (Kayagaki ve ark., 2015; Evavold ve ark., 2018). Bu koşullar altında, plazma membranı kısmen sağlam kalırken, PGE₂ gibi lipid medyatörleri de dahil olmak üzere inflamatuvar moleküllerin dışarı atılmasına izin verebilir.

Glisin ve nigerisin tedavileri arasındaki karşılaştırma, bu bileşiklerin hücresel yanıtları etkilediği farklı mekanizmaları daha da vurgulamaktadır. Glisin öncelikle bir membran stabilizatörü olarak işlev görür, hücreleri membran yırtılmasından korur ve hücre içi bileşenlerin sızıntısını sınırlar. Nigerisin ise, potasyum çıkışı ve inflamozom aktivasyonu yoluyla hücre içi inflamatuvar sinyalleme güçlü bir aktivatörü olarak işlev görür. Bu mekanizmalar önemli ölçüde farklı olsa da her iki tedavi de tek başına minimal hücre dışı PGE₂ tespitine yol açmıştır. Bu bulgu, yeterli membran geçirgenliğinin yokluğunda veya inflamatuvar aktivasyon olmadan membran stabilizasyonunda inflamatuvar sinyalleme, önemli miktarda aracı madde salınımını teşvik etmek için yetersiz olabileceğini düşündürmektedir. Glisin ve nigerisinin benzer PGE₂ yanıtı oluşturması, bu iki ajanın aynı mekanizma ile etki ettiğini değil, PGE₂ üretiminin glisinin hedef aldığı membran hasarı basamağından bağımsız olarak, daha erken inflamatuvar sinyal süreçlerinde gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Bu fark, nigerisin grubu ile kombine glisin-nigerisin tedavisi karşılaştırıldığında daha

belirgin hale gelir. Kombine glisin–nigerisin modeli, pirototik stres altında glisinin koruyucu (sitoprotektif) etkisini değerlendirmek için anlamlı bir yaklaşım sunar. Bu modelde, nigerisin kullanılarak kontrollü bir hücrel hasar piroptoz oluşturulur ve ardından glisinin bu hasarı ne ölçüde azaltabildiği incelenir. Böylece glisinin etkisi yalnızca normal koşullarda değil, aynı zamanda inflamatuvar stres ortamında da ortaya konmuş olur. Elde edilen bulgular, glisinin nigerisinle uyarılan hücrel yanıtı değiştirebildiğini düşündürmektedir. Ani ve düzensiz bir membran bozulması ya da yetersiz sinyal iletimi yerine, kombine uygulamanın daha kontrollü bir süreç oluşturduğu görölmektedir. Bu süreçte, düzenlenmiş membran porlarının oluşumu ve çeşitli aracı moleküllerin salınımı destekleniyor olabilir.

Nitekim literatürde de inflamozom aktivasyonunun, hücrenin tamamen parçalanmasından önce, kontrollü por oluşumu yoluyla eikozanoidler gibi lipid kökenli araçların salınımını artırabileceği belirtilmektedir (von Moltke ve ark., 2012). Bu bağlamda, kombine tedavi grubunda gözlenen yüksek PGE₂ düzeyleri de benzer bir mekanizma ile açıklanabilir.

SDS-PAGE ile toplam protein salınımının analizi, bu tedavilerle ilişkili hücrel stres yanıtlarına ilişkin ek bilgiler sağlamıştır. Nigerisin ile tedavi edilen grupta, daha az düşük molekül ağırlıklı protein bandı tespit edilmiş olup, bu durum bu koşullar altında nispeten sınırlı protein bozunumu veya hücre dışı salınımı olduğunu düşündürmektedir. Nigerisin pirototik hücre ölümünü indükleyebilse de piroptoz sırasında protein salınımının derecesi, inflamasyon aktivasyonunun zamanlamasına ve yoğunluğuna bağlıdır (Bergsbaken ve ark., 2009). Bu nedenle gözlemlenen model, kapsamlı sitoplazmik protein sızıntısı olmaksızın inflamatuvar sinyallemenin kısmi aktivasyonunu yansıtabilir.

Buna karşılık, glisin ile tedavi edilen grupta düşük molekül ağırlıklı protein bantlarının göçünde artış görölmüş olup, bu da hücre dışı fraksiyonda daha fazla çözünür protein veya daha küçük protein parçalarının bulunduğunu göstermektedir. Glisinin sitoprotektif etkileri, hücrel stres yanıtlarını ve protein işleme hücre ölüm mekanizmalarını değiştirebilir ve potansiyel olarak stres koşulları sırasında proteinlerin nasıl salındığını veya tutulduğunu etkileyebilir. Bu etki, bu grupta tespit edilen daha küçük protein bantlarının daha yüksek bolluğunu açıklayabilir.

Birleşik tedavi grubu, nigerisin grubundan daha fazla ancak glisin grubundan daha az düşük molekül ağırlıklı bant içeren ara bir göç paterni gösterdi. Bu patern, glisinin nigerisin tarafından indüklenen hücrel etkileri kısmen modüle edebileceğini ve daha

dengeli bir protein salınım profiliyle sonuçlanabileceğini düşündürmektedir. Bu tür bir modülasyon, glisinin membran bütünlüğünü stabilize ederken aynı zamanda inflamasyon aktivasyonu sırasında kontrollü aracı madde salınımına izin verdiği fikriyle tutarlıdır.

Sonuç olarak, bu çalışmanın bulguları, granüloza hücrelerinde PGE₂ salınımının, inflamasyon aktivasyonu ve plazma membran dinamikleri arasındaki etkileşimden etkilendiğini göstermektedir. Nigerisin, inflamasyonla ilgili sinyalleşme için gerekli olan hücre içi uyarıyı sağlarken, glisin membran stabilitesini ve hücresel bütünlüğü düzenliyor gibi görünmektedir. Kombine tedavi grubunda gözlemlenen PGE₂'deki önemli artış, uygun membran geçirgenliği koşulları olmadan, inflamasyon sinyalleşmesinin tek başına aracı madde salınımı için yeterli olmayabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar, inflamatuvar aracı madde salınımının kontrolünde membran düzenlemesinin önemini vurgulamakta ve sitoprotektif moleküllerin yumurtalık hücrelerinde inflamasyonla ilişkili yanıtları nasıl şekillendirebileceğine dair bir fikir vermektedir.

6. KAYNAKLAR

- Amisi, C. A. (2022). Insulin resistance markers in women with polycystic ovary syndrome: An update. *World Journal of Diabetes*, 13, 129–149.
- Azziz, R., Carmina, E., Chen, Z., Dunaif, A., Laven, J. S., Legro, R. S., ... Yildiz, B. O. (2016). Polycystic ovary syndrome. *Nature Reviews Disease Primers*, 2, 16057.
- Bergmeyer, HU ve Bernt, E. (1974) Laktat dehidrogenaz. Piruvat ve NADH ile UV analizi. Bergmeyer, HU, Ed., *Enzimatik Analiz Yöntemleri*, Academic Press, New York, 574-578.
- Bergsbaken, T., Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2009). Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews. Microbiology*, 7(2), 99–109. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2070>
- Berkel C. (2024). Inducers and Inhibitors of Pyroptotic Death of Granulosa Cells in Models of Premature Ovarian Insufficiency and Polycystic Ovary Syndrome. *Reproductive sciences* (Thousand Oaks, Calif.), 31(10), 2972–2992. <https://doi.org/10.1007/s43032-024-01643-3>
- Berkel C. (2026). A novel PKOS susceptibility gene, cathepsin B, migranüloza hücrelerit be likely to contribute to the pyroptosis of ovarian granulosa cells. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 10.1007/s10815-026-03799-0. Advance online publication. <https://doi.org/10.1007/s10815-026-03799-0>
- Borges, J. P., Sætra, R. S. R., Volchuk, A., Bugge, M., Devant, P., Sporsheim, B., Kilburn, B. R., Evavold, C. L., Kagan, J. C., Goldenberg, N. M., Flo, T. H., & Steinberg, B. E. (2022). Glycine inhibits *NINJI* membrane clustering to suppress plasma membrane rupture in cell death. *eLife*, 11, e78609. <https://doi.org/10.7554/eLife.78609>
- Broz P. (2025). Pyroptosis: molecular mechanisms and roles in disease. *Cell research*, 35(5), 334–344. <https://doi.org/10.1038/s41422-025-01107-6>
- Broz, P., & Dixit, V. M. (2016). Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature reviews. Immunology*, 16(7), 407–420. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.58>
- Cai, Z., He, S., Liu, R., Zhou, L., & Zhao, L. (2022). Plumbagin rescues the granulosa cell's pyroptosis by reducing WTAP-mediated N6-methylation in polycystic ovary syndrome. *Journal of ovarian research*, 15(1), 126. <https://doi.org/10.1186/s13048-022-01058-1>
- Cellosaurus. (t.y.). KGN (CVCL_0375). 24 Mart 2026 tarihinde https://www.cellosaurus.org/CVCL_0375 adresinden erişildi
- David, L., Borges, J. P., Hollingsworth, L. R., Volchuk, A., Jansen, I., Garlick, E., Steinberg, B. E., & Wu, H. (2024). *NINJI* mediates plasma membrane rupture by cutting and releasing membrane disks. *Cell*, 187(9), 2224–2235.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.03.008>

- Degen, M., Santos, J. C., Pluhackova, K., Cebrero, G., Ramos, S., Jankevicius, G., Hartenian, E., Guillerm, U., Mari, S. A., Kohl, B., Müller, D. J., Schanda, P., Maier, T., Perez, C., Sieben, C., Broz, P., & Hiller, S. (2023). Structural basis of *NINJI*-mediated plasma membrane rupture in cell death. *Nature*, 618(7967), 1065–1071. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-05991-z>
- Deng, H., Chen, Y., Xing, J., Zhang, N., & Xu, L. (2024). Systematic low-grade chronic inflammation and intrinsic mechanisms in polycystic ovary syndrome. *Frontiers in immunology*, 15, 1470283. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1470283>
- Diamanti-Kandarakis, E., & Dunaif, A. (2012). Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome revisited: an update on mechanisms and implications. *Endocrine Reviews*, 33(6), 981–1030.
- DiPeso, L., Ji, D. X., Vance, R. E., & Price, J. V. (2017). Cell death and cell lysis are separable events during pyroptosis. *Cell death discovery*, 3, 17070. <https://doi.org/10.1038/cddiscovery.2017.70>
- Dixon, S. J., Lemberg, K. M., Lamprecht, M. R., Skouta, R., Zaitsev, E. M., Gleason, C. E., Patel, D. N., Bauer, A. J., Cantley, A. M., Yang, W. S., Morrison, B., 3rd, & Stockwell, B. R. (2012). Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell*, 149(5), 1060–1072. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.042>
- Dondelinger, Y., Priem, D., Huygranüloza hücrelerie, J., Delangranüloza hücrelerie, T., Vandenabeele, P., & Bertrand, M. J. M. (2023). *NINJI* is activated by cell swelling to regulate plasma membrane permeabilization during regulated necrosis. *Cell death & disease*, 14(11), 755. <https://doi.org/10.1038/s41419-023-06284-z>
- Dong, Z., Venkatachalam, M. A., Weinberg, J. M., Saikumar, P., & Patel, Y. (2001). Protection of ATP-depleted cells by impermeant strychnine derivatives: implications for glycine cytoprotection. *The American journal of pathology*, 158(3), 1021–1028. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64049-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64049-7)
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Espey L. L. (1994). Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of reproduction*, 50(2), 233–238. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.233>
- Evavold, C. L., & Kagan, J. C. (2018). How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity. *Journal of molecular biology*, 430(2), 217–237. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.09.019>
- Evavold, C. L., Ruan, J., Tan, Y., Xia, S., Wu, H., & Kagan, J. C. (2018). The Pore-Forming Protein Gasdermin D Regulates Interleukin-1 Secretion from Living Macrophages. *Immunity*, 48(1), 35–44.e6. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.11.013>
- Fink, S. L., & Cookson, B. T. (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cellular microbiology*, 8(11), 1812–1825. <https://doi.org/10.1111/j.1462->

- Frank, D., & Vince, J. E. (2019). Pyroptosis versus necroptosis: similarities, differences, and crosstalk. *Cell death and differentiation*, 26(1), 99–114. <https://doi.org/10.1038/s41418-018-0212-6>
- Groß, C. J., Mishra, R., Schneider, K. S., Médard, G., Wettmarshausen, J., Dittlein, D. C., Shi, H., Gorka, O., Koenig, P. A., Fromm, S., Magnani, G., Ćiković, T., Hartjes, L., Smollich, J., Robertson, A. A. B., Cooper, M. A., Schmidt-Supprian, M., Schuster, M., Schroder, K., Broz, P., ... Groß, O. (2016). K⁺ Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity*, 45(4), 761–773. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.08.010>
- Huang, J., Fan, H., Li, C., Yang, K., Xiong, C., Xiong, S., Feng, S., Chen, S., Wang, B., Su, Y., Xu, B., Yang, H., Wang, N., & Zhu, J. (2024). Dysregulation of ferroptosis-related genes in granulosa cells associates with impaired oocyte quality in polycystic ovary syndrome. *Frontiers in endocrinology*, 15, 1346842. <https://doi.org/10.3389/fendo.2024.1346842>
- Huang, X., Li, Y., Zhang, H., & Chen, J. (2024). Granulosa cell dysfunction and follicular microenvironment alterations in polycystic ovary syndrome. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1289453.
- Huston, H. C., Anderson, M. J., & Fink, S. L. (2023). Pyroptosis and the cellular consequences of gasdermin pores. *Seminars in immunology*, 69, 101803. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2023.101803>
- Iwata, A., Murakami, Y., Okamoto, K., & Yoshida, S. (2010). Ninjurin-1 cleavage by matrix metalloproteinase-9 generates a chemotactic peptide involved in inflammatory cell migration. *Journal of Biological Chemistry*.
- Jiang, L., Xiao, J., Xie, L., Zheng, F., Ge, F., Zhao, X., Qiang, R., Fang, J., Liu, Z., Xu, Z., Chen, R., Wang, D., Liu, Y., & Xia, Q. (2025). The emerging roles of N6-methyladenosine (m6A) deregulation in polycystic ovary syndrome. *Journal of ovarian research*, 18(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s13048-025-01690-7>
- Kang, J. H., Woo, J. K., Jang, Y. S., & Oh, S. H. (2020). Radiation Potentiates Monocyte Infiltration into Tumors by Ninjurin1 Expression in Endothelial Cells. *Cells*, 9(5), 1086. <https://doi.org/10.3390/cells9051086>
- Kayagaki, N., Kornfeld, O. S., Lee, B. L., Stowe, I. B., O'Rourke, K., Li, Q., Sandoval, W., Yan, D., Kang, J., Xu, M., Zhang, J., Lee, W. P., McKenzie, B. S., Ulas, G., Payandeh, J., Roose-Girma, M., Modrusan, Z., Reja, R., Sagolla, M., Webster, J. D., ... Dixit, V. M. (2021). *NINJI* mediates plasma membrane rupture during lytic cell death. *Nature*, 591(7848), 131–136. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03218-7>
- Kayagaki, N., Stowe, I. B., Lee, B. L., O'Rourke, K., Anderson, K., Warming, S., Cuellar, T., Haley, B., Roose-Girma, M., Phung, Q. T., Liu, P. S., Lill, J. R., Li, H., Wu, J., Kummerfeld, S., Zhang, J., Lee, W. P., Snipas, S. J., Salvesen, G. S., ... Dixit, V. M. (2015). Caspase-11 cleaves gasdermin D for non-canonical inflammasome

- signalling. *Nature*, 526(7575), 666–671. <https://doi.org/10.1038/nature15541>
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*, 26(4), 239–257. <https://doi.org/10.1038/bjc.1972.33>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harbor protocols*, 2018(6), 10.1101/pdb.Prot 095497. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>.
- Levine, B., & Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*, 132(1), 27–42. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.12.018>
- Li, R., Li, H., Yang, Z., & Zhang, X. (2023). Combination of metformin with liraglutide in treating HAIR-AN syndrome in children: A case report and literature review. 二甲双胍联合利拉鲁肽治疗儿童HAIR-AN综合征1例并文献复习. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Central South University. Medical sciences*, 48(9), 1425–1431. <https://doi.org/10.11817/j.issn.1672-7347.2023.230100>Li, X., Lin, Y., Cheng, X., Yao, G., Yao, J., Hu, S., Zhu, Q., Wang, Y., Ding, Y., Lu, Y., Qi, J., Zhao, H., Bian, X., Du, Y., Sun, K., Vankelecom, H., & Sun, Y. (2024). Ovarian ferroptosis induced by androgen is involved in pathogenesis of PKOS. *Human reproduction open*, 2024(2), hoae013. <https://doi.org/10.1093/hropen/hoae013>
- Li, Y. Y., Peng, Y. Q., Yang, Y. X., Xu, N., Shi, T. J., Liu, R. X., Luan, Y. Y., & Yin, C. H. (2025). Fundamental mechanisms of cell death for polycystic ovary syndrome. *Biochemistry and biophysics reports*, 43, 102043. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2025.102043>
- Liu, Y., Pan, R., Ouyang, Y., Gu, W., Xiao, T., Yang, H., Tang, L., Wang, H., Xiang, B., & Chen, P. (2024). Pyroptosis in health and disease: mechanisms, regulation and clinical perspective. *Signal transduction and targeted therapy*, 9(1), 245. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01958-2>
- Lizneva, D., Suturina, L., Walker, W., Brakta, S., Gavrilova-Jordan, L., & Azziz, R. (2016). Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertility and Sterility*, 106(1), 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.05.003>
- Lu S. C. (2013). Glutathione synthesis. *Biochimica et biophysica acta*, 1830(5), 3143–3153. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.008>
- Mariathasan, S., Weiss, D. S., Newton, K., McBride, J., O'Rourke, K., Roose-Girma, M., Lee, W. P., Weinrauch, Y., Monack, D. M., & Dixit, V. M. (2006). Cryopyrin activates the inflammasome in response to toxins and ATP. *Nature*, 440(7081), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature04515>
- Menni, C., Fauman, E., Erte, I., Perry, J. R., Kastenmüller, G., Shin, S. Y., Petersen, A. K., Hyde, C., Psatha, M., Ward, K. J., Yuan, W., Milburn, M., Palmer, C. N., Frayling, T. M., Trimmer, J., Bell, J. T., Gieger, C., Mohny, R. P., Brosnan, M. J., Suhre, K., ... Spector, T. D. (2013). Biomarkers for type 2 diabetes and impaired fasting glucose using a nontargeted metabolomics approach. *Diabetes*,

62(12), 4270–4276. <https://doi.org/10.2337/db13-0570>

- Mi, X., Zhou, X., Zhu, S., Mateus, A., Backman, L. J., & Danielson, P. (2025). Nigericin Induces Paraptosis-Like Cell Death Instead of Pyroptosis in Corneal Keratocytes. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 39(12), e70740. <https://doi.org/10.1096/fj.202500502R>
- Miller, G. W., & Schnellmann, R. G. (1993). Cytoprotection by inhibition of chloride channels: the mechanism of action of glycine and strychnine. *Life sciences*, 53(15), 1211–1215. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90539-f](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90539-f)
- Mizushima, N., & Komatsu, M. (2011). Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*, 147(4), 728–741. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.026>
- Mizushima, N., Yoshimori, T., & Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 107–132. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154005>
- Mou, Y., Wang, J., Wu, J., He, D., Zhang, C., Duan, C., & Li, B. (2019). Ferroptosis, a new form of cell death: opportunities and challenges in cancer. *Journal of hematology & oncology*, 12(1), 34. <https://doi.org/10.1186/s13045-019-0720-y>
- Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B. L., Rajendiran, T. M., & Núñez, G. (2013). K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity*, 38(6), 1142–1153. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.05.016>
- Nagata S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research*, 256(1), 12–18. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4834>
- Navarro, G., Allard, C., Xu, W., & Mauvais-Jarvis, F. (2015). The role of androgens in metabolism, obesity, and diabetes in males and females. *Obesity (Silver Spring, Md.)*, 23(4), 713–719. <https://doi.org/10.1002/oby.21033>
- Noh, H., Hashem, Z., Boms, E., & Najafov, A. (2026). SIGLEC12 mediates plasma membrane rupture during necroptotic cell death. *Nature*, 649(8096), 460–466. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-09741-1>
- Pasparakis, M., & Vandenabeele, P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, 517(7534), 311–320. <https://doi.org/10.1038/nature14191>
- Pinzón-Fernández, M. V., Saavedra-Torres, J. S., López Garzón, N. A., Pachon-Bueno, J. S., Tamayo-Giraldo, F. J., Rojas Gomez, M. C., Arias-Intriago, M., Gaibor-Pazmiño, A., López-Cortés, A., & Izquierdo-Condoy, J. S. (2025). NLRP3 and beyond: inflammasomes as central cellular hub and emerging therapeutic target in inflammation and disease. *Frontiers in immunology*, 16, 1624770. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1624770>
- Pourmal, S., Truong, M. E., Johnson, M. C., Yang, Y., Zhou, L., Alegre, K., Stowe, I. B., Gupta, S., Chen, P. A., Zhang, Y., Rohou, A., Newton, K., Kayagaki, N., Dixit, V. M., & Deshpande, I. (2025). Autoinhibition of dimeric *NINJ1* prevents plasma

- membrane rupture. *Nature*, 637(8045), 446–452. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-08273-4>
- Qiao, Y., He, H., Jonsson, P., Sinha, I., Zhao, C., & Dahlman-Wiggranuloza hücrelerit, K. (2016). AP-1 Is a Key Regulator of Proinflammatory Cytokine TNF α -mediated Triple-negative Breast Cancer Progression. *The Journal of biological chemistry*, 291(10), 5068–5079. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.702571>
- Qiu, X., Wei, Y., Liu, C., Ding, C., & Zhao, S. (2020). Hyperandrogen enhances apoptosis of human ovarian granulosa cells via up-regulation and demethylation of PDCD4. *Gynecological endocrinology: the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 36(4), 333–337. <https://doi.org/10.1080/09513590.2019.1653844>
- Qiu, X., Zhu, L., Zhu, Y., & Zhang, Y. (2020). The role of granulosa cells in follicular development and oocyte maturation. *Biology of Reproduction*, 103(4), 681–691.
- Ramos, S., Hartenian, E., Santos, J. C., Walch, P., & Broz, P. (2024). *NINJI* induces plasma membrane rupture and release of damage-associated molecular pattern molecules during ferroptosis. *The EMBO journal*, 43(7), 1164–1186. <https://doi.org/10.1038/s44318-024-00055-y>
- Rao, Z., Zhu, Y., Yang, P., Chen, Z., Xia, Y., Qiao, C., Liu, W., Deng, H., Li, J., Ning, P., & Wang, Z. (2022). Pyroptosis in inflammatory diseases and cancer. *Theranostics*, 12(9), 4310–4329. <https://doi.org/10.7150/thno.71086>
- Rashid, R., Mir, S. A., Kareem, O., Ali, T., Ara, R., Malik, A., Amin, F., & Bader, G. N. (2022). Polycystic ovarian syndrome-current pharmacotherapy and clinical implications. *Taiwanese journal of obstetrics & gynecology*, 61(1), 40–50. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2021.11.009>
- Richards, J. S. (2001). Perspective: the ovarian follicle--a perspective in 2001. *Endocrinology*, 142(6), 2184–2193. <https://doi.org/10.1210/endo.142.6.8223>
- Richards, J. S., Russell, D. L., Ochsner, S., & Espey, L. L. (2002). Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annual review of physiology*, 64, 69–92. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081501.131029>
- Sahoo, B., Mou, Z., Liu, W., Dubyak, G., & Dai, X. (2025). How *NINJI* mediates plasma membrane rupture and why *NINJ2* cannot. *Cell*, 188(2), 292–302.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2024.11.021>
- Shen, L. Y., Fu, X. F., Zeng, Q., Mao, X. W., Hong, Q. Y., Liu, X. J., Li, H. Q., & Hu, H. (2023). Comparison of the efficacy of different frequency electroacupuncture in the treatment of polycystic ovary syndrome patients with abdominal obesity. 不同频率电针治疗腹部肥胖型多囊卵巢综合征的疗效比较. *Zhen ci yan jiu = Acupuncture research*, 48(12), 1266–1273. <https://doi.org/10.13702/j.1000-0607.20230575>
- Shi, J., Gao, W., & Shao, F. (2017). Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed

- Necrotic Cell Death. *Trends in biochemical sciences*, 42(4), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.10.004>
- Shi, J., Zhao, Y., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Huang, H., Zhuang, Y., Cai, T., Wang, F., & Shao, F. (2015). Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*, 526(7575), 660–665. <https://doi.org/10.1038/nature15514>
- Shimada, M., Hernandez-Gonzalez, I., Gonzalez-Robayna, I., & Richards, J. S. (2006). Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md.), 20(6), 1352–1365. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0504>
- Singh, S., Pal, N., Shubham, S., Sarma, D. K., Verma, V., Marotta, F., & Kumar, M. (2023). Polycystic Ovary Syndrome: Etiology, Current Management, and Future Therapeutics. *Journal of clinical medicine*, 12(4), 1454. <https://doi.org/10.3390/jcm12041454>
- Smith, W. L., Garavito, R. M., & DeWitt, D. L. (1996). Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and-2. *The Journal of biological chemistry*, 271(52), 33157–33160. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.52.33157>
- Stockwell, B. R., Friedmann Angeli, J. P., Bayir, H., Bush, A. I., Conrad, M., Dixon, S. J., Fulda, S., Gascón, S., Hatzios, S. K., Kagan, V. E., Noel, K., Jiang, X., Linkermann, A., Murphy, M. E., Overholtzer, M., Oyagi, A., Pagnussat, G. C., Park, J., Ran, Q., Rosenfeld, C. S., ... Zhang, D. D. (2017). Ferroptosis: A Regulated Cell Death Nexus Linking Metabolism, Redox Biology, and Disease. *Cell*, 171(2), 273–285. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.021>
- Tan, Y., Chen, Q., Li, X., Zeng, Z., Xiong, W., Li, G., Li, X., Yang, J., Xiang, B., & Yi, M. (2021). Pyroptosis: a new paradigm of cell death for fighting against cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 40(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s13046-021-01959-x>
- Taylor, R. C., Cullen, S. P., & Martin, S. J. (2008). Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 9(3), 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrm2312>
- Vajjhala, P. R., Mirams, R. E., & Hill, J. M. (2012). Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. *The Journal of biological chemistry*, 287(50), 41732–41743. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.381228>
- Von Moltke, J., Trinidad, N. J., Moayeri, M., Kintzer, A. F., Wang, S. B., van Rooijen, N., Brown, C. R., Krantz, B. A., Leppa, S. H., Gronert, K., & Vance, R. E. (2012). Rapid induction of inflammatory lipid mediators by the inflammasome in vivo. *Nature*, 490(7418), 107–111. <https://doi.org/10.1038/nature11351>
- Wang J, Yin T, Liu S. Dysregulation of immune response in PKOS organ system. *Front Immunol*. 2023 May 5;14:1169232. doi: 10.3389/fimmu.2023.1169232. PMID: 37215125; PMCID: PMC10196194.

- Weinberg, J. M., Bienholz, A., & Venkatachalam, M. A. (2016). The role of glycine in regulated cell death. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 73(11-12), 2285–2308. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2201-6>
- Weinberg, J. M., Davis, J. A., Abarzua, M., & Rajan, T. (1987). Cytoprotective effects of glycine and glutathione against hypoxic injury to renal tubules. *The Journal of clinical investigation*, 80(5), 1446–1454. <https://doi.org/10.1172/JCI113224>
- Wheeler, M. D., Ikejima, K., Enomoto, N., Stacklewitz, R. F., Seabra, V., Zhong, Z., Yin, M., Schemmer, P., Rose, M. L., Rusyn, I., Bradford, B., & Thurman, R. G. (1999). Glycine: a new anti-inflammatory immunonutrient. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 56(9-10), 843–856. <https://doi.org/10.1007/s000180050030>
- Wu G. (2009). Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 37(1), 1–17. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0269-0>
- Xiang, Y., Wang, H., Ding, H., Xu, T., Liu, X., Huang, Z., Wu, H., & Ge, H. (2023). Hyperandrogenism drives ovarian inflammation and pyroptosis: A possible pathogenesis of PKOS follicular dysplasia. *International immunopharmacology*, 125(Pt A), 111141. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2023.111141>
- Xiong, Y. L., Liang, X. Y., Yang, X., Li, Y., & Wei, L. N. (2011). Low-grade chronic inflammation in the peripheral blood and ovaries of women with polycystic ovarian syndrome. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*, 159(1), 148–150. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.07.012>
- Ye, Z., Zhang, C., Wang, S., Zhang, Y., Li, R., Zhao, Y., & Qiao, J. (2022). Amino acid signatures in relation to polycystic ovary syndrome and increased risk of different metabolic disturbances. *Reproductive biomedicine online*, 44(4), 737–746. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.11.012>
- Yu, P., Zhang, X., Liu, N., Tang, L., Peng, C., & Chen, X. (2021). Pyroptosis: mechanisms and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 128. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>
- Zhang, Y., Xie, X., & Han, L. (2025). Connection between granulosa cell pyroptosis and oocyte endoplasmic reticulum stress in a mouse model of polycystic ovary syndrome. *Journal of ovarian research*, 18(1), 288. <https://doi.org/10.1186/s13048-025-01841-w>
- Zhou, S., Lan, Q., Xin, W., Wang, Y., Zhang, A., Xiong, J., Lv, L., Li, Y., Nie, L., Qin, S., Zhou, J., Gong, S., Wang, S., Huang, Y., & Zhao, J. (2025). Targeting *NINJ1*-Mediated Plasma Membrane Rupture in Tubular Epithelial Cell Prevents Inflammatory Response in Acute Kidney Injury. *International journal of biological sciences*, 21(12), 5223–5239. <https://doi.org/10.7150/ijbs.115364>
- Zhu, L., & Xu, Y. (2025). Multifaceted roles of *ninjurin1* in immunity, cell death, and disease. *Frontiers in immunology*, 16, 1519519. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2025.1519519>