



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PREMATÜRE OVARYAN YETMEZLİK MODELİNDE
FOLLİKÜLER ATREZİ İLE GRANULOZA HÜCRELERİNİN
HÜCRE ÖLÜM MEKANİZMALARI AÇISINDAN İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ

DAMLA AKOĞULLARI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. ELGİN TÜRKÖZ ULUER

MANİSA
2018



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DAMLA AKOĞULLARI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN

Doç. Dr. Serap CİLAKEK MICİLİ

(Tez Danışmanı)

(Jüri Üyesi)

(Jüri Üyesi)

MANİSA-2018

BEYAN

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

Damla AKOĞULLARI

İMZA

XXXXXX

TEŞEKKÜR

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

Tez konumun belirlenmesi, gerçekleştirilmesi ve yazımında bana bilgi birikimi ve deneyimi ile destek olan, her durumda beni sabırla karşılayıp yol gösteren değerli hocam Sayın Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerini bana en verimli şekilde aktaran ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen başta; Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve ikinci danışmanım Sayın H. Seda VATANSEVER'e olmak üzere değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Kemal ÖZBİLGİN ve Sayın Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU'ya,

Lisansüstü eğitim hayatımda tanıdığım, yüksek lisans eğitimim ve tezimde gerek bilgi birikimi gerekse dostluğu ile yanımda olan Uzm. Dr. Pınar KILIÇASLAN SÖNMEZ'e

Tez deneylerimin gerçekleştirilmesinde bana destek olan başta Dr. Öğr. Üyesi Mahmud ÖZKUT, Uzm. Bio. Ezgi ERSÖZ, Uzm. Bio. Pelin TOROS, Araş. Gör. Hilal KABADAYI, Araş. Gör. M. Yusuf PEKMEZCİ, Dr. Gülsen KARAMAN, Bio. Serdağ DEMİRÖREN, Bio. Esmâ OZAN, Bio. Ahmet MUTLU ve Bio. Burak ÇELİK'e,

Hayatım boyunca sevgi ile beni bugünlere getiren her hatam ve başarımda, maddi ve manevi hiçbir desteğini benden esirgemeyen ve yanımda olan başta sevgili annem ve babam olmak üzere tüm aileme teşekkür ederim.

Bu tez, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 2017-149 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Damla AKOĞULLARI
Manisa, 2018

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
KISALTMALAR	iv
ŞEKİL DİZİNİ	vii
RESİM DİZİNİ	ix
TABLO DİZİNİ	x
ÖZET	1
ABSTRACT	3
1. GİRİŞ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1. OVARYUM	6
2.2. OVARYUM EMBRİYOLOJİSİ	9
2.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar	11
2.3. OVARYAN SIKLUS	13
2.3.1. Folikül Gelişimi	14
2.3.1.1. Primordiyal Folikül	15
2.3.1.2. Primer Folikül	16
2.3.1.2.1. Teka Hücreleri	18
2.3.1.3. Sekonder Folikül	21
2.3.1.4. Graaf Folikül	23
2.3.2. Ovulasyon	24
2.4. FOLİKÜLER ATREZİ	27
2.5. PREMATÜRE OVARYAN YETMEZLİK	31
2.6. HÜCRE ÖLÜMÜ	36
2.6.1. Apoptoz	38
2.6.1.1. Apoptoz Mekanizması	40
2.6.1.2. Ekstresek Yolak	41
2.6.1.3. İntrensek Yolak	42
2.6.2. Otofaji	44
2.6.3. Paraptoz	49
3. GEREÇ VE YÖNTEM	56
3.1. DENEY MODELİNİN OLUŞTURULMASI	56
3.2. DENEYİN SONLANDIRILMASI İLE DOKU VE KAN ÖRNEKLERİNİN ALINMASI	57
3.3. KANDA HORMON SERUM SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ (ELİSA)	58
3.3.1. Analizlerin Prensibi	59
3.3.2. Reaktif Hazırlığı	59
3.3.3. Analiz Prosedürü	60
3.4. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	61
3.4.1. Dokuların Takibi, Parafin Gömme ve Kesit Alma	61
3.4.2. Hematoksilen Eozin Boyama	62
3.4.2.1. Folikül Sayımı	64
3.5. İNDİREKT İMMÜNOHİSTOKİMYA	65
3.6. TUNEL ANALİZ	68
3.7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	71
4. BULGULAR	72

4.1. BİYOKİMYASAL SONUÇLAR	72
4.2. HİSTOPATOLOJİK SONUÇLAR	73
4.2.1. Hematoksilen Eozin Sonuçları	73
4.2.2. Folikül Sayımı Sonuçları	76
4.3. İMMÜNOHİSTOKİMYASAL SONUÇLAR	78
4.4. TUNEL SONUÇLARI	85
5. TARTIŞMA	86
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	96
7. KAYNAKLAR	97
8. EKLER	105
9. ÖZGEÇMİŞ	109



KISALTMALAR

Atg 1	Otofaji İlişkili Protein 1
Atg 5	Otofaji İlişkili Protein 5
Atg 6	Otofaji İlişkili Protein 6
Atg 7	Otofaji İlişkili Protein 7
Atg 9	Otofaji İlişkili Protein 9
Atg 12	Otofaji İlişkili Protein 12
Atg 13	Otofaji İlişkili Protein 13
Atg 16	Otofaji İlişkili Protein 16
Apaf-1	Aktif Proteaz Faktör 1
BAD	Bcl-2 ilişkili ölüm promotörü
Bak	Bcl-2 agonisti/öldürücüsü
BAX	Proapoptotik Bcl-2 ilişkili
Bcl-2	B lenfosit 2 hücreleri
Beclin 1	coiled-coil, moesin-like BCL2-interacting protein
BMP-4	Kemik morfogenetik protein
CAD	Kaspaz Aktive edici DNAaz
CHOP	C/EBP (CCAAT/enhancer-bağlanan protein)-homolog protein
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
Endo-G	Endonükleaz G
ERAD	Endoplazmik Retikulum İlişkili Degredasyonu
FAS	TNF reseptör superfamily
FASL	Fas Ligand
FASR	Fas reseptör
FIP-200	200 kDA'lık fokal adezyon kinaz ailesi ile etkileşen protein
GRP78	Glukozla düzenlenen protein 78
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
HSP73	Isı Şok Proteini 73

hVps34	İnsan Vakuolar Protein Sıralı Faktör Proteinini 34
IAF	İnhibitör Apoptotik Faktör
ICAD	İnaktif Kaspaz Aktive edici DNAaz
IGF1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IRE1	İnositol-gerektiren enzim 1
JNK	JUN N-terminal kinaz
Kaspaz	Sisteine bağlı aspartat yönlendirmeli proteazlar
Lamp1	Lizozom ile ilişkili zar proteini 1
LH	Luteinizan Hormon
MAP LC3 β	Mikrotübül İlişkili Protein hafif zincir 3 β
MOMP	Dış membran Permeabilizasyonu
mTOR	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi
mTOR1	Rapamisin protein kompleksinin memeli hedefi 1
NOXA	Forbol-12-miristat-13-asetat ile indüklenen protein
OMI	Oosit Matürasyon İnhibitörü
p53	Protein 53
PBS	Fosfat tuz tamponu
PERK	Çift zincirli RNA bağımlı protein kinaz benzeri-ER kinaz
PI3K	Fosfatidil inozitol 3 kinaz
POY	Prematüre Ovaryan Yetmezlik
PUMA	Apoptoz p53 upregüle modülatörü
SRY	Y kromozomunun cinsiyet tanımlayıcı bölgesi
Smac	Sekonder Mitokondri Kaynaklı Kaspaz Aktivitörü
TBF	Testis Belirleyici Faktör
TNF	Tümör nekroz faktörü
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
TNFR	Tümör nekroz faktör reseptörü-1
ULK1	Unc-51 gibi otofajiyi aktive eden kinaz 1
ULK2	Unc-51 gibi otofajiyi aktive eden kinaz 2

UPR	Katlanmamış Protein Yanıtı
XBP-1	X-kutusunda bağlanan protein 1
ZP-1	Zona Pellusida Proteini 1
ZP-2	Zona Pellusida Proteini 2
ZP-3	Zona Pellusida Proteini 3



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1. Ovaryumların anatomik olarak gösterimi	7
Şekil 2. Dişi üreme sistemine ait organların ve ovaryumun detaylı gösterimi	8
Şekil 3. Ovaryum histolojik kesitinin hematoksilen eozin boyaması	9
Şekil 4. Beş haftalık bir embriyo taslağında ovaryum gelişimi	10
Şekil 5. Primordiyal germ hücrelerinin göçü ile ovaryum gelişim süreci	12
Şekil 6. Beş haftalık bir embriyoda farklılaşmamış gonadların ovaryum ya da testise farklılaşmasının şematize edilmesi	13
Şekil 7. Ovaryan Siklus	14
Şekil 8. Folikülogenez ile primordiyal folikülün matürasyonu	15
Şekil 9. Primordiyal folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi	16
Şekil 10. Unilaminar Primer folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi	17
Şekil 11. Multilaminar Primer folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi	18
Şekil 12. Teka hücrelerinin graaf folikülündeki şematik gösterimi	19
Şekil 13. İnsan Korpus Luteum histolojik kesiti	20
Şekil 14. Sekonder folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi	21
Şekil 15. Graaf (preovulatar) folikülün şematik (a) ve histolojik (b) gösterimi	22
Şekil 16. Matür graaf folikülün histolojik (a) ve şematik (b) gösterimi	23
Şekil 17. Endokrin hormonların kontrolünde süren ovaryan siklus ve ovulasyon aşamasının gösterimi	25
Şekil 18. Oosit matürasyonunda mayoz bölünmeler sonucunda birinci ve ikinci polar cisim oluşumu	27
Şekil 19. Folikülogenez sürecinde fetal ve postnatal dönemdeki foliküler atrezi süreçleri	28
Şekil 20. Atrezik foliküllerin histolojik görünümü	29

Şekil 21. Foliküler atrezi sürecinde endokrin sistem ve ovaryumlar arasındaki ilişki	31
Şekil 22. Prematüre ovaryan yetmezliğin nedenleri	33
Şekil 23. Prenatal ve postnatal dönemde folikülogenez sürecinde folikül kaybı nedenleri ile Prematüre ovaryan yetmezlik ilişkisi	35
Şekil 24. Hücre ölüm tipleri ve ayırt edici özellikleri	37
Şekil 25. Hücre ölüm tiplerinden apoptoz, otofaji, nekroz ve paraptozun morfolojik ayrımı ile foliküler atrezi sürecine ait üç hücre ölüm tipi: apoptoz, otofaji ve paraptoz	38
Şekil 26. Apoptotik hücre ölümünün morfolojik basamakları	39
Şekil 27. Apoptozda görev alan kaspazlar	41
Şekil 28. Apoptozun ekstresek ve intrinsek yolları ve süreçleri	44
Şekil 29. Otofaji tipleri ve temel mekanizmaları	46
Şekil 30. Otofagozom oluşumu	48
Şekil 31. Endoplazmik retikulumun şematik üç boyutlu gösterimi	50
Şekil 32. Endoplazmik retikulumun elektron mikroskopik görüntüsü	51
Şekil 33. Endoplazmik retikulum stresindeki üç transdüksiyon yolağı ve ilgili şaperonlar	52
Şekil 34. Endoplazmik retikulum stresinde rol alan mekanizmalar	54
Şekil 35. Kandaki serum hormon seviyelerinin analizi	72
Şekil 36. Folikül sayımı sonucu gruplar arası ortalama folikül dağılımı	77
Şekil 37. Anti-Kaspaz 3 immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı	78
Şekil 38. Anti-Kaspaz 8 immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı	79
Şekil 39. Anti-Kaspaz 9 immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı	80
Şekil 40. Anti-Lamp1 immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı	81
Şekil 41. Anti-MAP LC3 β immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı	82
Şekil 42. Anti-CHOP immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı	83
Şekil 43. Anti-GRP78 immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı	84
Şekil 44. TUNEL analiz sonuçları	85

RESİM DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 1. İntraperitoneal enjeksiyon	57
Resim 2. Genel anestezi altında intrakardiyak kan alımı	58
Resim 3. Ovaryumların cerrahi olarak çıkarılması	58
Resim 4. Kontrol grubu Hematoksilen Eozin boyamaları	74
Resim 5. Sham grubu Hematoksilen Eozin boyamaları	75
Resim 6. POY grubu Hematoksilen Eozin boyamaları	76
Resim 7. Tüm gruplara ait Anti-Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması	78
Resim 8. Tüm gruplara ait Anti-Kaspaz 8 immünohistokimyasal boyaması	79
Resim 9. Tüm gruplara ait Anti-Kaspaz 9 immünohistokimyasal boyaması	80
Resim 10. Tüm gruplara ait Anti-Lamp1 immünohistokimyasal boyaması	81
Resim 11. Tüm gruplara ait Anti-MAP LC3 β immünohistokimyasal boyaması	82
Resim 12. Tüm gruplara ait Anti-CHOP immünohistokimyasal boyaması	83
Resim 13. Tüm gruplara ait Anti-GRP78 immünohistokimyasal boyaması	84
Resim 14. Tüm gruplara ait TUNEL analizi	85

TABLO DİZİNİ

Tablo	Sayfa
Tablo 1. Elisa standart çözeltilerin hazırlanma prosedürü	60
Tablo 2. Parafin takip prosedürü	62
Tablo 3. Hematoksilen Eozin boyama prosedürü	64
Tablo 4. İndirekt immünohistokimya prosedürü	67
Tablo 5. İmmünohistokimya için kullanılan primer antikorlar	68
Tablo 6. TUNEL prosedürü	70
Tablo 7. Gruplara göre kandaki serum hormon seviyeleri	72

Tezin Başığı: Prematüre Ovaryan Yetmezlik Modelinde Foliküler Atrezi ile Granüloza Hücrelerinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Açısından İlişkisinin İncelenmesi

Öğrencinin Adı: Damla AKOĞULLARI

Danışmanı: Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

Anabilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji AD

1. ÖZET

Amaç: Çalışmamızda, siklofosamid ile C57BL/6 dişi farelerde oluşturulan Prematüre Ovaryan Yetmezlik (POY) modelinde foliküler atrezide rol oynayan hücre ölüm mekanizmalarından apoptoz, otofaji ve paraptozun immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç Yöntem: Fareler rastgele; uygulama yapılmayan kontrol, aynı dozda serum fizyolojik uygulanan sham ve siklofosamid uygulanan POY modeli olarak 3 gruba ayrıldı. Hormon seviyelerinin ELİSA yöntemiyle ölçümü için intrakardiyak kan, histopatolojik incelemeler için ovaryum dokuları alınarak hematoksilen eozin boyaması ve folikül sayımı gerçekleştirildi. Hücre ölüm mekanizmaları immünohistokimyasal yöntemlerle incelendi. Apoptotik hücre varlığı TUNEL ile gösterildi. Sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Bulgular: Sham ve kontrol grubuna göre POY’da FSH ve LH seviyelerinde artış, östradiolde düşüş saptandı. Ovaryum dokularının histopatolojik değerlendirmesinde, sham ve kontrole oranla POY’da gelişen folikül kaybına karşılık atrezik foliküllerde artış izlendi. İmmünohistokimyasal boyamalarda; kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9 immünoreaktivitesi sham ve kontrolde hafif, POY’da ise kaspaz 3 hafif/orta, kaspaz 8 ve kaspaz 9’un orta; Lamp1 ve MAP LC3β immünoreaktivitesi sham ve kontrolde hafif, POY’da ise Lamp1 hafif/orta, MAP LC3β orta; CHOP ve GRP78 immünoreaktivitesi sham ve kontrolde hafif, POY grubunda ise orta şiddette gözlemlendi.

TUNEL analizi ile POY grubunda, sham ve kontrole göre daha fazla apoptotik hücre izlendi.

Sonuçlar: C57BL/6 dişi farelerde siklofosfamid uygulaması ile POY modeli oluşturulmuştur. Foliküler atrezi sürecince hücre ölüm tiplerinden apoptoz, otofaji ve paraptozun varlığı immünohistokimyasal olarak gösterilmiştir. TUNEL analiziyle POY grubundaki apoptotik hücre artışı tespit edilmiştir. Çalışmamızda, POY'a yol açan foliküler atrezide apoptoz ve otofajinin yanında paraptozun da rol aldığının gösterilmesi, yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Prematüre Ovaryan Yetmezlik, Siklofosfamid, Foliküler atrezi, Apoptoz, Otofaji, Paraptoz.

Thesis Title: Investigation of the Relation between Follicular Atresia and Granulosa Cells in terms of Cell Death Mechanisms in Premature Ovarian Failure Model

Name of the student: Damla AKOĞULLARI

Advisor: Assoc. Dr. Elgin TÖRKÖZ ULUER

Department: Department of Histology and Embryology.

2. SUMMARY

Aim: In this study, it was aimed to establish the Premature Ovarian Failure (POF) model in C57BL/6 mice that was induced by cyclophosphamide and evaluation of apoptosis, autophagy and paraptosis via indirect immunohistochemistry method in order to determine the cell death mechanism that play a role in follicular atresia process.

Material and Methods: Mice were randomly divided into 3 groups as no treatment control, serum physiologic injected sham and cyclophosphamide injected POF model. Intracardiac blood for measurement of hormone levels by ELISA, ovarian tissues for histopathological examinations, hematoxylin eosin staining and follicle counting were performed. Cell death mechanisms evaluated by immunohistochemistry. TUNEL analysis was performed to detect the presence of apoptotic cells. The results were evaluated statistically.

Results: A decrease in estradiol levels was observed when the serum FSH and LH levels were increased in the POF group according to the control and sham group. Histopathological evaluation of the ovarian tissues revealed an increase in atresic

follicles in comparison to the control and sham group in comparison to follicular loss in POF. As a result of immunohistochemical staining; caspase 3, caspase 8, and caspase 9 immunoreactivities were mild in the control and sham groups, caspase 3 immunoreactivity was mild to moderate in the POF group, caspase-8 and caspase-9 immunoreactivities were moderate; Lamp1 and MAP LC3 β immunoreactivities were mild in the control and the sham groups, while in the POF group, Lamp1 immunoreactivity was mild to moderate and MAP LC3 β immunoreactivity was moderate; CHOP and GRP78 immunoreactivities were observed to be moderate in the control and sham group and moderate in the POF group. As a result of TUNEL analysis, more apoptotic cells were detected in the POF group than in the control and sham group in the ovary sections.

Conclusions: POF model was generated by cyclophosphamide administration in C57BL/6 female mice. Apoptosis, autophagy, and paraptosis are demonstrated immunohistochemically from the cell death types in the follicular atresia process. Apoptotic cell increase in the POF group was detected by TUNEL analysis. The demonstrations in this study that apoptosis and autophagy as well as paraptosis play a role in the follicular atresia leading to POF, will help to develop new treatment protocols.

Keywords: Premature Ovarian Failure, Cyclophosphamide, Follicular Atresia, Apoptosis, Autophagy, Paraptosis.

1. GİRİŞ

Günümüzde kadın sağlığını etkileyen en önemli faktörlerden biri infertilitedir. Özellikle 40 yaşın altındaki kadınlarda infertilite nedenli hastalıkların başında gelen prematüre ovaryan yetmezlik (POY) klinik olarak amenore, yüksek gonadotropin ve düşük östrojen seviyeleri ile kendini gösteren ve ovaryum rezervlerinin erken dönemde tükenmesi ile ovaryumda fonksiyon bozukluğuna neden olan etiyolojisi net olarak aydınlatılamamış multifaktöriyel bir hastalıktır.

Prematüre ovaryan yetmezlik nedenli infertilite vakalarının gerek etiyolojisinin saptanması gerek ise tedavi protokollerinin geliştirilmesi için yapılan çalışmalarda, hastalığın klinik bulgularını taşıyacak ve histopatolojik değerlendirmelerde ovaryum hasarını oluşturacak uygun deney modelleri kullanılmaktadır.

Siklofosfamid, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve ovaryumlara sitotoksik etki yaptığı bilinen bir ajandır. Özellikle kanser tedavisi gören kadınlarda ikincil bir hastalık olarak prematüre ovaryan yetmezlik gelişmektedir.

Foliküler atrezi ovaryum granüloza hücrelerinde görülen birçok hücre ölüm sürecinin rol oynadığı bir süreçtir. Birincil olarak apoptoz ve otofajinin bu süreçte rol oynadığı bilinmekte ise de bunlara ek olarak son zamanlarda morfolojik ve biyokimyasal olarak farklılık gösteren bir hücre ölüm tipi olan paraptozun da rol aldığı düşünülmektedir.

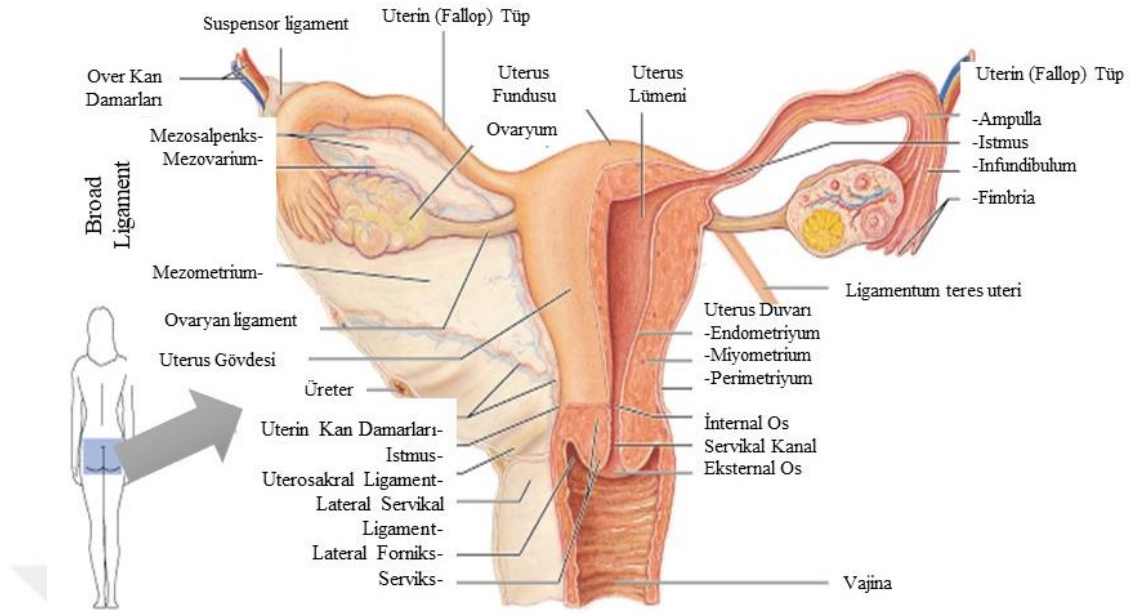
Çalışmamızda öncelikle siklofosfamid uygulaması ile oluşturulan prematüre ovaryan yetmezlik fare modelinin oluşturulduktan sonra, biyokimyasal olarak kandaki FSH, LH ve östradiol serum hormon seviyeleri ve histopatolojik olarak ovaryumların değerlendirilmesi ile doğrulanması, sonrasında foliküler atrezi sürecinde görülen hücre ölüm mekanizmalarından apoptoz için; kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9, otofaji için; Lamp1 ve MAP LC3 β ve paraptoz için; GRP78 ve CHOP primer antikorları kullanılarak immünohistokimyasal olarak kontrol, sham ve POY grubundaki karşılaştırmaların yapılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OVARYUM

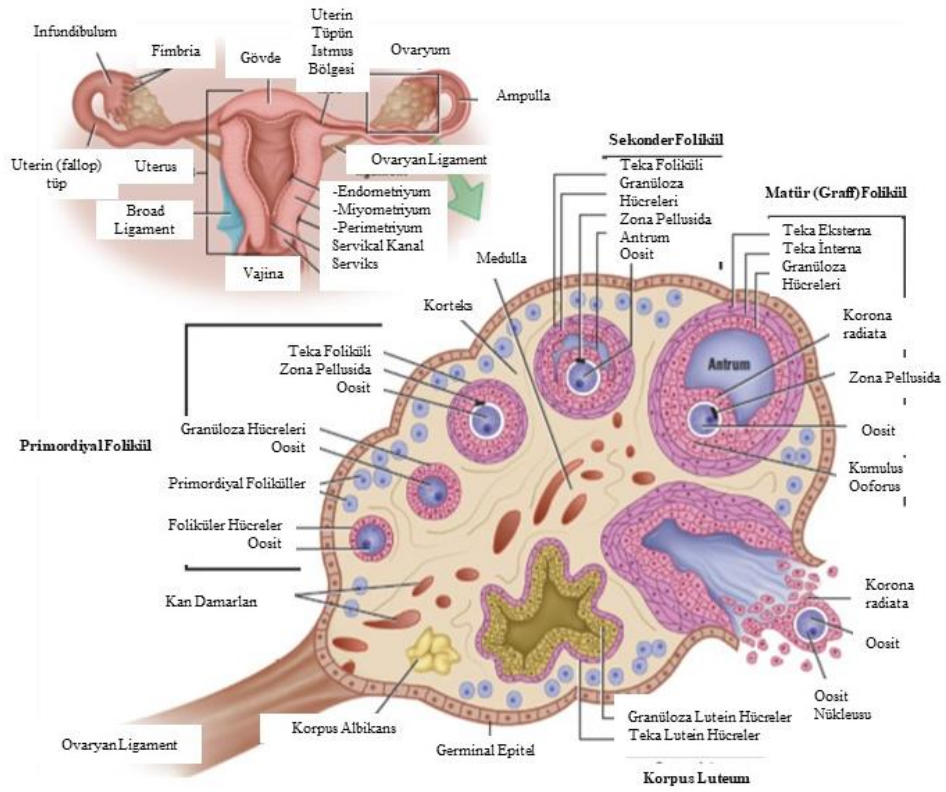
Ovaryum; hiç doğum yapmamış kadınlarda (nullipar) bir çift badem şeklinde pembemsi beyaz renkli, 3 cm boyunda, 1,5 cm eninde ve 1 cm kalınlığındadır (Hoffman ve ark. 2016; Ross ve Pawlina 2016). Ovaryum fonksiyonel olarak; dişi üreme hücrelerinin üretimi, ovaryan siklus, menstrual siklus, fertilizasyon gibi önemli olaylarda rol oynayan östrojen ve progesteron gibi steroid hormonların salgılanması, postnatal evrede üreme organlarının büyümesinin düzenlenmesi ve sekonder seks karakterlerinin gelişiminde rol oynamaktadır (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

Anatomik olarak tubal kutbu, ovaryumun sinirlerini ve damarlarını taşıyan suspensor ligament tarafından pelvis duvarına, uterin kutbu ise ovaryan ligament tarafından uterusu bağlanan her bir ovaryum mezovaryum denen peritoneal katlantı tarafından broad ligamentin posteriyör yüzüne bağlanmaktadır (Şekil 1) (Ross ve Pawlina 2016).



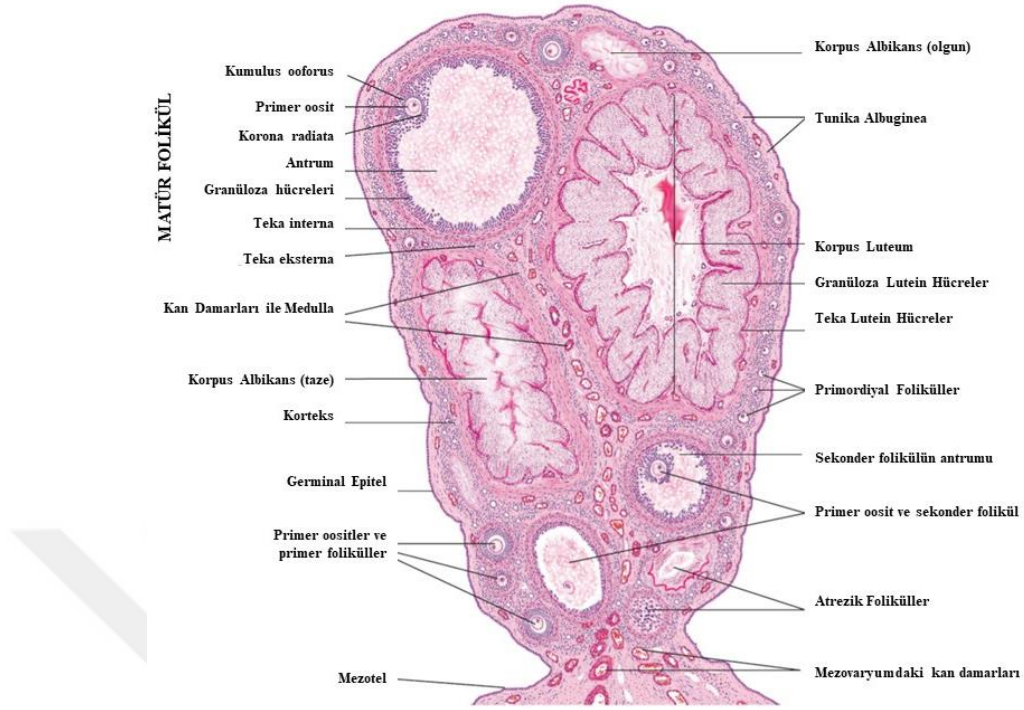
Copyright © 2001 Benjamin Cummings, an imprint of Addison Wesley Longman, Inc.

Şekil 1. Ovaryumların anatomik olarak gösterimi.
http://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020_Exam_Reviews/Exam_5/ovary%20uterus%20anatomy%20diagram.jpg Erişim Tarihi: 07.02.2018



Şekil 2. Dişi üreme sistemine ait organların ve ovaryumun detaylı gösterimi. (Eroschenko 2013)

Histolojik olarak ovaryumun yüzeyi, dıştan mezotelyum yerine tek katlı kübik ve bazı bölgelerde yassı epitel olarak değişen germinal epitel adı verilen ve mezotelyum ile devamlılık gösteren bir selüler tabaka ile döşelidir. Germinal epitelin hemen altında sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea tabakası yer almaktadır. Ovaryum histolojik kesitlerde aralarındaki sınır net bir şekilde ayırt edilemeyen korteks ve medulla kısımlarından oluşmaktadır (Şekil 2) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



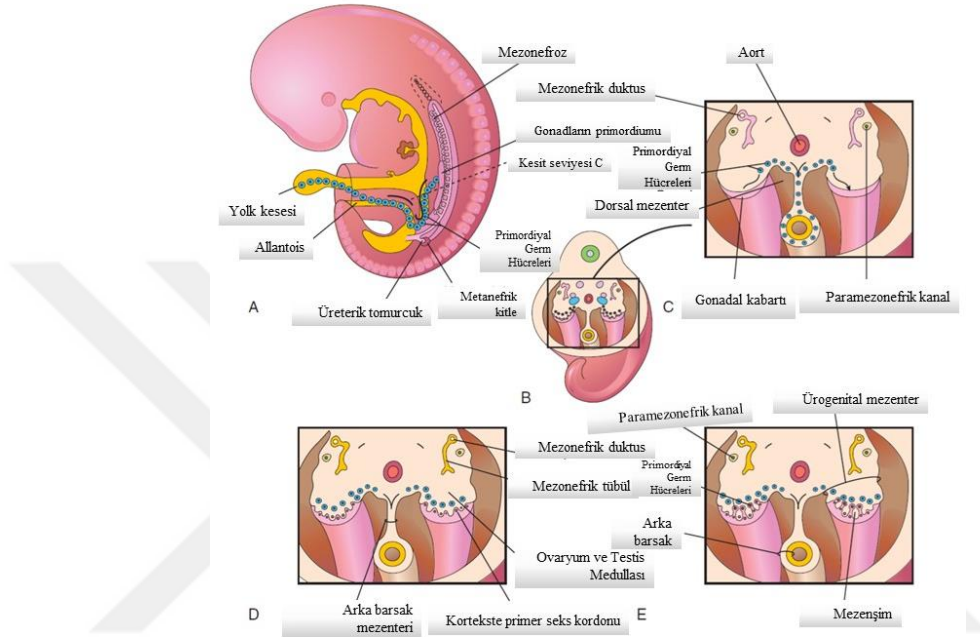
Şekil 3. Ovaryum histolojik kesitinin hematoksilin eozin boyaması. (Eroschenko 2013)

Ovaryumun merkezinde büyük ve kıvrımlı hilustan medullaya giren kan damarları, lenf damarları ve sinirleri içeren gevşek bağ dokusu ve intertisyel hücrelerden oluşan medullar bölge ya da medulla kısmı bulunmaktadır. Medullayı çevreleyerek ovaryumun periferinde yer alan korteks ya da diğer adı ile kortikal bölge ise selüler bağ dokusu içine gömülü içinde oositlerin bulunduğu ovaryum foliküllerini ve foliküllerin etrafındaki stromada dağınık düz kas liflerini içeren kısımdır (Şekil 3) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016)

2.2. OVARYUM EMBRİYOLOJİSİ

Dişi üreme hücreleri olan oogoniumlar, primordiyal germ hücrelerinin mitoz bölünmeleri sonucu oluşmaktadır (Kierszenbaum 2016). Primordiyal germ hücreleri, epiblasttan köken alarak, primitif çizgi boyunca göç eder ve üçüncü haftada yolk (vitellus) kesesine ulaşırlar (Şekil 4) (Kierszenbaum 2016; Sadler 2015). Bu büyük küre şeklindeki üreme hücreleri, allantoisten orjinlenen yolk kesesi (umbilikal kese)

endodermal hücreleri arasında dördüncü haftanın başlarında görülür (Moore ve ark. 2016).



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

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

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmalarından hemen önce ve ulaştıkları anda genital sırttaki epitel hücreleri proliferasyon olarak altlarındaki mezenşim içine gömülürler ve düzensiz olan primitif cinsiyet kordonlarını oluştururlar. Bu evredeki gonad, dişi ve erkekte ayırt edilemediği için farklılaşmamış gonad adını alır (Şekil 5) (Sadler 2015).

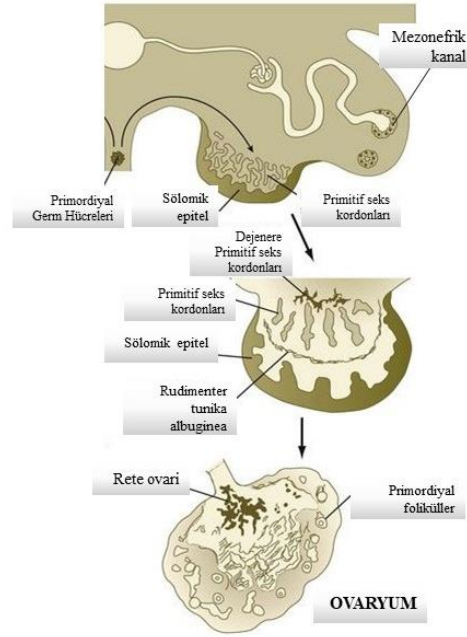
Gonadlar üç farklı yerden gelişmektedir;

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

2.2.1. Farklılaşmamış Gonadlar

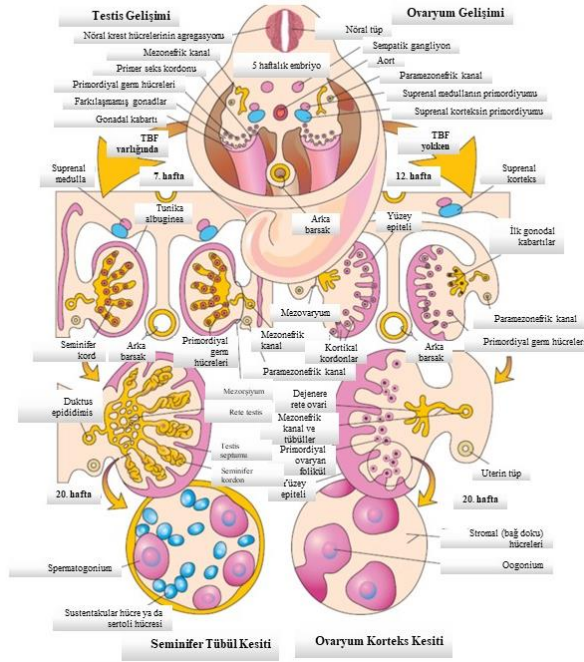
Gonadal gelişimin ilk safhaları, mezonefrozun medial kısmında gelişen mezoteldeki kalınlaşma beşinci haftada meydana gelir. Epitelin ve alttaki mezenşimin proliferasyonu gonadal sırtın mezonefrozunun medialinde bir çıkıntı olan primer seks kordonlarını oluşturur. Parmak benzeri epitel kordlar (gonadal kord) kısa sürede alttaki mezenşime doğru gelişir. Altıncı haftada primer hücre kordonlarındaki hücreler dejenerasyon olur ve yerlerini oogoniyumların etrafını çevreleyen sekonder seks kordonları alır (Şekil 4 ve 5) (Kierszenbaum 2016; Moore ve ark. 2016).

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



Şekil 5. Primordiyal germ hücrelerinin göçü ile ovaryum gelişim süreci. (Carlson 2009)

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

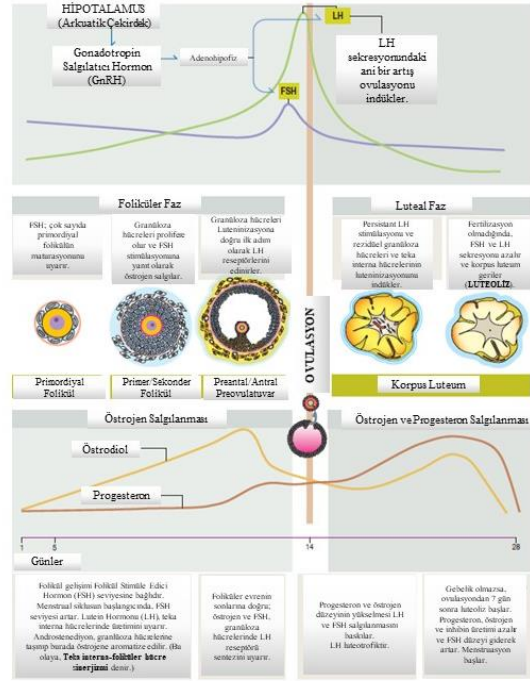


Şekil 6. Beş haftalık bir embriyoda farklılaşmamış gonadların ovaryum ya da testise farklılaşması şematize edilmiştir. Solda testis belirleyici faktörün (TBF) varlığında testis gelişimi gösterilmektedir. Sağda ise TBF yokluğunda ovaryum gelişimi gösterilmektedir. (Moore ve ark. 2016)

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

2.3. OVARYAN SIKLUS

Ovaryan siklus, foliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre olmak üzere üç evreden oluşmaktadır. Foliküler evrede gonadotropik hormonların etkisiyle primordiyal foliküllerden olgun graaf folikülleri gelişir (Şekil 7) (Kierszenbaum 2016).

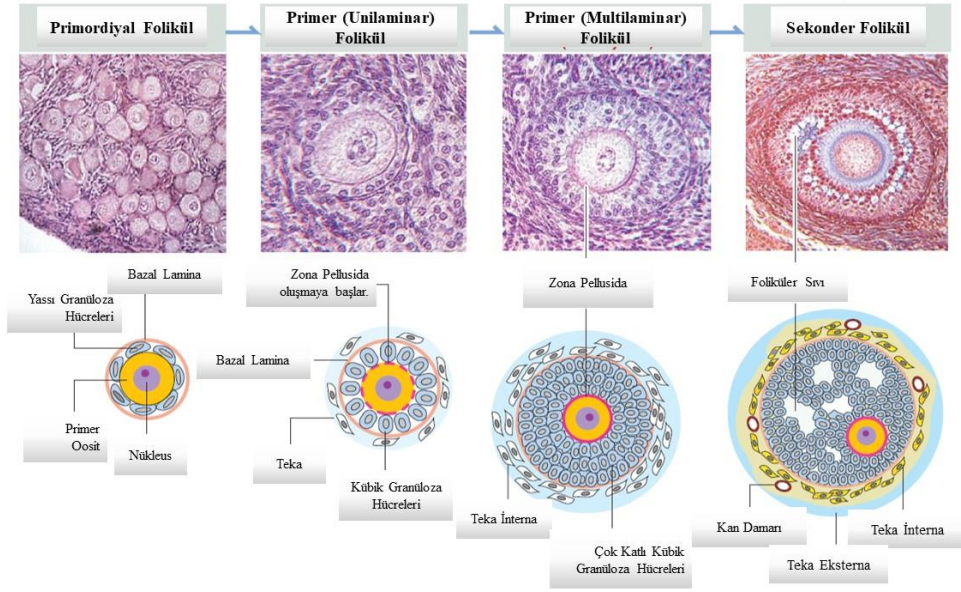


Şekil 7. Ovaryan siklus. (Kierszenbaum 2016)

2.3.1. Folikül Gelişimi

Ovaryumun medullar kısmında gömülü olarak görülen ovaryum folikülleri gelişim evrelerine göre histolojik olarak üç tiptir:

1. Primordiyal Foliküller
2. Primer Foliküller
 - a. Tek Tabakalı Primer Foliküller
 - b. Çok Tabakalı Primer Foliküller
3. Sekonder Foliküller
4. Olgun ya da Graaf Foliküller (Şekil 9) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016)

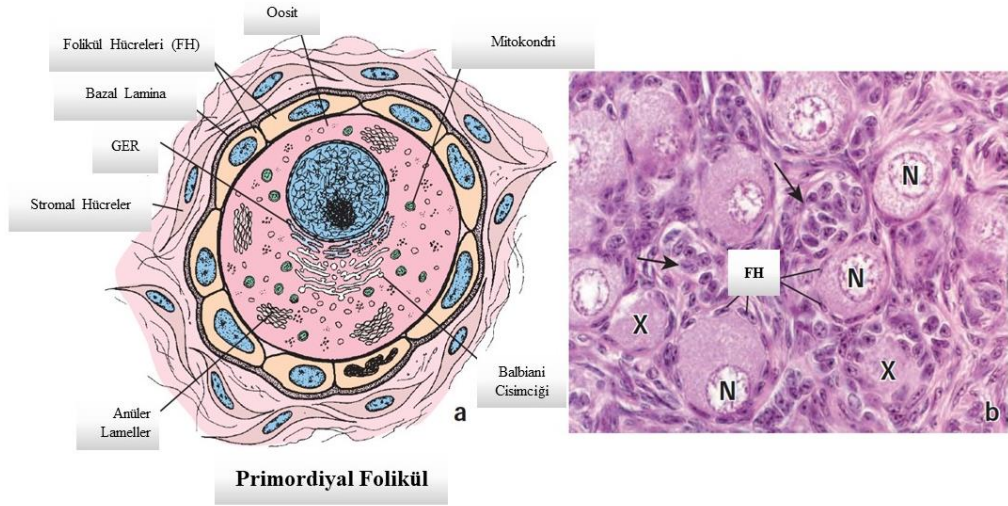


Şekil 8. Folikülogenez ile primordiyal folikülün matürasyonu. (Kierszenbaum 2016)

2.3.1.1. Primordiyal Foliküller

Erken gelişimleri gonadotropin stimülasyonundan bağımsız bir şekilde ilk olarak fetal dönemin üçüncü haftasında ortaya çıkan primordiyal foliküller olgun ovaryumlarda tunika albugineanın hemen altında korteks stromasında en çok yer alan folikül tipidir. (Şekil 8 ve 9) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

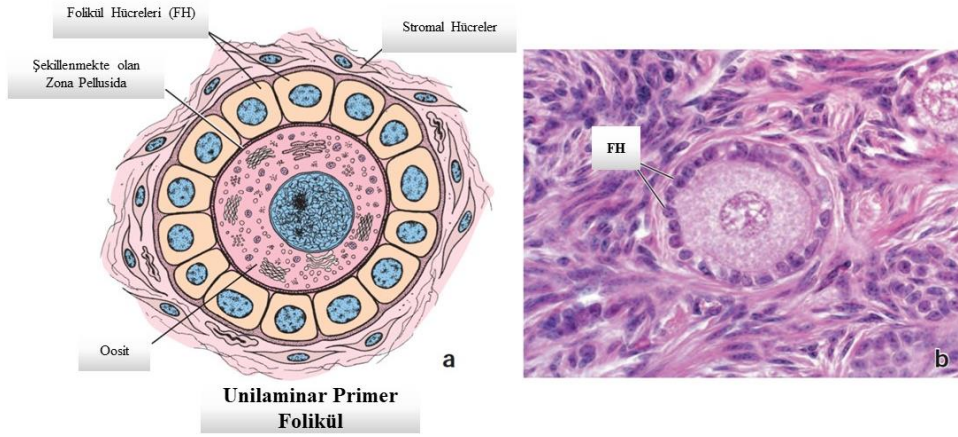
Oositin etrafını dış yüzeyi bazal lamina ile sınırlandırılmış yassı folikül hücreler tek bir tabaka halinde çevreler. Oosit yaklaşık 30µm çapındadır ve ince büyük eksantrik bir nükleus ve ooplazma olarak adlandırılan golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulumun, birçok mitokondriyonun ve lizozomların oluşturduğu bir küme olan Balbiani cisimciği içeren bir sitoplazmaya sahiptir (Şekil 9) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



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

2.3.1.2. Primer Foliküller

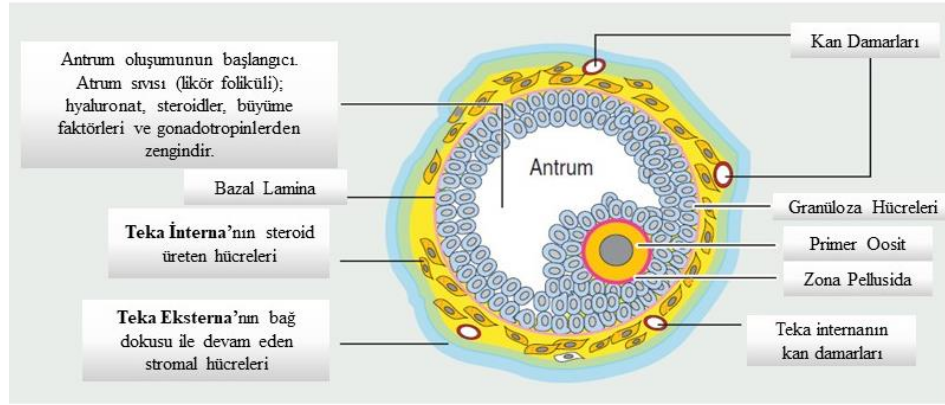
Primordiyal foliküller gelişirken, ilk olarak oosit büyür, oositi çevreleyen yassı folikül hücreleri proliferasyon olarak kübik şekil alırlar. Tek tabakalı kübik folikül hücreleriyle çevrili primer oosite sahip folikül tek tabakalı (unilaminar) primer folikül adını alır (Şekil 10) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



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

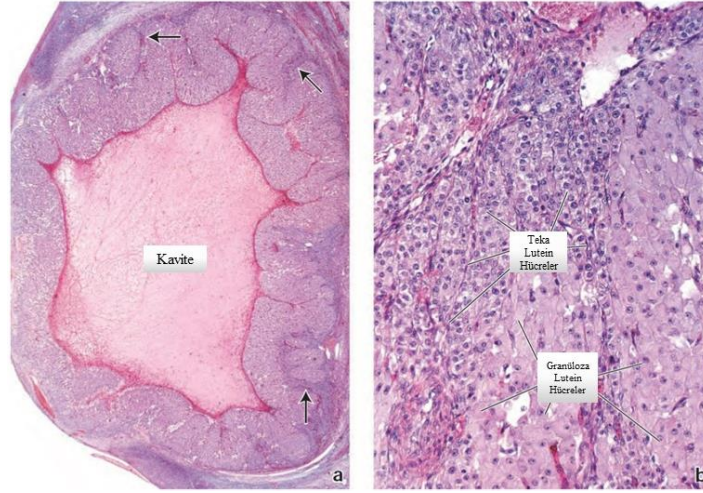
Oosit büyüdükçe oosit tarafından salgılanan özel proteinler bir araya gelerek oosit ile folikül hücreleri arasında ekstrasellüler bir örtü olan zona pellusida'yı meydana getirir (Şekil 10). Zona pellusida, foliküler hücreleri oositten ayırır. Foliküler hücreler ince sitoplazmik uzantıları ile zona pellusidayı deler ve oositin mikrovillusları ile temas geçer. Temas noktalarında oluklu bağlantılar bulunur. İnsandaki zona pellusida, sülfatlı üç asidik zona pellusida glikoprotein sınıfından meydana gelmektedir (ZP-1, ZP-2, ZP-3). Bu sınıfın en önemli üyesi spermatozoa-bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyonu indükleyicisi olan ZP-3'tür. ZP-2 sekonder spermatozoa-bağlanma reseptörü olarak davrandığına inanılmakta, ZP-1'in fonksiyonu henüz bilinmemektedir (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

Oositi çevreleyen tek tabakalı folikül hücreleri hızlı mitotik proliferasyon ile oositi çevreleyen çok katlı epitel bir tabaka olan stratum granulozumu oluştururlar. Bu evrede artık folikül çok tabakalı (unilaminar) primer folikül olarak tanımlanır. Folikül hücreleri de granüloza hücreleri adını alır. Testisteki sertoli hücrelerinin aksine, granüloza hücrelerinin bazal tabakalarının karmaşık sıkı bağlantılara sahip değildir ve bu durum kan-folikül bariyerinin bulunmadığını göstermektedir (Şekil 11) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



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

Teka internanın tamamen farklılaşmamış hücrelerinin ince yapısı steroid üreten hücrelerin özelliklerine sahiptir ve çok sayıda Luteinizan Hormon (LH) reseptörleri vardır. LH stimülasyonuna yanıt olarak östrojen prekürsörleri olan androjenleri sentezler ve salgırlar. Foliküler hücreler östrojenlerin doğrudan üretimi için gerekli enzimlere sahip değildir. Bu yüzden folikülogenez sırasında steroid prekürsörlerini üretemezler. Teka internanın hücreleri bir androjen prekürsörü olan androstenediyonu salgırlar. Androstenediyon, testosteron üretimi için folikül hücrelerine taşınır ve daha sonra testosteron, aromataz tarafından östradiyole çevrilir. Teka hücrelerinin androstenediyon üretimi LH tarafından düzenlenir (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



Şekil 13. İnsan Korpus Luteum histolojik kesiti (a) Granüloza ve teka hücrelerini içeren kollabe olmuş folikül duvarı. Foliküler kavite (Kav) granüloza lutein hücrelerini, katlantılar teka interna hücrelerini (oklar) oluşturur (b) Daha büyük büyütmede teka ve granüloza lutein hücreleri (Ross ve Pawlina 2016)

Teka interna salgı hücrelerine ek olarak fibroblastlar, kollajen demetleri ve endokrin organların tipik özelliği olan zengin küçük damar ağına sahiptir. Teka interna ile granüloza hücreleri arasındaki kesin bir sınır oluşturmeyen bazal lamina, folikül geliştikçe avasküler granüloza hücre tabakası ile teka internanın zengin kapiller yatağını birbirinden ayırır (Şekil 13) (Ross ve Pawlina 2016).

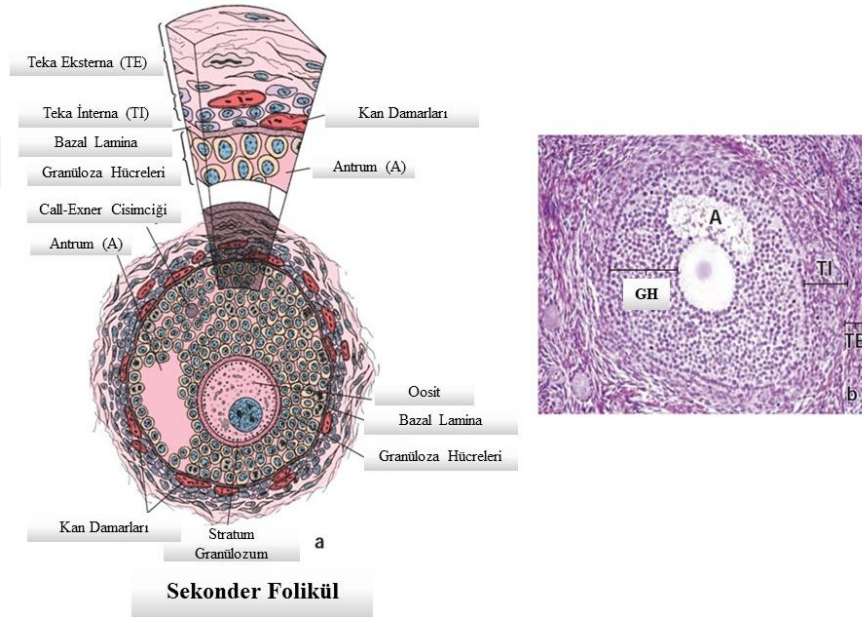
Oosit matürasyonu primer folikülde gerçekleşir. Oosit geliştikçe organellerin dağılımı değişime uğrar. Golgi aygıtı sitoplazmaya dağılır, serbest ribozomların, mitokondrilerin, küçük ve multiveziküllerin sayısı ve granüllü endoplazmik retikulum sayısı artar. Oositler kortikal granül denilen oolemmmanın hemen altında yer alan, ovum sperm tarafından aktive edildiğinde ekzositoz ile serbestleşen proteazları içeren özelleşmiş salgı granüllerine sahiptir (Şekil 11) (Ross ve Pawlina 2016).

Oosit ile onu çevreleyen granüloza hücreleri arasında zona pellusidanın biriktiği, oositin çok sayıda mikrovillusun uzandığı, aynı zamanda granüloza hücrelerinde ince uzantılarının oosite doğru uzandığı perivitellin aralık bulunur. Granüloza hücrelerinin uzantıları oositin mikrovillusları ile iç içe girerken bazıları da plazma

membranının içine doğru invajine olurlar ancak plazma membranı ile temas etseler de hücreler arasında sitoplazmik devamlılık sağlamazlar (Ross ve Pawlina 2016).

2.3.1.3.Sekonder Folikül

Granüloza hücreleri tarafından salgılanan, hyaluronan ve proteoglikan içeren Call-Exner cisimcikleri foliküler hücreler arasında, küçük hücreler arası boşluklarda bulunan, koyu boyanan PAS pozitif ekstrasellüler materyallerdir. Stratum granulozum 6-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştığında, granüloza hücreleri arasında sıvı dolu kaviteler oluşmaya başlar ve granüloza hücreleri arasında likör folikülü denilen ve hyaluronanca zengin sıvı biriktikçe kaviteler birleşir. En sonunda oluşturdukları hilal şeklindeki tek kavite antrum, folikül ise sekonder folikül adını alır. (Şekil 14) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

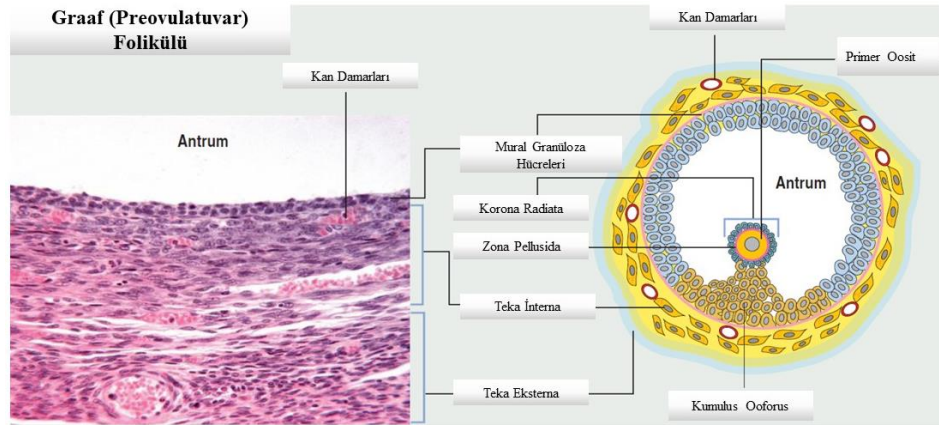


Şekil 14. Sekonder folikül histolojik ve şematik gösterimi. (Ross ve Pawlina 2016)

Oosit ve folikülerin gelişimi için Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH), büyüme faktörleri (EGF, IGF-1 gibi) ve kalsiyum iyonları gereklidir. Zona pellusida ile çevrelenmiş eksantrik yerleşimli 125µm çapındaki primer oositin daha fazla büyümesini ve mayotik profazı tamamlamasını engellemek için büyümenin

inhibisyonu küçük bir peptit olan Oosit Matürasyon Inhibitörü (OMI) granüloza hücreleri tarafından antral sıvıya salınır, oosite oluklu bağlantılar aracılığıyla ulaşır. Sekonder folikül ile OMI konsantrasyonu arasında bulunan direkt korelasyonun varlığından dolayı konsantrasyon küçük foliküllerde en yüksek iken olgun foliküllerde ise en düşüktür. Sıvının ilk ortaya çıktığı erken sekonder folikülde çapı 0.2 mm olan folikül büyüyerek 10 mm'ye hatta daha fazlasına ulaşır (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

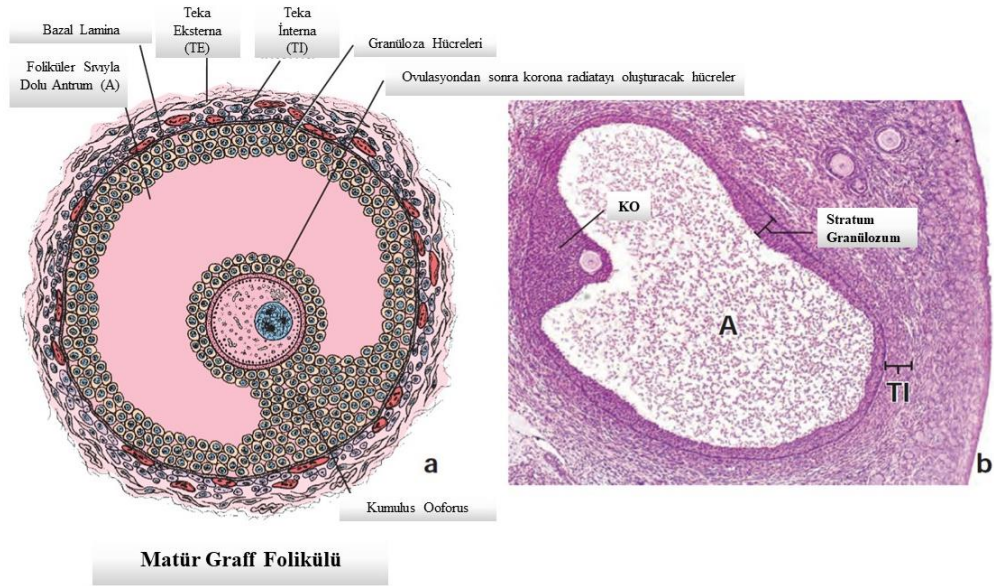
Sekonder folikülün boyutu arttıkça antrum genişler. Stratum granülozumun oosit ile ilişkili olduğu bölgede antruma doğru çıkıntı yapan bir tümsek oluşturan granüloza hücrelerine kumulus ooforus adı verilir. Oositin hemen etrafını çevreleyen ve ovulasyonda oosit ile birlikte kalan kumulus ooforus hücrelerine ise korona radiata denmektedir (Şekil 15). Korona radiatayı oluşturan kumulus hücrelerinin mikrovillusları, zona pellusidayı penetre ederek oluklu bağlantılar aracılığıyla oosit mikrovillusları ile iletişime geçerler. Foliküler matürasyon sırasında granüloza hücrelerinin yüzey mikrovilluslarının sayısının artması serbest antral yüzeydeki LH reseptörlerinin sayısının artışı ile ilişkilidir (Ross ve Pawlina 2016).



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

2.3.1.4.Graaf Folikülü

En büyük folikül olan graaf folikülünün çapı 10-20 mm çapında olup büyük bir antrum ve matür sekonder oositi içermektedir. Ovaryum korteksi boyunca uzanarak ovaryumun yüzeyinde çıkıntı oluşturur. Folikül maksimum boyutuna yaklaşırken granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Antrumun boyutu arttıkça stratum granulozum tabakası incilir. Granüloza hücrelerinin arasındaki boşluk genişlemeye devam ettikçe oosit ve kumulus hücreleri ile geri kalan granüloza hücreleri arasındaki yakınlık gevşer ve ovulasyona hazırlanır. Oositin hemen çevresindeki kumulus hücreleri korono radiatanın tek tabakasını oluşturur. Bu hücreler ve onlara gevşekçe bağlanan kumulus hücreleri ovulasyonda oositle atılır. Bu esnada teka hücreleri daha belirgin hale gelir. Teka interna hücrelerinin sitoplazmalarında lipid damlacıkları ortaya çıkar ve hücreler steroid üreten hücrelerle aynı ince yapısal özellikleri gösterirler (Şekil 15 ve 16) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina2016).



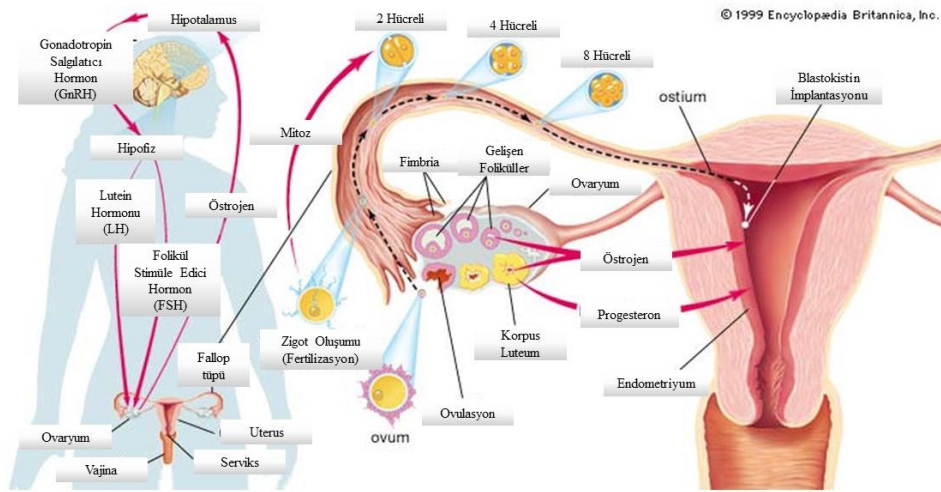
Şekil 16. Matür graaf folikülün histolojik (a) ve şematik (b) gösterimi. (Ross ve Pawlina 2016)

İnsanda LH, teka internayı östrojen prekürsörü olan androjen salgılamak üzere stimüle eder. Bazı androjenler granüloza hücrelerinin granülsüz endoplazmik

retikulumlarına taşınır ve FSH'a yanıt olarak, granüloza hücreleri androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizler. Östrojenler granüloza hücrelerini, proliferatör olup folikül büyümesi için stimüle eder. Foliküler ve sistemik kaynaklardan gelerek artan östrojen düzeyleri, gonadotropin salıverici hormona duyarlılıklarındaki artışla ilişkilidir. Ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce adenohipofizde FSH ya da LH salıverilmesinde ani bir artış görülür. LH'nin ani artışına yanıt olarak granüloza hücrelerindeki LH reseptörleri azalır ve granüloza hücreleri LH'a yanıt olarak östrojen üretmezler. Primer oositin birinci mayotik bölünmesi tamamlanır. Bu olay LH'nin ani artışından 12-24 saat sonra gerçekleşir ve sekonder oosit ile birinci polar cisim oluşumu ve oosit ile zona pellusida arasındaki perivitellin aralığa atılması ile sonuçlanır. Granüloza ve teka hücreleri daha sonra lutenizasyona uğrarlar ve progesteron üretirler (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

2.3.2.Ovulasyon

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



Şekil 17. Endokrin hormonların kontrolünde süren ovaryan siklus ve ovulasyon aşamasının gösterimi. <https://2nlsnb2fe1ed2nm0us28io0z-wpengine.netdna-ssl.com/wp-content/uploads/2015/08/ovulation1.jpg> Erişim Tarihi: 09.02.2018

LH düzeyinin artması sonucu uyarılan teka eksterna ve tunika albuginea içindeki proteolitik aktivite, olgun folikülün yırtılmasını kolaylaştırır. 28 günlük bir menstrual siklusun 14. gününde, sekonder oositin atılmasından hormonal değişiklikler ve enzimatik etkiler kombinasyonu sorumludur (Şekil 7 ve 17) (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).

Bu faktörler:

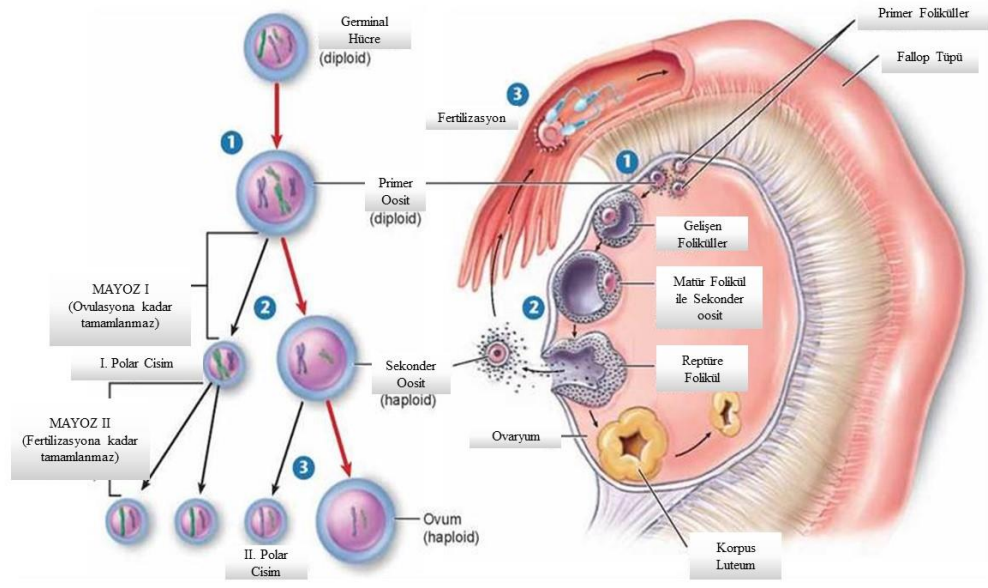
- Foliküler sıvının hacminin ve basıncının artması
- Folikül duvarının aktive plazminojen tarafından enzimatik proteolizisi
- Oosit-kumulus kompleksi ile stratum granulozum arasında hormonal yönlendirmeyeyle glikozaminoglikanların biriktirilmesi
- Teka eksterna tabakasındaki düz kas liflerinin prostaglandinler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

Ovulasyondan hemen önce folikül çıkıntısının üzerindeki ovaryan yüzeyin küçük bir alanında kan akışı durur, germinal epitelin foliküler stigma bölümü yükselir ve

sonra reptüre olur. Korono radiata ve kumulus ooforus hücreleri tarafından çevrelenmiş olan oosit reptüre olan folikülden atılır. Ovulasyonda kumulus kütlesi tuba uterinanın fimbriaları tarafında abdominal ostiumuna doğru süpürülür. Kumulus kütlesi tuba uterinayı döşeyen silyumlu hücreler tarafından aktif bir şekilde taşınarak peritoneal boşluğa geçişi engellenir (Şekil 17) (Ross ve Pawlina 2016).

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

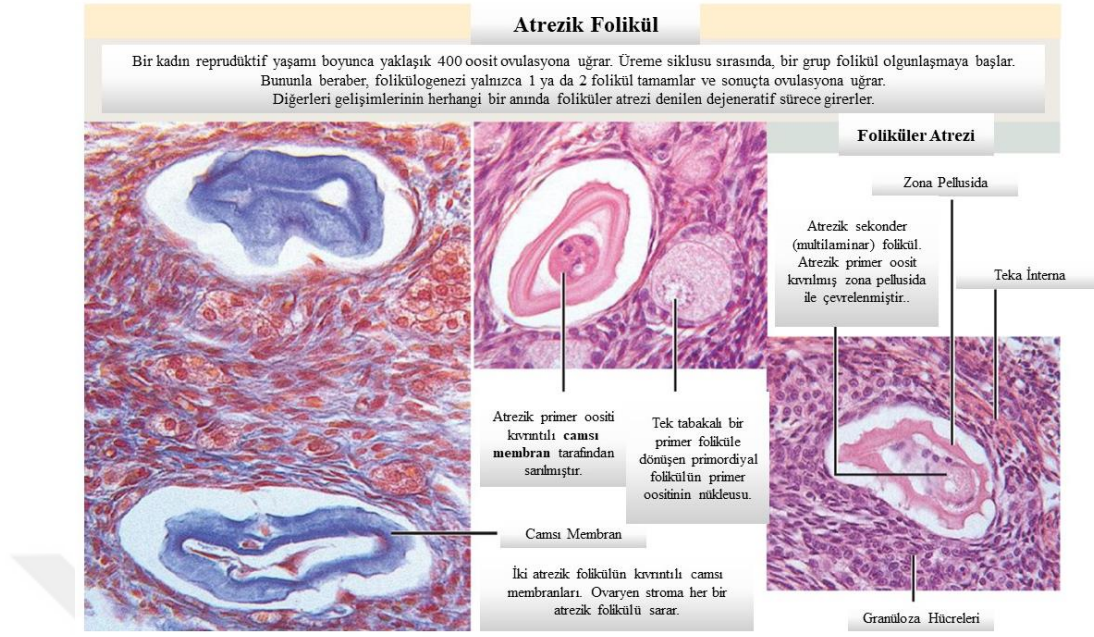
Primordiyal foliküller içindeki primer oositler birinci mayotik bölünmenin diploten evresinde areste uğrar. Ovulasyondan hemen önce birinci mayoz bölünmeyi tamamlayarak sekonder oositi oluşturur. Birinci mayoz bölünme sırasında oluşan kardeş hücreler eşit miktarda sitoplazma içerir ancak biri daha fazla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



Şekil 18. Oosit matürasyonunda mayoz bölünmeler sonucunda birinci ve ikinci polar cisim oluşumu. <http://schoolbag.info/biology/living/living.files/image906.jpg> Erişim Tarihi: 09.02.2018

2.4.FOLİKÜLER ATREZİ

Doğumda overlerde bulunan yaklaşık 2 milyon primer oositin sadece 40.000'i puberteye kadar hayatta kalır. Pubertede bu sayı yaklaşık 400'e (her menstrual siklus için bir folikül) iner (Carlson 2014; Kierszenbaum 2016). Puberteden sonra foliküller her menstrual siklusa olgunlaşmaya başlar ve normalde sadece bir folikül olgunlaşmasını tamamlar. Ovaryum foliküllerinin çoğu granüloza hücrelerinin apoptozunun aracılık ettiği ovaryan foliküler atrezi ile kaybedilir. Foliküler atrezi sürecinde görülen hücre ölüm tiplerinden biri olan apoptoz, inflamatuvar bir yanıt oluşturmadan follikülün gerilemesini sağlamaktadır. Foliküller gelişimlerinin herhangi bir evresinde atreziye uğrayabilirler yani foliküler atrezi hem fetal dönemdeki hem de postnatal dönemdeki ovaryumlarda gözlenebilir (Kierszenbaum 2016; Ross ve Pawlina 2016).



Şekil 20. Atrezik foliküllerin histolojik görünümü. (Kierszenbaum 2016)

Gelişmekte olan büyük foliküllerin atrezisi sırasında matür oositin dejenerasyonu gecikir. Bu dejenerasyon, folikül duvarındaki dejeneratif değişikliklere sekonder olarak gerçekleşiyor gibi görünmektedir. Bu gecikme, oosit olgunluğa ve yeterliliğe erişmişse, granuloza hücrelerinde atreziyi başlatan stimuluslara artık duyarlı olmadığını göstermektedir. Foliküler değişimler:

- Granuloza hücrelerinde endonükleazların ve diğer hidrolitik enzimlerin ekspresyonu ve mitoz bölünmenin durması ile granuloza hücrelerinde apoptozun başlaması

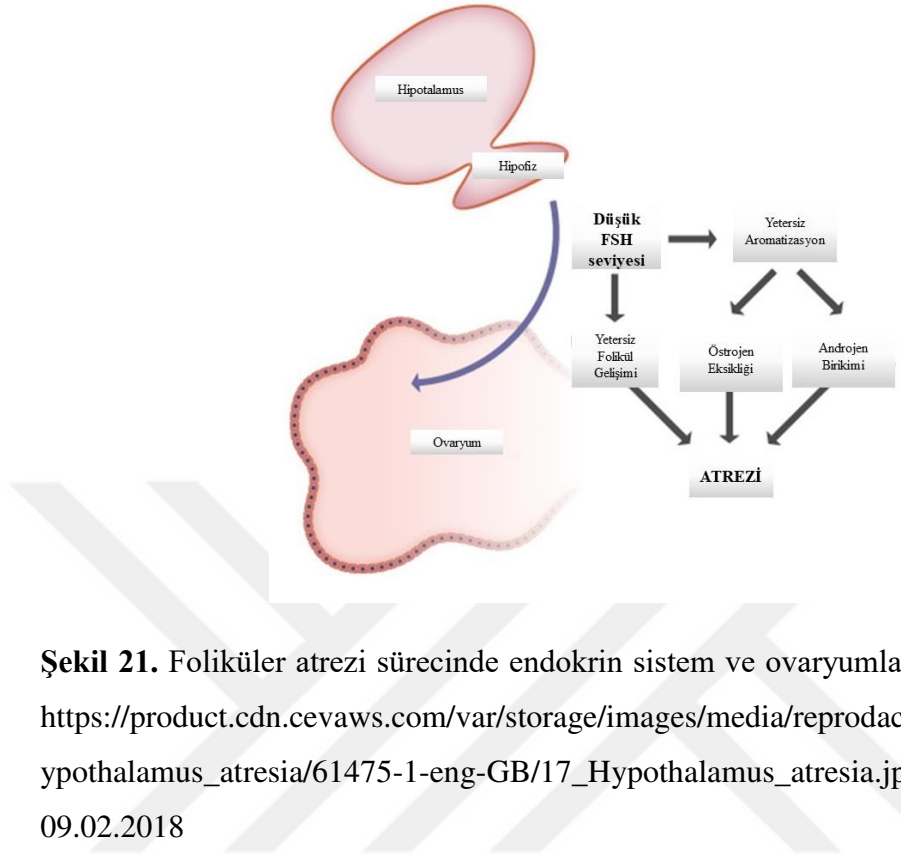
- Granuloza tabakasının nötrofil ve makrofajlar tarafından invazyonu
- Granuloza tabakasının vaskülarize bağ dokusu kordonları tarafından invazyonu
- Granuloza hücrelerinin folikülün antrumuna dökülmesi
- Teka interna hücrelerinin hipertrofisi
- Dejenerasyon devam ettikçe folikülün kollapsı
- Folikülün kavitesine bağ dokusunun invazyonu (Ross ve Pawlina 2016)

Atrezik foliküller, camsı membran denilen kalın, kıvrılmış mebranöz materyal, çok fazla değişikliğe uğramamış zona pellusida, dejenere olmuş oosit ve folikül

hücrelerinin kalıntıları ve istila eden makrofajlar ile ayırt edilir (Şekil 20) (Kierszenbaum 2006).

Oositin dejenerasyonu ve otolizi sonucu oluşan kalıntılar, invazyon yapan makrofajlar tarafından fagosit edilir. Sülfatlı asidik glikoproteinlerden meydana gelen zona pellusida hücre içi otolitik değişimlere dayanıklı olduğu için katlanır ve kollabe olur. Bağ dokusundaki makrofaj hücreleri zona pellusidanın ve dejenere hücrelerin kalıntılarının fagositozundan sorumludurlar. Teka interna ve folikül hücreleri arasındaki bazal membran folikül hücrelerinden ayrılabilir ve kalınlığı artarak camısı membran adını alan dalgalı hyalin tabakayı oluşturur. Bu yapı atrezinin geç evresindeki foliküller için karakterizedir (Şekil 20) (Ross ve Pawlina 2016).

Birçok folikül folikülogenez sürecine girerken genellikle sadece bir tanesinin ovulasyon sürecine girmesinin nedeni; fertilizasyon için en uygun kalitede oosit içeren canlı foliküllerin reproduktif süreçte etkin rol oynamasını sağlamaktır. Bunun yanında çok sayıda atrezik folikül streoidojenik aktiviteyi koruyarak overde implantasyon için endometriyumu hazırlayan endokrin fonksiyonlara katkıda bulunur (Şekil 21). Klinik bir perspektiften bakıldığında foliküler atrezi infertiliteye yol açan iki patolojik menapoz benzeri olay ile (prematüre ovaryan yetmezlik ve polikistik over sendromu) ilişkilidir (Kierszenbaum 2016).



Şekil 21. Foliküler atrezi sürecinde endokrin sistem ve ovaryumlar arasındaki ilişki. https://product.cdn.cevaws.com/var/storage/images/media/reproduction/images/17_hypothalamus_atresia/61475-1-eng-GB/17_Hypothalamus_atresia.jpg Erişim Tarihi: 09.02.2018

2.5.PREMATÜRE OVARYAN YETMEZLİK

Hipergonadotropik hipogonadizm; ovaryan fonksiyonlarında azalma ya da bitme (hipogonadizm) ve seks steroidlerinin negatif geri bildiriminin (feedback) olmaması ile FSH ve LH gibi gonadotropinlerin serum seviyelerinin yüksek olması (hipergonadotropik) olarak tarif edilir. Primer over ve hipotalamik ile hipofiz fonksiyon bozuklukları hastalık kategorisindedir. Aynı zamanda prematüre menapoz veya prematüre ovaryan yetmezlik olarak da adlandırılmaktadır (Dang ve ark. 2015; Hoffman ve ark. 2016).

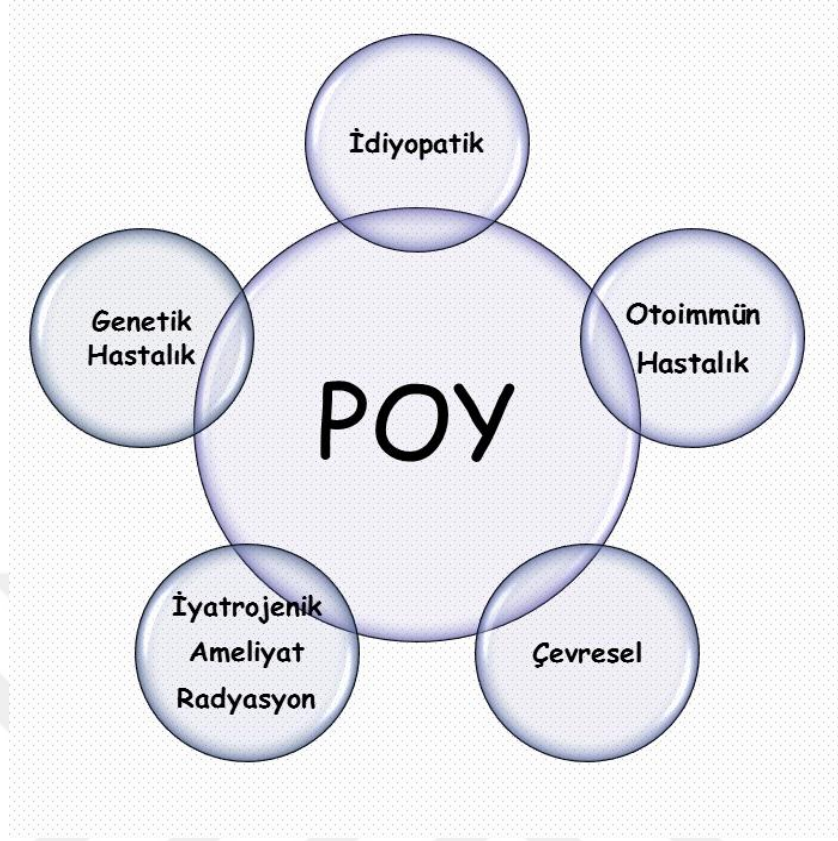
Prematüre ovaryan yetmezlik; kadınlarda 40 yaşından önce, en az dört aylık amenore öyküsü, hipergonadotropik serum profili (folikül stimüle edici hormon (FSH) seviyeleri $\geq$ mililitrede 40 mIU), düşük östrojen seviyesi ($E2 < 91750$ pmol/ml), matür folikül eksikliği gibi semptomlarla ifade edilen, ölümcül olmayan ancak kadın

infertilitesinin yaygın sebeplerinden olan bir hastalıktır (Dang ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2016; Ilhan ve ark. 2016; Xiong ve ark. 2017). Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Topluluğu (ESHRE), prematüre ovaryan yetmezliği; en az 4 ay oligo/amenore ve yüksek FSH düzeyinin 4 haftadan fazla aralıklarla >25IU/I olarak tanımlamıştır (Vabre ve ark. 2017).

Hastalığın ayırt edici tanısı normal menapoz sürecinde ortaya çıkan ovaryan fonksiyonların fizyolojik kaybıdır. Prematüre ovaryan yetmezlik insidansı, 30 yaşından önce 1000 kadında 1, 35 yaşından önce 250 kadında 1, 40 yaşından önce 100 kadında 1'dir ve %10-28 primer amenore, %4-18 sekonder amenore görülmektedir. Tanı ve etkili tedavi, hastanın psikolojik, kardiyovasküler, kemik ve cinsel sağlığı üzerinde önemli etkilere sahip olabileceğinden, dikkatli bir değerlendirme zorunludur. Klinik muayenede; hipoöstrojenizm, hipergonadotropizm, gelişen foliküllerin eksikliği ve kısmi foliküler olgunlaşma gibi prematüre ovaryan yetmezliğin klasik semptomları görülmektedir. Over dokusunun histopatolojik incelemelerinde önemli ölçüde atrofi ve fibrozis, belirgin foliküler atrezi ve normal foliküler evrelerin (primordiyal folikül, antral folikül, kumulus ooforus ve matür oosit içeren) yokluğu ortaya çıkmaktadır (Dang ve ark. 2015; Hoffman ve ark. 2016; Liu ve ark. 2016b; Zhang ve ark. 2016; Kristensen ve Andersen 2018; Zhang D ve ark. 2018).

40 yaşın altındaki kadınların %1'inin maruz kaldığı prematüre ovaryan yetmezlik; doğurganlıkta bir düşüşe ve ciddi vakalara sebep olmasından dolayı genç kadınlarda endişeye sebep olan ve yaşam kalitelerini olumsuz yönde etkileyen bir hastalık olup etiyolojisi halen net olarak bilinmemektedir (Zhang ve ark. 2016; Zhang ve ark. 2017a; Zhang ve ark. 2017b; Vabre ve ark. 2017).

Prematüre ovaryan yetmezlik için çeşitli etiyolojiler öne sürülmüştür; anormal otoimmün reaksiyonlar, fizyolojik faktörler, ekzojen maddeler, enfeksiyonlar, kemoterapi gibi tıbbi tedaviler ve bilateral ooforektomi gibi cerrahi müdahaleler ile ilişkili bilateral ooforektomi ile ilişkili olabileceği gibi genetik problemler ve çevresel faktörlerin de hastalığa yol açabileceği düşünülse de vakaların çoğu idiyopatikdir (Şekil 22) (Ilhan ve ark. 2016; Zhang ve ark. 2016; Zhang ve ark. 2017a; Zhang ve ark. 2017b).



Şekil 22. Prematüre ovaryan yetmezliğin nedenleri.

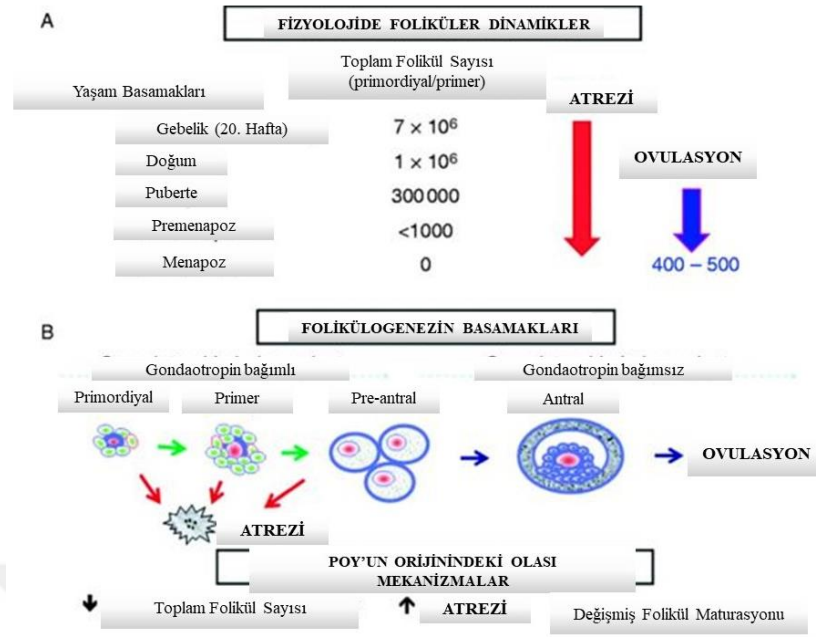
Multifaktöriyel bir hastalık olmasının yanında nedenleri son derece heterojeniktir ve tanı konulan kadınların %75'inden fazlasının nedeni belirlenememiştir; genetik, iyatrojenik, immünolojik, metabolik ve infeksiyöz sebepler rapor edilmiştir (Luo ve ark 2017; Vabre ve ark. 2017).

Varbe ve ark. 2017'deki çalışmalarına göre; prematüre ovaryan yetmezliğe neden olabilen dört ana mekanizma tanımlamışlardır;

1. Dinlenme evresindeki primordiyal folikül havuzunun tükenmesi (gerek yapılarında oluşan bozukluklardan dolayı gerekse zamanla artan atrezi kaynaklı)
2. Foliküler atrezinin artışı
3. Primordiyal foliküllerin aktivasyonundaki artış ve
4. Antral evrelerden önce ovulasyonu önleyen bir folikülogenez blokajı

Prematüre ovaryan yetmezliğin oluşum mekanizması yine de kesin olarak bilinmemektedir. Ancak; over granüloza hücrelerinin durumu ve kalitesi ile yakından ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ovaryan granüloza hücreleri oositlerin olgunlaşması ve gelişmesinde destekleyici ve östrojen aracılı bir düzenleyici olarak rol oynarlar, otokrin ve parakrin mekanizmalar yoluyla oosit olgunlaşmasını teşvik etmek için over nişinde hormonal denge sağlarlar. Over granüloza hücrelerinin senesensi ve belli bir derecede apoptoza girdiklerinde over atrezisinin uyarılmasıyla rezervlerindeki düşüş ve fonksiyon azalması, over fonksiyonundaki erken yetersizlik ve folikül havuzunda devam eden büyük orandaki azalmaların prematüre ovaryan yetmezliğe yol açtığı bilinmektedir. Bu nedenle, over fonksiyonu, oosit canlılığını korumak ve normal ovulasyonu sağlamak için yüksek kaliteli ovaryan granüloza hücrelerine ihtiyaç vardır (Şekil 23) (Liu ve ark. 2016a; Xiong ve ark. 2017).

Bunun yanında over fonksiyonu karmaşık bir gonadotropin kompleksi ve lokal ovaryan faktörler tarafından kusursuz bir şekilde düzenlenmektedir. FSH hipofiz bezinin anterior kısmı tarafından salgılanan bir glikoprotein polipeptid hormondur ve granüloza hücrelerinin östrojen üretimini uyarır, antral foliküllerin gelişimini destekler ve preovulatuvar foliküllerin dominansını ve seçimini belirler. Yapılan çalışmalar FSH'nın granüloza hücre ölümünü önleyerek antral folikül sağlığını korumada kritik bir rol oynadığını öne sürmektedir. Granüloza hücrelerinin apoptozu geleneksel olarak foliküler atrezinin ayırıcı özelliği olarak değerlendirilmektedir (Şekil 23) (Shen ve ark. 2016).



Şekil 23. Prenatal ve postnatal dönemde folikülogenez sürecinde folikül kaybı nedenleri ile Prematüre ovaryan yetmezlik ilişkisi. <https://medicalfoxx.com/wp-content/uploads/2016/01/premature-ovarian-failure-pathology.jpg> Erişim Tarihi: 09.02.2018

Prematüre ovaryan yetmezlik adına ideal bir önlem ve tedavi yöntemi geliştirilmesi adına birçok çalışma yapılmaktadır. Bunlardan en yaygın olanları in vivo hayvan modellerinin oluşturulmasıdır. İdeal bir model oluşumunun başarısı; hastalığın klinik bulguları olan hormon değişiklikleri, over folikül matürasyonundaki aksaklıklar ve hasarlı over oluşumu gibi standartlara dayanmakta, aynı zamanda bu bulguların hayvan modelinde kısa zamanda simüle edilebilmesini gerektirmektedir. Bununla ilgili çalışmalarda insandaki prematüre ovaryan yetmezlik ile karşılaştırılabilen fenotip sergileyen bazı mutant fare modelleri ile çalışmalar yapılmaktadır (Lai ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2016; Luo ve ark 2017).

Özellikle 40 yaşın altında kemoterapi veya radyasyona maruz kalan kadınlar, sıklıkla reproduktif hasara uğramaktadırlar. Bu hasar sıklıkla prematüre ovaryan yetmezlik ve ovaryan germ hücrelerinin toksisitesi ile ilişkilendirilmektedir. Tüm kemoterapötik ilaç sınıflarından en fazla prematüre ovaryan yetmezlik riski taşıyan

alkilleyici ajan olan siklofosamid, yaygın olarak kanser tedavisinde kullanılmakta ve sitotoksik etkisi ile overlerde foliküler atreziyi tetikleyerek prematüre ovaryan yetmezliğe yol açmaktadır. Bu nedenle farelerle oluşturulan hastalık modellerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Lai ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2016; Luo ve ark. 2017).

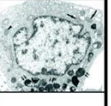
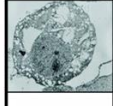
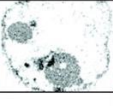
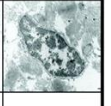
2.6.HÜCRE ÖLÜMÜ

Embriyonik dönemden itibaren yaşam boyu hücreler proliferasyon, farklılaşma ve ölüm süreçlerine maruz kalmaktadırlar. Bu şekilde erişkin dokular meydana gelirken aynı zamanda hücre ölümü ile kaybedilen hücrelerin yerine yenisinin gelmesiyle homeostaz sağlanmaktadır. Hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasında sürekli bir denge vardır. Bu iki yaşamsal olayın arasındaki oran net hücre miktarını belirlemektedir. Bu oranda herhangi bir anormallik olması hücrelerin kontrolsüz çoğalması (örneğin; hiperplazi, kanser, otoimmün bozukluklar) ya da hücre kaybına (otofaji, dejeneratif bozukluklar, AIDS, iskemik hasara) neden olabilir. Bu yüzden hücre proliferasyonu ve hücre ölümü arasındaki denge dikkatli bir şekilde korunmalıdır (Cooper ve Hausman 2015; Ross ve Pawlina 2016).

Carl Vogt tarafından ilk kez 1842 yılında rapor edilen hücre ölümü, geri dönüşümsüz bir olay olarak tanımlanmıştır. Hücre ölümü, homeostazın sağlanması ve hastalıklardan korunma adına geliştirilen bir mekanizma olup birçok moleküler yolağı içermektedir. Aktif ya da programlı hücre ölümü, çok hücreli organizmalarda homeostazın korunması, potansiyel hasarlı ya da enfekte hücrelerin eliminasyonu için gereklidir. Hücre ölüm süreci; kanser, otoimmün bozukluklar, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar da dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklarla ilişkilidir. Bu yüzden bu süreçteki mekanizmalar, biyoloji ve tıp alanında yaygın bir araştırma konusu haline gelmiştir (Cooper ve Hausman 2015; Green ve Llambi 2015; Ranjan ve ark. 2016).

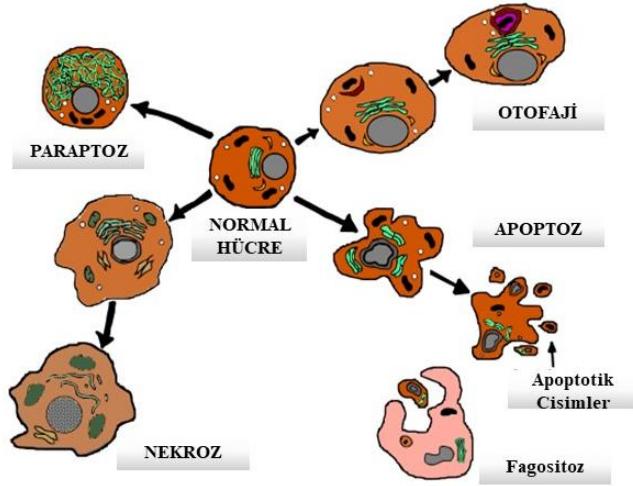
Hücre ölüm tipleri; apoptoz, otofaji, nekroz, kornifikasyon ve atipik hücre ölüm şekilleri (paraptoz, mitotik katastrof, anoikis, eksitotoksisite, wallerian dejenerasyon, piroptoz, pironekroz, entozi vb.) olarak sınıflandırılabilir. Bu tip hücre ölümleri

arasında üçü, apoptoz, otofaji ve paraptoz, morfolojik özelliklerine göre programlanmış hücre ölümü sınıfına girmektedir (Şekil 24) (Zhang ve ark. 2015).

TIPLER ▶	KANITLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMLERİ		KANITLANMAMIŞ HÜCRE ÖLÜMLERİ			
	Apoptoz	Otofaji	Paraptoz	Kalsiyum Aracılı	AIF/PARP Bağlı	Onkoz
Karakteristik Özellikler						
Morfoloji	Kromatin kondensasyonu, nükleer fragmentasyon, apoptotik cisimler	Otofajik vakuoller	Ultrastrüktürel yapıda ER şişmesi, Mitokondri şişmesi	Membran halkaları	Hafif kromatin kondensasyonu	Hücresel şişme
Tetikleyiciler	Ölüm reseptörleri, trofik faktör genleşmesi, DNA hasarı, viral enfeksiyonlar vb	Serum, amino asit, starvasyon, protein agregatı	Trofotoksiste	Kalsiyum girişi, deg mutasyonları	DNA hasarı, glutamat, NO	İskemi, eksitotoksiste
Mediyatörler	Kaspazlar, BH ailesi vb	JNK? MKK7? Atg ortologları	ERK2, Nur77	Kalpainler, katepsinler	PARP, AIF	JNK
Inhibitörler	Kaspaz İnhibitörleri, BH ailesi vb	JNK İnhibitörleri?	U0126 (MEK), DN Nur77	Calreticulin, bazı calpain inhibitörleri?	PARP İnhibitörleri	JNK İnhibitörleri
Örnekler	Tip I pcd, nükleer pcd	Tip II pcd	Tip III pcd, sitoplazmik pcd	C. elegans, deg mutasyonları	Bazı eksitotoksik pcd	İskemik Pcd

Şekil 24. Hücre ölüm tipleri ve ayırt edici özellikleri. (PCD: Programlı Hücre Ölümü)
<http://stroke.ahajournals.org/content/strokeaha/38/2/652/F1.large.jpg> Erişim Tarihi: 12.02.2018

Dişiler ovaryumlarında belirli bir oosit sayısı ile doğarlar ve pubertede gelişen foliküllerden dominant olan seçilerek ovulasyon sürecine girer. Ovulasyon için seçilmeyenler, foliküler atrezi ile elimine edilirler. Bu süreçte rol oynayan en önemli hücre ölüm mekanizmaları apoptoz, otofaji ve son dönemde ortaya çıkan hücre ölüm tipi olan paraptozdur (Şekil 25) (Escobar ve ark. 2015; Torres-Ramírez ve ark. 2016).



Şekil 25. Hücre ölüm tiplerinden apoptoz, otofaji, nekroz ve paraptozun morfolojik ayrımı ile foliküler atrezi sürecine ait üç hücre ölüm tipi: apoptoz, otofaji ve paraptoz. <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4a/Paraptosis.svg/550px-Paraptosis.svg.png> Erişim Tarihi: 09.02.2018

Gelişim ve doku homeostazı sırasında gözlenen programlı hücre ölümü, morfolojik olarak 3 temel tipe ayrılmıştır.

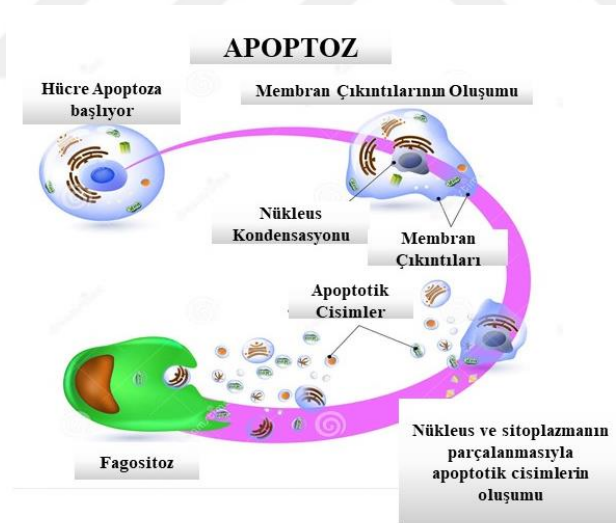
- Aynı zamanda nuklear ya da apoptotik olarak bilinen tip 1
- Tip 2 ya da otofajik
- Tip 3, paraptoz olarak da bilinen, lizozomal olmayan vakuol dejenerasyonu (Şekil 24) (Zhang ve ark. 2015)

2.6.1.Apoptoz

Gelişimsel ve fizyolojik bir perspektiften, hücre ölümünün en yaygın şekli, genetik olarak programlanmış bir hücrel intihar biçimi olan apoptoz; doku homeostazı, embriyonik gelişim ve immün regülasyonun korunması için çok önemli olan hücre ölümünün en iyi karakterize edilmiş tipidir. Apoptoz genellikle fizyolojik ve patolojik durumlarda fonksiyonu bozulan hücrelerin çevreye zarar vermeden kendi kendilerini yok edilmelerini kapsayan, genlerle düzenlenen, RNA, protein sentezi ve enerjiye gereksinimi olan programlı bir süreçtir. Apo: ayrı Ptozis: düşme anlamına gelen apoptoz terimi ilk kez 1972 yılında Avusturalyalı bir patolog olan Kerr ve

arkadaşları tarafından tanımlanmıştır. Postnatal dönemde birçok süreçte görülen apoptoz özellikle menstrual siklusta endometriyum fonksiyonel tabakasının dökülmesi ve korpus luteum involusyonunda bunun yanında patolojik bir süreç olan foliküler atrezide de rol almaktadır (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015; Ranjan ve ark. 2016; Kolb ve ark. 2017).

Tip 1 programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan kaspaz bağımlı bir süreç olan apoptozda birçok fizyolojik ve metabolik olaylar meydana gelmektedir. Apoptoz uyarısı alan hücre öncelikle bulunduğu ortamdan ve komşu hücrelerden uzaklaşır. Bundan sonra morfolojik olarak hücre büzülür, kromatini yoğunlaşarak piknotik bir görünüme bürünür (kromatin kondensasyonu). Ancak organelleri yapısal bütünlüğünü korur. Ardından çekirdek küçülür ve parçalara ayrılır (nükleer fragmentasyon), hücre zarla sarılı tomurcuklar halinde koparak (membran çıkıntısı), apoptotik cisimler oluşturur. Apoptotik cisimler makrofajlar tarafından fagosite edilir. (Şekil 24 ve 26) (Cooper ve Hausman 2015, Escobar ve ark. 2015; Zhang ve ark. 2015; Ranjan ve ark. 2016).



Şekil 26. Apoptotik hücre ölümünün morfolojik basamakları. <https://thumbs.dreamstime.com/z/apoptosis-process-programmed-cell-death-vector-diagram-45763884.jpg> Erişim Tarihi: 12.02.2018

2.6.1.1.Apoptoz Mekanizması

Apoptoz mekanizmasının daha iyi anlaşılması için yapılan genetik çalışmalarda bir nematod olan *Caenorhabditis elegans* kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda tanımlanan üç gen; ced-3, ced-4 ve ced-9'dan, ced-3 ve ced-4'ün mutasyonunda apoptozun gerçekleşmemesi ve hasarlı hücrelerin ölmemesi ile ced-3 (kaspaz homoloğu) ve ced-4'ün (Apaf-1 homoloğu) apoptozu indükleyen ölüm genleri, ced-9'un (Bcl-2) ise apoptozu inhibe ettiği saptanmıştır (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015)

Apoptozun düzenlenmesinde; kalsiyum, seramid, Bcl-2 ailesi gibi moleküllerin yanında p53, kaspazlar, sitokrom c gibi proteinler ve mitokondriler rol oynamaktadır:

Bcl-2 Ailesi; apoptozu tetikleyen proapoptotik (bax, bcl-Xs, Bad, Bim, Bak, Bok, Bid, Puma, Noxa) ve apoptozu inhibe eden anti-apoptotik (Bcl-2, bcl-Xl, Mcl-1), olmak üzere birbirine zıt çalışan üyelerden oluşmaktadır. (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015)

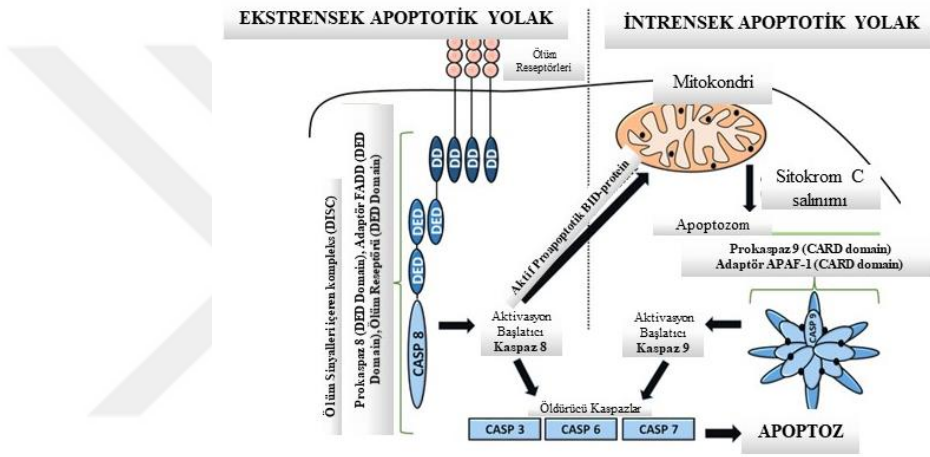
Antiapoptotik üyeler; mitokondri dışı membranı, endoplazmik retikulum ve çekirdek zarında yer alırlar, hücrenin çoğalma fazına girmesine yardımcı olurlar. Por oluşumunu sağlayan iyon transportunu (kalsiyum) sağlarlar. Mitokondri iç membranında bulunan ve elektron taşıma zincirinin bir proteini olan sitokrom c salınımını bloke ederler. Proapoptotik üyeler ise; apoptozu uyarıcı tümör baskılayan genler olup, sitokrom c'nin mitokondriden sitoplazmaya salınımını arttırarak apoptozu indüklerler. Bcl-2 ve Bax mitokondri zarındaki porları kontrol eder. Bax sitoplazmada bulunur ve apoptotik bir uyarı ile mitokondri membranına bağlanarak por oluşumunu indükler ve sonucunda sitokrom c salınımı gerçekleşir (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015).

KASPAZLAR; apoptozu büyük ölçüde koordine eden sistein proteazlardır. Hücrede biyokimyasal olarak inaktif bir formda bulunan kaspazlar, proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirirler ve kaskad yapısı oluştururlar.

1. Başlatıcı Kaspazlar: Kaspaz 2, 8, 9 ve 10
2. Efektör Kaspazlar: Kaspaz 3, 6 ve 7

3. İnflamatuvar Kaspazlar: Kaspaz 1, 4, 5, 11, 12, 13 ve 14 (insanda kaspaz-1, -4 ve -5, kemirgenlerde kaspaz-1 ve -11) şeklinde gruplandırılırlar (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015)

DNA tamir mekanizması ve replikasyonu için gerekli enzimleri inaktive ederler ve hücre iskeleti proteinlerini keserek hücre zarının tomurcuklanmasına neden olurlar. (Şekil 27) (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015; Escobar ve ark. 2015; Green ve Llambi 2015; Kolb ve ark. 2017).



Şekil 27. Apoptozda görev alan kaspazlar.

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fb/Apop1.png/600px-](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fb/Apop1.png/600px-Apop1.png)

Apopt1.png Erişim Tarihi: 12.02.2018

Apoptoz ekstrinsek ve intrinsek olmak üzere iki yolla gerçekleşir.

2.6.1.2. Ekstreneşek Yolak

Ekstreneşek yolağı; başlıca FAS ve TNFR aracılık etmektedir. Bu yolak, DNA hasarı (radyoterapi, kemoterapi ilaçları), hormonlar (timositlerdeki kortikosteroidler), ölüm reseptörlerinin aktivasyonu (CD95/APO-1/FAS; tümör nekroz faktör reseptör: TNFR), sitokinler, hormonlar ve patojenler (*Mycobacterium* ve *Chlamydia pneumoniae*), sitotoksik T lenfosit ve dış etkenler (iskemi, toksinler, UV, radyasyon

vb.) ile tetiklenir (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015; Green ve Llambi 2015; Ranjan ve ark. 2016; Kolb ve ark. 2017).

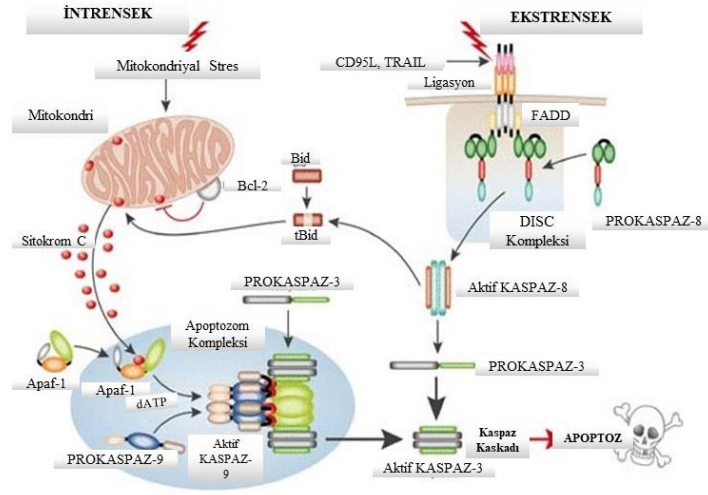
Hücre yüzeyindeki ölüm reseptörlerine (FAS, TNFR, DR5) ölüm sinyallerinin (FasL, TNF- α , TRAIL) bağlanmasıyla reseptörler trimerik yapı kazanır. Bu şekilde trimerik yapı kazanan reseptörler; adaptör molekülleri (FADD, TNFRD, DR5D) ve prokaspaz-8 ile birleşerek DISC yapısını oluşturur. Bu birleşmeden sonra inaktif durumdaki prokaspaz-8'in uzun ve kısa kolları kesilerek aktif kaspaz-8'in oluşumu sağlanır. Aktif kaspaz-8 ya doğrudan ya da Bid'i keserek intrinsik mekanizmada kaspaz-9'u aktive ettikten sonra dolaylı olarak iki şekilde kaspaz-3'ü aktive eder. Her iki yolla da aktif kaspaz-3 CAD (Kaspaz aktive edici DNaz) aktivasyonu ile DNA fragmentasyonuna neden olur. (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015; Green ve Llambi 2015; Green ve Llambi 2015; Ranjan ve ark. 2016; Kolb ve ark. 2017).

2.6.1.3.İntrensek Yolak

İntrinsik yolak; ilk olarak mitokondriyal olarak başlatılan olayları içeren reseptörlerin aracılık etmediği süreçtir; DNA hasarı, hücre içi kalsiyum artışı, pH artışı, oksidatif stres (reaktif oksijen türü, ROS), radyasyon, kemoterapi ilaçları ve endoplazmik retikulum stresi, metabolik ve/veya hücre siklus bozuklukları ve hipoksi ile tetiklenmektedir (Şekil 28) (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015; Green ve Llambi 2015; Ranjan ve ark. 2016; Kolb ve ark. 2017).

İntrinsik uyaranlar, B lenfosit 2 hücreleri (Bcl-2) ailesinden oluşan proteinlerin (proapoptotik Bcl-2 ilişkili X: BAX, Bcl-2 ilişkili ölüm promotörü: BAD; Bcl-2 agonisti/öldürücüsü: Bak ya da anti apoptotik Bcl-2; B lenfosit hücreleri-makro boyutu: Bcl-xL) aracılık ettiği mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu (MOMP) tetikler. Bu, sitokrom c (cyt c)'nin mitokondriden sitoplazmaya salınarak aktif proteaz faktör 1 (Apaf-1)'e bağlanmasıyla kaspaz 9 ve sonra da kaspaz 3 aktivasyonuna neden olur. Her iki yol da sistein proteaz enzim ailesine ait olan kaspazların aktivasyonunu içerir. (Şekil 28) (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015; Green ve Llambi 2015; Ranjan ve ark. 2016; Kolb ve ark. 2017).

Hücre içi sinyallerle apoptotik uyarı alındıktan sonra proapoptotik proteinlerden Bid; bir antiapoptotik protein olan Bcl-2'yi inaktive ederek Bax ve Bak'ı aktifleştirir. Aktifleşen Bax ve Bak mitokondri membranında por oluşumunu indükleyip zar potansiyelini değiştirir ve sitokrom c, Smac (Sekonder Mitokondri Kaynaklı Kaspaz Aktivatörü), Endo-G (Endonukleaz G), kalsiyum ve AIF (Apoptoz indükleyici faktör) salınımını uyarır. Sitokrom-C oksidatif fosforilasyon için elektron taşır. SMAC, IAF (İnhibitör apoptotik faktör)'ü inhibe eder ve apoptozu hızlandırır. IAF'nin ortamda bulunması ise kaspaz-3 ve kaspaz-8 aktivasyonunu engeller. AIF, çekirdeğe transloke olur ve parçalara ayırır. ENDO-G de DNA'yı parçalar. Mitokondriyal porlardan salınan sitokrom-c, Apaf-1 (Apoptotik proteaz aktive eden faktör) ve ATP'nin katılmasıyla sitozolde Apoptozom denen bir kompleks oluşturur. Apoptozom kaspaz 9'u keserek aktifleştirir. Kaspaz-9 da prokaspaz-3'ü aktif kaspaz-3 haline getirir. Aktif kaspaz-3 de ICAD (İnaktif kaspaz aktive edici DNaz)'ı inaktifleştirerek CAD'ı serbestleştirir. CAD ise çekirdekte kromatin yoğunlaşmasına ve DNA'nın nukleozomal alt birimler halinde fragmente olmasına neden olur (Coşkun ve Özgür 2011; Cooper ve Hausman 2015; Green ve Llambi 2015).



Şekil 28. Apoptozun ekstresek ve intrinsek yolları ve süreçleri.
https://www.researchgate.net/profile/Ann_Williams5/publication/8488846/figure/fig1/AS:279972263546883@1443761997130/Figure-1-Apoptosis-the-%27extrinsic%27-and-%27intrinsic%27-pathways-to-caspase-activation-Two.png
 Erişim Tarihi: 12.02.2018

2.6.2.Otofaji

Otofaji esas olarak bir metabolik krize (örn., Düşük ATP seviyeleri ve besin ve amino asit yoksunluğuna) yanıt veren veya hasarlı organelleri (örn., Düşük membran potansiyeli olan mitokondri) ve protein agregatlarını gideren bir hayatta kalma sürecidir ve ökaryotik hücrelere özgü, sitoplazmik kısımların, hücre içi organellerin ve proteinlerin lizozomlar ile kaynaştıktan sonra hücre bileşenlerine dereceli olarak geri dönüşümünü sağlayan otofagozom adı verilen çift membranlı vakuollere ayrılması ile karakterize edilmektedir (Cooper ve Hausman 2015; Green ve Llambi 2015; Zhang ve ark. 2015; Ranjan ve ark. 2016; Ross ve Pawlina 2016).

Otofaji, hasarlı hücrelerin yanında fonksiyonel olmayan hücresel organeller, yanlış katlanan proteinler ve patojenler gibi hücrenin istenmeyen komponentlerinin elimine edilmesine olanak sağlayan, diğer bir yandan da hücre sağkalımı ve de hücre ölümünü kontrol eden ve organellerin sindirilen komponentlerinin geri dönüşümü ile hücre büyümesi ve gelişimi için yeniden kullanılmasını sağlayarak hücre homeostaziyi koruyan katabolik lizozom bağımlı süreçle düzenlenir (Şekil 29)

(Cooper ve Hausman 2015; Zhang ve ark. 2015; Ranjan ve ark. 2016; Ross ve Pawlina 2016; Pugsley 2017).

Otofaji, programlı hücre ölümünün apoptotik olmayan bir alternatif mekanizması olup tip 2 programlı hücre ölümü olarak da adlandırılan bu süreç non-apoptotik, non-nekrotik hücre ölümüdür ve değişik derecelerde bozulma gösteren sitoplazmik içeriğe sahip artmış sayıda otofajik vezikül içeren çeşitli morfolojik özellikleri içerir (Şekil 24 ve 29) (Cooper ve Hausman 2015; Green ve Llambi 2015; Escobar ve ark. 2015; Ranjan ve ark. 2016).

Birçok önemli fizyolojik fonksiyona sahip olan otofaji; özünde çevresel hasar, kimyasal dalgalanmalar, metabolik yoksunluk ve patojene maruz kalma gibi strese tepki olarak öncü bir sağkalım stratejisidir ve hücrelerin, sil baştan protein ve ATP sentezi için hücre içi substratı parçalayarak biyosentetik ve enerjik işlevlerini muhafaza etmesine izin verir (Zhang ve ark. 2015; Ranjan ve ark. 2016; Kolb ve ark. 2017).

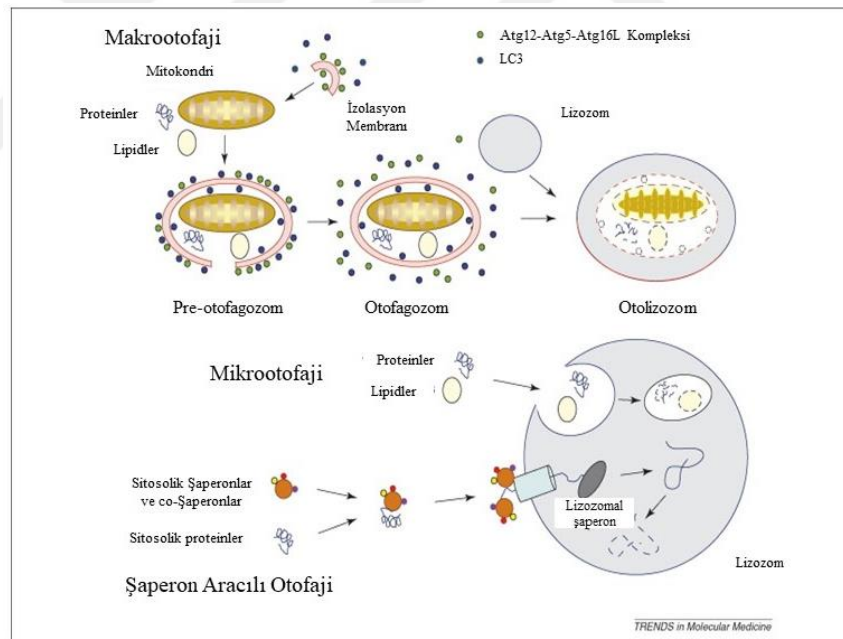
Apoptozdan farklı olarak; otofajide kromatin yoğunlaşması gibi çekirdeğe özgü değişiklikler çok daha sonra ortaya çıkmakta, kaspaz bağımlı bir süreç olmadığı için DNA merdivenleri ve apoptotik cisim oluşumu görülmemekte ve ölü hücrelerin makrofajlar tarafından fagosite edilmesi apoptozda görüldüğünden çok daha sonra ve rastgele gerçekleşmektedir (Gözüaçık ve ark. 2011; Karadağ 2016).

Otofaji üç farklı şekilde gerçekleşebilir.

1. Mikrootofaji: Normal fizyolojik koşullarda küçük sitoplazmik çözünebilen proteinlerin lizozom membranına invaginasyonu ile, lizozom içine alınıp yavaş ve sürekli olarak degradasyonunun yapılmasıdır.
2. Makrootofaji: Otofajik hücre ölümünü oluşturan temel mekanizmadır. Sitoplazmanın bir kısmının ya da bir organelin otofagozom adı verilen bir vakuol oluşturmak üzere endoplazmik retikulumdan oluşan izolasyon membranı ile sarılması ve otofagozom içine alınıp daha sonra lizozomlarla birleşerek meydana gelen degradasyondur. Başlıca Atg genleri tarafından kodlanan proteinlerce gerçekleştirilen bir süreçtir. LC3 otofagozom oluşumunda önemli bir rol oynar (Şekil 29)

Kritik metabolik ara maddelerin mevcudiyetini sağlamak için besin açlığı ve biyoenerjik başarısızlık gibi metabolik stres altında beslenen katabolik bir işlemdir. Ayrıca hasarlı organellerin (mitokondri dahil), protein agregatlarının ve enfekte edici organizmaların uzaklaştırılmasında da önemlidir (Green ve Llambe 2015).

3. Şaperon aracılı otofaji: Belli bir peptid sekanslı sitozolik proteinlerin moleküler şaperonlarla kompleks olan ısı şok proteini Hsp73 tarafından tanınması ve lizozomlara taşınmasıdır (Şekil 29). Besin yoksunluğunda aktive olan ve yıkılan proteinlerde hedefleme sinyali ve lizozom membranı üzerinde spesifik bir reseptörün bulunmasını gerektiren bir süreçtir (Cooper ve Hausman 2015; Escobar ve ark. 2015; Karadağ 2016; Ranjan ve ark. 2016; Ross ve Pawlina 2016; Kolb ve ark. 2017).

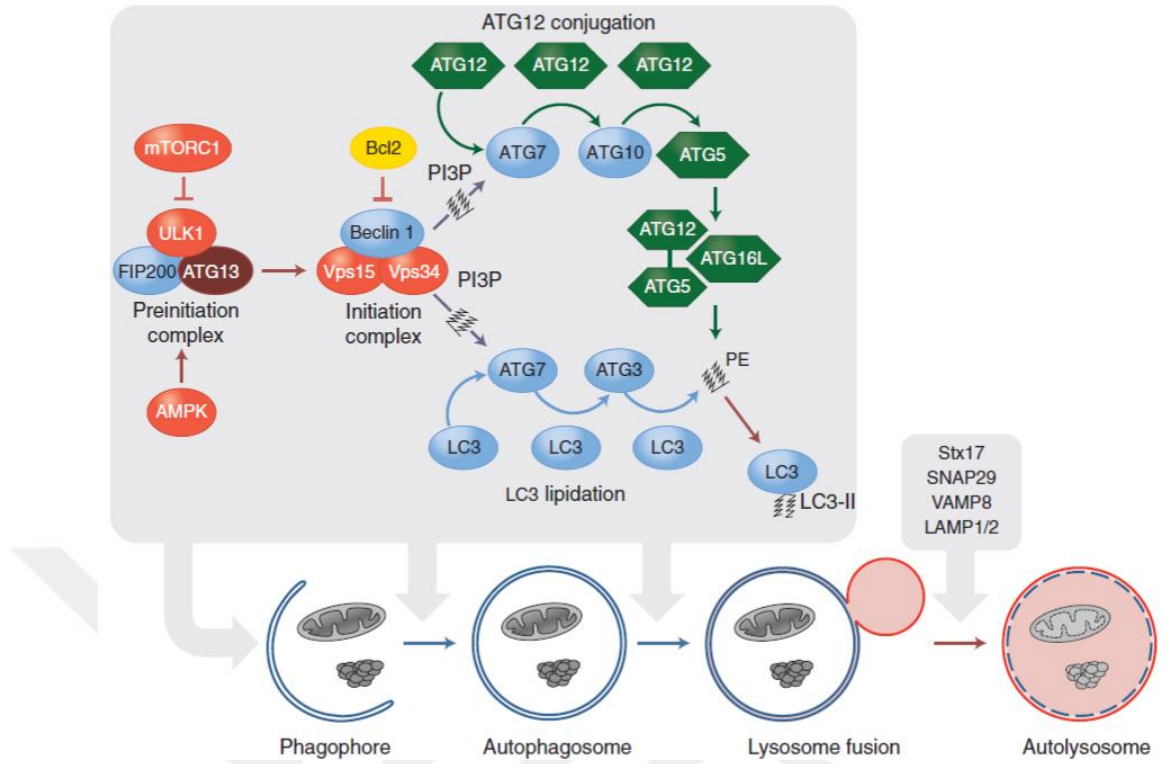


Şekil 29. Otofaji tipleri ve temel mekanizmaları.
<http://www.cell.com/cms/attachment/588206/4490116/gr1.jpg> Erişim Tarihi
[12.02.2018](#)

Otofajinin temel mekanizmasında yer alan genler ilk olarak mayada çalışılmış, daha sonra bu genlerin homologları *C. Elegans*, *Drosophila*, fare ve insanda tanımlanmıştır (Gözüaçık ve ark 2011; Karadağ 2016).

Otofagoz oluşumu ve olgunlaşması, multi tip otofajilasyonlu (ATG) proteinlerin ardışık fonksiyonu ile düzenlenir. İşlem, kinaz Unc-51 benzeri kinaz 1 (ULK1), FIP200 ve ATG13'ten oluşan bir başlama kompleksinin aktivasyonu ile başlar. Bu kinaz kompleksinin aktivitesi doğrudan iki ana metabolik kontrol noktası tarafından düzenlenir: rapamisin kompleksi 1 (mTORC1) ve AMP ile aktive edilmiş protein kinaz (AMPK) memeli hedefi (Şekil 30) (Green ve Llamby 2015).

Sağlıklı hücrelerde, mTORC1, ULK1 ve ATG13'ün fosforilasyonu yoluyla uç başlama kompleksini inhibe eder. Metabolik stres (örn., Amino asit yoksunluğu) üzerine, ULK1 ve ATG13'ün mTORC1 aracılı inhibisyonu ortadan kalkar. Aksine, AMPK oluşum başlama kompleksini harekete geçirir. ATP sentezi, bir hücrede ATP tüketiminin taleplerini karşılayamadığında, AMP ve ADP, AMPK'yi aktive eder. Aktif AMPK, mTORC1 aktivitesini baskılayarak ve doğrudan ULK1'i fosforile ederek aktifleştirir ve otofajiyi dolaylı olarak destekler. Bu nedenle, mTORC1'in inhibe edildiği ve/veya AMPK'nin aktive edildiği koşullar, kompleksinin aktivitesine girmektedir (Şekil 30) (Green ve Llamby 2015).



Şekil 30. Otofagozom oluşumu (Green ve Llambi 2015).

Başlama kompleksi, beclin 1, bir sınıf III PI3K (Vps34) ve protein kinaz Vps15'den oluşan bir başlatma kompleksini başlatır ve aktive eder, bu da lipid fosfatidilinositol 3 fosfatın (PI3P) üretilmesine yol açar. Başlama kompleksinin aktivitesi, birkaç bağımsız sinyalleme yolu ile negatif olarak düzenlenir. Akt direkt olarak 1'i fosforile eder, böylece 14-3-3'e bağlanır. Beclin-1-14-3-3 kompleksleri, ara filamentlerin bir bileşeni olan vimentin ile izole edilir. Aktive edilmiş bu sitoskelet izolasyonu, başlangıç kompleksinin lipid kinaz aktivitesini azaltır. Bu nedenle, büyüme faktörleri ve PI3K-AKT yolu, doğrudan beclin 1 yolu ve dolaylı olarak mTOR yolu boyunca otofajiye inhibe edebilir. Beclin 1, başlama kompleksinin lipid kinaz aktivitesini düzenleyen birkaç ek partner (Vps34 ve Vps15'e ek olarak) kazandıran bir iskele proteinidir. Otofaji indüksiyonu üzerine, AMBRA1, ULK1 tarafından fosforile edilir ve otofagozom formasyonunu sağlamak için sitoskeletten salınır (Şekil 30) (Green ve Llambi 2015).

Otofagozomun uzaması ve kapanışı, iki farklı fakat tamamlayıcı ubikuitin benzeri protein konjugasyon sistemleri ile düzenlenir: ATG5-12 ve LC3-PE konjugasyon yolları (Şekil 30). Her iki yol da, başlama kompleksi tarafından üretilen PI3P aracılığıyla fagofora katılan tek bir E1-ligaz benzeri aktive edici enzim olan ATG7 tarafından başlatılır. Birincisi, küçük bir protein olan ATG12, bir trimester bağlantısı ile ATG7'nin aktif bölge sistein kalıntısına kovalent olarak bağlanır. Daha sonra ATG12, trimester değişimi yoluyla, ATG10'a ATG5'e aktarılan bir E2-benzeri konjuge enzim olan ATG10'a aktarılır. Son olarak, ATG5-ATG12 konjugatı, oluşturucu fagforu stabilize etmek ve ikinci konjugasyonu tamamlamak için gerekli olan geniş bir multimerik kompleks oluşturmak üzere ATG16L'yi kovalent olarak toplar. LC3-PE (fosfatidiletanolamin) konjugasyon yolu, sistein proteazı ATG4 tarafından LC3'ün ayrılmasından sonra başlatılır. LC3, ATG7'ye bağlanır ve daha sonra ATG3 E2 enzimine aktarılır. Daha sonra ATG5-ATG12-ATG16L kompleksi, bir LC3-PE konjugatı (LC3-II olarak da anılır) oluşturmak üzere, fosfatidiletanolamin (PE) konjuge edici bir LC3 ligandı olarak işlev görür (Şekil 30) (Green ve Llamby 2015).

Bu lipitlenmiş, membrana bağlı form olan LC3-II, otozagozomların lizozomlara hedeflenmesi için çok önemlidir. Son bulgular, modifiye edici bir protein olan LC3'ün, otofaji sırasında otofagozomal bir membran oluşturmak üzere, ubikuitinle benzeyen eşsiz bir protein aktivasyonu ve konjugasyon sistemi tarafından işlendiğini ortaya koymuştur. Otofagozum oluşumu tamamlandığında bir otolizozom oluşturmak için lizozomlarla birleşir, böylece fagosite edilen materyali degrade eder. Bu füzyon olayı, her iki organelden alınan membranlar, lizozomdaki otofagozomal protein sentaksin 17 (Stx17), SNAP29 ve VAMP8 arasındaki etkileşimi ile elde edilir. Ek olarak, iki lizozomal protein, LAMP1 ve LAMP2, füzyon prosesi için gereklidir ve bunların yokluğunda, otofagozum, lizozomlara kaynaşmaz (Asanuma ve ark. 2013; Green ve Llamby 2015).

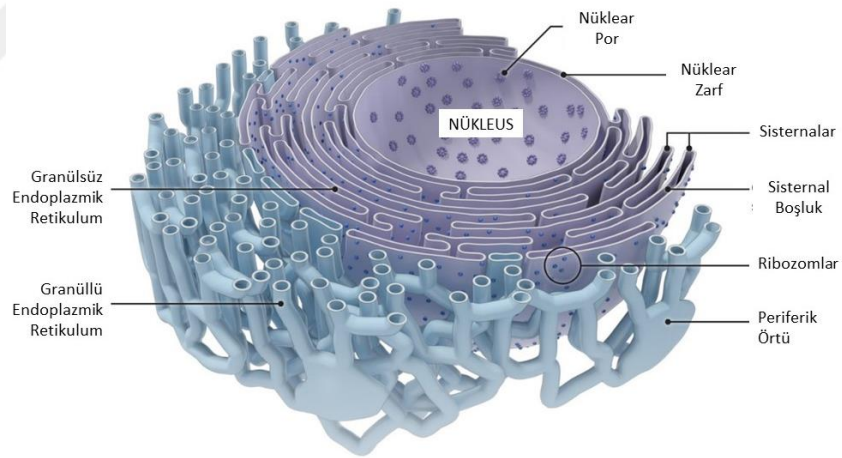
2.6.3.Paraptoz

Paraptoz, ilk olarak 2000 yılında Sperandio ve arkadaşları tarafından tanımlanan ve büyük ölçüde endoplazmik retikulumdan kaynaklanan sitoplazmik vakuolizasyon

ile karakterize edilen bir programlı hücre ölüm tipidir (Zhang ve ark. 2015; Ranjan ve ark. 2016; Torres-Ramírez ve ark. 2016).

Biyokimyasal olarak, kaspaz inhibitörlerine yanıt vermeyen, kaspaz veya Bcl-2 ailesine ait proteinlerin aşırı ekspresyonundan etkilenmeyen ve dolayısıyla kaspaz aktivasyonu göstermeyen; morfolojik olarak apoptotik cisim ya da otofagozom oluşumu görülmeyen, deneysel süreçte TUNEL analizlerine negatif ve Apaf-1 bağımsız bir süreçtir (Şekil 25) (Zhang ve ark. 2015; Ranjan ve ark. 2016; Torres-Ramírez ve ark. 2016).

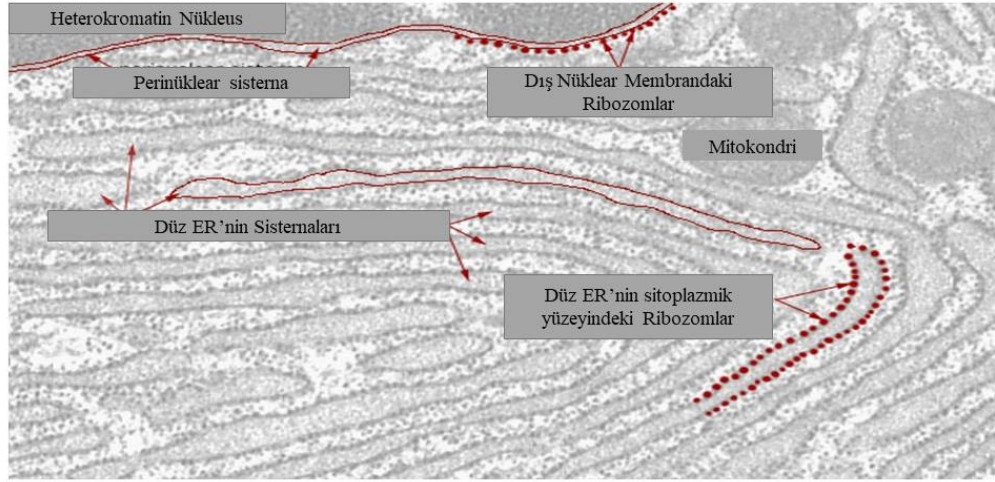
Endoplazmik retikulum; biyogenez, protein katlanması transportu ve sentezi, kalsiyum depolanması ve salınımı ile hücresel kalsiyum dengesinin sağlanması ve lipid biyosentezini içeren proteostasis (ökaryotik protein homeostasis) gibi süreçlerde anahtar rollere sahip olan önemli bir organeldir (Şekil 33) (Ross ve Pawlina 2016; Yang ve ark. 2016; Cybulsky 2017).



Şekil 31. Endoplazmik retikulumun şematik üç boyutlu gösterimi.
<https://iiif.elifesciences.org/lax:20468/elifesciences-20468-fig1-v1.tif/full/1500,/0/default.jpg>
Erişim Tarihi: 12.02.2018

Taramalı elektron mikroskopunda ultrastrüktürel yapısı sisterna adı verilen birbirine bağlı, membranla sınırlı, bir dizi yassılaştırmış keseler ile sisterna membranının

dış yüzeyine tutunan partiküller (ribozomlar) şeklinde izlenmektedir (Şekil 31) (Ross ve Pawlina 2016).



Şekil 32. Endoplazmik retikulum elektron mikroskopik görüntüsü.
<http://medlib.bu.edu/histology/i/21004loa.jpg> Erişim Tarihi: 12.02.2018

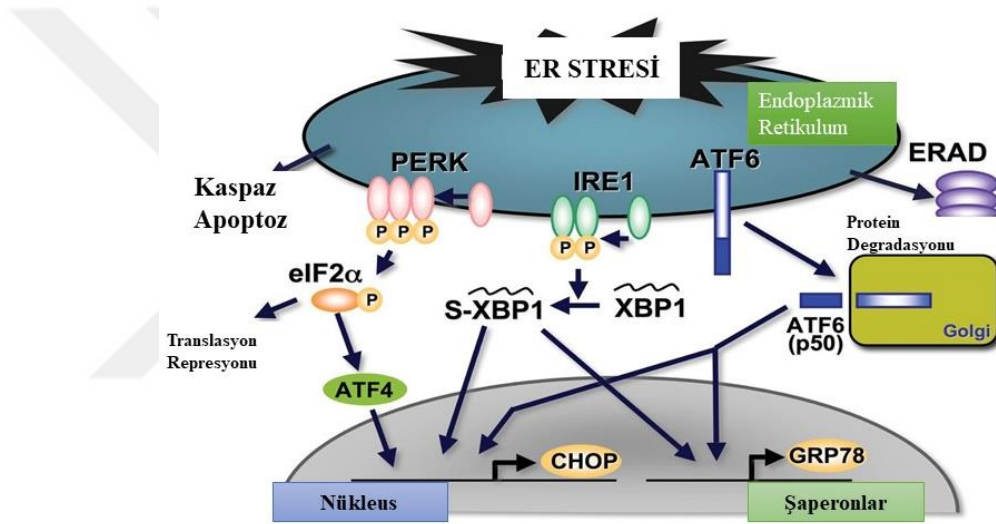
Endoplazmik retikulum stresi; çözünen ya da yanlış katlanan proteinlerin sisternalarda birikmesiyle normal fizyolojik durumu bozması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunun yanında kalsiyum azalması, hipoksi ve N-terminal glikozilasyonu da endoplazmik retikulum mikroçevresini bozarak strese sebep olabilir. Endoplazmik retikulumun normal fonksiyonlarına iyileştirilmesi, artmış endoplazmik retikulum ilişkili degradasyonu (Endoplasmic Retikulum Associated Degradation: ERAD) ve protein sentezinin bloke edilmesini içeren katlanmamış protein yanıtı (Unfolded Protein Response: UPR) aracılığı ile düzenlenir (Torres-Ramírez ve ark. 2016; Yang ve ark. 2016).

UPR üç transdüksiyon yolağı sinyalini içermektedir:

1. PERK (pankreasla ilişkili endoplazmik retikulum kinaz)/eIF2 α (ökaryotik başlatıcı faktör 2 alfa)/ATF4 (aktive edici transkripsiyon faktörü 4)
2. IRE1 α (inositol gerektiren enzim 1 α)/XBP-1 (X-box bağlayıcı protein)
3. ATF6 α (aktive edici transkripsiyon faktörü 6 α)

UPR vasıtasıyla, endoplazmik retikulum yükü aşağıdaki üç işlemle hafifletilir:

1. Yeni sentezlenmiş proteinlerin protein translasyonunu zayıflatmak suretiyle ER'ye girişinin azaltılması,
2. Endoplazmik retikulum gen ekspresyonunu upregüle ederek protein katlanma seviyesinde bir artışın sağlanması,
3. Endoplazmik retikulum ilişkili degradasyon (ERAD) ve lizozom aracılı otofaji ile katlanmamış ve yanlış katlanan proteinlerin degradasyonu (Şekil 32) (Yang ve ark. 2016).



Şekil 33. Endoplazmik retikulum stresindeki üç transdüksiyon yolağı ve ilgili şaperonlar. <http://www.clinsci.org/content/ppclnsci/118/1/19/F2.large.jpg> Erişim Tarihi: 12.02.2018

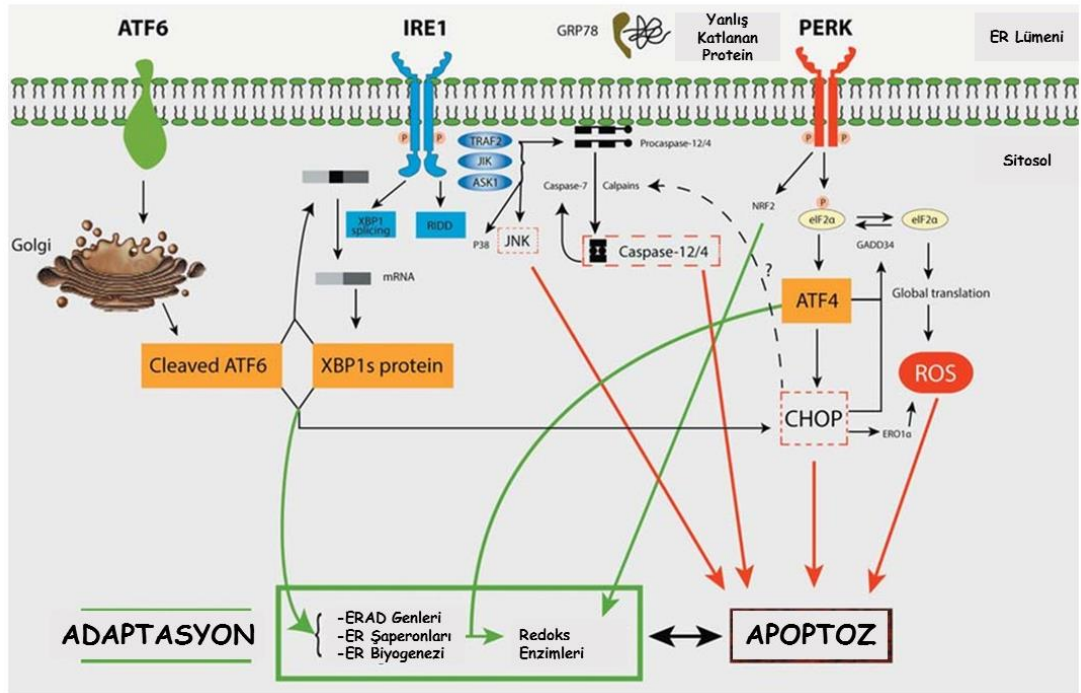
Katlanmamış ve yanlış katlanan proteinler temel olarak ubiquitin proteozom sistemi aracılığıyla ERAD ile degrade edilmektedir, ancak ERAD bozulduğu zaman lizozom aracılı otofaji tetiklenir ve böylece lizozom aracılı otofaji ikinci ERAD yolağı olarak söylenebilir. Bununla birlikte, UPR katlanmamış ve yanlış katlanmış proteinlerle başa çıkamadığında, hücresel apoptoz, aşırı veya kalıcı endoplazmik retikulum stresi, CHOP (C/EBP-homolog protein; büyüme durması ve DNA hasarına yol açabilen gen 153, GADD153; DNA hasar indüklenabilir transkripsiyon 3, DDIT3),

c-jun N-terminal kinaz (JNK) ve kaspaz bağımlı yollar, insanda kaspaz-4 kemirgenlerde kaspaz-12 tarafından tetiklenir. CHOP (C/EBP-homologu) proteinini endoplazmik retikulum stresine yanıt veren indirgeyici hedeflerden biridir (Şekil 32) (Torres-Ramírez ve ark. 2016; Yang ve ark. 2016).

Bcl-2 protein ailesi, anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeleri içeren apoptotik sinyalizasyonun temel regülatörlerindendir. Pro-apoptotik Bcl-2 proteinleri Bak ve Bax; endoplazmik retikulum stresinin neden olduğu apoptoz sürecinde lümen proteinlerine karşı endoplazmik retikulum membran geçirgenliğini düzenlerken anti-apoptotik Bcl-2 ekspresyonunun downregulasyonu sırasında CHOP ekspresyonu yükselmektedir. CHOP aynı zamanda non-apoptotik hücre ölümü ile de ilişkilidir (Torres-Ramírez ve ark. 2016).

Glikoz düzenleyici protein 78 kDa (GRP78 aynı zamanda BİP olarak bilinir) endoplazmik retikulum membranındaki PERK, IRE1 α ve ATF6 α ile etkileşim kuran bir endoplazmik retikulum şaperonudur. Bununla birlikte GRP78; PERK, IRE1 α ve ATF6 α dan farklı yerde lokalize olmakta ve endoplazmik retikulum stresine yanıt olarak endoplazmik retikulum lümenine salınmaktadır. GRP78, endoplazmik retikulum stresine yanıt süresince anti apoptotik olarak davranır. Ovaryan granüloza hücrelerinde GRP78 in ekspresyonu, ovaryan granüloza hücrelerinin apoptozunun endoplazmik retikulum stresi aracılığıyla indükleyerek foliküler atrezide bir sinyal yolağı olduğu düşünülmektedir. GRP78 ve CHOP erken atrezik foliküllerin apoptotik granüloza hücrelerinde belirgin bir şekilde artarken; atrezi süreci boyunca CHOP daha da artış gösterirken GRP78 azalmaktadır. Bu veri in vitro deneylerle de desteklenmiştir (Yang ve ark. 2016).

CHOP, JNK ve kaspaz 4/12 proapoptotik olup endoplazmik retikulum stresi aracılı apoptozu aktive eder. CHOP, üç UPR sinyal yolağının (downstream) alt basamağıdır ve bir ya da daha fazlası UPR sinyali bağımlıdır (Şekil 32 ve 33) (Yang ve ark. 2016).



Şekil 34. Endoplazmik retikulum stresinde rol alan mekanizmalar. https://www.researchgate.net/profile/Yves-Paul_Vandewynckel/publication/258503262/figure/fig1/AS:392665708417033@1470630208849/Figure-2-Endoplasmic-reticulum-ER-stress-induces-the-unfolded-protein-response-UPR.jpg Erişim Tarihi: 12.02.2018

Önceki çalışmalarda, endoplazmik retikulum stresine yanıt oluşumu; immün yanıt, inflamasyon, otofaji ve diyabet gibi metabolik hastalıklar, kemik ve eklem hastalıkları, alzheimer gibi nörolojik hastalıklar, kanser ve viral replikasyonu içeren çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde rapor edilmiştir. Buna ek olarak, bazı yeni araştırmalar, endoplazmik retikulum stresi yanıtının kadın üremesiyle de ilgili olduğunu ileri sürmüştür. Escobar ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, foliküler atrezi sürecinde granüloza hücrelerinin endoplazmik retikulumlarının sisternalarında ve nüklear kılıfta görülen dilatasyona benzer değişimler bulunmuş, ancak apoptoz ya da otofajiye ait sinyallere rastlanmamıştır (Escobar 2013; Yang ve ark. 2016).

Foliküler atrezi nedenli infertilite, ovaryan granüloza hücrelerinin apoptozu aracılığıyla meydana gelmektedir. Ölüm reseptörü ve mitokondri aracılı tip 1

programlanmış hücre ölümü (apoptoz), memeli overlerinde granüloza hücrelerinde etkindir. Buna ek olarak tip 2 programlı hücre ölümünün (otofaji) foliküler atreziyi indüklediği ileri sürülmektedir (Yang ve ark. 2016).

Endoplazmik retikulum stresi fizyolojik ve patolojik koşulların neden olduğu ovaryan granüloza hücre apoptozu ve foliküler atrezide rol oynayan yeni bir mekanizmadır. Granüloza hücre apoptozunda endoplazmik retikulum stresinin işlevinin ölüm reseptörü, mitokondri aracılı apoptoz ve otofajinin aracılık ettiği granüloza hücre ölümüyle yakından ilişkili olup olmadığı bilinmemektedir; bu potansiyel mekanizmanın daha fazla araştırılması gerekmektedir (Yang ve ark. 2016).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamız, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırmaları Etik Kurulu'nun 25.04.2017 tarihli 77637435 karar numaralı onayı ile yapılmıştır. Çalışmamızda histokimyasal, immünohistokimyasal inceleme ve değerlendirme için gerekli malzemelerin alınması Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2017-149 numaralı proje ile desteklenmiştir.

3.1.DENEY MODELİNİN OLUŞTURULMASI

Çalışmamızda 8 haftalık 18 adet dişi C57BL/6 cinsi fareler (KOBAY DENEY HAYVANLARI LABORATUVARI SAN. VE TİC. A.Ş. Ostim Mah. 21. Cad. 520. Sok. Ağaçişleri San. Sit. (İvedik Organize Sanayi İçi) Yenimahalle, ANKARA) kullanıldı. Fareler 3 gün boyunca (adaptasyon için) herhangi bir sağlık problemi belirtisine karşı gözlemlendi. Çalışma boyunca hayvanlar stabil koşullar altında (22°C sıcaklık ve %30-70 nem, aydınlık karanlık döngüsü 12/12 saat) tutuldu. Kuru pellet yem ve çeşme suyu ile beslenmeleri sağlandı.

Adaptasyon sürecinden sonra fareler her bir grupta 6 adet fare olacak şekilde kontrol, sham ve deney grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı:

1. Kontrol grubu: Bu gruptaki farelere herhangi bir uygulama yapılmadı.
2. Sham grubu: Bu gruptaki farelere sadece intraperitoneal olarak serum fizyolojik (Polifirm İlaç. San. ve Tic. A. Ş. Ergene, Tekirdağ, TÜRKİYE) enjekte edildi.
3. Deney grubu: Bu gruptaki farelere ise prematüre ovaryan yetmezlik modelini oluşturabilmek için kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik olan siklofosfomid (sc-202117, Chem Cruz, Amerika), intraperitoneal olarak ilk doz 70 mg/kg verildikten sonra 3 hafta boyunca iki günde bir 30 mg/kg olarak uygulandı (Resim 1).



Resim 1. İntraperitoneal enjeksiyon

3.2. DENEYİN SONLANDIRILMASI İLE KAN VE DOKU ÖRNEKLERİNİN ALINMASI

Üç haftalık enjeksiyon uygulamasının ardından; prematüre ovaryan yetmezlik modelinin oluşturulduğunun kontrolü amacıyla kandaki Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH), Luteinizan Hormon (LH) ve östradiol seviyelerine bakmak için her bir farenden genel anestezi altında 10mg/kg ksilazin (Alfazyne, 0804125-11, Alfasan, Woerden, Hollanda) ve 75mg/kg ketamin (Ketalar, 002038, Eczabıbaşı Sağlık Ürünleri San. ve Tic. A.Ş., Lüleburgaz, Türkiye) kardiyak 3 ml kan alındı (Resim 2). Daha sonra fareler servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek over dokuları alındı (Resim 3).



Resim 2. Genel anestezi altında intrakardiyak kan alımı



Resim 3. Ovaryumların cerrahi olarak çıkarılması

3.3. KANDA HORMON SERUM SEVİYELERİNİN BELİRLENMESİ (ELİSA)

Kanda FSH, LH ve östradiol hormon serum seviyelerinin belirlenmesi için her bir fareden genel anestezi altında intrakardiyak alınan kan örnekleri, 10-20 dakika pıhtılaşması için oda sıcaklığında bekletildikten sonra 3000rpm’de 20 dk santifüj (HETTICH Zentrifugen Mikro 22R, Almanya) edildi. Supernatant dikkatli bir şekilde alındıktan sonra etiketlenerek -80°C’ye kaldırıldı.

Serum FSH, LH ve östradiol düzeyleri, çift antikor sandviç yöntemiyle çalışan fare FSH, LH ve östradiol ticari kitleri kullanılarak (SHANGHAI YEHUA Biyolojik Teknoloji Limited Şirketi, Şangay, Çin) manuel olarak ELISA cihazında (ELİSA Reader cihazı, Thermo Scientific Multiskan GO, Waltham, Massachusetts, Amerika) çalışıldı.

3.3.1. Analizlerin Prensibi

Kitler ile birlikte gelen plakalar, sırasıyla folikül stimüle edici hormon, lüteinizan hormon ve östradiol spesifik antikorlar ile kaplanmış olarak hazır sunulmaktadır. Bu FSH, LH ve östradiol monoklonal antikorları ile kaplanmış plakalara sırasıyla FSH, LH ve östradiol hormonları ilave edilerek inkübe edildikten sonra streptavidin-HRP ile birleşerek immün kompleks oluşturmak üzere biotinle işaretlenmiş FSH, LH ve östradiol antikorları eklendi. İnkübasyon ve yıkamadan sonra bağlanmamış enzimler uzaklaştırılarak ardından A ve B substratları eklendi. Substratların eklenmesiyle maviye dönen çözeltide meydana gelen reaksiyon stop solüsyonu (asid) ile rengin sarıya dönmesiyle sonlandırıldı. Örneklerdeki renk değişimi 450 nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek fare FSH, LH ve östradiol konsantrasyonları ile kıyaslandı.

Analiz Aralığı: Standart eğri için kullanılan konsantrasyonlar; FSH (96, 48, 24, 12, 6, 3 ve 1,5 mIU/ml), LH (64, 32, 16, 8, 4, 2 ve 1 mIU/ml) ve östradiol (960,480, 240, 120, 60, 30 ve 15 mIU/ml) için hesaplandı.

3.3.2.Reaktif Hazırlığı

Yıkama Çözeltisi: 20 ml yıkama tamponundan alınıp distile su ile 600 ml yıkama çözeltisi hazırlandı.

Standart: Belirlenen konsantrasyona göre standarttan 120 µl alınarak 120 µl standart dilüent ile sulandırıldı ve stok solüsyon elde edildi. Standartın içine 120 µl dilüentten koyulduktan sonra bu stoktan hazırlamak üzere 4 adet ependorfa 120 µl dilüent ilave edildi ve sırasıyla bir önceki ependorftan 120 µl alınıp takip eden ependorfa boşaltıldı.

Standart solüsyon FSH, LH ve östradiol için ayrı ayrı tablodaki gibi hazırlanarak standart dilüsyonlar oluşturuldu (Tablo 1)

Tablo 1. ELİSA standart çözeltilerin hazırlanma prosedürü

FSH	LH	Östradiol		
96 ng/ml/	64 ng/ml/	960 ng/ml/	Standart No.7	120µl Orijinal Standart + 120µl Standart dilüentler
48 ng/ml	32 ng/ml	480ng/ml	Standart No.6	120µl Standart No.7 + 120µl Standart dilüentler
24 ng/ml	16 ng/ml	240 ng/ml	Standart No.5	120µl Standart No.6 + 120µl Standart dilüentler
12 ng/ml	8 ng/ml	120 ng/ml	Standart No.4	120µl Standart No.5 + 120µl Standart dilüentler
6 ng/ml	4 ng/ml	60 ng/ml	Standart No.3	120µl Standart No.4 + 120µl Standart dilüentler
3 ng/ml	2 ng/ml	30 ng/ml	Standart No.2	120µl Standart No.3 + 120µl Standart dilüentler
1,5 ng/ml	1 ng/ml	15 ng/ml	Standart No.1	120µl Standart No.2 + 120µl Standart dilüentler

3.3.3. Analiz Prosedürü

Numune eklenmesi:

- Boş kuyucuk: Örnek, biyotinle işaretlenmiş anti FSH, LH ve östradiol antikorları ve streptavidin-HRP eklenmedi. Kromojen A&B solüsyonu ve stop solüsyonu eklendi.
- Standart solüsyon kuyucuğu: 50µl standart ve 50µl streptavidin-HRP eklendi (antikorları önceden standart ile birleştirilmiş olduğu için biyotin antikoru eklenmedi).
- Test edilecek örnek kuyucuğu: 40µl örnek ve daha sonra kite göre 10µl FSH, LH ya da östradiol antikoru ile 50µl streptavidin-HRP eklendi. Daha sonra

plaka parafilm ile kaplanarak karışması için hafifçe çalkalandı ve 37 °C’de 60 dakika inkübe edildi.

Yıkama: Parafilm dikkatlice çıkarıldı ve kuyucuklar boşaltıldı. Her bir kuyucuk yıkama solüsyonuyla doldurularak 30 saniye bekletildikten sonra yıkama solüsyonu çekilerek kuyucuklar kurutuldu. Bu prosedür beş kez tekrarlanarak plaka kurutuldu.

Renk Oluşumu: İlk olarak her kuyucuğa 50µl kromojen A solüsyonu eklendi ve daha sonra yine her kuyucuğa 50µl kromojen B solüsyonu eklendi. Karıştırmak için hafifçe çalkalandı. Renk oluşumu için ışıktan korunarak 37 °C’de 10 dakika inkübe edildi.

Reaksiyonu Durdurma: Reaksiyonu durdurmak için her kuyucuğa 50µl Stop solüsyonu eklendi (o anda renk maviden sarıya değişti).

Ölçüm: Boş kuyucuk sıfır olarak alınarak, her bir kuyucuğun absorbanı 450 nm dalga boyunda ölçüldü (Ölçüm, prosedüre uygun şekilde stop solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içinde gerçekleştirildi.)

İstatistiksel Analiz: Standart konsantrasyonlarına ve ilgili absorban değerlerine göre istatistiksel analizler yapıldı.

3.4. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

3.4.1.Dokuların Takibi, Parafin Gömme ve Kesit Alma

Histopatolojik değerlendirme için; farelerin sakrifiye edilmesinin ardından over dokuları hızlı bir şekilde alınarak %10’luk formalin solüsyonu (2014P6, Ostim O.S.B. Mah. 1235 Sok. No:112 Yenimahalle, Ankara) içerisinde 48 saat tespit edildi. 48 saatin sonunda tespit edilen doku örnekleri, rutin parafin takip prosedürüne uygun şekilde her bir doku etiketlenip bohçalanarak tespit solüsyonunun uzaklaştırılması için bir gece akarsu altında yıkandı. Dokular, derecesi giderek artan etil alkol (1.00983.2511, Merck, Darmstadt, Almanya) serileri ile (%60-70-80-90-96) dehidratasyonları yapıp, iki değişim ksilen (Surgipath, Birleşmiş Milletler) ile şeffaflaştırmaları sağlandıktan sonra, parafine emdirme aşaması uygulanıp etiketlenerek parafine gömüldü (Tablo 2). Elde edilen parafin bloklardan rotary mikrotomla (RM2245, Leica Microsystems, Almanya) polilizin ile kaplı lamlara dokunun başladığı ilk kesitten itibaren herhangi

bir atlama yapılmadan doku bitene kadar 5 µm kalınlığında alınan seri kesitler histokimyasal ve indirekt immünohistokimyasal yöntemler uygulanarak incelendi.

Tablo 2. Parafin takip prosedürü.

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Tespit	%10'luk Formalin	48 saat
	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	%60'lık Etil Alkol	½ saat
	%70'lik Etil Alkol	½ saat
	%80'lik Etil Alkol	½ saat
	%90'lık Etil Alkol	½ saat
	%100'lük Etil Alkol	1 saat
	%100'lük Etil Alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Alkol-Ksilen	½ saat
	Ksilen	1 saat
	Ksilen	1 saat
İnfiltrasyon	Ksilen-Parafin	½ saat
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

3.4.2. Hematoksilen ve Eozin Boyaması

Tüm gruplara ait ovaryum dokularının ilk seri kesitinden başlanarak her beş kesitte bir tanesi seçilip hematoksilen ve eozin boyaması (Tablo 3) için öncelikle etüvde (FN400, Nüve Sanayi Malz. İma. ve Tic. A.Ş. Saracalar Mahallesi, Saracalar Mah. Saracalar Kümeevleri No: 4/2, 06750 Akyurt/Ankara) 56°C de bir gece bekletildi, ardından bir saat ksilene (Surgipath, Birleşmiş Milletler) alınarak deparafinizasyonu sağlandı. Bu işlemten sonra derecesi azalan etil alkol (1.00983.2511, Merck, Darmstadt, Almanya) serilerinin (%96-80-70-60) her birinde ikişer dakika tutularak rehidratasyon işlemi yapıldı. Fazla alkolün uzaklaştırılması için

beş dakika akarsu altında yıkandıktan sonra çekirdek boyaması için hematoksilende (Harris Hematoksilen, Histo-med Medikal Lab. Sis. İm. San. Tic. Ltd. Şti. Alinteri Bulv. Gül 86 Yapı Koop. No: 1/13 Ostim, Yeni Mahalle, Ankara) üç dakika tutularak, fazla boyanın uzaklaştırılması için beş dakika akarsu altında yıkama yapıldı. Diferansiyasyon için bir saniye asit alkole batırılan kesitler tekrar akarsuda beş dakika yıkandıktan sonra sitoplazma boyaması için eozinde (05-11007/L Bio-optica 20134 Milano, İtalya) iki dakika bekletildi. Fazla boyanın uzaklaştırılması için akarsuda beş dakika yıkanan kesitler dehidratasyon için sırasıyla %80'lik ve %96'lık etil alkolde birer dakika bekletildikten sonra şeffaflaştırma işlemi için bir saat ksilende bekletildi. Bir saatin sonunda entellan (107961.0500, MERCK, Darmstadt, Almanya) ile kapatılarak kurumaya bırakılan lamalar ışık mikroskopunda (OLYMPUS BX43, Tokyo, Japonya) incelenerek fotoğraflandı.

Tablo 3. Hematoksilen Eozin boyama prosedürü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	56 °C Etüvde	1 Gece
	Ksilen	1 Saat
Rehidratasyon	%96'lık Etil Alkol	2 Dakika
	%80'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%70'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%60'lık Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Boyama	Hematoksilen	3 Dakika
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Diferansiyasyon	Asit-alkol	1 saniye
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Boyama	Eozin	2 Dakika
Yıkama	Akar su	5 Dakika
Dehidratasyon	%80'lik Etil Alkol	1 Dakika
	%96'lık Etil Alkol	1 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 Saat
Kapama	Entellan	

3.4.2.1. Folikül Sayımı

Takip eden seri kesitlerdeki foliküllerin sınıflandırılması için;

Tip 1: Primodiyal Folikül, oositin etrafı tek katlı yassı granüloza hücreleri ile çevrili olan foliküller

Tip 2: Primer Folikül, oosit unilaminar ya da mutlilaminar kübik granüloza hücreleri ile çevrili olan foliküller

Tip 3: Sekonder Folikül, oosit tek tabakadan fazla kübik granüloza hücreleri ile çevrili, gözle görülür bir antrum yapısı olmayan foliküller

Tip 4: Antral Folikül, oositin etrafı çok tabakalı kübik granüloza hücreleri ile çevirili ve bir ya da daha fazla antum boşluğu ve muhtemelen kumulus ooforus, teka tabakası içeren foliküller

Tip 5: Atrezik Folikül, ovulasyon olmadan dejenerasyon sürecine girmiş folikül, oosit nükleusu küçülüp büzülmüş, kromozomlar ve sitoplazma erimiş, granüloza hücre tabakası azalmış ve foliküler membran hücreleri hipertrofik olan şekilde değerlendirilmiştir (Hirshfield ve Midgley 1978; Wang ve ark. 1991; Borgeest ve ark. 2002; Yan ve ark. 2018).

3.5. İNDİREKT İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BOYAMA

Avidin-Biyotin-Peroksidaz tekniği ile İndirekt İmmünohistokimyasal yöntem için (Tablo 4); formalin (2014P6, Ostim O.S.B. Mah. 1235 Sok. No:112 Yenimahalle, Ankara) ile tespit edilip parafine gömüldükten sonra rotary mikrotom (RM2245, Leica Microsystems, Almanya) ile polilizin kaplı lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki seri kesitler kullanıldı. Over kesitleri deparafinizasyon için 1 gece 60°C etüvde (FN400, Nüve Sanayi Malz. İma. ve Tic. A.Ş. Saracalar Mahallesi, Saracalar Mah. Saracalar Kümeevleri No: 4/2, 06750 Akyurt/Ankara) bekletildikten sonra iki değişim ksilen (Surgipath, Birleşmiş Milletler ile muamele edildi. Rehidratasyon için, azalan etil alkol (1.00983.2511, Merck, Darmstadt, Almanya) serilerinden (%96-80-70-60) geçirildi. Distile su ile 10 dakika yıkandıktan sonra fosfat tampon solüsyonu (PBS- 00-3002, Invitrogen, Life Technologies, Amerika) ile üç defa beşer dakika yıkandı. Kesitler %0,5'lik tripsin (TSS155, ScyTek Lab, Logan Utah Amerika) solüsyonu içinde 37°C de 10 dakika tutuldu. Doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂-1.08597.2500, MERCK, Darmstadt, Almanya) uygulandıktan sonra kesitler üç defa beşer dakika PBS ile yıkandı. Bloklama solüsyonu ile oda sıcaklığında 1 saat bekletildi. Hücre ölüm mekanizmalarının varlığının belirlenmesi için kesitler otofaji ile ilgili anti-Lamp1 (sc-20011, Santa Cruz, Dallas, Teksas, Amerika) ve anti-MAP LC3β (sc-271625, Santa Cruz, Dallas, Teksas, Amerika), paraptoz ile ilgili anti-CHOP (Abp50978, Abbkine, Wuhan, Çin) ve anti-GRP78 (sc-376768, Santa Cruz, Dallas, Teksas, Amerika), apoptoz ile ilgili anti-kaspaz 3 (sc-56053, Santa Cruz, Dallas, Teksas, Amerika), anti-kaspaz 8 (sc-70501, Santa Cruz, Dallas, Teksas, Amerika) ve anti-kaspaz 9 (sc-56076, Santa Cruz, Dallas,

Teksas, Amerika) primer antikorları ile (Tablo 5) 18 saat +4°C’de inkübe edildi. Primer antikor ile inkübasyondan sonra PBS ile üç defa yıkanan kesitler biotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz sekonder antikor (SHP125, ScyTek Lab, Logan, Utah, Amerika) ile 30 dakika boyandı ve tekrar PBS ile yıkandıktan sonra kesitlere 30 dakika streptavidin (SHP125, ScyTek Lab, Logan, Utah, Amerika) uygulandı. İmmunoreaktivitenin görünürlüğünü saptamak amacıyla diaminobenzidine (DAB-ACK125, SkyTek Lab, Logan, Utah, Amerika) ile 5 dakika boyanan kesitlerin, artalan boyaması ise Mayer’s hematoxilen (HMM999, ScyTek Lab, Logan, Utah, Amerika) ile sağlandı. %80 ve %95’lik alkollerde dehidratasyon işlemi gerçekleştirilen kesitler, 30 dakika ksilen ile şeffaflaştırma işleminden sonra entellan (107961.0500, MERCK, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı ve ışık mikroskobu (OLYMPUS BX43, Tokyo, Japonya) ile incelenerek fotoğrafları çekildi.

Tablo 4. İndirekt immünohistokimya prosedürü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
	Ksilen	1 Saat
	Ksilen	1 Saat
Rehidratasyon	%96'lık Etil Alkol	2 Dakika
	%80'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%70'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%60'lık Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Distile su	10 Dakika
	Fosfat Tampon Solüsyonu	3x5 Dakika
	(PBS)	
Permeablizasyon	%0,5'lik Tripsin Solüsyonu	37°C de 10 dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu	3x5 Dakika
	(PBS)	
Endojen İnhibasyonu	Peroksidaz %3'lük Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	5 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu	3x5 Dakika
	(PBS)	
	Bloklama Solüsyonu	1 saat
İnkübasyon	Primer Antikor	18 saat +4°C'de
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu	3x5 Dakika
	(PBS)	
	Sekonder Antikor	30 Dakika
	(Biotinle işaretlenmiş hidrojen peroksidaz)	
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu	3x5 Dakika
	(PBS)	
	Streptavidin	30 Dakika
İmmünoreaktivite	Diaminobenzidine (DAB)	5 Dakika
Artalan Boyama	Mayer's hematoksilen	
Dehidratasyon	%80'lik Etil Alkol	1 Dakika
	%96'lık Etil Alkol	1 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 Saat
Kapama	Entellan	

Tablo 5. İmmünohistokimya için kullanılan primer antikorlar

PRİMER ANTİKOR	MARKA / KAT NO	DİLÜSYON
Anti-Lamp1 (Mouse monoclonal)	Santa Cruz / sc-20011	1/100
Anti-MAP LC3β (Mouse monoclonal)	Santa Cruz / sc-271625	1/100
Anti-CHOP (Rabbit polyclonal)	Abbkine / Abp50978	1/100
Anti-GRP78 (Mouse monoclonal)	Santa Cruz / sc-376768	1/100
Anti-kaspaz 3 (Mouse monoclonal)	Santa Cruz / sc-56053	1/100
Anti-kaspaz 8 (Mouse monoclonal)	Santa Cruz / sc-70501	1/100
Anti-kaspaz 9 (Mouse monoclonal)	Santa Cruz / sc-56076	1/100

3.6. TUNEL ANALİZİ

Apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling (TUNEL-Millipore LOT: 2869035, Burlington, Massachusetts, Amerika) boyama yöntemi kullanıldı (Tablo 6). Alınan 5 μm 'lik seri kesitler, deparafinizasyon için 1 gece 60°C etüvde bekletildikten sonra iki kez ksilen ile muamele edildi. Rehidratasyon için, azalan etil alkol (1.00983.2511, Merck, Darmstadt, Almanya) serilerinden (%96-80-70-60) geçirildi. Ardından distile su ile 10 dakika yıkandı. Fosfat tampon solüsyonu (PBS- 00-3002, Invitrogen, Life Technologies, Amerika) ile üç defa beşer dakika yıkandıktan sonra 1/500 oranında PBS ile dilüe edilen 20 $\mu\text{g/ml}$ Proteinaz-K 37°C'de 15 dakika uygulandı. PBS ile beşer dakika üç kez yıkamayı takiben 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit ile muamele edildikten sonra yeniden 5'er dakika 3 kez PBS ile oda ısısında yıkandı. Örnekler 5 dakika Equilibration buffer ile oda ısısında tutulduktan sonra TdT-enzimi ile nemli atmosferik ortamda 37°C'de 60 dakika plastik lameller kesitleri kapatacak şekilde

bekletildi. Sürenin ardından Stop Wash Buffer ile 10 dakika bekletildikten sonra Antidioksisinin Peroksidaz Konjugatı ile 30 dakika muamele edilen örnekler beşer dakika üç kez PBS ile yıkandı. Ardından DAB (Diaminobenzidin) ile boyama yapılarak, birkaç kez distile su ile yıkandı. Artalan boyaması Mayer's Hematoksilen ile yapıldı. Kör yöntemle TUNEL pozitif hücreler saptandı ve sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi.



Tablo 6. TUNEL prosedürü

İŞLEM	KULLANILAN MADDE	SÜRE
Deparafinizasyon	60°C Etüvde	1 Gece
	Ksilen	1 Saat
	Ksilen	1 Saat
Rehidratasyon	%96'lık Etil Alkol	2 Dakika
	%80'lık Etil Alkol	2 Dakika
	%70'lik Etil Alkol	2 Dakika
	%60'lık Etil Alkol	2 Dakika
Yıkama	Distile su	10 Dakika
	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
Permeablizasyon	Proteinaz-K	37°C'de 15 dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
Endojen İnhibasyonu	Peroksidaz %3'lük Hidrojen Peroksit (H ₂ O ₂)	5 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
	Equilibration buffer	5 Dakika
İnkübasyon	TdT-enzimi	60 dakika 37°C'de
Yıkama	Stop Wash Buffer	10 Dakika
	Antidioksinin Peroksidaz Konjugatı	30 Dakika
Yıkama	Fosfat Tampon Solüsyonu (PBS)	3x5 Dakika
	Streptavidin	30 Dakika
İmmünoreaktivite	Diaminobenzidine (DAB)	5 Dakika
Artalan Boyama	Mayer's hematoksilen	
Dehidratasyon	%80'lik Etil Alkol	1 Dakika
	%96'lık Etil Alkol	1 Dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 Saat
Kapama	Entellan	

3.7.İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler, Tukey-Kramer çoklu karşılaştırma testi ile one way ANOVA kullanılarak analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ve istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar $p \leq 0.05$ olarak kabul edildi.



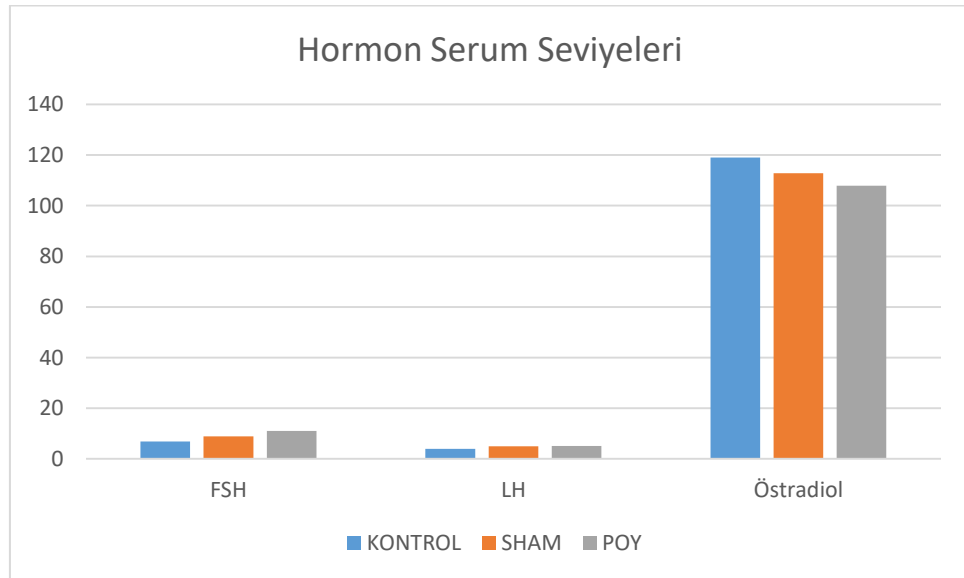
4. BULGULAR

4.1.BİYOKİMYASAL SONUÇLAR

Prematüre ovaryan yetmezlik modelinin oluşturulduğunun doğrulanması için deneyin sonlandırılmasından sonra farelerden alınan kan örneklerindeki FSH, LH ve östradiol serum seviyeleri ELİSA yöntemi ile değerlendirildi. Kontrol ve sham grubuna göre POY grubunda FSH ve LH seviyeleri (Kontrol grubu; FSH:6,79±1,73, LH:3,93±1,19; Sham grubu; FSH:8,89±1,89, LH:4,89±3,72; POY grubu; FSH:10,98±3,45, LH:5,11±1,51) artarken östradiol seviyesinin (Kontrol grubu; Östradiol:119,05±19,63; Sham grubu; Östradiol:112,85±48,24; POY grubu; Östradiol: 107,93±27,22) azaldığı fakat bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı gözlemlendi (Tablo 7, Şekil 35).

Tablo 7. Gruplara göre kandaki serum hormon seviyeleri.

	FSH	LH	ÖSTRADİOL
KONTROL	6,79±1,73	3,93±1,19	119,05±19,63
SHAM	8,89±1,99	4,89±3,72	112,85±48,24
POY	10,98±3,45	5,11±1,51	107,93±27,22



Şekil 35. Kandaki serum hormon seviyelerinin analizi

4.2.HİSTOPATOLOJİK SONUÇLAR

Deneyin sonlandırılmasından sonra servikal dislokasyon ile sakrifiye edilen hayvanlardan alınan ovaryum dokularının histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeleri ışık mikroskobu altında yapıldı.

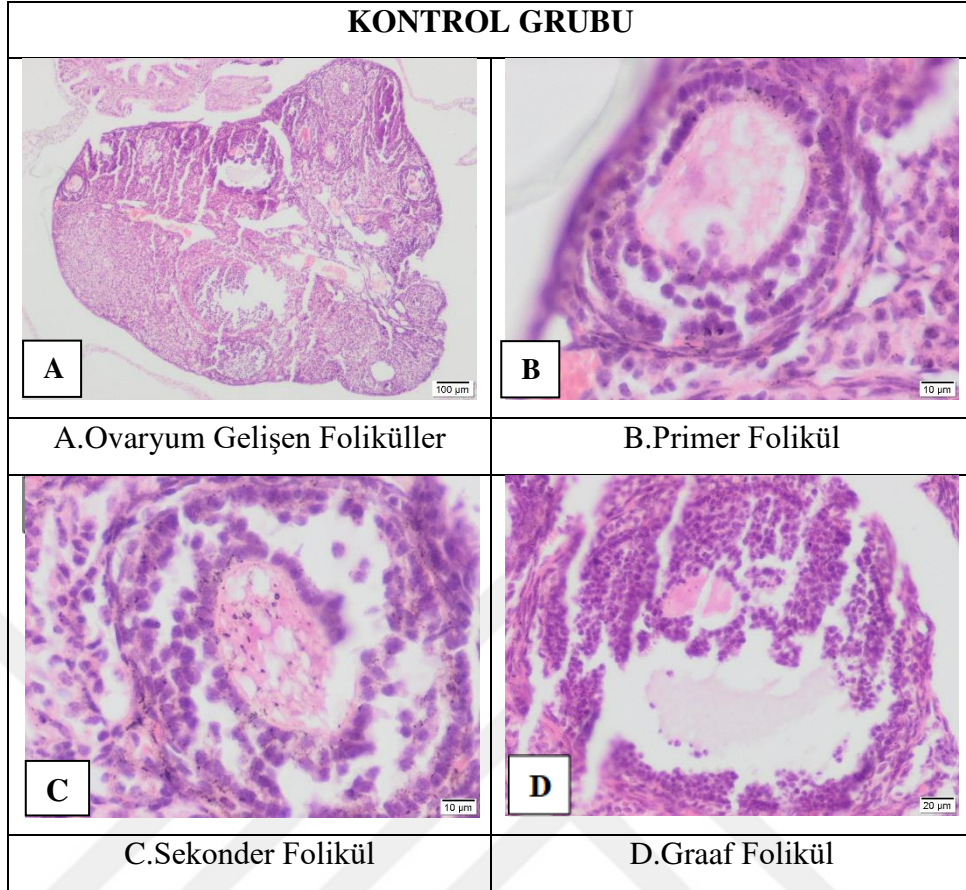
4.2.1.Hematoksilen Eozin Sonuçları

Kontrol, sham ve POY gruplarına ait ovaryum dokularının hematoksilen eozin boyamalarının ışık mikroskobu altında incelemesi sonucunda, kontrol ve sham grubunda gelişen folikül tiplerinin hemen hemen hepsi gözlenirken (Resim 4 ve 5), POY grubuna ait ovaryumlar gelişen folikülden yoksun daha çok atrezik foliküllerden zengindi (Resim 6).

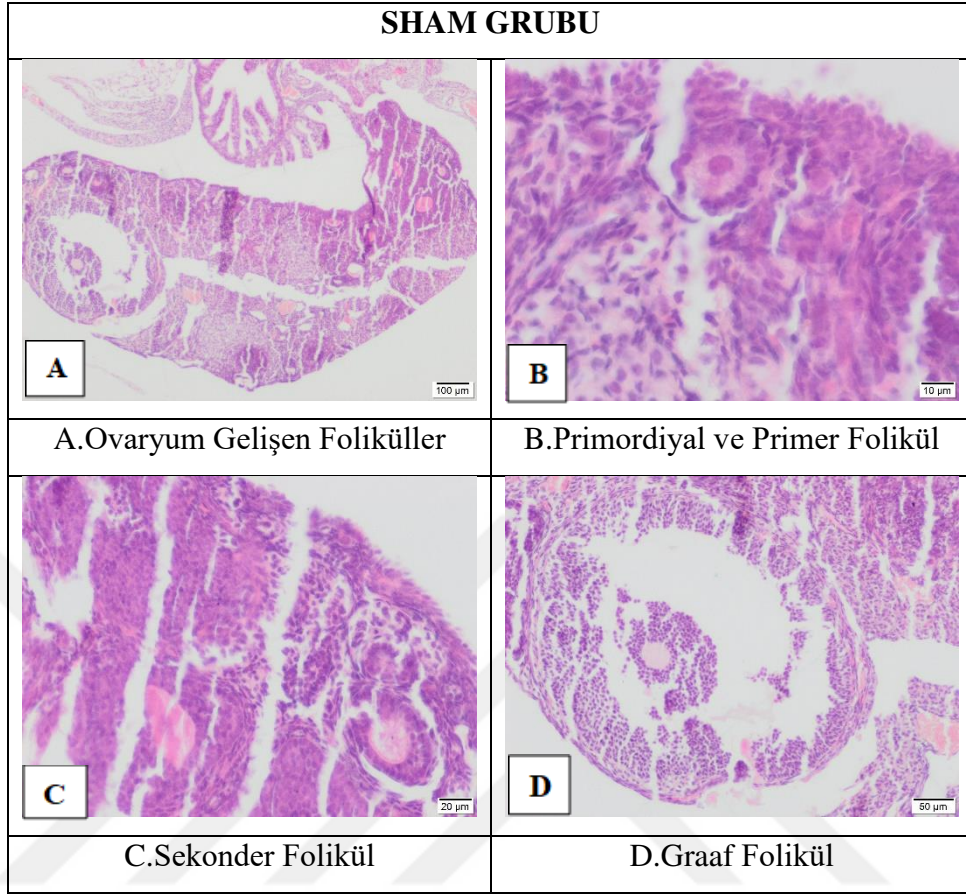
Kontrol grubunda, ovaryum dokusunun dıştan tek katlı kübik germinal epitel ile sarılı olduğu ve hemen altında gevşek bağ dokusu yapısındaki tunika albugineanın yer aldığı izlenmiştir. Ovaryumun korteks tabakasında gelişen foliküllerden; etrafı tek katlı yassı epitel ile çevrili primordiyal foliküller, tek katlı (unilaminar) ve çok katlı (multilaminar) kübik epitelle çevrili primer foliküller, etrafı iki tabakalı teka hücreleri ile çevrilen ve antruma sahip sekonder foliküller ve belirgin bir antrum yapısı, korona radiata ve kumulus ooforus ile karakterize graaf folikülleri ve kan damarları ile ovaryum stromasını içeren medulla kısmı ayırt ediliyordu (Resim 4).

Sham grubunda, kontrol grubuna benzer şekilde foliküler yapıların varlığı izlendi (Resim 5).

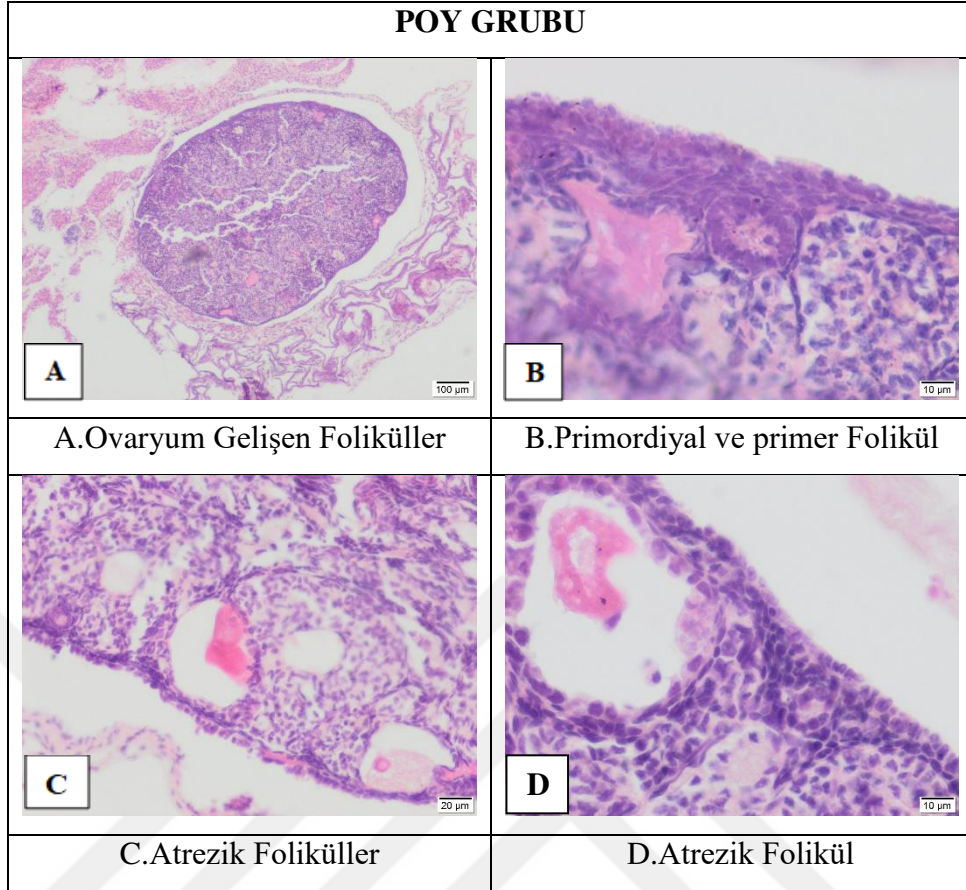
POY grubunda ise ovaryum dokusunda stromal hiperplazi ile kontrol grubunda yer alan foliküler yapının bozulduğu, preantral ve antral foliküllerin sayısının önemli ölçüde azaldığı ve bunun yanında atrezik folikül yapısının hakim olduğu görülürken, graaf folikül yapısının olmadığı gözlemlendi (Resim 6).



Resim 4. Kontrol grubu Hematoksilen Eozin boyamaları (Ölçek: A: 100µm, B: 10µm, C: 10µm, D: 20 µm).



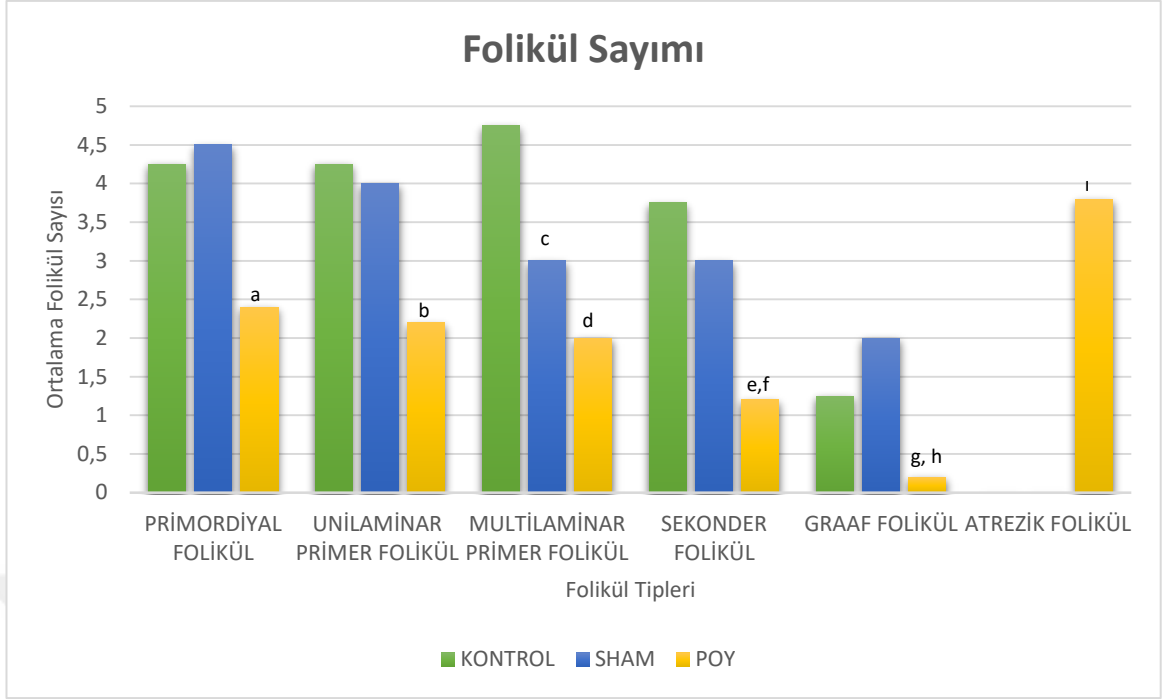
Resim 5. Sham grubu Hematoksilen Eozin boyamaları (Ölçek: A:100µm, B: 10µm, C: 20µm, D: 50µm).



Resim 6. POY grubu Hematoksilen Eozin boyamaları (Ölçek: A: 100µm, B: 10µm, C: 20µm, D: 10µm)..

4.2.2.Folikül Sayımı Sonuçları

Seri kesitlerden yapılan folikül sayımı sonuçlarına göre; istatistiksel olarak kontrol ve sham grubuna ait folikül sayıları hemen hemen aynı iken POY grubunda primordiyal, unilaminar ve multilaminar primer, sekonder ve graaf folikül sayısı anlamlı bir biçimde azalmış olup atrezik folikül sayısının artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 36).

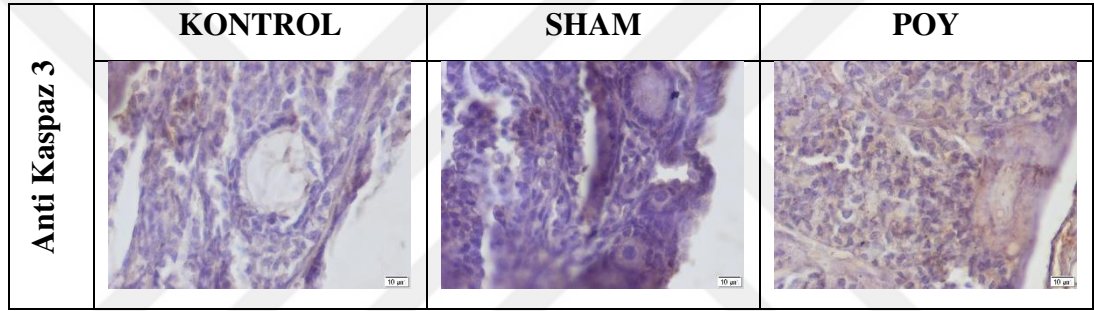


Şekil 36. Folikül sayımı sonucu gruplar arası ortalama folikül dağılımı [a: Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.01$), b: Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.001$), c: Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.01$), d: Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.001$), e: Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.001$), f: Sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.01$), g: Kontrol grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.01$), h: Sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.001$), ı: Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.01$)].

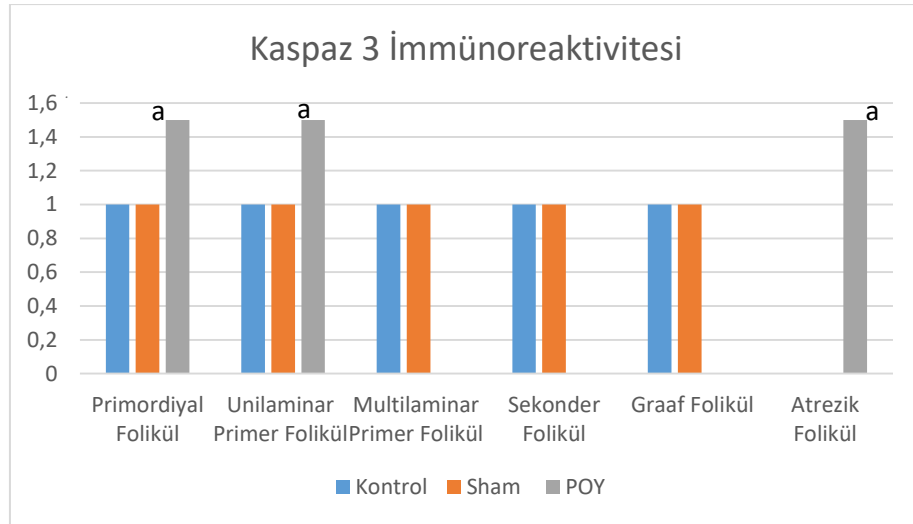
4.3.İMMÜNOHİSTOKİMYASAL SONUÇLAR

Tüm gruplara ait farelerden alınan ovaryum dokularının immünohistokimyasal incelemesi sonucunda;

Anti-kaspaz 3 immünoreaktivitesi, primordiyal ve unilaminar primer foliküllerde POY grubunda foliküler hücrelerde hafif/orta (+/++) şiddette izlenirken kontrol ve sham gruplarında hafif (+) şiddette gözlemlendi. Multilaminar primer, sekonder ve graaf foliküllerinin kontrol ve sham gruplarında granüloza hücrelerinde anti-kaspaz 3 immünoreaktivitesi hafif (+) olarak izlendi. POY grubunda ise bu foliküller gözlenmez iken bu foliküllerin yerine atrezik foliküllerde anti-kaspaz 3 immünoreaktivitesi hafif/orta (+/++) olarak saptandı (Resim 7, Şekil 37).

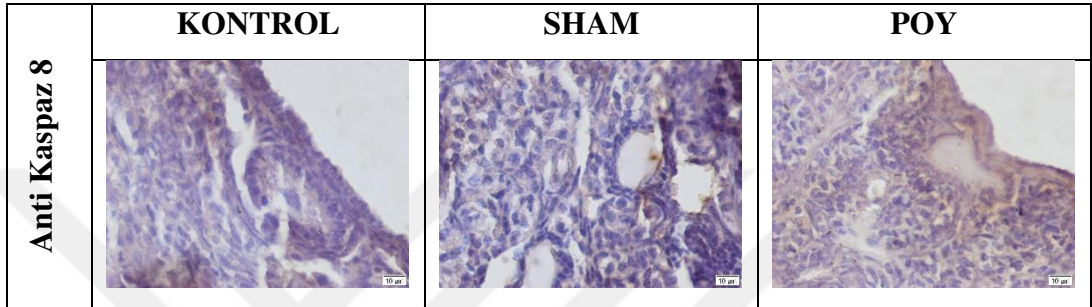


Resim 7. Tüm gruplara ait Anti-Kaspaz 3 immünohistokimyasal boyaması (Ölçek: 10µm).

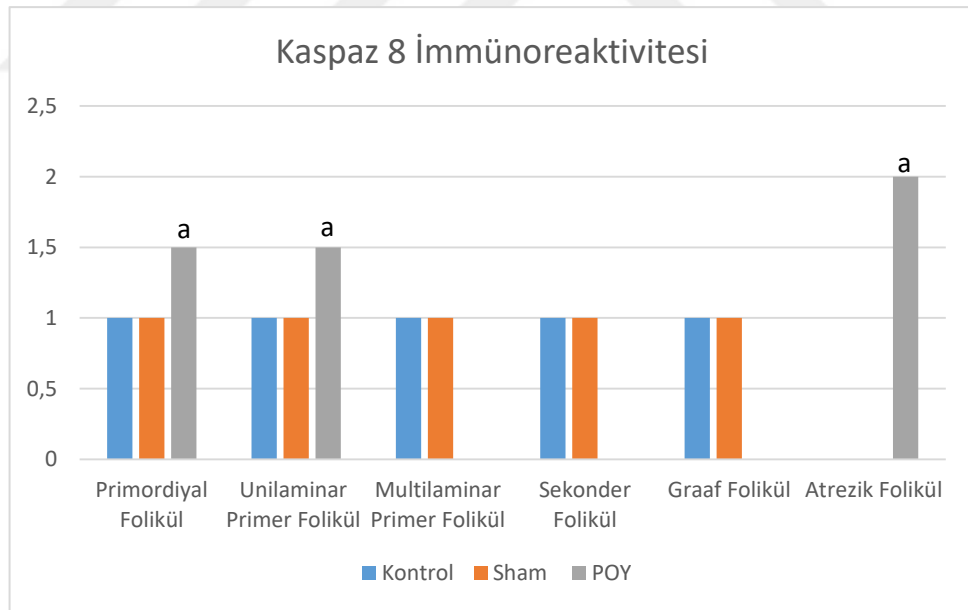


Şekil 37. Anti-kaspaz 3 immünoreaktivitesinin foliküllere göre dağılımı [a: Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.001$)].

Anti-kaspaz 8 immünoaktivitesi, primordiyal ve unilaminar primer foliküllerde POY grubunda foliküler hücrelerde ve oositlerde hafif/orta (+/++) şiddette izlenirken kontrol ve sham gruplarında foliküler hücrelerde hafif (+) şiddette gözlemlendi. Multilaminar primer, sekonder ve graaf foliküllerinin kontrol ve sham gruplarında anti-kaspaz 8 immünoaktivitesi hafif (+) olarak izlendi. POY grubunda ise bu foliküller gözlenmez iken bu foliküllerin yerine atrezik foliküllerde anti-kaspaz 8 immünoaktivitesi orta (++) şiddette saptandı (Resim 8, Şekil 38).

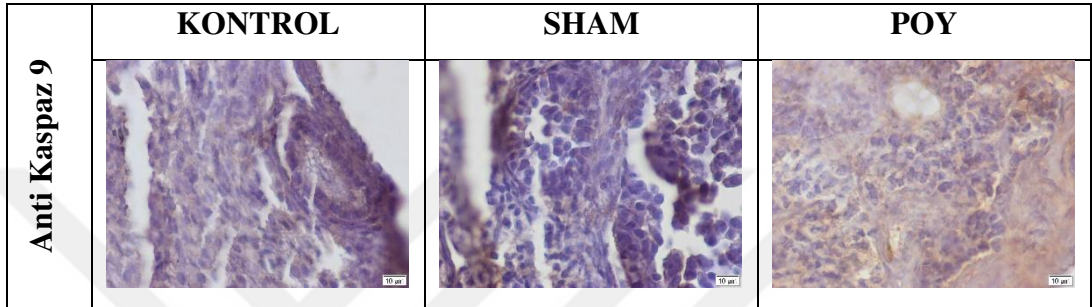


Resim 8. Tüm gruplara ait Anti-Kaspaz 8 immünohistokimyasal boyaması. (Ölçek: 10µm).

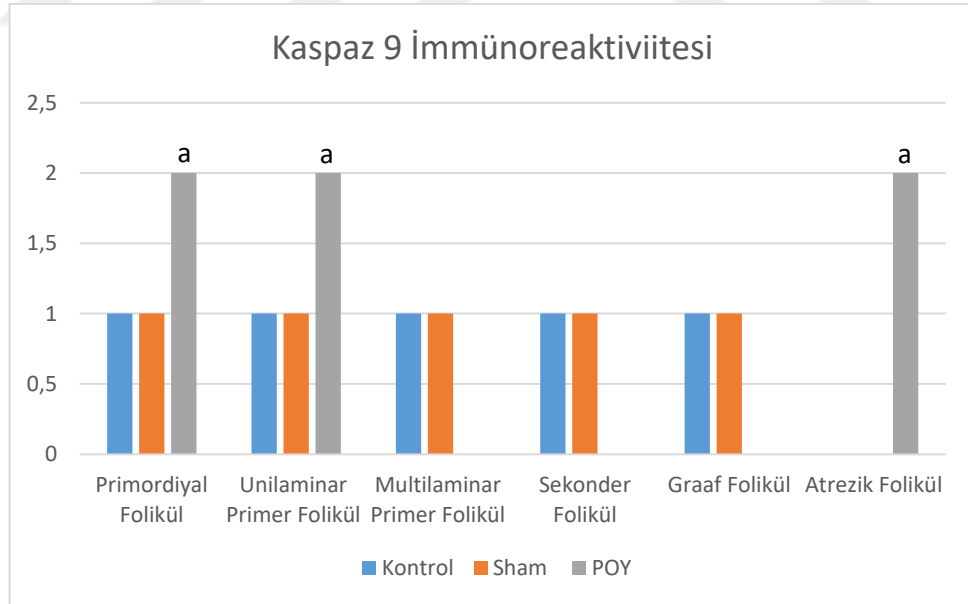


Şekil 38. Anti-kaspaz 8 immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı [a: Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p < 0.001$)].

Anti-Kaspaz 9 immünoaktivitesi, primordiyal ve unilaminar primer foliküllerde POY grubunda foliküler hücrelerde ve oositlerde orta (++) şiddette izlenirken kontrol ve sham gruplarında foliküler hücrelerde hafif (+) şiddette gözlemlendi. Multilaminar primer, sekonder ve graaf foliküllerinin kontrol ve sham gruplarında granüloza hücrelerinde anti-kaspaz 9 immünoaktivitesi hafif olarak izlendi. POY grubunda ise bu foliküller gözlenmez iken bu foliküllerin yerine atrezik foliküllerde anti-kaspaz 9 immünoaktivitesi orta (++) şiddette saptandı (Resim 9, Şekil 39).

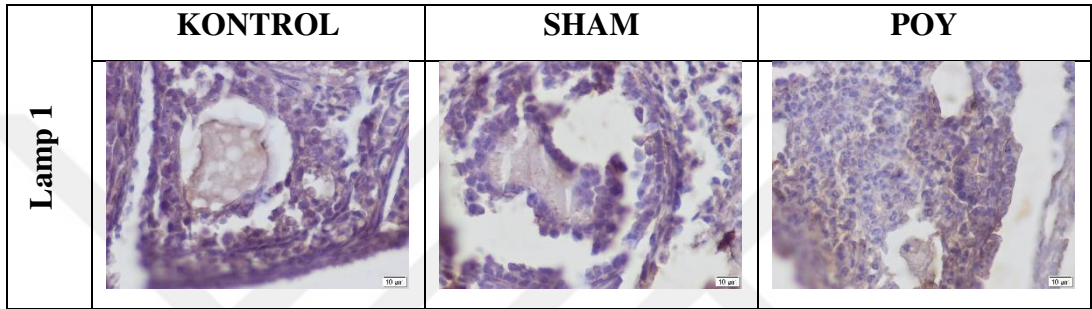


Resim 9. Tüm gruplara ait Anti-Kaspaz 9 immünohistokimyasal boyaması (Ölçek: 10µm).

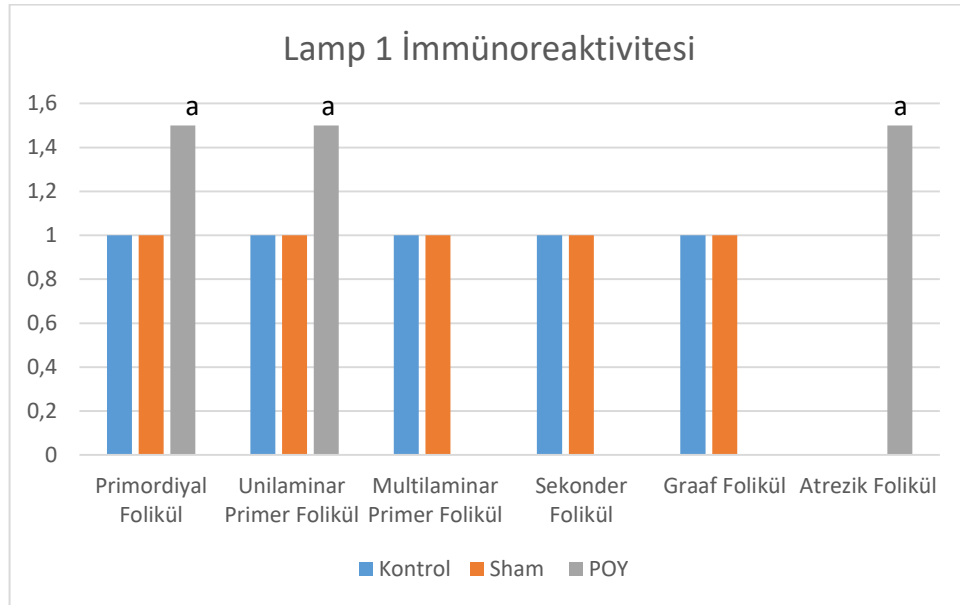


Şekil 39. Anti-kaspaz 9 immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı [a: Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p<0.001$)].

Anti-Lamp 1 immünoaktivitesi, primordiyal ve unilaminar primer foliküllerde POY grubunda foliküler hücrelerde ve oositlerde hafif/orta (+/++) şiddette izlenirken kontrol ve sham gruplarında foliküler hücrelerde hafif (+) şiddette gözlemlendi. Multilaminar primer, sekonder ve graaf foliküllerinin kontrol ve sham gruplarında granüloza hücrelerinde anti-Lamp 1 immünoaktivitesi hafif (+) olarak izlendi. POY grubunda ise bu foliküller gözlenmez iken bu foliküllerin yerine atrezik foliküllerde anti-Lamp 1 immünoaktivitesi hafif/orta (+/++) şiddette saptandı (Resim 10, Şekil 40).

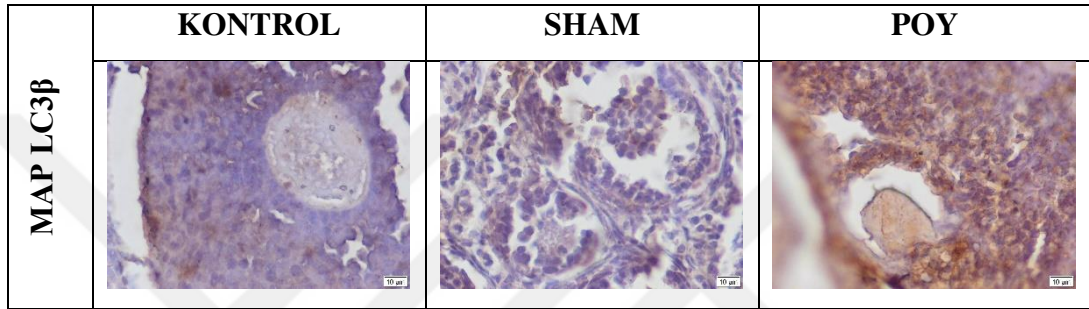


Resim 10. Tüm gruplara ait Anti-Lamp1 immünohistokimyasal boyaması (Ölçek: 10µm).

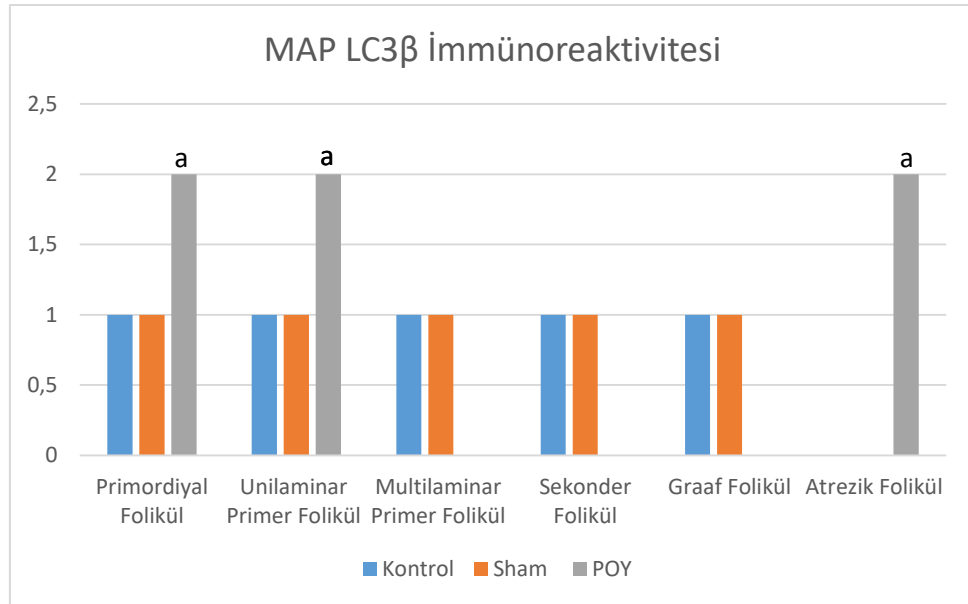


Şekil 40. Anti-Lamp1 immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı [a: Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p < 0.001$)].

Anti-MAP LC3 β immünoaktivitesi, primordiyal ve unilaminar primer foliküllerde POY grubunda foliküler hücrelerde ve oositlerde orta (++) şiddette izlenirken kontrol ve sham gruplarında foliküler hücrelerde hafif (+) şiddette gözlemlendi. Multilaminar primer, sekonder ve graaf foliküllerinin kontrol ve sham gruplarında granüloza hücrelerinde anti- MAP LC3 β immünoaktivitesi hafif (+) olarak izlendi. POY grubunda ise bu foliküller gözlenmez iken bu foliküllerin yerine atrezik foliküllerde anti- MAP LC3 β immünoaktivitesi orta (++) şiddette saptandı (Resim 11, Şekil 41).

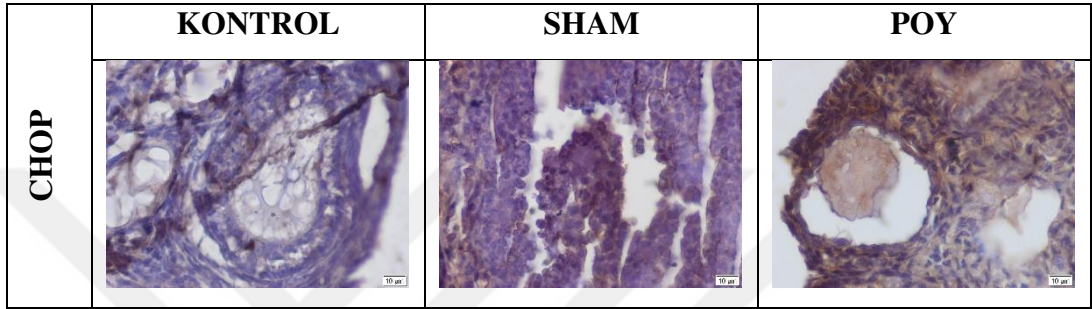


Resim 11. Tüm gruplara ait Anti-MAP LC3 β immünohistokimyasal boyaması (Ölçek: 10 μ m).

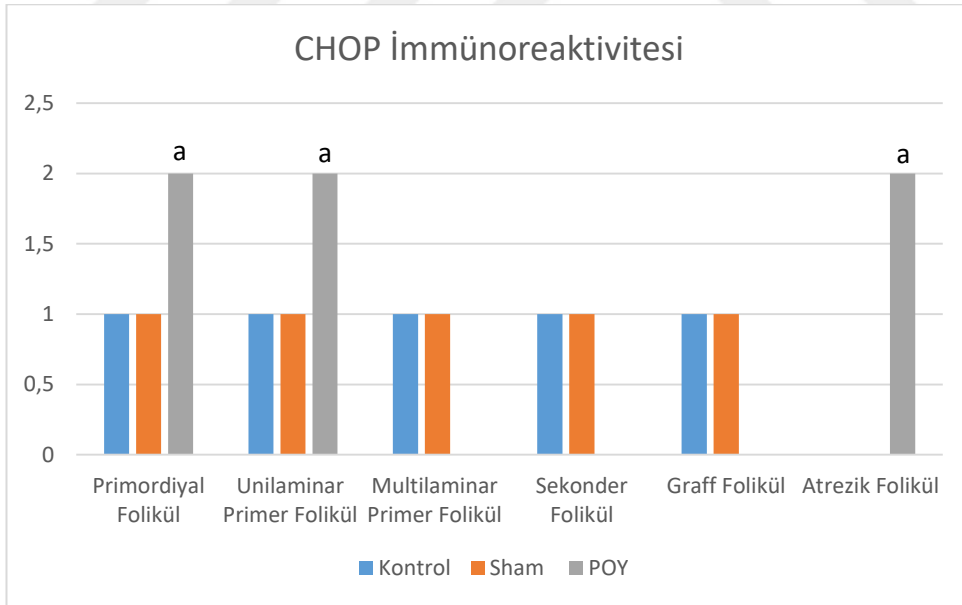


Şekil 41. Anti-MAP LC3 β immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı [a: Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak farklı (p<0.001)].

Anti-CHOP immünoaktivitesi, primordiyal ve unilaminar primer foliküllerde POY grubunda foliküler hücrelerde ve oositlerde orta (++) şiddette izlenirken kontrol ve sham gruplarında foliküler hücrelerde hafif (+) şiddette gözlemlendi. Multilaminar primer, sekonder ve graaf foliküllerinin kontrol ve sham gruplarında granüloza hücrelerinde anti-CHOP immünoaktivitesi hafif (+) olarak izlendi. POY grubunda ise bu foliküller gözlenmez iken bu foliküllerin yerine atrezik foliküllerde anti-CHOP immünoaktivitesi orta (++) şiddette saptandı (Resim 12, Şekil 42).

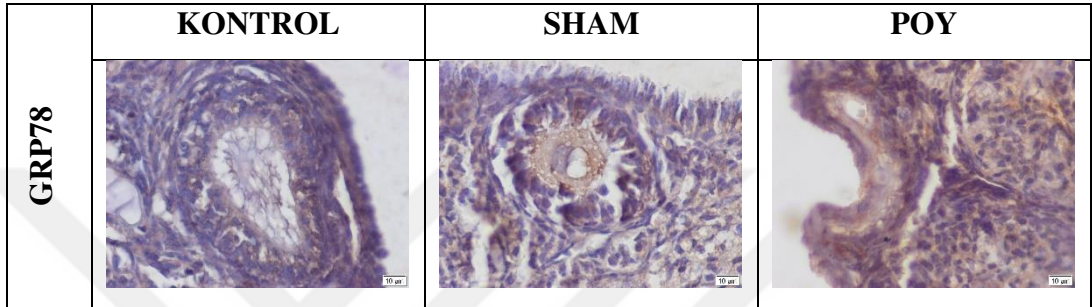


Resim 12. Tüm gruplara ait Anti-CHOP immünohistokimyasal boyaması (Ölçek: 10µm).

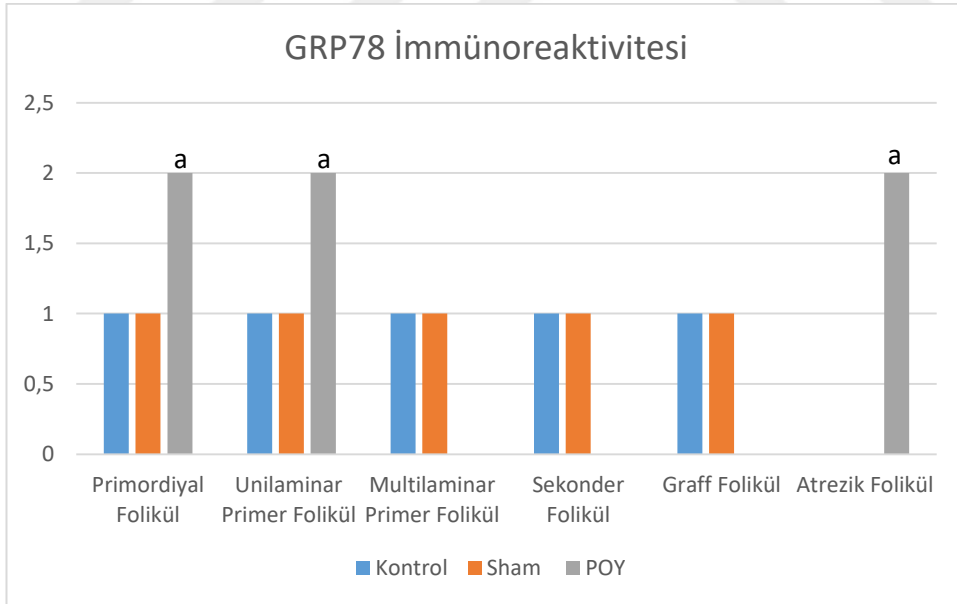


Şekil 42. Anti-CHOP immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı [a: Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p < 0.001$)].

Anti-GRP78 immünoaktivitesi, primordiyal ve unilaminar primer foliküllerde POY grubunda foliküler hücrelerde ve oositlerde orta (++) şiddette izlenirken kontrol ve sham gruplarında foliküler hücrelerde hafif (+) şiddette gözlemlendi. Multilaminar primer, sekonder ve graaf foliküllerinin kontrol ve sham gruplarında granüloza hücrelerinde anti-GRP78 immünoaktivitesi hafif (+) olarak izlendi. POY grubunda ise bu foliküller gözlenmez iken bu foliküllerin yerine atrezik foliküllerde anti-GRP78 immünoaktivitesi orta (++) şiddette saptandı (Resim 13, Şekil 43).



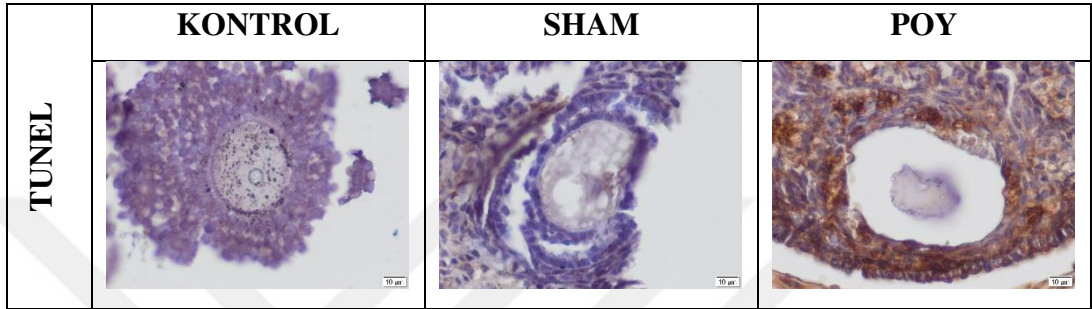
Resim 13. Tüm gruplara ait Anti-GRP78 immünohistokimyasal boyaması (Ölçek: 10µm).



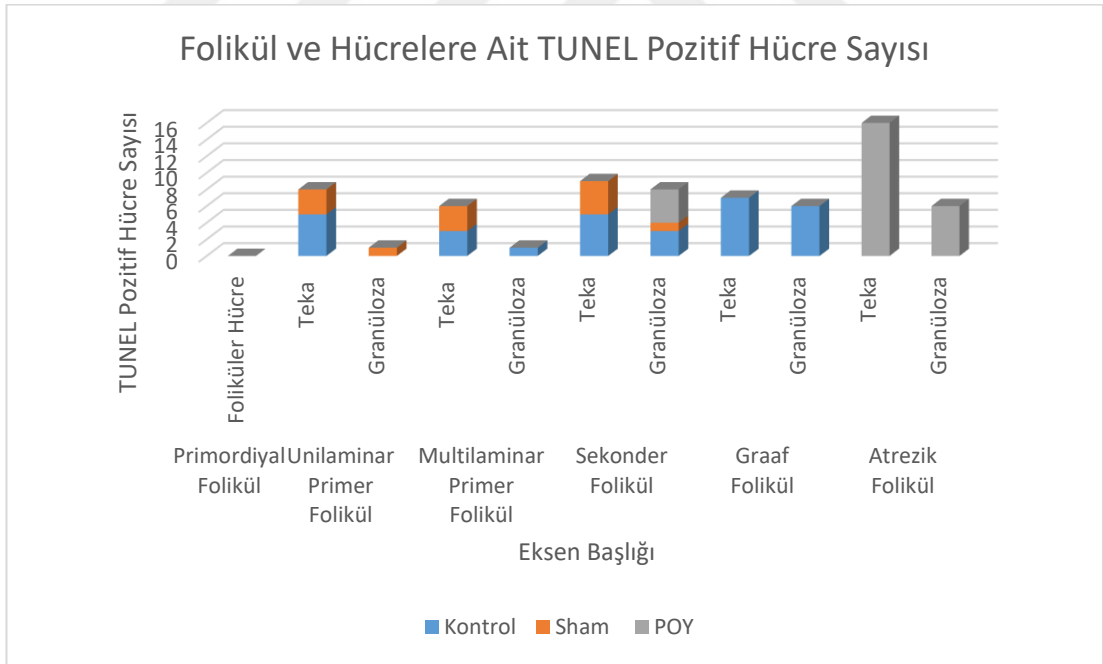
Şekil 43. Anti-GRP78 immünoaktivitesinin foliküllere göre dağılımı [a: Kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak farklı ($p < 0.001$)].

4.4.TUNEL SONUÇLARI

Teka hücreleri, granüloza hücreleri ve oositte yer alan apoptotik hücrelerin ışık mikroskobu altında sayılması sonucunda, kontrol ve sham grubuna ait ovaryum dokularının POY grubuna göre daha az apoptotik hücreye sahip olduğu görüldü (Resim 14 ve Şekil 44).



Resim 14. Tüm gruplara ait TUNEL analizi (Ölçek: 10µm).



Şekil 44. TUNEL Analizi Sonuçları

5. TARTIŞMA

Prematüre ovaryan yetmezlik, ovaryan rezervin yokluğu, fonksiyonsuzluğu ya da erken tükenmesi ile karakterize edilen, dünyadaki kadınların yaklaşık %1'ini etkileyerek, 40 yaşından önce kadınlarda amenore ve hipergonadotropik hipoestrogenizme neden olan, etiyolojisi net olarak aydınlatılamamış heterojenik bir hastalık olup hali hazırda efektif bir tedavisi bulunmamaktadır (Kristensen ve Andersen 2018; Yan ve ark. 2018; Yin ve ark. 2018). Spontan POY; genetik, otoimmünolojik, inflamatuvar, enzim eksikliği, metabolik ya da sıklıkla idiyopatik nedenleri içerirken, indüklenen POY çoğunlukla cerrahi (bilateral oofektomi), kemoterapi ve radyoterapi gibi onkolojik tedavilerden kaynaklanmaktadır (Kristensen ve Andersen 2018). POY hastalarında, ovaryum rezervinin erken tükenmesini durduracak ya da yavaşlatacak efektif bir tedavi bulunmamaktadır (Zhang ve ark. 2018). POY ile birçok etiyolojik faktörün ilişkilendirilmiş olmasına rağmen, ovaryum fonksiyon bozukluklarına neden olan mekanizmaların yeterince anlaşılamamış olması nedeniyle potansiyel tedavilerin geliştirilmesi için kapsamlı araştırmaların yapılması gereklidir (Grasa ve ark. 2016).

Primordiyal folikül gelişimi ve aktivasyonunun anormal kontrolü 40 yaşın altındaki kadınların %1-3'ünü etkileyen ve vakaların %70'inden fazlasında idiyopatik prematüre ovaryan yetmezliğe neden olur. Heterojen bir spektruma yol açan iki ana etiyolojik mekanizma vardır. İlki folikül yoksunluğudur (afoliküler POY), ikinci mekanizma ise değişken bir folikül popülasyonunun varlığında folikül disfonksiyonudur (foliküler POY). Foliküler POY vakaların yaklaşık %50'sini oluşturur. Her ne kadar bazı faktörler POY ile ilişkili olsa da, vakaların çoğunda nedensel mekanizma açık değildir ve bu nedenle POY modelleri kullanılarak daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Grasa ve ark. 2016).

Çalışmamızda kadın infertilitesinin en önemli sebeplerinden biri olan prematüre ovaryan yetmezlik fare modelinin oluşturulması ve POY'da görülen ovaryum rezervinin tükenmesine neden olan foliküler atrezi sürecinde rol oynayan hücre ölüm mekanizmalarından apoptoz, otofaji ve paraptozun immünohistokimyasal yöntemlerle araştırılması amaçlanmıştır.

Son zamanlarda prematüre ovaryan yetmezlik ile ilgili artan çalışmalar ile POY semptomlarını önlemek ve iyileştirmek için birçok terapötik yöntem uygulanmış ve hem etiyolojiye yönelik hem de tedavi amaçlı çeşitli POY hayvan modelleri oluşturulmuştur (Zhang ve ark. 2016). Hayvan modelinin oluşturulma başarısı, hormon değişiklikleri, ovaryan folikül matürasyonu ve hasarlı ovaryum dokusu gibi bazı standartlara bağlıdır. İdeal hayvan modeli, POY klinik semptomlarını hızlı bir şekilde simüle edebilmelidir. İnsanlarda POY'un altında yatan moleküler mekanizmaların daha iyi anlaşılması için bazı mutant fare modelleri geliştirilmiştir (Jagarlamudi ve ark. 2010, Zhang ve ark. 2016). Literatürde çok sayıda aday gen olduğu düşünüldüğünde, birçok mutant POY hayvan modelinin, kullanım gereksinimlerini karşılayamadığı ve koruyucu yöntemlerin araştırılmasında yaygın olarak kullanılamadığı düşünülmektedir. Deney hayvanlarında, alkillayıcı ajanlar, metotreksat, 6 merkaptopurin ve adriamisin gibi indükleyici maddeler POY oluşumu ile ilgili özellikleri sergilemektedir (Zhang ve ark. 2016).

Literatürde; yaygın olarak siklofosfamid ile indüklenen POY hayvan modeli kullanıldığı ve overlere toksik etki yaptığı gösterilmiştir. Bununla birlikte POY modeli oluşturmak için kullanılacak siklofosfamid dozu ve ilaç süresi ile ilgili farklı bilgiler bulunmaktadır (Zhang ve ark. 2016). Bu nedenle, güncel çalışmaların amacı, yaygın olarak kullanılan, farelerde prematüre ovaryan yetmezlik gelişimi için ovaryan hasara neden olabilen siklofosfamid gibi kemoterapötik alkillayıcı ilaçları araştırmak ve ovaryan hasarın gelişimine neden olan hücre ölümünü incelemektir (Luo ve ark. 2017, Xiong ve ark. 2017).

Bu çalışmada prematüre ovaryan yetmezlik modeli, en çok kullanılan ve ovaryum doku hasarı yaptığı kanıtlanmış olan siklofosfamid ile oluşturularak en sıklıkla kullanılan doz olarak ilk uygulama için intraperitoneal 70 mg/kg verildikten sonra 3 hafta boyunca iki günde bir 30 mg/kg olarak uygulandı.

Siklofosfamid ile POY fare modelinin oluşturulduğu, alınan kan örneklerindeki serum FSH ve LH seviyelerindeki artış ve östradiol seviyesindeki düşüş ile biyokimyasal olarak doğrulanmıştır. Fonksiyonel foliküllerin gelişimi ve matürasyonu, ovaryumda östradiol salgılanmasını doğrudan düzenleyen hipofizden salgılanan FSH'a bağlıdır. Ovaryan hasar biyokimyasal olarak ölçülen azalmış serum

östradiol düzeyi ile artmış serum FSH ve LH düzeyleri ile gösterilebilir (Luo ve ark. 2017). Zhang ve arkadaşları çeşitli prematüre ovaryan yetmezlik modellerini oluşturarak karşılaştırdıkları çalışmalarında siklofosfamid ile oluşturulan POY modelinde FSH, LH ve östradiol serum konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark olmadığını, fakat siklofosfamid grubunda LH serum konsantrasyonunun kontrole göre artmış olduğunu göstermişlerdir (Zhang ve ark. 2016). Yapılan bir başka çalışmada, POY modeli C57BL/6 farelerde siklofosfamid ve busulfan verilerek oluşturulmuş ve kontrole göre serum östradiol düzeyinin azalmış, FSH düzeyinin artmış olduğu saptanmıştır (Luo ve ark. 2017). Dang ve arkadaşları, 0,5 gr kobalt 60 γ radyasyon ile POY modeli oluşturmuşlar ve kontrole göre POY oluşturulan grupta azalmış östradiol ile artmış FSH ve LH düzeyleri bulmuşlardır (Dang ve ark. 2015). Yan ve arkadaşları d-galaktoz ile oluşturdukları POY modelinde aldıkları kan örnekleri sonucunda kontrol grubuna göre POY grubunda FSH ve LH seviyesinin arttığını, östradiolün ise azaldığını rapor etmişlerdir (Yan ve ark. 2018). Liu ve arkadaşları, C57BL/6 cinsi farelere siklofosfamid uygulayarak oluşturdukları POY modelinde aynı dozda serum fizyolojik uyguladıkları kontrol grubuna göre POY grubunda FSH seviyesinin arttığını, östradiolün ise azaldığını bulmuşlardır (Liu ve ark. 2016b). Xiong ve arkadaşlarının siklofosfamid uygulamasıyla C57BL/6 cinsi dişi farelerde POY modeli oluşturdukları çalışmada kontrol grubuna göre POY modelinde FSH ve LH seviyelerinin arttığını bununla birlikte östradiolün azaldığını rapor etmişlerdir (Xiong ve ark. 2017). Yin ve arkadaşları freund adjuvant ile tamamlanmış ZP3 uygulaması ile oluşturdukları POY modelinde kontrole göre östradiol seviyesinin azaldığını buna karşılık FSH ve LH seviyelerinin arttığını rapor etmişlerdir (Yin ve ark. 2018). Xu ve arkadaşları tripterygium glikozit uygulaması ile Sprague–Dawley cinsi sıçanlarda oluşturdukları POY modelinde kontrol grubuna göre FSH seviyesinin arttığını ve östradiol seviyesinin düştüğünü belirlemişlerdir (Xu ve ark. 2017). Bu çalışmada istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kontrol ve sham grubuna göre POY oluşturulan grupta azalmış östradiol ile artmış FSH ve LH serum seviyelerinin saptanması biyokimyasal olarak prematüre ovaryan yetmezlik modelinin oluşturulduğunu desteklemektedir.

Dişi gametleri, ovaryumda granüloza hücreleri olarak bilinen tek bir tabaka halinde somatik hücrelerle çevrelenen her biri immatür oosit içeren primordiyal

foliküllerde saklanır. Ovulasyonu sağlayan tüm matür hormon üreten foliküller ve oositler, doğumda ovaryumlarda bulunan primordiyal folikül havuzundan elde edilir. Bu nedenle primordiyal foliküllerin sayısı gelecekteki fertilite ve ovaryan endokrin fonksiyonun kritik bir belirleyicisidir. Reprodüktif yaşam boyunca, primordiyal foliküllerin sayısı, büyümeye başladıklarında, mayozu yeniden başlattıklarında, ovulasyonda ve yaygın olarak foliküler atreziye uğrayarak ölmeleri nedeniyle yavaş yavaş azalır. Yaşa bağlı infertilite ve daha sonra menapoz primordiyal foliküllerin tükenmesi ile meydana gelir. En önemlisi, folikül havuzu erken tükense bile, doğumdan sonra yeni primordiyal foliküllerin yapılması mümkün değildir (Nguyen ve ark. 2018).

Alınan ovaryum örneklerinin histopatolojik incelemeleri için yapılan hematoksilin-eozin boyamasında kontrol ve sham grubunda ovaryum germinal epiteli, gevşek bağ doku yapısındaki tunika albuginea ve korteks tabakasında primordiyal, primer, sekonder ve graaf foliküllerin net bir şekilde ayırt edildiği bunun yanında kontrol ve sham grubuna göre POY grubunda ovaryum yapısının bozulduğu, gelişen folikül sayısının azalmasıyla atrezik foliküllerde belirgin bir artış olduğu gözlenmiştir. Yan ve arkadaşlarının d-galaktoz ile indükleyerek oluşturdukları POY modeli ovaryumlarının hematoksilin-eozin boyaması sonucunda yaptıkları folikül sayımında, kontrol grubuna göre POY grubunda primordiyal folikül sayısının azaldığını atrezik foliküllerin en çok d-galaktoz ile indüklenen POY grubunda olduğunu gözlemlemişlerdir (Yan ve ark. 2018). Nguyen ve arkadaşları yabancı tip ve transgenik fare modelleri ile yaptıkları çalışmada, siklofosfamid ve sisplatin uygulaması ile oluşturdukları POY modelinde, özellikle yabancı tipte kemoterapötiklerin ovaryum hasarına ve folikül kaybına neden olduğunu vurgulamışlardır (Nguyen ve ark. 2018). Xiong ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada siklofosfamid ile oluşturdukları POY modeli farelerden aldıkları ovaryumların folikül sayımında kontrol grubuna göre POY grubunda normal foliküllerin azaldığı ve atrezik foliküllerin arttığını rapor etmişlerdir (Xiong ve ark. 2017). Zhang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada fare ve sıçanlarla siklofosfamid, busulfan, sisplatin, 4-vinilsikloheksen diepoksit uygulaması ile oluşturdukları POY modellerinden siklofosfamid ile uygulama yapılan POY grubunda kontrol grubuna göre ovaryumdaki foliküllerde hasar oluştuğunu özellikle antral foliküllerde granüloza hücreleri ve oositin hafif dejenerasyon ve nekroza sahip

olduğunu bulmuşlardır (Zhang ve ark. 2016). Luo ve arkadaşları siklofosfamid ve busulfan ile oluşturdukları POY modelinde kontrol grubundan farklı evrede birçok folikül olduğunu ancak POY grubu ovaryumlarında stromal hiperplazi ve bunun yanında preantral ve antral folikül sayısının önemli ölçüde azaldığını, ovaryumun atrezik foliküllerle dolu olduğunu rapor etmişlerdir (Luo ve ark. 2017). Dang ve arkadaşları, 0,5 gr kobalt 60 γ radyasyon ile POY modeli oluşturdukları çalışmada kontrole göre POY grubunda folikül sayısının anlamlı biçimde azaldığını rapor etmişlerdir (Dang ve ark 2015). Liu ve arkadaşları, C57BL/6 cinsi farelere siklofosfamid uygulayarak oluşturdukları POY modelinde aynı dozda serum fizyolojik uyguladıkları kontrol grubuna göre POY grubunda atrezik folikül sayısının anlamlı bir biçimde arttığını bulmuşlardır (Liu ve ark. 2016a). Barberino ve arkadaşlarının Swiss cinsi dişi farelerde sisplatin uygulaması ile ovaryan hasar oluşturdukları çalışmada kontrol grubuna göre sisplatin uygulanan grupta normal folikül sayısının oldukça azaldığını bulmuşlardır (Barberino ve ark 2017). Xu ve arkadaşları tripterygium glikozit uygulaması ile Sprague–Dawley cinsi sıçanlarda oluşturdukları POY modelinde kontrol grubunda ovaryumlarında korteks ve medulla histolojik görünümünün normal olduğu inflamatuvar hücre ya da ovaryan fibroz olmadığı, farklı evrelere ait birçok folikül olduğu gözlenirken POY grubunda ise azalan primordiyal ve primer folikül sayısı ve mevcut matür foliküllerin oositlerinin degrade olduğu ve ovaryum korteks ve medulla histolojisinin anormal bir görünümde olduğu gözlenmiştir (Xu ve ark. 2017). Bu çalışmada seri kesitlerden yapılan folikül sayımı sonuçlarına göre; istatistiksel olarak kontrol ve sham grubuna ait folikül sayıları hemen hemen aynı iken POY grubunda primordiyal, unilaminar ve multilaminar primer, sekonder ve graaf folikül sayısı anlamlı bir biçimde azalmış olup atrezik folikül sayısının artmış olduğu gözlemlendi. Böylece siklofosfamid ile C57BL/6 cinsi dişi farelerde prematüre ovaryan yetmezlik modelinin geliştirildiği hem biyokimyasal hem de histopatolojik olarak doğrulanmıştır.

Foliküler gelişim sürecinde ovulasyondan önce ovaryum foliküllerinin %99'u foliküler atrezi adı verilen bir süreçle degrade olmaktadır. Bu süreçte granüloza hücrelerinin temel olarak apoptoz ile hücre ölümüne gittikleri bilinse de aynı zamanda otofajinin de bu süreçte görülen bir hücre ölümü olduğu doğrulanmıştır (Meng ve ark 2018, Shen ve ark 2018). Bunlara ek olarak morfolojik ve biyokimyasal olarak

apoptozdan ayrılan, endoplazmik retikulum ve/veya mitokondri şişmesi/dilatasyonundan kaynaklanan sitoplazmik vakuolizasyon ile karakterize, morfolojik olarak apoptotik cisim ya da otofagozom oluşumu göstermeyen bir hücre ölümü olan paraptozun da bu süreçte rol aldığı saptanmıştır (Torres-Ramírez ve ark. 2016, Tsai ve ark 2017).

Çalışmamızda ovaryumda foliküler atrezi sürecinde görülen hücre ölüm mekanizmalarından apoptozun varlığını göstermek için; kaspaz 3, kaspaz 8 ve kaspaz 9, otofajinin varlığını göstermek için; Lamp1 ve MAP LC3 β ve paraptozun varlığını göstermek için; GRP78 ve CHOP primer antikörlerinin indirekt mmünohistokimyasal boyamaları yapılmıştır.

Yapılan immünohistokimyasal çalışmalarda kontrol ve sham grubuna göre POY grubu farelerde apoptozun ekstrensek yolak belirteci olan kaspaz 8, intrinsek yolak belirteci olan kaspaz 9 ve efektör kaspaz olan kaspaz 3 immünoreaktivitelerinin anlamlı bir biçimde artmış olması, apoptozun tetiklendiğini doğrulamaktadır. Buna ek olarak yapılan TUNEL analizi ile ovaryumdaki apoptotik hücre sayısının kontrol ve sham grubuna göre POY grubunda daha fazla olduğu gösterilmiştir.

Meng ve arkadaşları Wistar cinsi sıçanların preantral ve antral foliküllerindeki hücre ölüm tiplerinden apoptoz ve otofajiyi araştırdıkları çalışmada elde ettikleri ovaryumlarda kaspaz 3 immünohistokimyasal analizi sonucunda sağlıklı preantral ve antral foliküllerin granüloza ve teka hücrelerinde boyanma gözlenmediği, ancak atrezik antral foliküllerin granüloza tabakasında kaspaz 3 pozitif boyanmaya sahip birçok apoptotik hücre olduğu rapor edilmiştir (Meng ve ark. 2018). Xu ve arkadaşları tripterygium glikozit uygulaması ile Sprague–Dawley cinsi sıçanlarda oluşturdukları POY modelinde kaspaz 3 immünohistokimyasal boyamasının kontrol grubuna göre daha artmış olduğu bunun yanında bazı hücrelerin yoğun çekirdek ile daha küçük ve kompakt ve düzensiz şekilli olduğunu, apoptozun ileri seviyesindeki hücrelerin ise çekirdeklerinin fragmente olduğu, vakuolizasyon ve apoptotik cisim oluşumu ile sonuçlandığını rapor etmişlerdir (Xu ve ark. 2017). Escobar ve arkadaşlarının foliküler atrezi sürecinde granüloza hücrelerindeki apoptotik ve otofajik hücre ölümünü incelemek için Wistar cinsi dişi sıçanlarla yaptıkları çalışmada ovaryum dokularında, elektron mikroskobu ile gözlemledikleri sitoplazmik vakuollerin yanısıra ışık

mikroskobu altında belirledikleri atrezik foliküllerin granüloza hücrelerinde normal foliküllere göre aktif kaspaz 3 immünoaktivitesinin ve TUNEL pozitif hücrelerin anlamlı bir biçimde arttığını bulmuşlardır (Escobar ve ark 2013). Barberino ve arkadaşlarının Swiss cinsi farelerde sisplatin uygulaması ile ovaryan hasar oluşturdukları çalışmada kontrol grubuna göre uygulama grubu ovaryumların granüloza hücreleri ve oositlerinde TUNEL pozitif hücrelerin ve aktif kaspaz 3 immünoaktivitesinin istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttığı gösterilmiştir (Barberino ve ark. 2017). Luo ve arkadaşları C57BL/6 farelerle oluşturdukları POY modelinde yaptıkları TUNEL analizi sonucunda kontrol grubuna göre POY grubunda daha fazla apoptotik hücre olduğunu rapor etmişlerdir. (Luo ve ark. 2017).

Bu çalışmada primordiyal ve unilaminar primer folikülde kaspaz 3, 8 ve 9 immünoaktivitelerinin POY grubunda kontrol ve sham grubuna göre anlamlı olarak arttığı ve TUNEL pozitif hücrelerin POY grubunda kontrol ve sham gruplarına göre daha fazla olduğu saptanmıştır. POY grubunda ovaryum dokusunun hasarına bağlı olarak multilaminar primer folikül, sekonder ve graaf folikülleri kesitlerde izlenmemiştir. Bununla birlikte bu foliküllerin yerini atrezik foliküllerin aldığı ve kaspaz 3, 8 ve 9 immünoaktivitelerinin orta şiddette izlendiği ve TUNEL pozitif hücrelerin olduğu izlenmiştir. POY grubunda primordiyal, unilaminar primer ve atrezik foliküllerde kaspaz 3, 8 ve 9 immünoaktiviteleri ile TUNEL pozitif hücrelerin varlığı foliküler atrezi etiyolojisinde apoptozu desteklemektedir.

Otofaji, ökaryotik hücrelere özgü, sitoplazmik kısımların, hücre içi organellerin ve proteinlerin lizozomlar ile kaynaştıktan sonra hücre bileşenlerine dereceli olarak geri dönüşümünü sağlayan otofagozom adı verilen çift membranlı vakuollere ayrılması ile karakterize dinamik bir süreçtir. Otofaji, programlı hücre ölümünün bir tipi olup, bu süreç non-apoptotik, non-nekrotik hücre ölümüdür ve değişik derecelerde bozulma gösteren sitoplazmik içeriğe sahip artmış sayıda otofajik vezikül içeren çeşitli morfolojik özellikleri içerir (Cooper ve Hausman 2015; Escobar ve ark. 2015; Ranjan ve ark. 2016).

Lamp'lar (lizozom ile ilişkili zar proteinleri), ifadesi farklı dokular arasında değişebilen ve bundan dolayı farklı fonksiyonlarının olduğu düşünülen, lizozomların zarında bulunan bir glikozile protein ailesini temsil eder. Otofajide, iki lizozomal

protein, Lamp1 ve Lamp2, füzyon işlemi için gereklidir ve bunların yokluğunda, otofagozom, lizozomlara kaynaşamaz. Ayrıca, memeli sistemlerinde otofajiyi tanımlayan anahtar biyolojik belirteç, mikrotübül ilişkili protein 1A/1B-hafif zincir 3 (LC3) olarak tanımlanmaktadır. Otofaji sırasında sitozolik LC3-1, LC3-II'yi oluşturmak için fosfatidiletanolamine konjuge edilir. Otofaji sırasında sitoplazmik LC3, otofagozomal membranlara toplanır; otofagozom daha sonra otolizozom oluşturmak için lizozom ile birleşir (Asanuma ve ark. 2003; Green ve Llambi 2015; Alessandrini ve ark. 2017; Pugsley 2017)

Bu çalışmada ovaryumda foliküler atrezi sürecinde görülen hücre ölüm mekanizmalarından apoptozun yanı sıra otofajinin de varlığını göstermek için otofagozomun lizozomla kaynaşmasında rol oynayan proteinler olan Lamp1 ve MAP LC3 β primer antikorlarının dağılımı indirekt immünohistokimya yöntemi ile incelenmiştir. Primordiyal, unilaminar primer ve atrezik foliküllerde Lamp1 ve MAP LC3 β immünoreaktivitelerinin POY grubunda, kontrol ve sham gruplarına göre artmış olduğu izlenmiştir.

Bizim bulgularımızla uyumlu olarak, Torres-Ramírez ve arkadaşlarının Wistar cinsi farelerle yaptıkları çalışmada östrus siklusunda aldıkları ovaryumlardaki folikülleri normal ve bozulmuş olarak ayırmış foliküler atrezi sürecinde otofaji varlığını doğrulamak için Lamp1 ve LC3 ile yaptıkları immünohistokimya sonucunda bozulmuş foliküllerde normal hücrelere göre daha fazla ekspresyon olduğunu bulmuşlardır (Torres-Ramírez ve ark. 2016). Meng ve arkadaşları Wistar cinsi sıçanların preantral ve antral foliküllerindeki hücre ölüm tiplerinden apoptoz ve otofajiyi araştırdıkları çalışmada elde ettikleri ovaryumlarda MAP LC3 β immünohistokimyasal analizi sonucunda sağlıklı ve atrezik preantral foliküllerin granüloza hücrelerinde şiddetli derecede MAP LC3 β boyaması gözlenirken teka hücrelerinde boyanmanın belli belirsiz olduğu, sağlıklı ve atrezik antral foliküllerin granüloza hücrelerinde şiddetli derecede MAP LC3 β boyanması gözlenirken teka hücrelerinde ve oositte boyanma olmadığını saptamışlardır (Meng ve ark. 2018). Escobar ve arkadaşlarının foliküler atrezi sürecinde granüloza hücrelerindeki apoptotik ve otofajik hücre ölümünü incelemek için Wistar cinsi dişi sıçanlarla yaptıkları çalışmada ovaryum dokularında, elektron mikroskobu ile gözlemledikleri

sitoplazmik vakuollerin yanısıra ışık mikroskobu altında belirledikleri atrezik foliküllerin granüloza hücrelerinde normal foliküllere göre LC3 immünoaktivitesinin anlamlı bir biçimde arttığını bulmuşlardır (Escobar ve ark 2013). POY grubunda, Lamp1 ve MAP LC3β immünoaktivitelerinin kontrol ve sham grubuna göre özellikle atrezik ve primordiyal foliküllerde artmış olması granüloza hücrelerinin ölümüne otofajinin de neden olduğunu düşündürmüştür.

Yakın zamanda yapılan çalışmalarla ortaya çıkan endoplazmik retikulumdan kaynaklanan sitoplazmik vakuolizasyon ile karakterize edilen bir programlı hücre ölüm tipi olan paraptoz; kaspaz inhibitörlerine yanıt vermeyen, kaspaz veya Bcl-2 ailesine ait proteinlerin aşırı ekspresyonundan etiklenmeyen ve dolayısıyla kaspaz aktivasyonu göstermeyen; morfolojik olarak apoptotik cisim ya da otofagozom oluşumu görülmeyen, deneysel süreçte TUNEL analizlerine negatif ve Apaf-1 bağımsız bir süreçtir (Zhang ve ark. 2015; Ranjan ve ark. 2016; Torres-Ramírez ve ark. 2016). Bir endoplazmik retikulum şaperonu olan GRP78, endoplazmik retikulum homeostazının ve stresinin ana düzenleyicisi olarak kabul edilir. Endoplazmik retikulum stresi; çözünen ya da yanlış katlanan proteinlerin sisternalarda birikmesiyle normal fizyolojik durumu bozması sonucu ortaya çıkmaktadır. CHOP proteini (C/EBP-homolog protein), endoplazmik retikulum stresine yanıtın alt hedeflerinden biridir. Endoplazmik retikulum stresine cevap sırasında GRP78 anti-apoptotik olarak fonksiyon görmektedir. Bununla birlikte CHOP ise pro-apoptotik olup endoplazmik retikulum stresi aracılı apoptozisi aktive etmektedir (Yang ve ark. 2016).

Escobar ve arkadaşlarının foliküler atrezide granüloza hücrelerindeki apoptotik ve otofajik hücre ölümünü incelemek için yaptıkları çalışmada bazı hücrelerde hücre lümeninde, nüklear zarf ve endoplazmik retikulum sisternalarında şişlik olduğunu ve bu hücrelerin farklı bir hücre ölüm sürecine ait olabileceğini belirtmişlerdir (Escobar ve ark 2013). Torres-Ramírez ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada endoplazmik retikuum şişmesinin granuloza hücrelerindeki stres ile ilişkili olup olmadığını belirlemek için CHOP proteinini immünfloresan yöntemi ile boyamışlar ve sonucunda apoptotik karakterde ve geniş olmayan vakuollere sahip hücrelerde belirgin olmadığını ve endoplazmik stresini belirten genişlemiş vakuoller gösteren granüloza hücrelerinin sitoplazmasında bol miktarda bulmuşlardır (Torres-Ramírez ve ark. 2016).

Alemu ve arkadaşları çalışmalarında, granüloza hücrelerine ısı uyguladıktan sonra western blot analizi ile GRP78 ekspresyonunun kontrole göre arttığını tespit etmişlerdir (Alemu ve ark 2018). Yang ve arkadaşlarının sıçan ovaryumlarında erken luteal, orta luteal ve geç luteal evredeki endoplazmik retikulum stresini araştırdıkları çalışmada CHOP ve GRP78'in immünohistokimyasal boyamasında GRP78'in sitoplazmada CHOP'un ise hem sitoplazmada hem de nükleusta lokalize olduğunu ve geç luteal evrede (14. günde) artış gösterdiğini ve 20. günde azaldığını, CHOP'un ise 14. ve 20. günde arttığını bulmuşlardır (Yang ve ark. 2015).

Literatürde CHOP proteinin hem proapoptotik olduğu hem de antiapoptotik Bcl-2 proteinini düzenleyerek hücreyi endoplazmik retikulum stresi aracılı hücre ölümünden koruduğu belirtilmektedir. CHOP'un artışı ile korele olan endoplazmik retikulum stresinin apoptotik hücre ölümünü aktive etmediğini, çünkü bu hücrelerin apoptotik belirteçlerinin negatif olduğu belirtilmektedir (Torres-Ramírez ve ark. 2016). Bu çalışmada paraptozun varlığı ise kontrol ve sham grubuna göre POY grubunda artmış GRP78 ve CHOP immünoaktivitesi ile gösterilmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Önemli bir infertilite nedeni olan prematüre ovaryan yetmezlik özellikle 40 yaşın altındaki kadınlarda klinik olarak amenore, yüksek gonadotropin ve düşük östrojen seviyeleri ile kendini gösteren ve ovaryum rezervlerinin erken dönemde tükenmesi ile ovaryumda fonksiyon bozukluğuna neden olan etiyolojisi net olarak aydınlatılamamış multifaktöriyel bir hastalıktır.

Prematüre ovaryan yetmezlik etiyolojisinin saptanması ve tedavi protokollerinin geliştirilmesi için birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalarda genellikle ya transgenik ya da farklı kimyasal ajanlar verilerek oluşturulan deney hayvanı modelleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada, kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan ve ovaryumlara sitotoksik etki yaptığı bilinen bir ajan olan siklofosamid, deney modelinin oluşturulması için kullanılmış ve gerek biyokimyasal gerekse histopatolojik olarak prematüre ovaryan yetmezlik modelinin oluşturulduğu doğrulanmıştır.

Foliküler atrezi ovaryum granüloza hücrelerinde görülen birçok hücre ölüm sürecinin rol oynadığı bir süreçtir ve prematüre ovaryan yetmezliğe neden olmaktadır. Birincil olarak apoptoz ve otofajinin bu süreçte rol oynadığı bilinmekte ise de bunlara ek olarak son zamanlarda morfolojik ve biyokimyasal olarak farklılık gösteren bir hücre ölüm tipi olan paraptozun da rol aldığı düşünülmektedir.

Bu çalışma ile foliküler atrezi sürecinde rol alan ana hücre ölüm mekanizmaları olan apoptoz ve otofajinin yanı sıra paraptozun da foliküler atreziye sebep olduğunun gösterilmesi, prematüre ovaryan yetmezliğe yönelik yeni tedavi protokollerinin geliştirilmesine yardımcı olacaktır.

7. KAYNAKLAR

Alemu TW, Pandey HO, Salilew Wondim D, Gebremedhn S, Neuhof C, Tholen E, Holker M, Schellander K, Tesfaye D. Oxidative and endoplasmic reticulum stress defense mechanisms of bovine granulosa cells exposed to heat stress. *Theriogenology*. 2018 Apr 1;110:130-141.

Alessandrini F, Pezzè L, Ciribilli Y. LAMPs: Shedding light on cancer biology. *Semin Oncol*. 2017 Aug;44(4):239-253.

Asanuma K, Tanida I, Shirato I, Ueno T, Takahara H, Nishitani T, Kominami E, Tomino Y. MAP-LC3, a promising autophagosomal marker, is processed during the differentiation and recovery of podocytes from PAN nephrosis. *FASEB J*. 2003 Jun;17(9):1165-7.

Barberino RS, Menezes VG, Ribeiro AEAS, Palheta RC Jr, Jiang X, Smitz JEJ, Matos MHT. Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. *Biol Reprod*. 2017 Jun 1;96(6):1244-1255.

Carlson BM, Human Embryology and Developmental Biology. 5th Edition ed. 2014: Saunders.

Coşkun G, Özgür H. Apoptoz ve Nekrozun Moleküler Mekanizması. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 20 (2014) 145-158

Cybulsky AV. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response and autophagy in kidney diseases. *Nat Rev Nephrol*. 2017 Nov;13(11):681-696.

Dang J, Jin Z, Liu X, Hu D, Wang Z. Human cord blood mononuclear cell transplantation for the treatment of premature ovarian failure in nude mice. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Mar 15;8(3):4122-7.

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

Escobar ML, Echeverria OM, Casasa AS, Garcia G, Aguilar SJ, Vazquez-Nin GH. Involvement of pro-apoptotic and pro-autophagic proteins in granulosa cell death. Vol. 1, No. 1, 2013, pp. 9-17.

Escobar ML, Echeverría OM, García G, Ortiz R, Vázquez-Nin GH. Immunohistochemical and ultrastructural study of the lamellae of oocytes in atretic follicles in relation to different processes of cell death. Eur J Histochem. 2015 Aug 12;59(3):2535.

Gözüaçık D, Koçtürk S, Vatansever HS. Otofaji ve Sinyal Yolakları. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri. Dokuz Eylül Üniversitesi Yayını. 2011: İzmir s. 53-61. ISBN 978-975-441-349-6.

Green DR, Llamas F. Cell Death Signaling. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 Dec 1;7(12).

Grasa P, Sheikh S, Krzys N, Millar K, Janjua S, Nawaggi P, Williams SA. Dysregulation of follicle development in a mouse model of premature ovarian insufficiency. Reproduction. 2016 Nov;152(5):591-601.

Hoffman BL, Schorge JO, Bradshaw KD, Halvorson LM, Schaffer JI, Corton MM. Williams Gynecology. 3th Edition. 2016: MC GRAW HILL

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

[http://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020 Exam Reviews/Exam 5/ovary%20uterus%20anatomy%20diagram.jpg](http://www.apsubiology.org/anatomy/2020/2020%20Exam%20Reviews/Exam%205/ovary%20uterus%20anatomy%20diagram.jpg)

<http://www.cell.com/cms/attachment/588206/4490116/gr1.jpg>

<http://www.clinsci.org/content/ppclinsci/118/1/19/F2.large.jpg>

<http://www.doctortipster.com/wp-content/uploads/2011/09/Premature-Ovarian-Failure-Causes-600x860.jpg>

<https://iiif.elifesciences.org/lax:20468/elif-20468-fig1-v1.tif/full/1500,/0/default.jpg>

<https://medicalfoxx.com/wp-content/uploads/2016/01/premature-ovarian-failure-pathology.jpg>

<http://medlib.bu.edu/histology/i/21004loa.jpg>

https://obgynkey.com/wp-content/uploads/2016/06/978-3-13-143951-2_c004_f002.jpg

https://product.cdn.cevaws.com/var/storage/images/media/reproduction/images/17_hypothalamus_atresia/61475-1-eng-GB/17_Hypothalamus_atresia.jpg

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

<http://stroke.ahajournals.org/content/strokeaha/38/2/652/F1.large.jpg>

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/fb/Apop1.png/600px-Apop1.png>

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/4/4a/Paraptosis.svg/550px-Paraptosis.svg.png>

<https://thumbs.dreamstime.com/z/apoptosis-process-programmed-cell-death-vector-diagram-45763884.jpg>

https://www.researchgate.net/profile/Ann_Williams5/publication/8488846/figure/fig1/AS:279972263546883@1443761997130/Figure-1-Apoptosis-the-%27extrinsic%27-and-%27intrinsic%27-pathways-to-caspase-activation-Two.png

https://www.researchgate.net/profile/Yves-Paul_Vandewynckel/publication/258503262/figure/fig1/AS:392665708417033@1470630208849/Figure-2-Endoplasmic-reticulum-ER-stress-induces-the-unfolded-protein-response-UPR.jpg

Ilhan G, Atmaca FFV, Altan E, Zebitay AG, Sozen H, Akyol H, Kurek Eken M. Evaluation of Neutrophil-Lymphocyte Ratio, Platelet-Lymphocyte Ratio and Red Blood Cell Distribution Width-Platelet Ratio for Diagnosis of Premature Ovarian Insufficiency. J Family Reprod Health. 2016 Dec;10(4):211-216.

Jagarlamudi K, Reddy P, Adhikari D, Liu K. Genetically modified mouse models for premature ovarian failure (POF). Mol Cell Endocrinol. 2010 Feb 5;315(1-2):1-10.

Karadağ A. Otofaji: Programlı Hücre Ölümü. Ankara Sağlık Hizmetleri Dergisi. 2016 cilt:15 sayı:2

Kierszenbaum AL, Tres LL. Histology and Cell Biology. 4th Edition 2016: Saunders

Kristensen SG, Andersen CY. Cryopreservation of Ovarian Tissue: Opportunities Beyond Fertility Preservation and a Positive View Into the Future. Front Endocrinol (Lausanne). 2018 Jun 28;9:347.

Kolb JP, Oguin TH 3rd, Oberst A, Martinez J. Programmed Cell Death and Inflammation: Winter Is Coming. Trends Immunol. 2017 Oct;38(10):705-718.

Kong L, Gao X, Zhu J, Cheng K, Tang M. Mechanisms involved in reproductive toxicity caused by nickel nanoparticle in female rats. *Environ Toxicol*. 2016 Nov;31(11):1674-1683.

Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *J Transl Med*. 2015 May 12;13:155.

Liu T, Li Q, Wang S, Chen C, Zheng J. Transplantation of ovarian granulosa-like cells derived from human induced pluripotent stem cells for the treatment of murine premature ovarian failure. *Mol Med Rep*. 2016 Jun;13(6):5053-8. (a)

Liu T, Wang S, Li Q, Huang Y, Chen C, Zheng J. Telocytes as potential targets in a cyclophosphamide-induced animal model of premature ovarian failure. *Mol Med Rep*. 2016 Sep;14(3):2415-22. (b)

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

Moore KL, Persaud TVN; Torchia MG. *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 10th Edition 2016: Elsevier

Meng L, Jan SZ, Hamer G, van Pelt AM, van der Stelt I, Keijer J, Teerds KJ. Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biol Reprod*. 2018 May 14.

Nguyen QN, Zerafa N, Liew SH, Morgan FH, Strasser A, Scott CL, Findlay JK, Hickey M, Hutt KJ. Loss of PUMA protects the ovarian reserve during DNA-

damaging chemotherapy and preserves fertility. *Cell Death Dis.* 2018 May 23;9(6):618.

Pugsley HR. Quantifying autophagy: Measuring LC3 puncta and autolysosome formation in cells using multispectral imaging flow cytometry. *Methods.* 2017 Jan 1;112:147-156.

Ranjan A, Iwakuma T. Non-Canonical Cell Death Induced by p53. *Int J Mol Sci.* 2016 Dec 9;17(12).

Ross MH, Pawlina WP. *Histology: A Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology* 7th Edition: 2016 Wolters Kluwer

Shen M, Cao Y, Jiang Y, Wei Y, Liu H. Melatonin protects mouse granulosa cells against oxidative damage by inhibiting FOXO1-mediated autophagy: Implication of an antioxidation-independent mechanism. *Redox Biol.* 2018 Jul 7;18:138-157.

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

Tsai TL, Wang HC, Hung CH, Lin PC, Lee YS, Chen HHW, Su WC. Wheat germ agglutinin-induced paraptosis-like cell death and protective autophagy is mediated by autophagy-linked FYVE inhibition. *Oncotarget.* 2017 Aug 24;8(53):91209-91222.

Torres-Ramírez N, Escobar ML, Vázquez-Nin GH, Ortiz R, Echeverría OM. Paraptosis-like cell death in Wistar rat granulosa cells. *Dev Growth Differ.* 2016 Oct;58(8):651-663.

Vabre P, Gatimel N, Moreau J, Gayrard V, Picard-Hagen N, Parinaud J, Leandri RD. Environmental pollutants, a possible etiology for premature ovarian insufficiency: a narrative review of animal and human data. *Environ Health.* 2017 Apr 7;16(1):37.

Xiong Y, Liu T, Wang S, Chi H, Chen C, Zheng J. Cyclophosphamide promotes the proliferation inhibition of mouse ovarian granulosa cells and premature ovarian failure by activating the lncRNA-Meg3-p53-p66Shc pathway. *Gene*. 2017 Jan 5;596:1-8.

Xu X, Tan Y, Jiang G, Chen X, Lai R, Zhang L, Liang G. Effects of Bushen Tianjing Recipe in a rat model of tripterygium glycoside-induced premature ovarian failure. *Chin Med*. 2017 Apr 24;12:10.

Yan Z, Dai Y, Fu H, Zheng Y, Bao D, Yin Y, Chen Q, Nie X, Hao Q, Hou D, Cui Y. Curcumin exerts a protective effect against premature ovarian failure in mice. *J Mol Endocrinol*. 2018 Apr;60(3):261-271.

Yang Y, Pei X, Jin Y, Wang Y, Zhang C. The roles of endoplasmic reticulum stress response in female mammalian reproduction. *Cell Tissue Res*. 2016 Mar;363(3):589-97.

Yang Y, Sun M, Shan Y, Zheng X, Ma H, Ma W, Wang Z, Pei X, Wang Y. Endoplasmic reticulum stress-mediated apoptotic pathway is involved in corpus luteum regression in rats. *Reprod Sci*. 2015 May;22(5):572-84.

Yin N, Wang Y, Lu X, Liu R, Zhang L, Zhao W, Yuan W, Luo Q, Wu H, Luan X, Zhang H. hPMSC transplantation restoring ovarian function in premature ovarian failure mice is associated with change of Th17/Tc17 and Th17/Treg cell ratios through the PI3K/Akt signal pathway. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Feb 14;9(1):37.

Zhang C, Jiang Y, Zhang J, Huang J, Wang J. 8-p-Hdroxybenzoyl Tovarol Induces Paraptosis Like Cell Death and Protective Autophagy in Human Cervical Cancer HeLa Cells. *Int J Mol Sci*. 2015 Jul 2;16(7):14979-96.

Zhang CX, Zhang Q, Xie YY, He XY, Xiang C, Hou XS, Zhou Y, Chen L, Zhang GX, Liu G. Mouse Double Minute 2 Actively Suppresses p53 Activity in Oocytes during Mouse Folliculogenesis. *Am J Pathol.* 2017 Feb;187(2):339-351. (a)

Zhang D, Liu Y, Zhang Z, Lv P, Liu Y, Li J, Wu Y, Zhang R, Huang Y, Xu G, Qian Y, Qian Y, Chen S, Xu C, Shen J, Zhu L, Chen K, Zhu B, Ye X, Mao Y, Bo X, Zhou C, Wang T, Chen D, Yang W, Tan Y, Song Y, Zhou D, Sheng J, Gao H, Zhu Y, Li M, Wu L, He L, Huang H. Basonuclin 1 Deficiency is a Cause of Primary Ovarian Insufficiency. *Hum Mol Genet.* 2018 Jul 16.

Zhang T, Chen Y, Yang Y, Wang Z, Pan Q, Xu S, Sun Z. The potentiality of two-dimensional preantral follicle culture as an in vitro model in predicting premature ovarian failure. *Exp Toxicol Pathol.* 2017 Sep 5;69(7):477-484. (b)

Zhang T, Yan D, Yang Y, Ma A, Li L, Wang Z, Pan Q, Sun Z. The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016 Nov;81:223-232.

8. EKLER

EK 1

T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tez Adı

"Prematüre Ovaryan Yetmezlik Modelinde Folliküler Atrezi ile Granuloza Hücrelerinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Açısından İlişkinin İncelenmesi"

Tezime ilişkin 23/07/2018 tarihinde yapılan Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %9'dur.

Belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı : Damla AKOĞULLARI
Öğrenci No : 151350003
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji AD
Programı : Tezli Yüksek Lisans

23.07.2018
[İmza]

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

[İmza]

Açıklamalar

1-Tez Çalışması Orijinallik Raporu (TÇOR), TURNITIN İntihal Tespit Programı kullanımı için kişisel hesap alma hakkı bulunan tez danışmanları, Enstitülerde görevlendirilen personeller, Kütüphane ve Dokümantasyon Daire Başkanlığı'nda görevlendirilen kütüphaneciler tarafından alınır.

2-Sayfa sayısı 400'den az olan tezler için tez savunmasından önce ve başarılı olması durumunda düzeltmelerden sonra olmak üzere 2 kez TÇOR alınır.(400 sayfadan fazla olan tezler 400 ve katları şeklinde bölünerek Turnitin veri tabanına yüklenmesi gerekmektedir. Bu gibi durumlarda benzerlik oranının hesaplanmasına ilişkin detaylı forma, kütüphane web sayfasında bulunan Turnitin kullanım kılavuzlarının altından erişilebilir.)

3-TÇOR, tezin yalnızca Kapak Sayfası, Giriş, Ana Bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan kısmının tek bir dosya olarak intihal tespit programına yüklenmesi ile alınır.

Programa yükleme yapılırken Dosya Başlığı (document title) olarak tez başlığının tamamı, Yazar Adı (author's first name) olarak öğrencinin adı, Yazar Soyadı (author's last name) olarak öğrencinin soyadı bilgisi yazılır.

4- TURNITIN İntihal tespit programına yüklenen dosyanın sürecekleme sürecinde, ilgili programdaki filtreleme seçenekleri aşağıdaki şekilde ayarlanır: - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - 5 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 5 words)

5-İsteğe bağlı ayarlar kısmından; "Ödevleri şuraya gönder?" seçeneği mutlaka DEPO YOK şeklinde işaretlenmesi gerekmektedir; aksi durumda aynı tezin ikinci kez yüklenmesi durumunda benzerlik %100 çıkacaktır ve depodan tezi silmek çok uzun süre gerektirecektir.

6- Raporlama işlemi tamamlandıktan sonra, kaydedilmiş olan ekranın görüntüsünü sağ üst köşesinde yüzdelik sayı olarak belirtilen "benzerlik oranı," raporlamaya tabi tutulmuş olan dosyanın "toplam sayfa sayısı" ve raporlama işleminin yapıldığı "tarih" bilgisi, "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu" formuna işlenir.

7- Benzerlik oranında tüm sorumluluk öğrenciye aittir.

8-Tez savunma sınavı sonrasında başarılı bulunan öğrenci, tez savunma sınavı tarihi sonrasında tezde yapılmış muhtemel değişiklikleri içeren dosya kullanılarak alınmış ikinci bir intihal raporundaki bilgiler kullanılarak hazırlanmış ve tez danışmanı tarafından onaylanarak imzalanmış ikinci bir "Yüksek Lisans/Doktora Tez Çalışması Orijinallik Raporu"nu Enstitüye teslim etmekle yükümlüdür.

9-Turnitin Hakkında Bilgiler: <http://kutuphane.cbu.edu.tr/turnitin.9370.tr.html>



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÖNETİM KURULU KARAR ÖRNEĞİ

Karar Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar Sayısı
29.12.2016	28	27

Karar 17- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı'nın 23.12.2016 tarih/19 sayılı Akademik Kurul Kararı ve 26.12.2016/96964 sayılı yazısı görüşülerek; Tezli Yüksek Lisans Programı öğrencisi Damla AKOĞULLARI'nın Tez Konusunun, Etik Kurul Onayı alınması kaydı ile **"Prematüre Ovarian Yetmezlik Modelinde Folliküler Atrezi ile Granuloza Hücrelerinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Açısından İlişkinin İncelenmesi"** olarak belirlenmesine **OY BİRLİĞİ** ile karar verildi.

İmza Prof. Dr. Ayşe AKTAŞ Enstitü Müdürü		
İmza Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER Müdür Yardımcısı	İmza Doç. Dr. Özge YILMAZ Müdür Yardımcısı	İmza Prof. Dr. Necip KUTLU Üye
İmza Doç.Dr.. Sezgi ÇINAR PAKYÜZ Üye	İmza Doç. Dr. Murat TAŞ Üye	
İmza Özcan GERÇEKER Enstitü Sekreteri Raportör		

Aslı Gibidir
07/08/2018

Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER
Enstitü Sekreteri



EK 3

Evrak Tarih ve Sayısı: 26/04/2017-E.35318



T.C.
MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

Sayı : 77637435-050.04.04-
Konu : Etik Kurul Kararı - Prematür Ovaryan

Sayın Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

"Prematür Ovaryan Yetmezlik Modelinde Folliküler Atrezi ile Granuloza Hücrelerinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Açısından İlişkisinin İncelenmesi"başlıklı dosyanız görüşülmüş olup, Etik Kurul Karar Formu ektedir.
Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Emin KURT
Kurul Başkanı

Ek: Elgin TÜRKÖZ - 25.04.2017 - karar formu (1 sayfa)

Adres:Manisa Celal Bayar Üniversitesi Uncubozköy Kampüsü Manisa
Telefon:(0 236) 2338586 Faks:(0 236) 2331466
E-Posta:tip@cbu.edu.tr Elektronik Ağ:http://tip.cbu.edu.tr

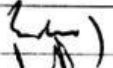
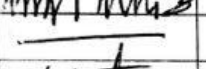
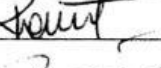
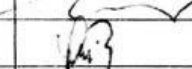
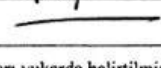
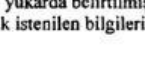
Bilgi için: İsa Köse
Unvanı: Veri Hazırlama ve Kontrol
İşletmeni



Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır

EK 4

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

KARAR TARİH / NO	25/ 04 /2017 / 77.637.435 -		
ARAŞTIRMANIN ADI	Prematür Ovaryan Yetmezlik Modelinde Folliküler Atrezi ile Granuloza Hücrelerinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Açısından İlişkisinin İncelenmesi		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç. Dr. Elgin Türköz ULUER - MCBÜ Histoloji ve Embriyoloji AD		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Prof. Dr. H. Seda Vatansever,- Bio. Damla Akoğulları		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi ☐	Yüksek Lisans/Doktora ☒	Akademik ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	07 / 04 / 2017 / Tarih ve 15806 sayılı; araştırma dosyası		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir		
Ünvanı/Adı/Soyadı	İmza	Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları		☐	☐
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon		☐	☐
Prof. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi		☐	☐
Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN DEHAM Müdürü		☐	☒
Doç. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji		☐	☐
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik		☐	☐
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		☐	☐
Saim ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		☐	☒
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.		 Prof. Dr. Emin KURT Başkan	

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Damla	Soyadı	AKOĞULLARI
Doğum Yeri	AKHİSAR	Doğum Tarihi	06.04.1991
Uyruğu	Türk	Tel	05052340770
E-mail	daakogullari@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Bölümü	2015-Halen devam ediyor.
Önlisans	Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Laborant ve Veteriner Sağlık Bölümü	2013-Halen devam ediyor.
Lisans	Manisa Celal Bayar Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2013
Lise	Balçova Y.D.A. Lisesi	2008

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre(Yıl-Yıl)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma
İngilizce	Orta	Orta	Orta

Yabancı Dil Sınav Notu									
Yökdil	YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
60.00									

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	66,59212	65,64443	60,26134
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi
Microsoft Power Point	İyi
Microsoft Word	İyi
Microsoft Excel	İyi

Analitik temel bilgiler:

DNA İzolasyonu, PCR, Jel Elektroforezi, Histokimyasal Teknikler (Doku Takibi, Parafin Gömme, Mikrotom ile kesit alma, Hematoksilen Eozin Boyama, Hücre ve Doku İmmünohistokimyası), Hücre Kültürü.

Stajlar/Eğitimler/Sertifikalar:

1. Bitki Moleküler Genetik Laboratuvarı Stajı (Sorumlu: Prof. Dr. Sami DOĞANLAR) (Kimyasal Solüsyon Hazırlama, DNA İzolasyonu, Agoroz Jel Hazırlama, Jel Elektroforezi, PCR), 1-30.Temmuz.2011, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, İZMİR
2. Genel İngilizce Sertifikası (Intermediate) 23.Şubat-25.Mayıs 2013, YDS Academy, İZMİR
3. Laboratuvar Uzmanlık Seminerleri (GMP- İyi Üretim Uygulamaları, GLP-İyi Laboratuvar Uygulamaları, GHP- İyi Hijyen Uygulamaları, ISO 22716 : 2007

Kozmetik İyi Öğretim Uygulamaları –GMP), 28.Şubat-03.Mart.2015, TSC Yönetim Sitemleri Akademisi, Armis Hotel, İZMİR

4. İş Sağlığı ve Güvenliği İşe Başlama (Oryantasyon) Eğitimi, 01.Aralık.2016, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, MANİSA

Katıldığı Bilimsel Çalıştay/Kongre/Sempozyum/Seminerler ve Kurslar:

1. Türkçe Bilim Dili Çalıştayı - THED, 20.Kasım.2015, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa
2. Gamet Biyolojisi Makale Kulübü 14. Toplantısı (GABİMAK45) - MCBÜ SBE ve Tıp Fakültesi Histoloji ve Embiyoloji AD, 21.Kasım.2015, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa
3. 4. Genetik ve Biyomühendislik Günleri, 20-21.Şubat.2016, Yeditepe Üniversitesi, İstanbul
4. I. Yaşam Bilimleri Sempozyumu, 23-24.Şubat.2016, Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri
5. XX. Ege Onkoloji Günleri Kanser ve Genetik Kursu, 30.Mart.2016, Ege Üniversitesi, İzmir
6. I. Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi, 12-14.Mayıs.2016, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa
7. Sağlıkta Biyomühendislik Teknolojileri Kök Hücre ve Elektromanyetik Alanlar, 20.Şubat.2017, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa
8. I. Yaşam Bilimleri Kongresi, 23-25.Şubat.2017, Abdullah Gül Üniversitesi, Kayseri
9. 7. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tanıtım Günleri, 12-13.Nisan.2017, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa
10. III. International Stem Cell Symposium, 04-05.Mayıs.2017, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa
11. II. Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi (MCBU-ULEK2017), 12-14.Mayıs.2017, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa
12. 15. International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2017), 18-21.Mayıs.2017, Kervansaray Lara Hotel, Antalya

- 13. II. Sağlıkta Biyomühendislik Teknolojileri alıştayı: Hücre Kültürü.**
11.Aralık.2017, Süleyman Demirel Kültür Merkezi, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa.
- 14. III. Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi (MCBU-ULEK2018), 11-13.Mayıs.2018, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa**

Proje Görevleri:

Püromisin (Pan) İle Nefrotik Sendrom Geliştirilen Ratlarda 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ Ve Parikalsitolün Proteinüri İle Podosin Ve Nefrin Mrna Üzerine Etkisi. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, 2016-103, **Araştırmacı**, Manisa, 2016.

Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı – Tıp Fakóltesi Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Pelin ERTAN

Prematüre Ovaryan Yetmezlik Modelinde Folliküler Atrezi ile Granuloza Hücrelerinin Hücre Ölüm Mekanizmaları Açısından İlişkisinin İncelenmesi. Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu, 2017-149, **Araştırmacı**, Manisa, 2017- Devam ediyor

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tıp Fakóltesi Proje Yürütücüsü: Doç. Dr. Elgin TÜRKÖZ ULUER

Bildiriler / Yayınlar:

Lisans Bitirme Tezi:

‘İnsanda Embriyonik Gelişim ve Fetal Dönemin İncelenmesi.’

Danışman: Doç. Dr. Feyzan ÖZDAL KURT.

Fen Edebiyat Fakóltesi Biyoloji Bölümü, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, 2013.

Sözlü Bildiri:

Damla AKOĞULLARI, Elgin TÜRKÖZ ULUER, Melike ÖZGÜL, Sevinç İNAN. ‘MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Wortmannin ve Bevacizumab Kullanımının VEGF, PI3K, TGF- β , EGF ve E-Kaderin Dağılımı Üzerine Etkisi’, II. Uluslararası Lisansüstü Eğitim Kongresi (MCBU-ULEK2017), 12-14.Mayıs.2017, Manisa Celal Bayar Üniversitesi, Manisa

Poster Sunumları:

Pınar KILIÇASLAN SÖNMEZ, **Damla AKOĞULLARI**, Elgin TÜRKÖZ ULUER, Fatih ÇÖLLÜ, Mehmet İbrahim TUĞLU. ‘Effect of Inula Viscosa Extract on Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Line MDA-MB-231’, 15. International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2017), 18-21.Mayıs.2017, Kervansaray Lara Hotel, Antalya.

Elgin TÜRKÖZ ULUER, Işıl AYDEMİR, Oya KORKMAZ, **Damla AKOĞULLARI**, Sevinç İNAN. ‘The Importance of PI3K/Akt Pathway on Endometrial Cancer Cell Lines by Using Immunohistochemistry’, 15. International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2017), 18-21.Mayıs.2017, Kervansaray Lara Hotel, Antalya.

Sevinç İNAN, Fatma FIRAT, **Damla AKOĞULLARI**, Elgin TÜRKÖZ ULUER. ‘The Effects of CAPE and EGCG on Cyclooxygenase and Junctional Complexes in Breast Cancer Cell Lines’, 15. International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (ICHC2017), 18-21.Mayıs.2017, Kervansaray Lara Hotel, Antalya.

Melike ÖZGÜL, Elgin TÜRKÖZ ULUER, Tuna ONAL, **Damla AKOĞULLARI**, Kemal ÖZBİLGİN, Sevinç İNAN. ‘The effects of Paclitaxel and Metformin and combined treatments on TLR signaling pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell lines’, 2nd International Conference on Natural Products for Cancer Prevention and Therapy, 8-11.Kasım.2017, Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

Dergi Yayınları:

Damla AKOĞULLARI, Elgin TÜRKÖZ ULUER, Melike ÖZGÜL, Sevinç İNAN. ‘MDA-MB-231 Meme Kanseri Hücre Hattında Wortmannin ve Bevacizumab

Kullanımının VEGF, PI3K, TGF- β , EGF ve E-Kaderin Dağılımı Üzerine Etkisi', Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2017 / Cilt 4 (Özel Sayı).

Hamdi METİN, Pelin ERTAN, Ahmet KESKİNOĞLU, Elgin TÜRKÖZ ULUER, Sırrı ÇAM, Pelin KESKİNOĞLU, Muhammet Burak BATIR, **Damla AKOĞULLARI**. 'Püromisin (PAN) ile Nefrotik Sendrom Geliştirilen Ratlarda 1,25(OH)₂ Vitamin D3 ve Parikalsitolün Proteinüri ile Podosin ve Nefrin mRNA Üzerine Etkisi' Manisa Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2017 / Cilt 4 (Özel Sayı).

Melike ÖZGÜL, Elgin TÜRKÖZ ULUER, Tuna ONAL, Damla AKOĞULLARI, Kemal ÖZBİLGİN, Sevinç İNAN. 'The effects of Paclitaxel and Metformin and combined treatments on TLR signaling pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell lines', MDPI. Proceedings 2017, 1, 1016; doi:10.3390/proceedings1101016