

T. C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Betül TİRE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2023-ANTALYA

**TEKRARLAYAN SÜPEROVULASYONUN FARE
OOSİTLERİNDEKİ TELOMERAZ EKSPRESYONU VE
TELOMER UZUNLUĞU ÜZERİNE ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ**

Betül TİRE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2023-ANTALYA

T. C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEKRARLAYAN SÜPEROVULASYONUN FARE
OOSİTLERİNDEKİ TELOMERAZ EKSPRESYONU VE
TELOMER UZUNLUĞU ÜZERİNE ETKİSİNİN
BELİRLENMESİ

Betül TİRE

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK

Bu tez, TÜBİTAK 1002 Hızlı Destek Projeleri kapsamında 221S182 proje numarası ve aynı zamanda Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2022-5826 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir.”

2023-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Üreme Biyolojisi Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 20/06/2023

İmza

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Gökhan AKKOYUNLU
Akdeniz Üniversitesi

.....

Üye : Prof. Dr. Alp CAN
Ankara Üniversitesi

.....

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Melike CENGİZ

Enstitü Müdürü

ETİK 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 çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Betül TİRE

İmza

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK

İmza

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca beni her zaman destekleyen, bilgi, birikim, tecrübe ve vizyonu ile bana yön veren, gelişimimde en çok katkısı olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Saffet ÖZTÜRK'e,

Tez çalışmam sürecinde yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli ekip arkadaşlarım Günel TALİBOVA ve Yeşim BİLMEZ'e

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nın değerli tüm öğretim üyelerine, asistan arkadaşlarıma ve teknik ekibe,

Güler yüzleri ve samimiyetleri ile her zaman yardıma hazır olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün kıymetli çalışanlarına,

Yardımları ile yanımda olan Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nın değerli personeline,

Hayatım boyunca her daim yanımda olarak hayallerimin peşinden gitmem için beni destekleyen çok kıymetli babam İbrahim TİRE ve annem Emine TİRE'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Tekrarlayan süperovulasyonun fare germinal vezikül (GV) ve metafaz II (MII) oositlerindeki *Tert* ve *Terc* gen ekspresyonu ile telomer uzunluğu üzerine etkilerinin belirlenmesidir.

Yöntem: Balb/C ırkı dişi farelerden kontrol (K; n=12), bir kez süperovulasyon uygulanan (1S; n=12), birer hafta ara verilerek üç kez süperovulasyon uygulanan (3S; n=12), birer hafta ara verilerek beş kez süperovulasyon uygulanan (5S; n=12) olmak üzere 4 grup oluşturuldu; bu gruplardan GV ve MII oositlerin eldesi gerçekleştirildi. Elde edilen oositlerde, *Tert* ve *Terc* genlerinin ekspresyon seviyeleri RT-qPCR, TERT protein düzeyi immüno Floresan boyama, telomer uzunluğu ise qPCR yöntemleriyle belirlendi. Elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA ve Tukey post-hoc testi ile analiz edildi.

Bulgular: *Terc* gen ekspresyon seviyesi, 5S grubundan elde edilen GV oositlerde 1S grubuna göre yüksek olduğu belirlendi ($P<0.05$). MII oosit elde edilen 5S grubunun *Terc* seviyesi, K grubuna göre yüksek bulundu ($P<0.05$). GV oositlerdeki *Tert* mRNA seviyesi ise 1S ve 5S gruplarında, K grubuna göre yüksek olduğu görüldü ($P<0.05$). MII oosit elde edilen 1S grubundaki *Tert* seviyesi de diğer gruplara göre daha yüksek bulundu ($P<0.001$). TERT proteini GV oositlerde yoğun olarak çekirdek bölgesinde ve sitoplazmada; MII oositlerde ise yoğun olarak sitoplazma ve polar cisimciklerde gözlemlendi. TERT protein düzeyinin MII oosit elde edilen 1S grubundan 5S grubuna doğru kademeli olarak arttığı belirlendi ($P<0.01$). 1S, 3S ve 5S gruplarına ait GV oositlerin telomer uzunluğu, K grubuna göre daha kısaydı ($P<0.001$). K ve 3S gruplarından elde edilen MII oositlerin telomer uzunluğu ise 1S ve 5S gruplarına göre daha kısa olduğu belirlendi ($P<0.001$).

Sonuç: Tekrarlayan süperovulasyon, telomeraz bileşenleri olan *Tert* ve *Terc* gen ekspresyonları ile TERT protein düzeyi ve telomer uzunluğunu GV ve MII oositlerde değiştirmektedir. Bu değişimlerin yardımcı üreme teknikleri sonucunda elde edilen oositlerde görülen bazı gelişimsel bozukluklarla ilişkili olabileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar Kelimeler: tekrarlayan süperovulasyon, telomeraz ekspresyonu, telomer uzunluğu, oosit, fare

ABSTRACT

Objective: To determine the effects of repeated superovulation on the *Tert* and *Terc* genes expression and telomere length in mouse germinal vesicle (GV) and metaphase II (MII) oocytes.

Method: Four groups from Balb/C female mice consisting of control (C; n=12), one time superovulated (1S; n=12), three times with one week intervals (3S; n=12); five times with one week intervals (5S; n=12) were created, and GV and MII oocytes were obtained from these groups. The expression levels of the *Tert* and *Terc* genes by RT-qPCR, TERT protein level by immunofluorescence staining, and telomere length by qPCR were determined. The obtained data were analysed by one-way ANOVA and post-hoc Tukey test.

Results: The *Terc* gene expression level in GV oocytes from 5S group was higher than 1S group ($P<0.05$). *Terc* level in MII oocytes from 5S group was higher than C group ($P<0.05$). The *Tert* mRNA level increased in GV oocytes obtained from 1S and 5S groups than C group ($P<0.05$). TERT protein was detected as densely in the nucleus and in the cytoplasm of GV oocytes; densely localized in the cytoplasm and polar body of MII oocytes. It is worth noting that TERT level in MII oocytes gradually increased from 1S to 5S groups ($P<0.01$). Telomere length in GV oocytes of 1S, 3S and 5S groups were shorter than C group ($P<0.001$). Telomere length in MII oocytes obtained from C and 3S groups was shorter than those of 1S and 5S groups ($P<0.001$).

Conclusion: Repeated superovulation changes the telomerase components, *Tert* and *Terc* genes expression, TERT protein level, and telomere length in GV and MII oocytes. These changes may be associated with some developmental disorders, which are observed in the oocytes as a result of assisted reproductive techniques.

Key Words: repeated superovulation, telomerase expression, telomere length, oocytes, mouse

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Memelilerde Ovaryumun Genel Histolojik Yapısı	4
2.2. Ovaryumların Gelişimi ve OogeneZ	5
2.3. Memelilerde Folikülogenez	7
2.4. Süperovulasyon ve Tekrarlayan Süperovulasyon	11
2.5. Süperovulasyon ve Tekrarlayan Süperovulasyonun Oosit ve Erken Dönem Embriyo Gelişimi Üzerine Etkileri	13
2.6. Telomerlerin Yapısı	16
2.7. Telomer İlişkili Proteinler	17
2.8. Telomer Uzunluğunun Düzenlenmesi	20
2.9. Telomerazın Yapısı	20
2.9.1. <i>TERC</i> 'in Yapısı	21
2.9.2. <i>TERT</i> 'in Yapısı	22
2.10. ALT Mekanizması	23
2.11. Memeli Oositlerinde Telomeraz Aktivitesi	24

2.12.	Memeli Oositlerinde Telomer Uzunluğu	25
2.13.	Süperovulasyonun Telomer Uzunluğu ve Telomeraz Aktivitesi Üzerine Etkileri	25
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1.	Kontrol ve Süperovulasyon Uygulanan Farelerden GV ve MII Oositlerin Eldesi	29
3.1.1.	Östrus Siklus Tayini	29
3.1.2	Gonadotropinlerin Hazırlanması	30
3.1.3	Vazektomize Erkek Modelinin Oluşturulması	31
3.1.4	Kontrol ve Süperovulasyon Gruplarından GV ve MII Oositlerin Eldesi	31
3.2.	<i>Tert</i> ve <i>Terc</i> Gen Ekspresyonlarının Kontrol ve Süperovulasyon Grubu Oositlerde RT-qPCR ile Belirlenmesi	33
3.2.1	GV ve MII Oositlerden Total RNA İzolasyonu	33
3.2.2.	İzole Edilen RNA'lara DNaz uygulaması	34
3.2.3.	cDNA (Komplementer DNA) Eldesi	34
3.2.4	RT-qPCR Uygulama Basamakları	35
3.3.	TERT Proteininin Kontrol ve Süperovulasyon Grubu Oositlerde İmmünofloresan ile Değerlendirilmesi	37
3.3.1	İmmünofloresan Boyama Yöntem Basamakları	37
3.4.	Telomer Uzunluğunun Kontrol ve Süperovulasyon Grubu Oositlerde Belirlenmesi	38
3.4.1.	GV ve MII Oositlerden Genomik DNA İzolasyonu	38
3.4.2.	qPCR Uygulama Basamakları	40
4.	BULGULAR	42

4.1.	Kontrol ve Süperovulasyon Gruplarından Elde Edilen GV ve MII Oositlerdeki <i>Terc</i> , <i>Tert</i> ve β -Akt Genlerinin Ekspresyonu	42
4.2.	TERT Protein Dağılımı ve Görelî Düzeyinin Kontrol ve Süperovulasyon Grubu Oositlerde İmmünofloresan Boyama ile Belirlenmesi	48
4.3.	Telomer Uzunluğunun Kontrol ve Süperovulasyon Grubu Oositlerde Belirlenmesi	53
5.	TARTIŞMA	57
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER	62
	KAYNAKLAR	64
	ÖZGEÇMİŞ	76

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1.	İmmünofloresan boyamasında kullanılan primer ve sekonder antikorlar, dilüsyon oranları, marka ve katalog numaraları	38
Tablo 3.2.	Elde edilen genomik DNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri	40
Tablo 3.3.	qPCR aşamasında kullanılan telomer ve <i>B1</i> primerleri	41



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Ovaryumun histolojik yapısı	4
Şekil 2.2.	Primordiyal germ hücrelerinin genital kabartıya göçü	6
Şekil 2.3.	Memelilerde oogenezi süreci	8
Şekil 2.4.	Memelilerde folikülogenez süreci	9
Şekil 2.5.	Telomerin yapısı	17
Şekil 2.6.	Telomerazın yapısı	21
Şekil 2.7.	Fare ve insan oosit ile preimplantasyon embriyolarında telomer uzunluğu ve telomeraz aktivite değişiklikleri	26
Şekil 3.1.	Çalışmada uygulanan deneysel yöntemler	28
Şekil 3.2.	Balb/C ırkı dişi farelerden alınan vajinal yayma örnek mikrografları	30
Şekil 3.3.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından GV ve MII oositlerin eldesi	32
Şekil 4.1.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, β -Act için uygulanan RT-qPCR sonucu	42
Şekil 4.2.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, β -Act için uygulanan RT-qPCR erime eğrisi (melting curve) sonucu	43
Şekil 4.3.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, <i>Terc</i> için uygulanan RT-qPCR sonucu	43

Şekil 4.4.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, <i>Terc</i> için uygulanan RT-qPCR erime eğrisi (melting curve) sonucu	44
Şekil 4.5.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerdeki görelî <i>Terc</i> RNA ekspresyonu	45
Şekil 4.6.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen MII oositlerdeki görelî <i>Terc</i> RNA ekspresyonu	45
Şekil 4.7.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, <i>Tert</i> için uygulanan RT-qPCR sonucu	46
Şekil 4.8.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, <i>Tert</i> için uygulanan RT-qPCR erime eğrisi (melting curve) sonucu	46
Şekil 4.9.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerdeki görelî <i>Tert</i> mRNA ekspresyonu	47
Şekil 4.10.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen MII oositlerdeki görelî <i>Tert</i> mRNA ekspresyonu	47
Şekil 4.11.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerin immünofloresan boyama sonucu	49
Şekil 4.12.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen MII oositlerin immünofloresan boyama sonucu	50
Şekil 4.13.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerdeki TERT protein görelî düzeyi	51
Şekil 4.14.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerin çekirdek alanlarındaki TERT protein görelî düzeyi	51

Şekil 4.15.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerin sitoplazma alanlarındaki TERT protein görelî düzeyi	52
Şekil 4.16.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen MII oositlerdeki görelî TERT protein düzeyi	52
Şekil 4.17.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, <i>B1</i> geni için uygulanan qPCR sonucu	53
Şekil 4.18.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde <i>B1</i> geni için uygulanan qPCR erime eğrisi (melting curve) sonucu	54
Şekil 4.19.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde telomer uzunluğunu belirlemek için uygulanan qPCR sonucu	54
Şekil 4.20.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde telomer uzunluğunu belirlemek için uygulanan qPCR erime eğrisi (melting curve) sonucu	55
Şekil 4.21.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerin görelî telomer uzunluğu	55
Şekil 4.22.	Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen MII oositlerin görelî telomer uzunluğu	56

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALT	: Telomerlerin Alternatif Uzatılması
AMH	: Anti-Müllerian Hormon
ATR	: Ataksi Telenjektazi ve RAD3 ile İlişkili
ATM	: Ataksi-Telenjektazi Mutasyon
CR	: Korunmuş Bölge
CTE	: C-Terminal Uzantısı
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
eCG	: Kısırak Koryonik Gonadotropin
FSH	: Folikül Uyarıcı Hormon
FISH	: Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon
GV	: Germinal Vezikül
GVBD	: Germinal Vezikül Yıkımı
GnRH	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	: İnsan Koryonik Gonadotropin
IVF	: <i>In Vitro</i> Fertilizasyon
KOK	: Kumulus Oosit Kompleksi
LH	: Lüteinleştirici Hormon
MII	: Metafaz II
MtDNA	: Mitokondriyon DNA'sı
NTE	: N-Terminal Uzantısı
OHSS	: Ovaryal Hiperstimülasyon Sendromu
PMSG	: Gebe Kısırak Serum Gonadotropin

POT1	: Telomerler Koruma Proteini 1
RAP1	: Represör Aktivatör Protein 1
RNA	: Ribonükleik Asit
ROS	: Reaktif Oksijen Türleri
RT-qPCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SRY	: Y Kromozomunda Cinsiyet Belirleyici Bölge
TDF	: Testis Belirleyici Faktör
TERT	: Telomeraz Geri Transkriptaz
TEN	: N-Terminal Domain
TRAP	: Telomer Tekrarı Çoğaltma Protokolü
TRBD	: Telomeraz RNA Bağlayıcı Alan
TRF1	: Telomerik Tekrar Bağlanma Faktörü 1
TRF2	: Telomerik Tekrar Bağlanma Faktörü 2
T-SCE	: Telomerik Kardeş Kromatid Değişimi
TIN2	: TRF1 Etkileşimli Nüklear Protein 2
TPP1	: POT1 Bağlanma Ortak 1
YÜT	: Yardımcı Üreme Teknikleri
ZP	: Zona Pellusida
qPCR	: Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Q-FISH	: Kantitatif Floresan <i>In Situ</i> Hibridizasyon

1. GİRİŞ

1.1. Hipotezin Temeli ve Amaç

Süperovulasyon veya ovaryum stimülasyonu, infertilite tedavisinde ve deney hayvanları ile ilgili farklı araştırmalarda sıklıkla kullanılan ve fazla sayıda oosit eldesinin amaçlandığı bir uygulamadır (Luo ve ark., 2011; Wdowiak ve ark., 2015). Bu uygulama, folikül uyarıcı hormon (FSH) ve lüteinleştirici hormon (LH) analoglarının belirli zaman aralıklarında ve dozlarda enjekte edilmesi temeline dayanmaktadır. Deney hayvanlarına uygulanan süperovulasyon protokolü ise dışarıdan FSH analogu olan gebe kısırak serum gonadotropin (PMSG) ve LH analogu olan insan koryonik gonadotropin (hCG) hormonlarının belirli doz ve zaman dilimlerinde uygulanması ile gerçekleştirilmektedir (Luo ve ark., 2011; Behringer ve ark., 2018).

Süperovulasyonun hedefe yönelik olumlu katkısına rağmen; oosit olgunlaşması, embriyo gelişimi ve ovaryum yapısını olumsuz etkileyebilmektedir. Fareler üzerinde yapılmış çalışmalarda, bu uygulamanın oosit ve embriyo kalitesinde azalma (Ertzeid ve ark., 2001), olgunlaşan oosit oranında azalma (Lee M. ve ark., 2017), embriyo ve fetal gelişimde gecikme (Ertzeid ve ark., 1992; Van der Auwera ve ark., 2001), normal olmayan blastosist oluşumunda artış (Van der Auwera ve ark., 2001), düşük implantasyon oranı (Ertzeid ve ark., 2001), implantasyon sonrası ölüm oranında artış (Ertzeid ve ark., 2001) ve DNA metilasyon kurulumunda bozulma (Fortier ve ark., 2008) gibi birçok olumsuz etkileri olabildiği gösterilmiştir. Süperovulasyonun fare oositlerinde mitokondriyon yapısında bozulma, endozom oluşumunda düşüş, mitokondriyon aktivitesi ve ATP üretiminde azalmaya da neden olabildiği bildirilmiştir (Lee M. ve ark., 2017).

In vitro fertilizasyon (IVF) kliniklerinde, bazı hastalar için yeterli sayıda oosit ve dolayısıyla embriyo eldesi için tekrarlayan süperovulasyon gerekebilmektedir. Tekrarlayan süperovulasyon, başarılı bir gebelik için umut verici olsa da ovaryum yapısında çeşitli olumsuz etkilerin ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Fareler üzerinde yapılmış olan çalışmalarda, bu uygulamanın ovaryumda oksidatif hasar artışına, mitokondriyon DNA (mtDNA) mutasyonlarına ve apoptoza neden olabildiği gösterilmiştir (Chao ve ark., 2005; Zhang S. ve ark., 2023). Rhesus maymunları üzerinde

yapılan bir çalışmada ise tekrarlayan süperovulasyonun ovaryumda hücre çoğalması ile farklılaşmasını baskılayan ve hücre apoptozunu tetikleyen birçok protein seviyesini değiştirdiği bildirilmiştir (Dong ve ark., 2014).

Tekrarlayan süperovulasyon, ovaryum yapısındaki olumsuz etkilerine ek olarak folikül gelişimini ve oosit kalitesini de etkileyebilmektedir. Nie ve arkadaşları tarafından (2018) yayımlanan bir çalışmada, tekrarlayan süperovulasyonun progesteron, östradiyol (E2) ve inhibin B miktarında azalma; FSH, LH, reaktif oksijen türleri (ROS), apoptoz, yaşlanma (senesens)-ilişkili mRNA ve protein düzeylerinde artışa sebep olarak ovaryum fonksiyonunu ve oosit kalitesini etkilediği belirtilmiştir (Nie ve ark., 2018). Benzer şekilde, yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada da tekrarlayan süperovulasyonun anti-Müllerian hormon (AMH), östrojen, FSH ve LH hormon düzeylerinde düşüşe neden olarak folikül gelişimini etkileyebileceği rapor edilmiştir (Wang Q. ve ark., 2022). Yapılan farklı çalışmalarda, tekrarlayan süperovulasyon uygulamasının fare oositlerinde organellerin dağılımında değişime, iç ipliklerinde hasar oluşumuna ve oksidatif strese artışa neden olduğu ortaya konulmuştur (Van Blerkom ve ark., 2001; Kalthur ve ark., 2016). Bununla birlikte, tekrarlayan süperovulasyonun oositi çevreleyen kumulus hücrelerini de etkileyerek mitokondriyon fonksiyonlarını değiştirdiği belirlenmiştir (Xie ve ark., 2016). Görüldüğü gibi, tekrarlayan süperovulasyon ovaryum ve oositlerde gerek yapısal gerekse moleküler biyolojik düzeyde olumsuz yönde değişimlere neden olabilmektedir.

Süperovulasyona bağlı olarak da ortaya çıkan oksidatif stres artışı, anöploidi, oosit ve embriyo kalitesinde azalma ve mitokondriyon fonksiyon bozukluklarının, telomer kısalması ile ilişkili olarak da görülebilmektedir (Keefe ve ark., 2007; Zheng ve ark., 2019). Telomer kısalması sonucunda embriyo gelişimindeki bozulmalar da meydana gelebilmektedir. (Liu L. ve ark., 2002; Treff ve ark., 2011). Sonuç olarak, süperovulasyon uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan olumsuz etkilerin belirli bir kısmının, telomer kısalması sonucunda meydana gelen fenotiplerle benzerlik göstermektedir. Bu bilgiler, süperovulasyonun bu olumsuz etkileri telomerlere direkt ya da dolaylı olarak etki ederek gerçekleştirebileceği düşüncesini kuvvetlendirmektedir. Yaptığımız literatür taramalarına göre, bu uygulamanın telomer uzunluğu ve telomeraz bileşenleri üzerine etkisini araştıran

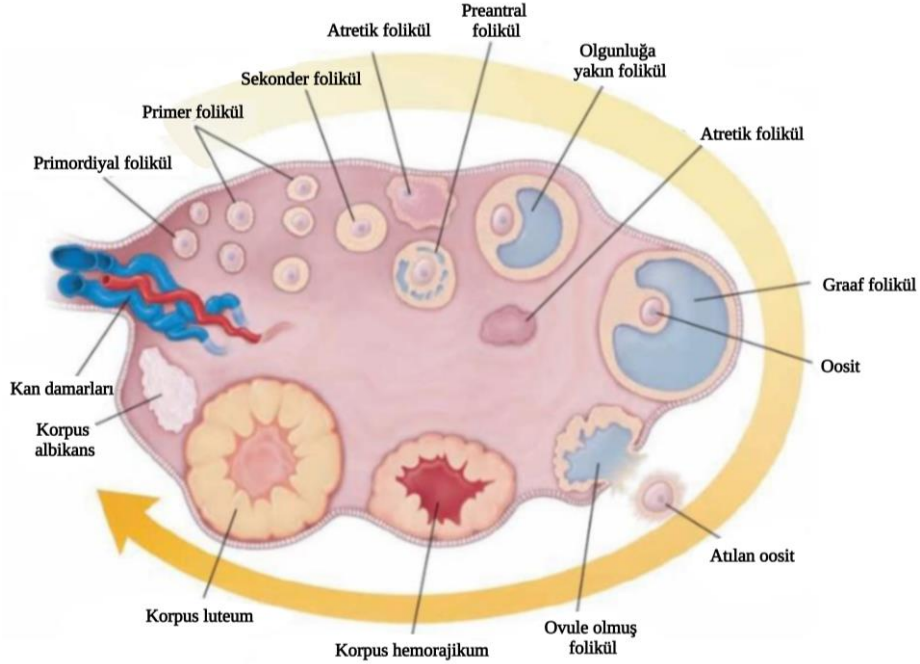
sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yakın tarihte Berteli ve arkadaşları (2022) tarafından yapılan bir çalışmada, süperovule edilen farelerden elde edilen blastosistlerin, kontrol grubuna göre daha uzun telomere sahip olduğu rapor edilmiştir (Berteli ve ark., 2022). Sıçan granuloza hücreleri üzerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada ise FSH reseptörünün PMSG tarafından uyarılması ile bu hücrelerdeki *Tert* mRNA ekspresyonu, TERT protein düzeyi ve telomeraz aktivitesinin arttığı gözlenmiştir (Mordechai ve ark., 2020).

Tekrarlayan süperovulasyonun, telomeraz bileşenlerinin ekspresyonu ve telomer uzunluğu üzerine etkisine yönelik bir çalışma tespit edilmemiştir. Bu bilgilerden yola çıkılarak çalışmadaki hipotezimiz “Tekrarlayan süperovulasyon uygulaması, germinal vezikül (GV) ve metafaz II (MII) oositlerinde telomeraz alt bileşen genlerinin ekspresyonlarını etkileyerek telomer uzunluğunu değiştirir.” şeklinde oluşturulmuştur. Bu projede, tekrarlayan süperovulasyonun fare GV ve MII oositlerdeki *Tert* ve *Terc* gen ekspresyonu ile telomer uzunluğu üzerine etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu projeden elde edilen verilerin, yardımcı üreme teknikleri (YÜT) ile elde edilen oositlerde görülen bazı gelişimsel bozuklukların alt yapısının aydınlatılmasına katkı(lar) sağlanabileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Memelilerde Ovaryumun Genel Histolojik Yapısı

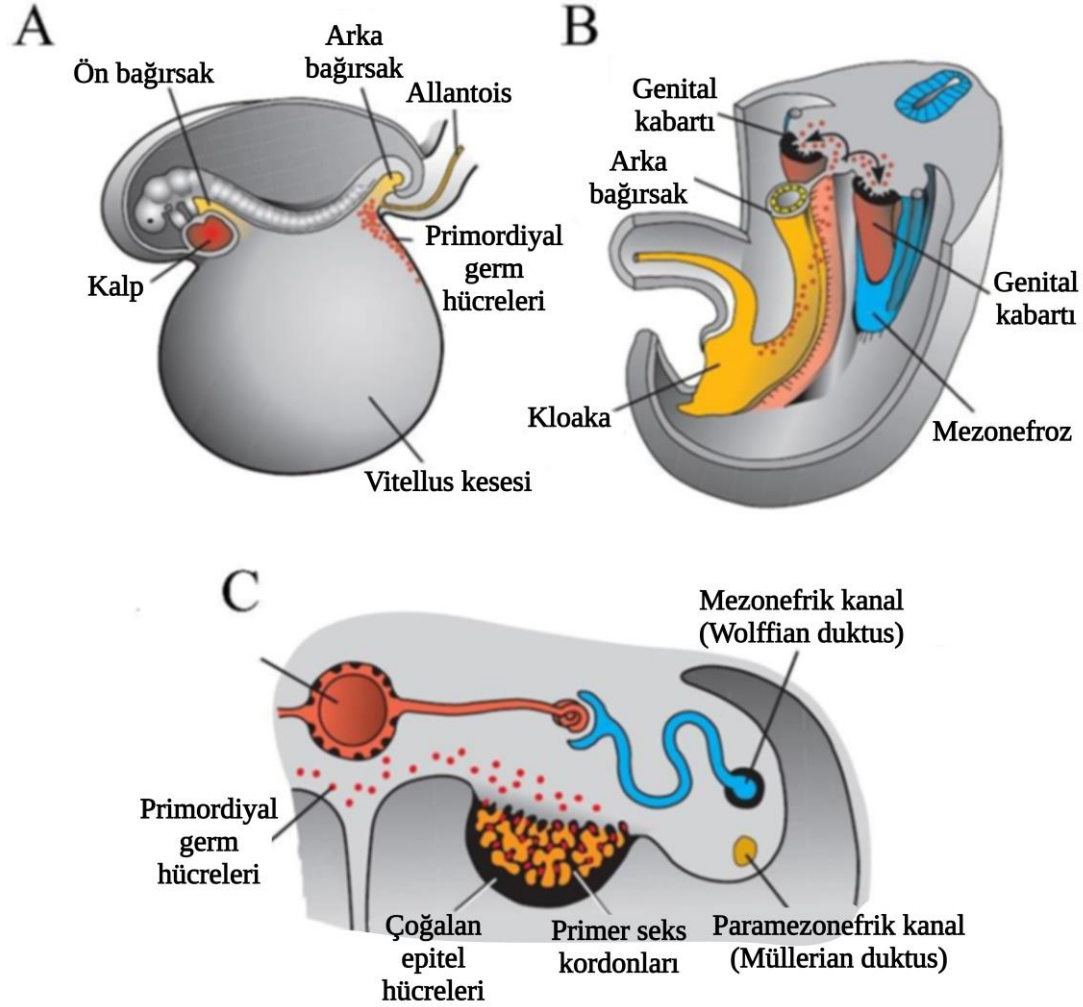
Uterusun (rahmin) sağında ve solunda yerleşimli bir çift ovaryum bulunmaktadır. Her bir ovaryum, mezovaryum olarak isimlendirilen periton katlantısı tarafından geniş ligamente, suspensör ligament tarafından pelvis duvarına ve ovaryum ligamenti tarafından da uterusu bağlanmaktadır (Ross ve ark., 2006). Ovaryumlar, badem şeklinde bir görünüme sahip endokrin organlardır. Ovaryum yüzeyi, germinal epitel olarak da bilinen; tek katlı kübik ve bazı bölgelerde tek katlı yassı epitel ile döşelidir. Germinal epitel ile korteks arasında, tunika albuginea denilen sıkı bağ dokusu yer almaktadır. Tunika albugineanın hemen altında yer alan korteks, bağ doku hücreleri ve farklı gelişim aşamasındaki folikülleri içermektedir (Şekil 2.1). Ovaryumun iç kısmında ise kan ve lenf damarlarını içeren gevşek bağ dokusu yapısındaki medulla bölgesi bulunmaktadır. Ovaryumlar, dişi gametlerin üretilmesi (oogenez) ve başlıca steroid hormonlar olan östrojen ve progesteron salgılanmasında (steroidogenez) görev almaktadır (Ross ve ark., 2006).



Şekil 2.1. Ovaryumun genel histolojik yapısı. Bu şekil, ilgili kaynaktan (Ross ve ark., 2006) alınarak, değiştirilmiştir. Ovaryum yüzeyi, germinal epitel ile döşelidir. Germinal epitelin hemen altında sıkı bağ dokusu olan tunika albuginea yer almaktadır. Ovaryumun ana yapısı, dışta foliküllerin bulunduğu korteks; içte kan ve lenf damarları bakımından zengin medulladan meydana gelmektedir.

2.2. Ovaryumların Gelişimi ve Oogenez

Dişi gonadlar (ovaryumların öncü formu), arka karın duvarını döşeyen mezotel (mezoderm kaynaklı epitel), mezenkimal doku (embriyonik bağ dokusu) ve buraya göç eden primordiyal germ hücreleri (PGH'ler) olmak üzere üç kaynaktan köken almaktadır (Moore ve ark., 2018). İnsanda gonad gelişimi, gebeliğin 5. haftasında mezoderm kaynaklı epitelin kalınlaşmasıyla başlar. Daha sonra, mezoderm kaynaklı epitel ve hemen altındaki mezenşim hücrelerinin çoğalması ile mezonefrozun (geçici böbrek formu) orta hattının her iki yanında gonad taslağı olarak bilinen gonadal kabartılar meydana gelir (Şekil 2.2). Gelişimin ilk yedi haftasında dişi ve erkek gonadlar aynı görünüme sahiptir. Bu nedenle, bu süreç gonadal gelişimin farklılaşmamış dönemi olarak isimlendirilmektedir (Kashimada ve ark., 2010). Embriyonik gelişimin 7. haftasından sonra ise dişi veya erkek yönünde farklılaşmaya başlar. Gonadal cinsiyet, Y kromozomunun kısa kolunda bulunan ve testis belirleyici faktörü (TDF) kodlayan *SRY* geninin varlığıyla belirlenmektedir (Ross ve ark., 2006; Rodriguez Gutierrez ve ark., 2019; Nagahama ve ark., 2021). *SRY* geni tarafından kodlanan TDF'nin varlığında: testis yönünde gelişim başlar ve primer seks kordonları önce seminifer kordonlara, daha sonra seminifer tübüllere farklılaşır. TDF'nin yokluğunda ise ovaryum gelişimi gözlemlenmektedir. Embriyonik gelişimin 10. haftasına kadar ovaryum yapısı net bir şekilde ayırt edilemezken; 12. hafta itibarıyla histolojik olarak ovaryum yapısı gözlemlenmeye başlar (Ross ve ark., 2006). Ovaryum gelişiminde, kortikal kordonlar altında bulunan mezenşim içerisine girintiler yaparak boyutlarını arttırmaktadır. Bu dönemde, göç eden PGH'ler kortikal kordonların içerisine girerek yerleşmektedir. Gonadal cinsiyetten bağımsız olarak, gelişen embriyo çift genital kanal yapısına sahiptir. Sonrasında cinsiyete bağlı olarak, bu genital kanalların gelişimi düzenlenir. Dişi genital kanalların gelişimine, paramezonefrik kanallar (Müllerian duktus olarak da bilinmektedir.) köken oluştururken; erkek genital kanalların gelişiminde ise mezonefrik kanallar (Wolffian duktus olarak da bilinmektedir.) görev almaktadır (Teixeira ve ark., 2008; Moore ve ark., 2018).



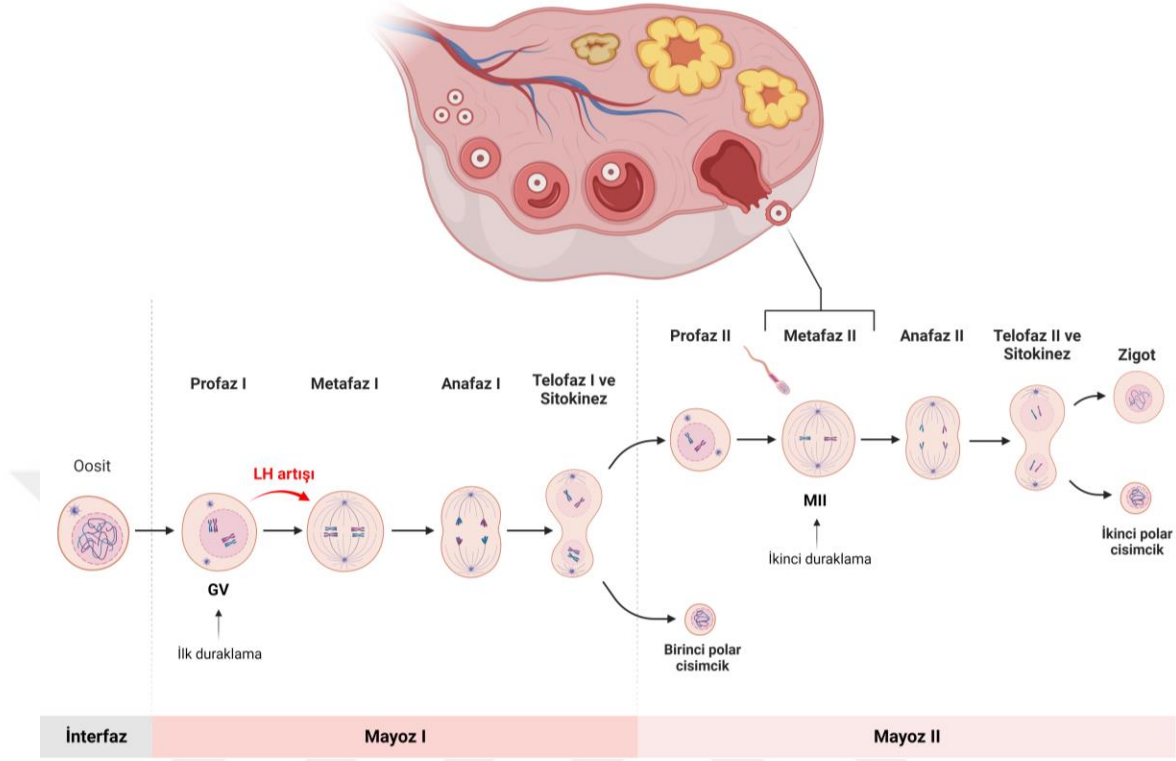
Şekil 2.2. Primordiyal germ hücrelerin (PGH'lerin) genital kabartıya göçü. Bu şekil ilgili kaynaktan (Sadler, 2017) alınarak, değiştirilmiştir. **A.** PGH'lerin oluşumu. PGH'ler, vitellus kesesi duvarının endoderminde ortaya çıkarlar. **B.** PGH'lerin göçü. PGH'ler ameboid hareketlerle arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca ilerleyerek gonadal kabartılara ulaşmaktadır. **C.** PGH'lerin gonadlara yerleşimi. Dişi gonadlara ulaşan PGH'ler, primer seks kordonları (Daha sonra kortikal kordonlara dönüşür.) içerisine yerleşirler.

PGH'ler, insan embriyosunda ilk olarak gelişimin 4. haftasında vitellus kesesi duvarının endoderminde ortaya çıkar (Sadler, 2017). Embriyonik katlanmalar ile vitellus kesesi embriyo içerisine doğru yerleşim gösterir ve burada yer alan PGH'ler ameboid hareketlerle arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca ilerleyerek gonadal kabartılara göç ederler (Şekil 2.2). Göç sırasında yaklaşık yüz olan PGH sayısı mitoz bölünmelerle arttırılır. Embriyonik gelişimin 6. hafta sonunda, dişi gonada ulaşan PGH'ler kortikal kordonlar içinde oogonyumlara farklılaşarak; oogenezi sürecini başlatırlar. Oogonyumlar doğumdan önce ardışık mitoz bölünmeler geçirerek sayılarını 7 milyona kadar çıkarırlar. Oluşan oogonyumların büyük bir kısmı apoptoz ile ortadan kaldırılırken; kalanlar birinci

mayoz bölünmeye girer ve bu aşamadan itibaren oosit olarak isimlendirilmektedirler. Oositler, birinci mayoz bölünmenin profazının diploten evresinde durur ve puberteye kadar profaz I evresinde bekler (Solovova ve ark., 2022). Bu aşamadaki primer oosit, germinal vezikül (GV) olarak da tanımlanmaktadır. Tek katlı yassı epitel hücreleri (pre-granuloza hücreleri), primer oositi çevreleyerek primordiyal folikülü oluşturur. Her folikülojeniz sürecinde belli sayıda primordiyal folikül aktive edilir, fakat sadece bir tanesi [baskın (dominant) folikül] olgunlaşmasını tamamlar ve ovulasyon ile atılır. Foliküller içerisinde bulunan primer oositlerin olgunlaşması, granuloza hücrelerinden salgılanan oosit olgunlaşma inhibitörü (OMI) ile ovulasyonun hemen öncesine kadar baskılanır. Ovulasyondan hemen önce ani LH artışı meydana gelir. Bu artış ile primer oosit birinci mayoz bölünmeyi tamamlayarak sekonder oosit ve birinci polar cisimciği oluşturur (Wasielak-Politowska ve ark., 2022). MII oosit olarak da bilinen sekonder oosit, ikinci mayoz bölünmenin metafaz evresinde durur. Nüklear ve sitoplazmik olgunlaşmasını tamamlayan sekonder oosit, folikülden ovulasyon ile atılır. Sitoplazmik olgunlaşma sürecinde hücre içi organellerin (mitokondriyon ve endoplazmik retikulumu gibi), mikrotübüllerin, mikrofilamanların ve kortikal granüllerini dağılımı düzenlenir (Mao ve ark., 2014). Bu olgun MII oositin sperm tarafından döllenmesi durumunda ikinci mayoz bölünme tamamlanarak, zigot ve ikinci polar cisimciği oluşur (Wasielak-Politowska ve ark., 2022) (Şekil 2.3).

2.3. Memelilerde Folikülojeniz

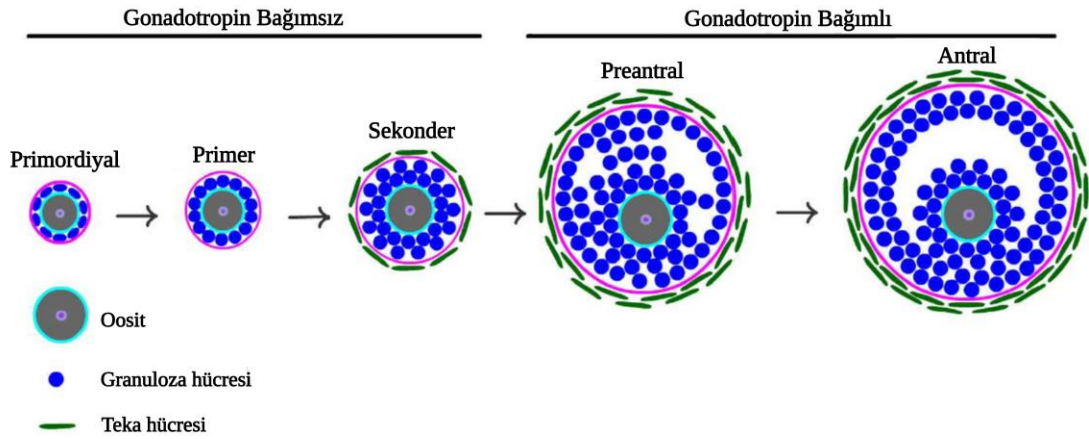
Embriyonik dönemde oluşan ve profaz I evresinde bekleyen oositler, puberte dönemine kadar primordiyal foliküller içerisinde ve ovaryumun kortesinde korunmaktadır. Bu primordiyal foliküller, korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında yer alırlar. Puberte ile birlikte, her menstrual siklusta 6-12 adet primordiyal folikül gelişerek sırasıyla primer, sekonder, preantral ve antral folikülleri oluşturmaktadır. Primordiyal folikülden antral folikül aşamasına kadar olan foliküller gelişim süreci folikülojeniz olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.4). Her siklusta belirli sayıda primordiyal folikül folikülojeniz sürecine başlamasına rağmen; insanda yalnızca bir tanesi gelişimini tamamlayarak ovule olabilmektedir (Moore ve ark., 2018). Primordiyal foliküllerin sayısı, dişinin sahip olduğu ovaryum folikül havuzunu temsil etmektedir.



Şekil 2.3. Memelilerde oogenez süreci. Bu şekil, ilgili kaynaktan (Wasielak-Politowska ve ark., 2022) değiştirilerek, alınmıştır. Primer oosit, doğumdan önce profaz I’in diploten evresinde durur ve puberteye kadar bekler. Puberte ile birlikte, LH seviyesi yükselir ve primer oosit mayoz bölünmeye devam ederek; sekonder oosit ve birinci polar cisimciği oluşturur. Ovulasyon sonrası olgun sekonder oositin sperm tarafında döllenmesi gerçekleşirse mayoz bölünme tamamlanır; ikinci polar cisimcik ve zigot oluşur.

Primordiyal folikülü çevreleyen yassı epitel hücreleri hem sayılarını arttırmakta hem de kübik bir şekil alarak primer folikülü meydana getirir (Dunlop ve ark., 2014; Rimon-Dahari ve ark., 2016). Bu sırada primer oosit büyümeye başlar ve folikül hücreleriyle birlikte glikoprotein yapıda olan zona pellusidayı (ZP) sentezler. Bu kübik hücreler ardışık mitotik bölünmeler geçirerek çok katlı tabakalı bir yapı oluşturur. Foliküler hücreler, çoğalıp katmanlaştıktan sonra granuloza hücreleri olarak isimlendirilirken; çok katlı tabaka ise granuloza tabakası (stratum granulozum) olarak adlandırılmaktadır. Granuloza hücreleri arasında herhangi bir boşluk bulunmadığı bu folikül aşaması sekonder folikül olarak tanımlanmaktadır. Bu aşamada, folikülü çevreleyen stromal hücreler teka tabakasını meydana getirirler. Folikül boyutundaki artış ve granuloza hücrelerinin proliferasyonunun devam etmesiyle birlikte hücreler arasında hiyaluronan bakımından zengin sıvı dolu küçük veziküler boşluklar oluşmaya başlar. Bu aşamadaki folikül, preantral folikül olarak tanımlanmaktadır. Preantral folikülde teka tabakası, teka interna

ve teka eksterna olmak üzere iki tabakaya ayrılır. Teka interna tabakası, bol miktarda kan damarı, fibroblast ve kollajen demetleri bulundurmaktadır. Teka interna tabakası folikül gelişiminde kritik rollere sahip olan LH reseptörlerini de içerir. Teka eksterna tabakası ise düz kas hücreleri ve kollajen lif demetlerinden meydana gelmektedir. Preantral folikül boyutu arttıkça, granuloza hücreleri arasında oluşan sıvı dolu boşluklar birleşerek hilal şeklinde büyük bir antrumu meydana getirirler. Primer oosit, bu aşamada folikülün kenarına doğru konumlanır. Oositi çevreleyen kumulus hücrelerinin ilk tabakası korona radiata olarak isimlendirilmektedir. Folikül duvarı ile oosit arasında yer alan granuloza hücre kitlesi olan kumulus ooforus antruma doğru bir çıkıntı oluşturur. Büyük ve tek bir antrum içeren bu folikül, Graaf veya antral olarak tanımlanmaktadır (Dunlop ve ark., 2014; Esencan ve ark., 2022).



Şekil 2.4. Memelilerde folikülogenez süreci. Bu şekil, ilgili kaynaktan (Kosebent ve ark., 2020) alınarak, değiştirilmiştir. Primer oositin, tek katlı yassı epitel hücre tabakası tarafından çevrenmesiyle primordiyal folikül oluşmaktadır. Puberte ile birlikte, primordiyal folikül gelişerek sırasıyla primer, sekonder, preantral ve antral (Graaf) folikülleri meydana getirir. Primordiyal folikül tek katlı yassı folikül hücreleri içerirken; primer folikül yapısı tek katlı kübik folikül hücreleri ile karakterizedir. Sekonder folikül ise granuloza hücrelerinin çoğalarak iki ve daha fazla sayıda katman oluşturduğu aşama olarak tanımlanmaktadır. Preantral folikül, granuloza hücreleri arasında hiyaluronan bakımından zengin küçük boşluklar bulundururken; antral folikül hilal şeklinde tek bir boşluk (antrum) içermektedir.

Foliküler gelişim, gonadotropin bağımsız ve gonadotropin bağımlı olmak üzere iki evreden meydana gelmektedir (Ross ve ark., 2006; Dunlop ve ark., 2014). Sekonder folikül aşamasına kadar olan gelişim, hipofiz bezinden salgılanan gonadotropinlerden bağımsız olarak gerçekleşmektedir. Bu evrede otokrin ve parakrin mekanizmalar aracılığıyla üretilen büyüme faktörleri ile sinyal mekanizmalarının etkili olduğu bilinmektedir (Dunlop ve ark., 2014). Yapılan çalışmalarda, primordiyal foliküllerin

gelişiminde dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF β) süper ailesinin üyeleri olan kemik morfogenetik protein 4 (BMP4) ve kemik morfogenetik protein 7 (BMP7) ve büyüme farklılaştırma faktör 9 (GDF9)'un rol oynadığı gösterilmiştir (Williams ve ark., 2000; Dunlop ve ark., 2014). Bunlara ek olarak, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü 7 (FGF7), kit ligand (KL) ve lösemi inhibe edici faktör (LIF) gibi faktörlerin primer foliküle geçişte etkili oldukları bilinmektedir (Williams ve ark., 2000; Dunlop ve ark., 2014). Folikül gelişiminin preantral folikül aşaması ve sonrası ise hipofiz bezinden salgılanan FSH ve LH kontrolünde meydana gelmektedir. Folikül gelişimiyle birlikte, FSH reseptörleri sekonder folikül aşamasında granuloza hücrelerinde; LH reseptörleri ise preantral folikül aşamasında teka interna tabakasında ortaya çıkmaktadır (Oktay ve ark., 1998; Sullivan ve ark., 1999). Bu reseptörler aracılığıyla FSH ve LH hormonları folikül gelişiminin düzenlenmesinde görev almaktadır.

Foliküler gelişimde kritik rollere sahip olan FSH ve LH hormonlarının sentezlenmesi, hipotalamus-hipofiz-ovaryum eksenini tarafından düzenlenmektedir. TGF- β ailesinin üyelerinden olan aktivin ve inhibin, FSH salınımının düzenleyicisi olarak görev yapmaktadırlar (Padmanabhan ve ark., 2020). Aktivin A ve B izoformları, FSH salınımını uyarak artmasını sağlarken; inhibin A ve B izoformları ise FSH salınımını baskılamaktadır. Bununla birlikte, kandaki östrojen miktarının azalması FSH ve LH salınımını uyarmaktadır. Görüldüğü gibi östrojen seviyesi, FSH ve LH salınımı için düzenleyici etkenlerden biridir (Padmanabhan ve ark., 2020). Östrojen negatif geri bildirim yaparak FSH ve LH salınımını azaltabileceği gibi ovulasyondan hemen önce pozitif geri bildirim yaparak ani LH artışına sebep olmaktadır. Bu LH artışı ile birlikte ovulasyon gerçekleşir ve atılan oosit uterus tüplerine (ovidukta) alınır. Ovulasyondan sonra folikül duvarında kalan granuloza hücreleri granuloza lutein; teka interna hücreleri teka lutein hücrelerine dönüşerek korpus luteum meydana getirmektedir (Rimon-Dahari ve ark., 2016). Korpus luteum, olası bir gebelik oluşumuna karşı endometriyumu hazırlamak amacıyla progesteron ve östrojen sentezlemektedir. Gebelik oluşması durumunda: korpus luteum östrojen ve progesteron salgılayama devam eder. Gebelik gerçekleşmez ise korpus luteum yapısı gerileyerek korpus albicans yapısını oluşturur. Ovaryum korteksinde yer alan korpus albicans zaman içinde iyice küçülüp, kaybolur.

2.4. Süperovulasyon ve Tekrarlayan Süperovulasyon

YÜT, infertilite tedavisinde yaygın olarak uygulanmaktadır. YÜT uygulamalarının temel basamaklarından birisi de süperovulasyondur. Süperovulasyon, çok sayıda oosit elde edilmesi için dışarıdan FSH ve LH analoglarının belirli zaman aralıklarında ve dozlarda enjekte edilmesi temeline dayanan bir protokoldür (Luo ve ark., 2011; Wdowiak ve ark., 2015). Bu protokol, birden fazla baskın folikül gelişimini destekleyerek, oosit sayısını arttırdığı için infertilite tedavisinde ve deney hayvanları ile ilgili araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Deney hayvanları ve insanlarda uygulanan süperovulasyon protokollerinde kullanılan hormonlar, kimyasal moleküller ve bunların uygulanma dozları ile zamanları bakımından farklılıklar göstermektedir. Deney hayvanlarında gerçekleşen süperovulasyon protokolünde sıklıkla PMSG, hCG veya kısarak koryonik gonadotropin (eCG) hormonları kullanılmaktadır (Behringer ve ark., 2018; Lin ve ark., 2020). İnsanlarda uygulanan ovaryum stimülasyon protokolünde ise GnRH (gonadotropin salgılatıcı hormon) analogları, insan menopozal gonadotropin (hMG), gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) agonistleri, GnRH antagonistleri, östrojen inhibitörleri (klomifen sitrat) veya aromataz inhibitörleri (letrozol) uygulanmaktadır (Huang ve ark., 2014; Pacchiarotti ve ark., 2016). GnRH agonistlerin kullanımı, hipofizden gonadotropinlerin salınımını uyarır. Artan FSH, LH ve östrojen salınımı ise alt mekanizmaların aktifleşmesine neden olmaktadır (Depalo ve ark., 2012). GnRH agonistlerin kullanımındaki temel amaç, hipofizden salgılanan gonadotropinlerin üretimini baskılayarak menstrual siklusu kontrol altına almak ve erken luteinizasyonu önlemektir (Depalo ve ark., 2012). GnRH agonistlerin çalışma mekanizmasından farklı olarak, GnRH antagonistleri doğrudan GnRH reseptörlerine bağlanabilmekte ve gonadotropin salınımını baskılayabilmektedir. Böylece, GnRH antagonistlerin kullanımıyla erken oosit olgunlaşması ve erken LH artışı önlenmektedir (Diedrich ve ark., 2001).

IVF merkezlerinde, uygulanan hormon ve moleküllerin (GnRH agonisti veya antagonisti gibi) tipine ve bunların uygulanma zamanlarına bağlı olarak birden fazla ovaryum stimülasyon protokolü uygulanabilirken; deney hayvanlarında standart bir protokol kullanılmaktadır. Deney hayvanlarına MII oosit eldesi için uygulanan süperovulasyon

protokolü, FSH analogu olan PMSG hormon enjeksiyonundan 48 saat sonra LH analogu olan hCG hormonu enjekte edilmesiyle gerçekleştirilmektedir (Behringer ve ark., 2018). İnsanda ise bir önceki menstrual siklusun tahmini ovulasyon süresinden 7-8 gün sonra başlanan GnRH agonist uygulamasını içeren uzun protokol sıklıkla kullanılmaktadır (Depalo ve ark., 2012). Ayrıca, kısa protokol, çok kısa protokol, çok uzun protokol, mikrodaz arttırıcı protokol ve tek doz uygulama gibi birçok yöntemin klinikte uygulandığı bilinmektedir (Huang ve ark., 2014; Shrestha ve ark., 2015; Zhang H. ve ark., 2016). Geliştirilen bu protokollerle, kaliteli olgun oosit sayısını arttırmak ve ardışık süperovulasyonlar sonucunda ortaya çıkabilecek ovaryal hiperstimülasyon sendromu (OHSS) gibi olası olumsuz etkileri en aza indirmek amaçlanmaktadır. İnfertil bireylere uygulanacak protokol, kullanılacak molekül ve hormonların dozları ve uygulanma zamanları; bireyin yaşı, vücut kitle endeksi, antral folikül sayısı ve AMH düzeyine bağlı olarak değişim gösterebilmektedir. Bu nedenle, ovaryum stimülasyon protokolünün hasta yaşı, oosit rezervi ve hastanın diğer epidemiyolojik durumlarına bağlı olarak kişiselleştirilmesi gerekliliği öngörülmektedir (Sighinolfi ve ark., 2017).

Bazı hastalarda, yeterli sayıda oosit ve embriyo elde edilebilmesi için tekrarlayan ovaryum stimülasyonu gerekebilmektedir. Tekrar sayısı ve protokoller arasında geçen süre, bireyler arasında değişim gösterebilmektedir (Caligara ve ark., 2001). Klinik uygulamalarda, sıklıkla ardışık iki ovaryum stimülasyon protokolü arasında bir menstrual siklus zaman aralığı olacak şekilde düzenlenmektedir. Bu konuda yapılmış olan bir çalışmada ise iki ovaryum stimülasyon arasında bir, iki veya daha fazla menstrual siklus zaman aralığı olmasının oosit verimi, döllenme ve embriyo gelişimi açısından anlamlı bir farklılığa sebep olmadığı bildirilmiştir (Reichman ve ark., 2013).

IVF kliniklerinde sıklıkla uygulanan tekrarlayan stimülasyonun etkilerini incelemek amacıyla, deney hayvanları üzerinde farklı çalışmalar yapılmıştır (Xie ve ark., 2016; Tang ve ark., 2019; Zhang S. ve ark., 2023). Deney hayvanlarında oluşturulan bu tekrarlayan süperovulasyon modellerinde, iki süperovulasyon uygulaması arasındaki süre beş gün olacak şekilde düzenlenmiştir. Bilindiği üzere, farelerin östrus siklusları yaklaşık 4-5 gün içerisinde tamamlamaktadır (Byers ve ark., 2012). Fareler üzerinde oluşturulan

tekrarlayan süperovulasyon modelinde insanlarda uygulanan protokole benzer şekilde, ardışık iki süperovulasyon arasında bir östrus siklusu geçecek şekilde planlanmaktadır.

Sonuç olarak, IVF uygulamaları ve deney hayvanları ilgili çalışmalarda fazla sayıda oosit ve dolayısıyla embriyo elde etmek için çeşitli süperovulasyon protokolleri kullanılmaktadır. İlk süperovulasyon uygulamasında yeterli sayıda olgun oosit elde edilememesi durumunda ise tekrarlayan süperovulasyon protokolleri uygulanabilmektedir.

2.5. Süperovulasyon ve Tekrarlayan Süperovulasyonun Oosit ve Erken Dönem Embriyo Gelişimi Üzerine Etkileri

Süperovulasyon, oosit ve embriyoların gelişim sürecini ve ovaryum yapısını olumsuz etkileyebilmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda, süperovulasyonun oosit ve embriyo kalitesinde düşüş (Ertzeid ve ark., 2001), oosit olgunlaşma oranında azalma (Lee M. ve ark., 2017), embriyo ve fetal gelişimde gecikme (Ertzeid ve ark., 1992; Van der Auwera ve ark., 2001), normal olmayan blastosist oluşumunda artış (Van der Auwera ve ark., 2001), implantasyon oranında azalma (Ertzeid ve ark., 2001), implantasyon sonrası ölüm oranında artış (Ertzeid ve ark., 2001), canlı fetüs ağırlığında azalma (Ertzeid ve ark., 2001) ve DNA metilasyon düzeyinde değişim (Huffman ve ark., 2015; Yu ve ark., 2019) gibi çeşitli olumsuz etkilere neden olabildiği rapor edilmiştir. Bunlara ek olarak, süperovulasyon oosit morfolojisi ve organelleri üzerinde çeşitli değişimlere neden olabilmektedir (Lee M. ve ark., 2017). Fare oositleri üzerinde yapılan bir çalışmada, süperovulasyonun mitokondriyon bozulmalar ile karakterize olan vakuollerin artışına, mitokondriyon aktivitesinde ve ATP üretiminde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Lee M. ve ark., 2017). Ayrıca, süperovulasyon uygulaması oositlerin yakından ilişkili olduğu granuloza ve kumulus hücrelerini de etkileyebilmektedir. İnsan granuloza hücreleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, süperovulasyonun bağışıklık ve sitokin üretimi/düzenlenimi ile ilişkili 715; hücre döngüsü ve mayoz bölünme ile ilişkili 287 genin ekspresyon düzeyinde değişime neden olduğu belirlenmiş ve bu genlerdeki ekspresyonel değişimlerin oositlerde mayoz bölünme hatalarına neden olabileceği öne sürülmüştür (Lu ve ark., 2019). Aynı çalışmada, süperovulasyona bağlı olarak folikül sıvısındaki E2 ve LH düzeyinin azaldığı; progesteron düzeyinin ise arttığı rapor edilmiştir.

(Lu ve ark., 2019). Süperovulasyon sonucunda bu olumsuz etkilerin ortaya çıkmasında uygulanan gonadotropin dozlarının da önemli bir rolü olabileceği düşünülmektedir. Gonadotropinlerin doza bağlı etkilerini inceleyen bir çalışmada, dört farklı doz [0, 5, 10 ve 15 IU (internasyonel ünite) eCG] gonadotropin uygulaması karşılaştırılmış ve 15 IU eCG uygulanan farelerde fertilizasyon oranında ve preimplantasyon embriyolardaki ATP düzeyinde azalma, anormal iğ iplik oluşumu, ROS miktarı ve anöploidi oranında artış olduğu tespit edilmiştir (Lin ve ark., 2020).

IVF merkezlerinde birçok hasta bir defa uygulanan infertilite tedavisi sonucunda çocuk sahibi olabilmesine rağmen, infertilite tedavisi gören hastaların %24-33'ünde yeterli sayıda oosit ve embriyo elde edilebilmesi için tekrarlayan süperovulasyon gerekebilmektedir (de Mouzon ve ark., 2020; Zhang S. ve ark., 2023). Tekrarlayan süperovulasyon, hedefe yönelik olumlu etkilerinin yanı sıra ovaryum ve oosit yapısı üzerinde olumsuz etkilere neden olabildiği bilinmektedir. Bu konuda yapılan çalışmalarda, tekrarlayan süperovulasyonun fare ovaryumlarında oksidatif hasar artışına, mitokondriyonun DNA'sında mutasyonlara ve apoptoza neden olduğu rapor edilmiştir (Chao ve ark., 2005; Liu B. ve ark., 2020; Zhang S. ve ark., 2023). Benzer şekilde Rhesus maymunlarının ovaryumları üzerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada, tekrarlayan süperovulasyonun granuloza hücrelerinde mitokondriyon bozukluğuna ve steroid hormon sentezinde rol oynayan genlerin ekspresyonunda azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (Dong ve ark., 2014). Aynı çalışmada, bu uygulamanın hücre çoğalması ile farklılaşmanın baskılanmasına ve hücre apoptozunda artışa sebep olduğu bildirilmiştir. Bunlara ek olarak, tekrarlayan süperovulasyonun ovaryum yaşlanmasını hızlandırarak osteoporoz ve kardiyovasküler hastalık riskini arttırabileceği öne sürülmüştür (Zhang J. ve ark., 2018). Tekrarlayan süperovulasyonun (5-15 defa) ovaryum yaşlanması ile karakterize olan primordiyal folikül sayısı ve ovaryum fonksiyonlarında azalmaya ek olarak oksidatif stres düzeyinde artışa yol açarak prematür ovaryum yetmezliğinin ortaya çıkmasını tetikleyebileceği vurgulanmıştır (Nie ve ark., 2018).

Tekrarlayan süperovulasyon, ovaryum yapısının yanı sıra folikül gelişimini ve ilgili hormonların düzeylerini etkileyebilmektedir. Bu uygulamanın farelerde primordiyal folikül sayısında ve bu foliküllerin aktivasyonu ile ilişkili genlerin (*Rptor*, *Akt*, *Foxo3* ve

Kitl) ekspresyon düzeylerinde azalma; atretik folikül sayısında ve granuloza hücrelerinde apoptoz ilişkili genlerin (*Bax*, *Casp3*, *Casp8* ve *Casp9*) ekspresyon düzeylerinde artışa neden olduğu ortaya konulmuştur (Wang Q. ve ark., 2022). Aynı çalışmada, tekrarlayan süperovulasyona bağlı olarak fare serum örneklerindeki AMH, östrojen, FSH ve LH hormon düzeylerinde azalma tespit edilmiş ve hormon düzeylerindeki bu değişimin folikül gelişimini etkileyebileceği öne sürülmüştür (Wang Q. ve ark., 2022). Bu bulgularla tutarlı olarak, fareler üzerinde gerçekleştirilen başka bir çalışmada da 5-15 defa tekrarlanan süperovulasyonun primordiyal folikül sayısında azalmaya neden olduğu ve serumdaki progesteron, E2 ve inhibin B düzeylerinde azalma ve FSH ile LH düzeylerinde ise artışa sebep olduğu ortaya konulmuştur (Nie ve ark., 2018). Sonuç olarak, tekrarlayan süperovulasyon uygulamasının folikül-ilişkili genlerin ve ilişkili hormonların düzeyinde değişime neden olarak folikül aktivasyonu ve gelişimini etkileyebilmektedir.

Tekrarlayan süperovulasyon, farelerde oosit sayısı ve kalitesinde azalmaya (Chao ve ark., 2005; Nie ve ark., 2018; Liu B. ve ark., 2020; Zhang S. ve ark., 2023), çeşitli morfolojik değişiklere (Zhang J. ve ark., 2018), iğ ipliklerinde hasara (Van Blerkom ve ark., 2001), genomik DNA metilasyonunda değişime (Xiao ve ark., 2019), oksidatif strese (Miyamoto ve ark., 2010; Kalthur ve ark., 2016; Nie ve ark., 2018) ve apoptozda (Xiao ve ark., 2019) artışa da neden olduğu bildirilmiştir. Fare embriyoları üzerinde gerçekleştirilen diğer bir çalışmada ise tekrarlayan süperovulasyonun embriyo gelişim potansiyelinde ve kalitesinde azalmaya; preimplantasyon embriyolarındaki histon modifikasyon genlerinin ekspresyon düzeylerinde değişimlere neden olduğu belirlenmiştir (Tang ve ark., 2019). Ayrıca, bu uygulamanın kumulus hücrelerini etkileyerek mitokondriyon DNA kopya sayısının azalmasına ve bu organelde fonksiyon kaybına neden olabildiği tespit edilmiştir (Xie ve ark., 2016).

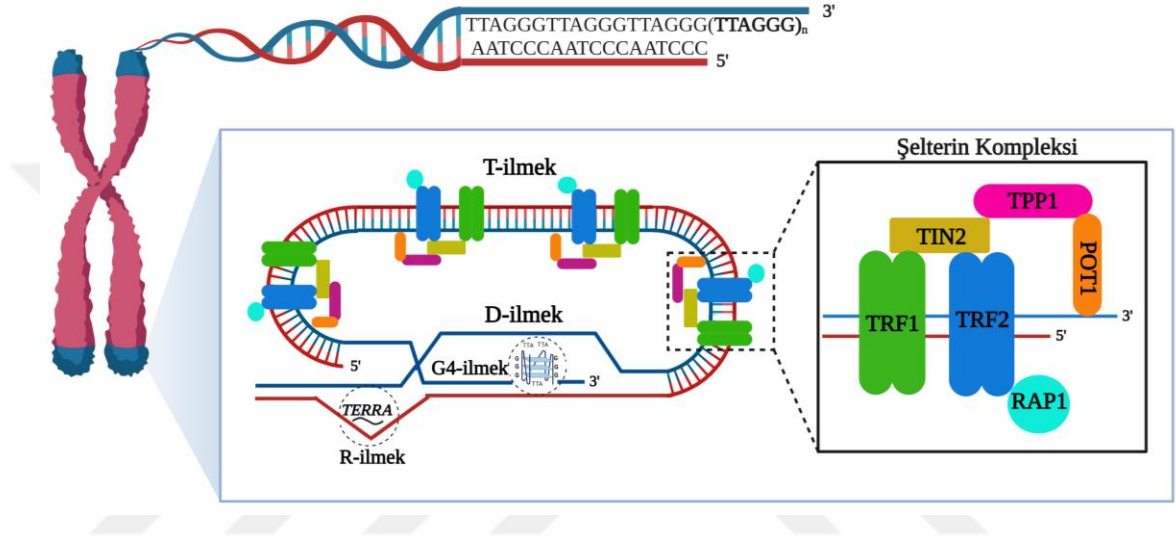
Özet olarak, süperovulasyon ve tekrarlayan süperovulasyon ovaryum, oosit ve embriyoları hem yapısal hem de moleküler düzeyde etkileyerek olumsuz değişimlere neden olabilmektedir. Bu değişimlerin altında yatan moleküler mekanizmaların aydınlatılması için yeni çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu değişimlerle ilişkili moleküler mekanizmalardan birisinin de telomer biyolojisi olduğu düşünülmektedir.

2.6. Telomerlerin yapısı

Telomerler, kromozomların uç bölgelerinde bulunan evrimsel olarak korunmuş, kodlanmayan ve tekrarlı DNA dizileridir. Bu eşsiz yapı, 1938 yılında Hermann Muller tarafından *Drosophila melanogaster*'in kromozomlarında keşfedilmiştir (Muller, 1938). İlk kez Hermann Muller tarafından kullanılan 'telomer' kelimesi, Yunanca 'son' anlamına gelen "telos" ve 'kısım' anlamına gelen "meros" kelimelerinden oluşmaktadır (Muller, 1938). Telomer yapısı, telomer DNA'sı ve telomer ilişkili proteinleri içeren esas telomer ve subtelomer olmak üzere iki bölgeden meydana gelmektedir. Telomer DNA'sı, tekrarlayan DNA dizilerinden (5'-TTAGGG-3')_n oluşan çift zincir ve guanin bakımından zengin, G-kuyruk olarak da isimlendiren tek zincirli 3' ucuna sahiptir. G-kuyruğu, geriye doğru katlanarak T-ilmek yapısını oluştururken; çift zincirli telomer DNA'sının içerisine girmesiyle D-ilmek yapısını oluşturmaktadır (de Lange, 2005) (Şekil 2.5). Oluşan ilmek yapıları, bu bölgelerdeki istenmeyen DNA tamir mekanizmalarının aktivasyonunun önlenmesinde ve genom bütünlüğünün korunmasında büyük bir öneme sahiptir (Longhese, 2008; de Lange, 2009). Ayrıca bu yapılar, telomerazın telomer bölgesine erişebilirliğini düzenleyerek telomer uzama sürecine katkıda bulunmaktadır (Lopes ve ark., 2019).

T- ve D-ilmek yapılarına ek olarak telomerler, ikincil DNA yapıları olarak bilinen G4-ilmek ve R-ilmek yapılarını da içermektedir (Tan ve ark., 2020) (Şekil 2.5). G-kuyruğu, G4-ilmek yapısını (G-kuadrupleks olarak da bilinir) oluşturmak için ek kıvrımlar yapar (Bryan, 2020). G4-loop'un temel birimi, Hoogsteen hidrojen bağlarıyla bir arada tutulan dört guanin bazından oluşan G-kuartetidir (Bryan, 2020). İki veya daha fazla dörtlü birimin bir araya gelmesi G4-ilmek oluşumunu sağlar. G4-ilmek yapısı, DNA hasar sinyal iletiminin baskılanmasına (Ray ve ark., 2014), telomeraz erişiminin engellenmesine (Zahler ve ark., 1991), telomerlerin korunması ve kararlılığının sağlanmasına (Lopes ve ark., 2019) katkıda bulunur. Bir diğer ikincil yapı olan R-ilmek ise DNA:RNA etkileşiminin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Vohhodina ve ark., 2021). R-ilmek yapısı, telomer tekrarı içeren RNA (*TERRA*) gen ifadesinin ve DNA onarım yanıtının düzenlenmesinde önemli görevlere sahiptir (Vohhodina ve ark., 2021; Chebly ve ark., 2022).

Bu ilmek yapıları telomer bölgelerinin DNA kırığı olarak algılanmasını önleyerek, istenmeyen DNA tamir mekanizmalarının aktivasyonu ve genomik kararsızlığın ortaya çıkmasını engellemektedir. Telomerlerde meydana gelen fonksiyon kaybı veya telomerlerin kısalması sonucunda T-ilmek ve D-ilmek yapılarının bozulması hücresel yaşlanma, genomik kararsızlık ve apoptoz ile sonuçlanabilmektedir.



Şekil 2.5. Telomerin yapısı. Bu şekil ilgili kaynaktan (Tire ve ark., 2023) değiştirilerek alınmıştır. Telomerler, telomerik DNA tekrarları (5'-TTAGGG-3')_n ile TRF1, TRF2, TIN2, TPP1, POT1 ve RAP1 proteinlerinden oluşan şeltern kompleksinden oluşur. TRF1 ve TRF2 proteinleri çift zincirli DNA'ya bağlanırken, POT1 proteini tek zincirli DNA bölgeleriyle etkileşime girer. G-kuyruğu olarak bilinen telomerin 3' ucu, telomerik DNA dupleksinin içine girerek T-ilmek ve D-ilmek yapılarını oluşturmak üzere geriye katlanır. G4-ilmek ve R-ilmek olarak bilinen ikincil DNA yapıları da telomer yapısında bulunmaktadır. Bu şekil BioRender programı kullanılarak oluşturulmuştur (BioRender Şirketi; Toronto, Kanada).

2.7. Telomer İlişkili Proteinler

Esas telomer bölgesi, telomer DNA'sı ve telomer-ilişkili proteinlerden meydana gelmektedir. Telomer tekrar bağlanma faktörü 1 (TRF1) ve 2 (TRF2), TRF1 etkileşimli nükleer protein 2 (TIN2), telomerleri koruma proteini 1 (POT1), baskılayıcı uyarıcı protein 1 (RAP1) ve POT1 bağlanma ortak 1 (TPP1) olmak üzere altı adet telomer ilişkili protein birleşerek şeltern adı verilen bir kompleks yapısını oluşturmaktadır (Kosebent ve ark., 2018) (Şekil 2.5). Şeltern, telomer bütünlüğünün sağlanmasında, uygun olmayan DNA tamir mekanizması aktivasyonunun önlenmesine ve telomer uzamasının düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır (O'Sullivan ve ark., 2010; de Lange, 2018).

Şelterin kompleksinin temel bileşenleri olan TRF1 ve TRF2 proteinleri, çift zincirli telomer DNA'sı ile doğrudan etkileşime giren homodimer bir yapıya sahiptir (Turner K. J. ve ark., 2019) (Şekil 2.5). TRF1, diğer telomer ilişkili protein olan TIN2 ile etkileşime girerek şelterin kompleks yapısına katılır. TRF1 proteininin yokluğu, diğer şelterin bileşenlerinin telomerdeki yerleşim düzenlerini etkileyerek kromozomlarda kararsızlığa neden olabilmektedir (Okamoto ve ark., 2008). TRF1, T-ilmek yapısının oluşumuna katılarak telomerazın telomerlere erişimini engelleyebilmektedir (Okamoto ve ark., 2008). Bu özelliği nedeniyle TRF1, telomer uzamasının negatif düzenleyicisi olarak görev almaktadır. Bu bilgi ile tutarlı olarak, TRF1'in aşırı ekspresyonunun telomer kısalmasına neden olduğu ortaya konulmuştur (van Steensel ve ark., 1997).

TRF1 ile benzer yapısal özelliklere sahip olan TRF2, homodimer (TRF2-TRF2) bir yapı oluşturarak çift zincirli telomer DNA'sına bağlanmasının yanı sıra, telomer ilişkili diğer protein olan RAP1 ile heterodimer (TRF2-RAP1) yapı oluşturarak şelterin kompleks yapısına katılmaktadır. TRF2, T-ilmek oluşumunda görev alarak telomer yapısının korunmasına katkıda bulunur (Benarroch-Popivker ve ark., 2016). Bununla birlikte TRF2, DNA hasar yanıtını indükleyen ataxi-telenjipektazi mutasyon (ATM) kinaz yolağını baskılayarak istenmeyen DNA hasar yanıt aktivasyonunu engellemektedir (Benarroch-Popivker ve ark., 2016). Fare embriyo fibroblastları üzerinde yapılan bir çalışma, *Trf2* geninin koşullu olarak silinmesinin ATM kinazın yolağının aktifleşmesine neden olduğunu rapor etmiştir (Celli ve ark., 2005). Ayrıca, TRF2 telomerazın telomere erişimini engellemesi nedeniyle telomer uzamasının negatif düzenleyici olarak görev yapmaktadır (Smogorzewska ve ark., 2000). TRF2 eksikliğinin kromozomların uçtan uca füzyonuna ve hücresel büyümenin durmasına neden olduğu belirlenmiş; bu sonucun telomer uzunluk düzenlemesindeki bozulmaya bağlı olabileceğini bildirilmiştir (van Steensel ve ark., 1998).

Şelterin kompleksinin diğer bir üyesi olan POT1, sadece 3' tek zincirli G-kuyruğu ile etkileşime girmektedir (Turner K. J. ve ark., 2019). POT1, TPP1 proteini ile heterodimer (POT1-TPP1) bir yapı oluşturarak bu komplekse katılmaktadır. POT1, D-ilmek yapısının oluşumunda görev alarak, ataksi telenjipektazi ve Rad3 ile ilişkili (ATR) kinaz aktivitesinin baskılanması ve uygunsuz DNA hasar yanıt mekanizmasının aktivasyonunun

önlenmesinde önemli rollere sahiptir (Denchi ve ark., 2007). D-ilmek oluşumundaki rolü nedeniyle POT1, telomerazın telomerlere erişimini ve telomer uzamasını düzenleyebilmektedir (Gu ve ark., 2021). POT1 proteini, telomer yapısının korunması ve uzamasının düzenlenmesi için TRF2 proteini ile birlikte de çalışmaktadır (Yang ve ark., 2005; Kendellen ve ark., 2009). Beklenildiği gibi, POT1 eksikliği, G-kuyruğunun kısalmasına neden olarak kromozomal kararsızlık, hücresel yaşlanma ve apoptoza yol açabilmektedir (Yang ve ark., 2005).

TPP1 proteini, TIN2 ve POT1 proteinleri arasında bir köprü olarak görev yapmakta ve bu etkileşimler yoluyla telomer bütünlüğünün sürdürülmesinde rol oynamaktadır (Rajavel ve ark., 2014). TPP1, POT1 ile heterodimer bir yapı oluşturarak POT1'in telomere bağlanma isteğini artırmaktadır (Wang F. ve ark., 2007). Bu özelliği nedeniyle TPP1, hem DNA hasar cevabının kontrolünde hem de telomer uzunluğunun düzenlenmesinde büyük bir öneme sahiptir. Bununla tutarlı olarak insanda rekombinant TPP1 proteini kullanılarak yapılan bir çalışmada, TPP1 ile POT1 proteininin kompleks oluşturarak telomeraz aktivasyonu ve işlevinin artırılmasında görev aldığı belirlenmiştir (Wang F. ve ark., 2007).

Şelterin kompleksinin merkezi proteini olan TIN2, POT1 ve TPP1 proteinlerini bu komplekse bağlamakla kalmaz; aynı zamanda TRF1 ve TRF2 proteinleri arasında yer alarak bu heterodimerin kararlılığının sağlanmasına da katkıda bulunmaktadır (Hu ve ark., 2017). TIN2 proteini, TPP1 ve POT1 proteinleri ile kurmuş olduğu etkileşim sayesinde ATR sinyalinin baskılanmasında ve kromozom uçlarının uygunsuz DNA hasarı yanıtlardan korunmasında görev almaktadır (Hu ve ark., 2017). Farede *Tin2* gen eksikliğinin telomerik yapı bütünlüğünde ciddi şekilde bozulmalara neden olarak, embriyonik ölümlere yol açtığı ortaya konulmuştur (Chiang ve ark., 2004).

Telomer-ilişkili proteinlerden biri olan RAP1, TRF2 ile etkileşim kurarak şelterin yapısına katılmaktadır. RAP1, uygun olmayan cNHEJ onarım aktivasyonu ve kromozomlar arasında uçtan uca füzyonların önlenmesinde görev almaktadır (Pardo ve ark., 2005). Yakın zamanda insan fibroblast hücre hattı üzerinde yapılan bir çalışma, kritik derece kısalan telomerlerin yapısının korunmasında RAP1 proteininin önemi vurgulamıştır (Lototska ve ark., 2020). Bu bilgilerle tutarlı olarak, RAP1 eksikliğinin telomer

kısalmasına ve DNA hasar seviyesinde artışa neden olduğu gösterilmiştir (Cai ve ark., 2021).

Sonuç olarak, telomer-ilişkili proteinler tarafından oluşturulan şeltrin kompleksi, istenmeyen DNA hasar yanıt aktivasyonunun önlenmesinde ve telomerler uzunluğunun düzenlenmesinde görev almaktadır. Bu nedenle, telomer-ilişkili proteinlerin kaybı, telomer yapısının bozulmasına ve telomer kısalmasına yol açarak apoptozun artmasına, hücrel yaşlanmaya ve genomik bütünlüğün bozulmasına neden olabilmektedir.

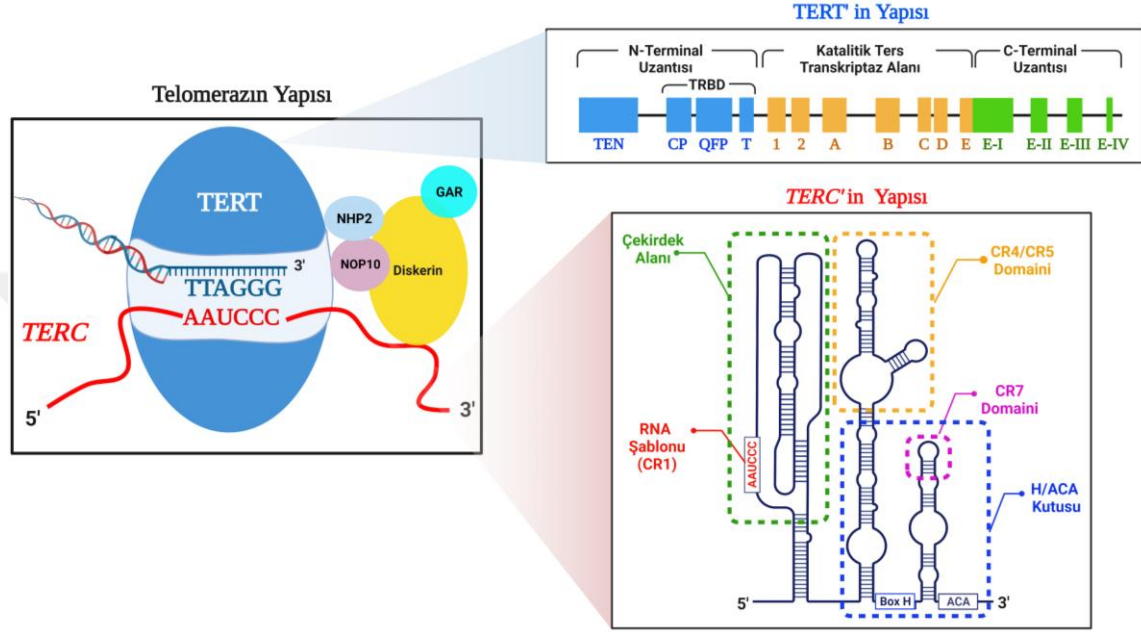
2.8. Telomer Uzunluğunun Düzenlenmesi

Ökaryotik hücrelerde, telomerler fiziksel olarak açık ve kapalı olarak nitelendirilen iki farklı durumda bulunabilir (Lopes ve ark., 2019). Telomer-ilişkili proteinler, ilmek yapıları ve ikincil DNA yapıları tarafından oluşturulan telomerlerin kapalı durumu, belirli bir uzunluktaki telomerlerde görülmektedir. Tamamlanmamış DNA replikasyonu, ardışık hücre bölünmeleri, biyolojik yaşlanma, yaşam tarzı, ROS, genotoksik ajanlar gibi çok sayıda faktör telomer uzunluğunda kademeli bir azalmaya neden olabilmektedir (Shammas, 2011). Telomer kısalması ve telomere bağlı proteinlerin işlev kaybı, telomerlerin açık bir duruma geçmesine sebep olabilmektedir. Bu durum, DNA hasarı yanıt yolları (ATM ve ATR) ve DNA çift zincir onarım mekanizmalarını (NHEJ ve HR) aktifleştirerek genomik kararsızlık, hücrel yaşlanma ve apoptoz ile sonuçlanabilmektedir (Lazzerini-Denchi ve ark., 2016; Lopes ve ark., 2019). Bununla birlikte, bazı hücrelerdeki kısalan telomerler, telomerase ve telomerlerin alternatif uzatılması (ALT) mekanizması ile uzatılarak telomerlerin ilmek yapıları tekrar oluşturulmaktadır. Telomerase'nin yapısı ve ALT mekanizması aşağıda ayrıntılı olarak açıklanmıştır.

2.9. Telomerase'nin Yapısı

Telomer tekrar dizilerinin telomer bölgelerine eklenmesini katalizleyen telomerase, 1985 yılında Elizabeth Blackburn ve Carol Greider tarafından *Tetrahymena* üzerinde yapılan bir çalışma sırasında keşfedilmiştir (Greider ve ark., 1985). Ribonükleoprotein yapıdaki bu enzim, şablon görevi gören telomerase RNA bileşeni (*TERC*) ve katalitik alt birim olan telomerase geri transkriptaz (*TERT*) olmak üzere iki alt birimden meydana gelmektedir (Şekil 2.6). Birçok somatik hücrede *TERC* ekspresyonu bulunabilirken; *TERT* ekspresyonu ise germ hücreleri, erken dönem embriyolar, granuloza hücreleri, kök

hücreler ve kanser hücreleri gibi belirli hücrelerde bulunmuştur (Hiyama ve ark., 2007; Ozturk ve ark., 2014; Yuan ve ark., 2019). Bu nedenle, telomeraz aktivitesi tüm hücrelerde olmayıp; sadece TERT eksprese eden hücre tiplerinde bulunmaktadır.



Şekil 2.6. Telomerazın yapısı. Bu şekil ilgili kaynaktan (Tire ve ark., 2023) alınarak değiştirilmiştir. Telomeraz kompleksi temel olarak TERT ve *TERC* alt birimlerinden oluşmaktadır. Ek olarak, adaptör proteinler NHP2, GAR, NOP10 ve Diskerin bu kompleksin yapısal bütünlüğünü destekler. Katalitik alt birim olan TERT, N ve C-terminal uzantıları ve bu bölgelerin arasındaki katalitik ters transkriptaz alanını içerir. N-terminal uzantısı, TERT RNA-bağlayıcı alanını (TRBD) içermektedir. *TERC* alt birimi çekirdek alanı, CR4/CR5, H/ACA kutusu (CR6/CR8) ve CR7 gibi korunmuş bölge (CR) alanlarını içerir. Bu şematik diyagram, BioRender Programı kullanılarak oluşturulmuştur (BioRender Şirketi; Toronto, Kanada).

2.9.1. *TERC*'in Yapısı

Telomerazın alt bileşeni olan *TERC*, telomer tekrarlarının sentezi için şablon görevi görmektedir. *TERC* RNA uzunluğu, canlı türlerine göre farklılık göstermektedir. İnsanda 451 nükleotid uzunluğundayken (Calado ve ark., 2008), farede 397 nükleotid (Blasco ve ark., 1995) uzunluğundadır. *TERC* çekirdek alanı, CR4/CR5, H/ACA kutusu (CR6/CR8 olarak da bilinir.) ve CR7 olarak isimlendirilen yedi adet korunmuş bölgeden meydana gelmektedir (Calado ve ark., 2009) (Şekil 2.6). Çekirdek alanı, içerisinde CR1 olarak adlandırılan şablon bölgesini içerir. Bu nedenle, telomerazın diğer alt bileşeni olan TERT ile etkileşimde önemli rol oynamaktadır (Calado ve ark., 2009). H/ACA kutusu ise telomeraz kompleksinin kararlılığının sağlanmasına katkıda bulunmaktadır. *TERC*

yapısında bulunan bu bölgeler, *TERC*-*TERT* etkileşimi ve telomeraz aktivitesinin devamı için büyük öneme sahiptir.

TERC, telomeraz aktivitesinin doğrudan göstergesi olmamakla birlikte, bu aktivite için sınırlayıcı bir faktör olarak değerlendirilmektedir (Garrels ve ark., 2012; Boyraz ve ark., 2016). Bununla birlikte, *TERC* seviyesinin telomer uzunluğunun düzenlenmesinde önemli olduğu bilinmektedir (Greider, 2006). Farede *Terc* gen eksikliği telomer kısalması, anöploidi ve kromozomlar arası füzyona neden olabildiği gösterilmiştir (Blasco ve ark., 1997; Liu L. ve ark., 2002). *TERC* gen mutasyonunun, telomer kararlılığının bozulması ve hücrel yaşlanmaya da neden olabildiği ortaya konulmuştur (Schildhorn ve ark., 2015; Jose ve ark., 2018).

2.9.2. TERT'in Yapısı

Telomerazın katalitik alt birimi olan *TERT*, N-terminal uzantısı (NTE), katalitik ters transkriptaz (RT) alanı ve C-terminal uzantısı (CTE) olmak üzere üç ana bölümden meydana gelmektedir (Calado ve ark., 2009). NTE, telomer DNA'sının tanınması ve uzamasında rol oynayan N-terminal domain (TEN) ve *TERC* alt birimine bağlanmaya katkıda bulunan telomeraz RNA bağlayıcı alan (TRBD) olmak üzere iki alt bölümden oluşmaktadır (Şekil 2.6). Katalitik RT alanı, enzimatik aktiviteyi sağlamaktadır. Bu alanının yapısı, elin parmakları ve avuç içine benzetilmektedir (Wyatt ve ark., 2010). Katalitik RT alanı bu yapısı sayesinde DNA-RNA hibritiyle ve telomerin 3' ucuyla temas kurabilmektedir. Böylelikle, DNA-RNA hibritlerinin oluşması ve telomeraz kararlılığına katkıda bulunabilmektedir. Elin baş parmağına benzeyen C-terminal uzantısının ise *TERT*-RNA-DNA kompleksinin kararlılığında görev aldığı düşünülmektedir (Wyatt ve ark., 2010).

TERT gen ekspresyonu germ hücreleri, granuloza hücreleri, endotel hücreleri, belirli kök hücre popülasyonları, kanser hücreleri, aktive lenfositler ve preimplantasyon embriyolar gibi telomeraz aktivitesi gösteren hücrelerde gözlemlenmektedir (Hiyama ve ark., 2007; Ozturk ve ark., 2014; Yuan ve ark., 2019). Bu özelliği nedeniyle *TERT* seviyesi, telomeraz aktivitesinin göstergesi olarak kabul edilmektedir. *Tert* gen ekspresyonu, östrojen ve progesteron hormon düzeyleri gibi birçok faktörden etkilenmektedir (Toupance ve ark., 2021; Taheri ve ark., 2022). Östrojen hormonunun, *Tert* geni promotör

bölgesindeki östrojen yanıt elemanlarına bağlanarak doğrudan ya da c-myc ekspresyonu ile dolaylı olarak *Tert* ekspresyon düzeyini ve telomeraz aktivitesini düzenleyebildiği bilinmektedir (Kyo ve ark., 1999; Bayne ve ark., 2011). Bu bilgiyle tutarlı olarak, östrojen hormon yokluğunun fare granuloza hücrelerinde *Tert* ekspresyonunun ve telomeraz aktivitesinin azalmasına neden olduğu tespit edilmiştir (Bayne ve ark., 2011). Progesteron hormonunun ise *Tert* ekspresyonu ve telomeraz aktivitesinin azalmasına neden olduğu ortaya konulmuştur (Wang Z. ve ark., 2000; Taheri ve ark., 2022)

TERT proteini, telomer uzamasındaki temel işlevine ek olarak; gen ekspresyonu, sinyal iletimi, stres yanıtı ve mitokondriyon metabolizmasının düzenlenmesinde kanonik olmayan görevlere sahiptir (Kotiyal ve ark., 2021). Stres koşulları altında TERT'in SRC kinaz tarafından fosforilasyona uğradığı ve artan oksidatif stresten korumak için mitokondriyona taşındığı gösterilmiştir (Zheng ve ark., 2019). Ayrıca, TERT, transkripsiyon sürecinde yardımcı bir faktör olarak hareket ederek; WNT/ β -katenin sinyali-hedef genlerinin ekspresyonunun düzenlenmesine katılmaktadır (Choi ve ark., 2008).

TERT işlevleriyle uyumlu olarak, hücre içinde hem sitoplazma hem de çekirdekte yerleşim göstermektedir. TERT proteininin domuz ve farelerden elde edilen primer ve preantral foliküllerine ait granuloza ve oositlerin nükleuslarında daha yoğun bir yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (Russo ve ark., 2006; Kosebent ve ark., 2020). Antral folikül oositlerinde ve MII oositlerde ise TERT'in sitoplazmik yerleşim gösterdiği rapor edilmiştir (Russo ve ark., 2006). Benzer şekilde, Yamada-Fukunaga ve arkadaşları (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, genç farelerden (6-8 haftalık) elde edilen MII oositlerde TERT proteininin sitoplazmik yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (Yamada-Fukunaga ve ark., 2013). TERT'in sitoplazmik yerşimi ile uyumlu olarak, telomer uzamasının yanı sıra DNA hasar yanıtları ve oksidatif strese karşı korunmada görev aldığı belirlenmiştir (Rosen ve ark., 2020; Thompson ve ark., 2020).

2.10. ALT Mekanizması

Kısalan telomerlerin uzatılmasında görev alan diğer bir mekanizma ALT'dir. ALT'nin moleküler detayları henüz ayrıntılı olarak bilinmemekle birlikte, kardeş kromatidlerin telomerleri arasında gerçekleşen homolog rekombinasyona dayanmaktadır (Zhao ve ark.,

2019). Heterojen telomer uzunlukları, telomer-kardeş kromatid değişimleri (T-SCE), ekstrakromozomal telomer tekrarı ve ALT ile ilişkili promiyelositik lösemi (PML) cisimciklerin (APB'ler) varlığı ALT'nin temel özelliklerindendir (Zhao ve ark., 2019; Zhang J. M. ve ark., 2020). APB alanları DNA rekombinasyonu, replikasyon ve onarım proteinlerini içeren PML cisimciğinden meydana gelmektedir. ALT mekanizması, bazı kanser hücrelerinde yaygın olarak görülmekle birlikte; epigenetik değişiklikler tarafından düzenlendiği düşünülmektedir. ALT mekanizmasının tamamen aydınlatılması ve bu mekanizmayı düzenleyen hücre içi faktörler, sinyal yolları ve diğer etkenlerin belirlenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.11. Memeli Oositlerinde Telomeraz Aktivitesi

Telomeraz aktivitesi, oosit olgunlaşması ve embriyo gelişiminde dinamik değişiklikler göstermektedir (Ozturk ve ark., 2014). Fareler üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada, telomer tekrarı amplifikasyon protokolü (TRAP) ile telomeraz aktivitesi ölçülmüş ve olgun oositlerde ve erken dönem embriyolarda (1-hücreli, 2-hücreli ve 4-hücreli embriyolar) düşük seviyelerde olduğu, ancak blastosist aşamasında belirgin şekilde arttığı belirlenmiştir (Liu L. ve ark., 2007). Telomeraz nakavt (*Terc*^{-/-}) fare modeli oluşturularak telomer uzunluğu üzerindeki etkisi değerlendirilmiş ve telomeraz aktivitesinin morula-blastosist geçişinde telomer uzaması için gerekli olduğu gösterilmiştir (Schaetzlein ve ark., 2004) (Şekil 2.7).

İnsan oosit ve embriyolardaki telomeraz aktivitesi, etik kaygılar nedeniyle sınırlı sayıda çalışmada değerlendirmiştir. Wright ve arkadaşlarının (1996) yapmış olduğu bir çalışmada, blastosistlerde telomeraz aktivitesi belirlenirken; olgun oositlerde tespit edilmemiştir (Wright W. E. ve ark., 1996). Daha sonra aynı grup tarafından yapılan başka bir çalışmada, GV oosit ve blastosistlerdeki telomeraz aktivitesinin, olgun oosit ve erken preimplantasyon embriyolara göre yüksek olduğu gösterilmiştir (Wright D. L. ve ark., 2001). Ayrıca, zigot aşamasından 8-16 hücreli embriyolara kadar düşük seviyelerdeki telomeraz aktivitesinin, morula ve blastosist aşamasında kademeli olarak arttığı belirlenmiştir (Wright D. L. ve ark., 2001) (Şekil 2.7). Bu bulgular, telomeraz aktivitesinin oosit olgunlaşması ve embriyo implantasyonu başlamadan önce telomer uzunluğunu arttırmak amacıyla yüksek seviyelerde tutulduğunu düşündürmektedir.

2.12. Memeli Oositlerinde Telomer Uzunluğu

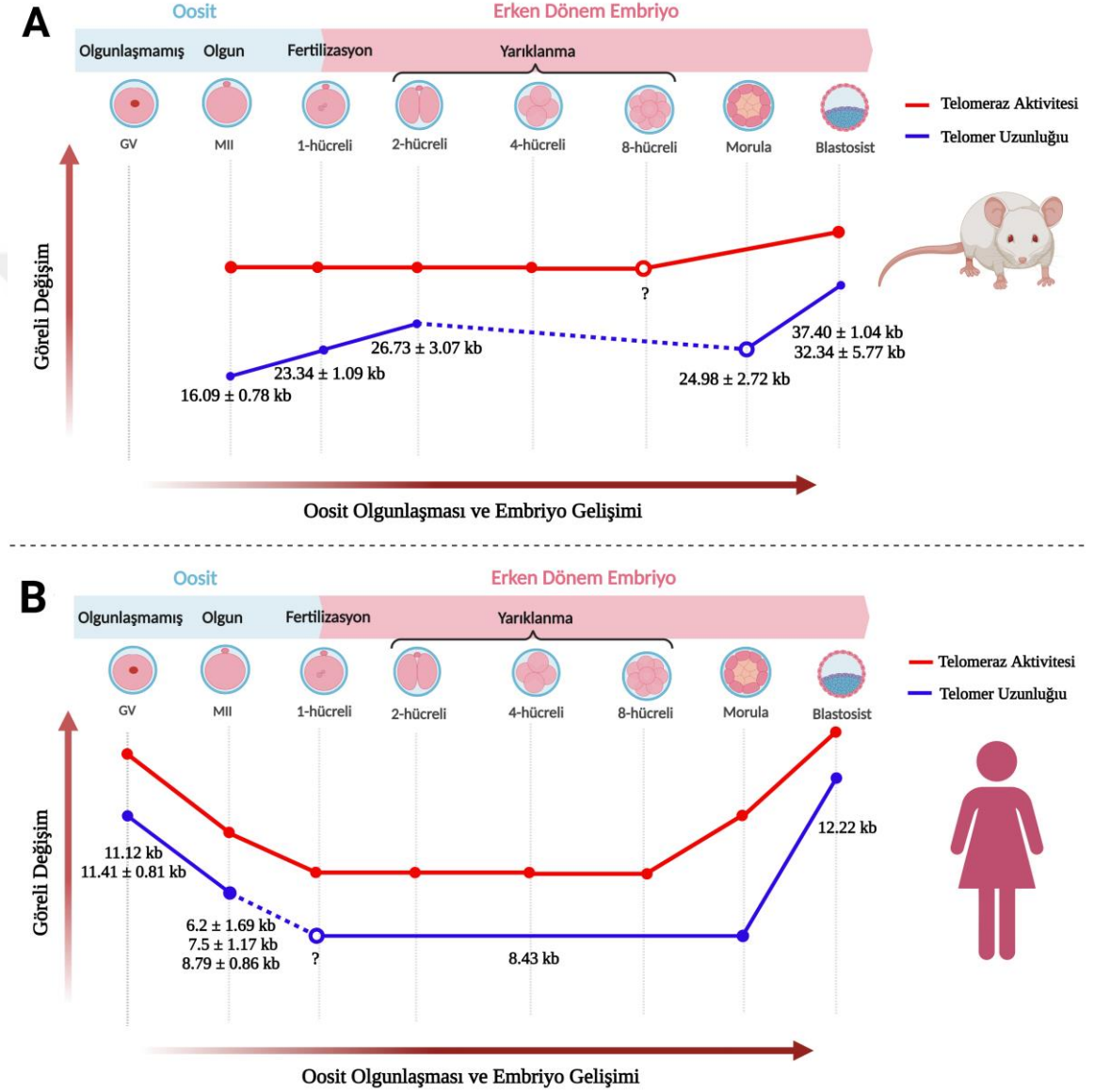
Telomer uzunluğu, telomeraz aktivitesi ile büyük ölçüde paralellik göstermektedir. Kantitatif floresan *in situ* hibridizasyon (Q-FISH) ile telomer uzunluğu, fare MII oositlerinde 16.09 ± 0.78 kb, zigotlarda 23.34 ± 1.09 kb, 2-hücreli embriyolarda 26.73 ± 3.07 kb ve blastosistlerde 37.40 ± 1.04 kb olarak ölçülmüştür (Liu L. ve ark., 2007) (Şekil 2.7). Benzer şekilde Varela ve arkadaşlarının (2011) yapmış olduğu çalışmada, fare blastosistindeki ortalama telomer uzunluğunun (32.34 ± 5.77 kb) morula (24.98 ± 2.72 kb) aşamasındaki embriyolardan daha uzun olduğu tespit edilmiştir (Varela ve ark., 2011) (Şekil 2.7). Bu bulgular, telomer uzunluğunun oositlerden erken dönem embriyolara doğru kademeli olarak arttığını göstermektedir.

İnsanda telomer uzunluğu ilgili araştırmalar, YÜT için başvuran kadınlardan bağışlanan oosit ve embriyolar kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Turner ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada, GV oosit (11.12 kb) ve blastosist (12.22 kb) telomer uzunluklarının yarıklanma aşamasındaki embriyolardan (8.43 kb) daha uzun olduğu belirlenmiştir (Turner S. ve ark., 2010). Aynı grup tarafından yayımlanan başka bir çalışmada ise insan GV oositlerinin (11.41 ± 0.81 kb) MII oositlerden (8.79 ± 0.86 kb) önemli ölçüde daha uzun telomerlere sahip olduğu gözlenmiştir (Turner S. ve ark., 2013). Benzer şekilde, FISH yöntemi ile telomer uzunluğu ölçüldüğünde: olgun MII oositlerin telomer uzunluğu 7.5 ± 1.17 kb olarak bulunmuştur (Keefe ve ark., 2007) (Şekil 2.7). GV oosit ve blastosistlerde telomerlerin uzun olmasının, bu dönemlerdeki yüksek telomeraz aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

2.13. Süperovulasyonun Telomer Uzunluğu ve Telomeraz Aktivitesi Üzerine Etkileri

Süperovulasyonun, telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesi üzerine etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Yakın zamanda yayımlanan bir çalışmada, süperovulasyon uygulaması sonucu elde edilen blastosistlerin telomer uzunluğunun kontrol grubu blastosistlere kıyasla daha uzun olduğu tespit edilmiştir (Berteli ve ark., 2022). Süperovulasyonun telomeraz aktivitesi üzerindeki etkisini inceleyen başka bir çalışmada ise dışarıdan PMSG verilmesinin sıçan granuloza hücrelerindeki *Tert* mRNA ekspresyonu, TERT protein düzeyi ve telomeraz aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir

(Mordechai ve ark., 2020). Süperovulasyonun farklı fizyolojik mekanizmalar üzerinde yapmış olduğu bu etkiler göz önüne alındığında, doğrudan ya da dolaylı olarak telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesini etkilediği görülmektedir.



Şekil 2.7. Fare ve insan oosit ile preimplantasyon embriyolarında telomer uzunluğu ve telomeraz aktivite değişiklikleri **A.** Fare oosit ve preimplantasyon embriyolarında telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesi. Telomeraz aktivitesi MII oosit aşamasından 8-hücreli aşamaya kadar benzerken; blastosist aşamasında artmıştır. Telomer uzunluğu ise MII oosit aşamasından 2-hücreli aşamaya kadar kademeli bir yükseliş göstermiştir. Bununla birlikte, morula aşamasından blastosist aşamasına geçişte telomer uzunluğu artmıştır. **B.** İnsan oosit ve preimplantasyon embriyolarında telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesi. Telomeraz aktivitesi GV oositinden 1-hücreli aşamaya kadar kademeli olarak azalırken; 1-hücreliden 8-hücreli embriyo aşamasına kadar benzerken; 8-hücreliden blastosist aşamasına kadar kademeli olarak artmıştır. Telomer uzunluğu ise GV oositinden MII oosit aşamasına geçişte azalırken; preimplantasyon embriyolarında benzer

düzyededir. Blastosist aşamasında ise telomerler uzayarak, 12.22 kb'ye ulaşmıştır. ‘?’, Bilinmiyor. Bu şematik diyagram BioRender Programı kullanılarak oluşturulmuştur (BioRender Şirketi; Toronto, Kanada).

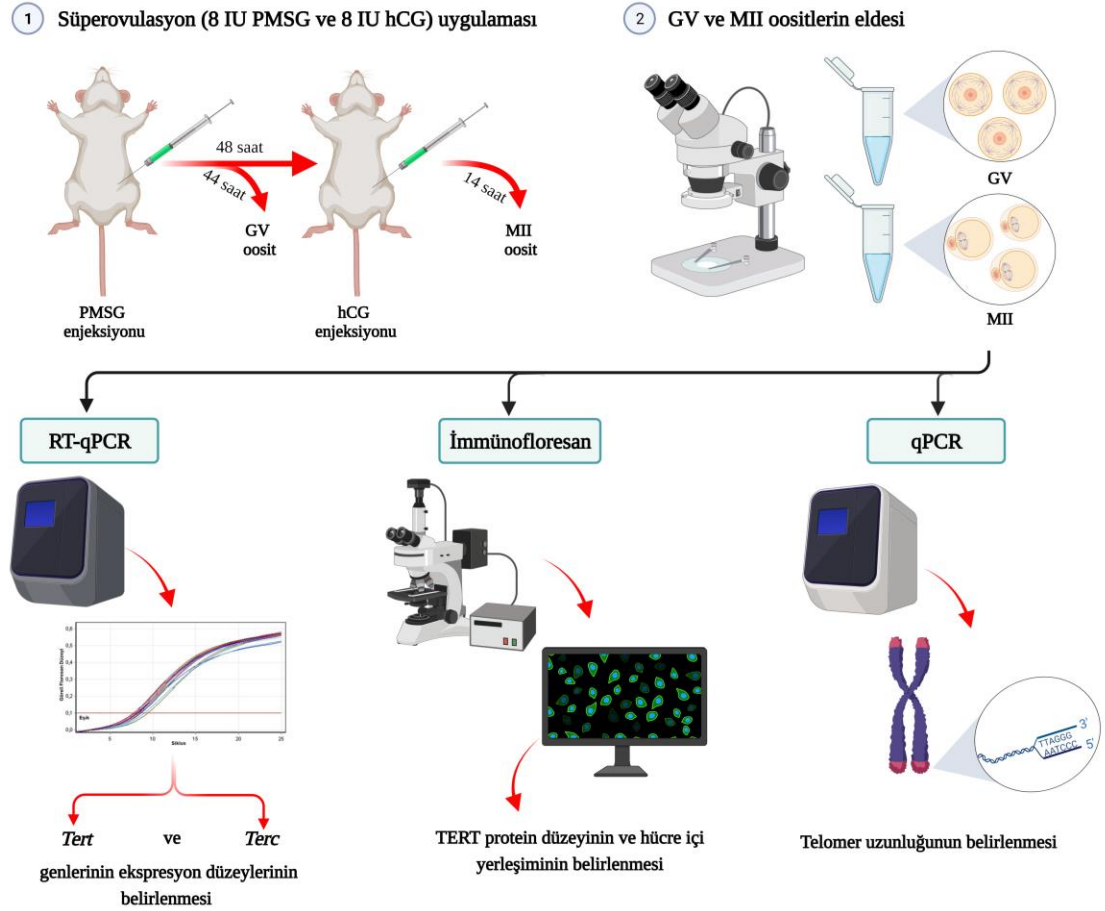
Tüm bu bilgiler ve öngörüler ışığında, bu projede tekrarlayan süperovulasyonun telomeraz bileşenleri olan *Tert* (protein ve mRNA düzeyinde) ve *Terc* (RNA düzeyinde) gen ekspresyonu ile telomer uzunluğuna etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, dişi farelerden kontrol (K; n=12), bir kez süperovulasyon uygulanan (1S; n=12), birer hafta ara verilerek üç kez süperovulasyon uygulanan (3S; n=12), birer hafta ara verilerek beş kez süperovulasyon uygulanan (5S; n=12) olmak üzere dört grup oluşturularak GV ve MII oositler elde edildi. Bu oositlerde, *Tert* ve *Terc* gen ekspresyonu gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR), TERT protein düzeyi immüno floresan ve telomer uzunluğu da kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemleriyle belirlendi. Elde edilen veriler, tek yönlü varyans analizi (tek yönlü ANOVA) ve Tukey post-hoc testi ile değerlendirildi.

Çalışmanın Hipotezi

Literatürdeki çalışmalarda, süperovulasyonun oosit ve embriyo kalitesini, oosit olgunlaşmasını ve embriyo gelişimini olumsuz etkileyebildiği rapor edilmiştir. Bununla birlikte, telomer kısalmasına bağlı olarak gelişen fenotipik değişimlerin, süperovulasyon uygulamasına bağlı olarak ortaya çıkan olumsuz etkiler ile belirli ölçüde örtüştüğü görülmektedir. Bu nedenle, süperovulasyonda kullanılan moleküllerin telomeraz bileşenleri ile telomer uzunluğu üzerine etkisinin araştırılmasının önemli olacağı düşünülmüştür. Bu bilgi ve öngörülerden yola çıkılarak çalışmamızın hipotezi, “Tekrarlayan süperovulasyon, GV ve MII oositlerde telomeraz alt bileşen genlerinin ekspresyonlarını etkileyerek telomer uzunluğunu değiştirir.” şeklinde oluşturulmuştur. Bu hipotez doğrultusunda, tekrarlayan süperovulasyon uygulamasının fare GV ve MII oositlerindeki *Tert* ve *Terc* gen ekspresyonu ile telomer uzunluğu üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmadan elde edilen veriler, telomeraz bileşenlerinin ekspresyon düzeyleri ile telomer uzunluğunun tekrarlayan süperovulasyona bağlı olarak değişimler gösterdiği ortaya konulmuştur.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu tez çalışması kapsamında uygulanan yöntemler Şekil 3.1’de özetlenmiştir: Bu kapsamdan alt konu başlıkları **3.1.** Kontrol ve süperovulasyon uygulanan farelerden GV ve MII oositlerin eldesi, **3.2.** *Tert* ve *Terc* gen ekspresyonlarının kontrol ve süperovulasyon grubu oositlerde gerçek zamanlı kantitatif PCR (RT-qPCR) ile belirlenmesi, **3.3.** TERT proteininin kontrol ve süperovulasyon grubu oositlerde immüno Floresan ile değerlendirilmesi, **3.4.** Telomer uzunluğunun kontrol ve süperovulasyon grubu oositlerde belirlenmesi şeklinde planlanmıştır.



Şekil 3.1. Çalışmada uygulanan deneysel yöntemler. Bu çalışma kapsamında kontrol ve süperovulasyon (8 IU PMSG ve 8 IU hCG periton içine (intraperitoneal) enjekte edildi.) grubu farelerden elde edilen GV ve MII oositlerde, *Tert* ve *Terc* gen ekspresyonu gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR), TERT protein düzeyi immüno Floresan ve telomer uzunluğu da kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemi ile belirlenmiştir. RT-qPCR ve qPCR teknikleri için ≥ 50 , immüno Floresan için ise ≥ 18 GV ve MII oosit kullanılmıştır. Bu şekil, BioRender programı (BioRender; Toronto, Kanada) kullanılarak oluşturulmuştur.

3.1. Kontrol ve Süperovulasyon Uygulanan Farelerden GV ve MII Oositlerin Eldesi

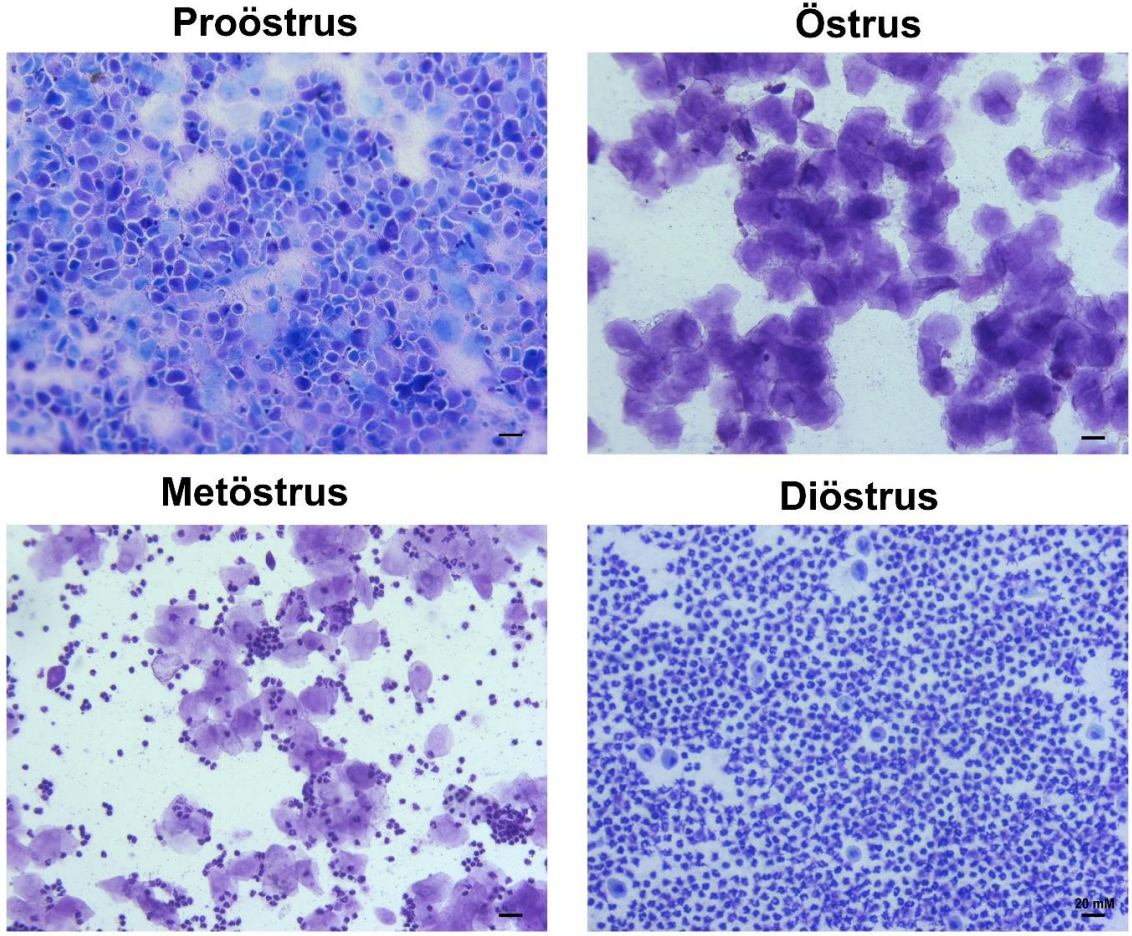
Çalışmamızda, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinde üretilen 48 adet 9 haftalık Balb/C ırkı dişi fare ve 6 adet 8-10 haftalık Balb/C ırkı erkek fareler kullanıldı. Balb/C ırkı dişi ve erkek fareler standart laboratuvar koşullarında (su ve besin kısıtlaması olmaksızın, 12 saat aydınlık/12 saat karanlık döngüsü) tutularak bakımları sağlandı. Kullanılan dişi farelerin aynı siklus aşamasında çalışmaya dahil edilebilmesi için östrus siklus tayini aşağıda anlatıldığı şekilde yapılmıştır.

3.1.1. Östrus Siklus Tayini

Kontrol ve deney gruplarını oluşturmadan önce, östrus siklus farklılığına bağlı olarak ortaya çıkabilecek olası etkileri en aza indirmek amacıyla; deneyde kullanılan 48 adet Balb/C ırkı dişi fareye her gün saat ~16.00'da östrus siklus tayini yapıldı. Östrus siklusu belirlenen dişi farenin vajinası, 45 µl 1XPBS (fosfat tamponlu salin solüsyonu) ile yıkandı. Yıkama, bu solüsyonun vajina bölgesinde 2-3 kez pipetaj yapılması ile gerçekleştirildi. Elde edilen örnek lam üzerine yayılarak, havada kuruması için bırakıldı.

Kuruma işlemi tamamlandıktan sonra, 1 gram toluidin mavisi ile 1 gram Boraks'ın 100 ml distile su içerisinde çözünmesiyle hazırlanmış olan %1'lik toluidin mavisi boyası damlatılarak 5 dakika beklenildi. Süre sonunda, toluidin mavisi yıkanarak uzaklaştırıldı. Su damlaları konulan lam, lamel yardımıyla kapatılarak ışık mikroskobu ile incelendi. Literatürdeki çalışmalar örnek alınarak; incelenen preparatlar, hücre morfolojisi ve yoğunluğuna göre proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olarak sınıflandırıldı (McLean ve ark., 2012; Lee J. ve ark., 2021) (Şekil 3.2). Proöstrus, sağlam (intakt) görünümlü, oval veya çok yüzlü (poligonal) ve çekirdekli hücrelerin yoğun olarak bulunduğu bir faz olarak tanımlanmıştır. Östrus fazında ise hücreler mavi-mor tonlarda boyanarak, kümelenmeler oluşturmuştur. Ayrıca, bu hücrelerin çekirdekleri olmayıp, boyutları artmıştır. Metöstrus fazı ise kornifiye epitel hücrelerin ve lökositlerin bir arada bulunduğu faz olarak tanımlanmıştır. Diöstrus fazı, çok sayıda lökosit varlığı ile çok sayıda oval görünümlü ve az sayıda çok yüzlü çekirdekli hücreler ile karakterizedir. Süperovulasyon üzerinde yapılan bir çalışma temel alınarak (Kalthur ve ark., 2016); diöstrus siklusunda olduğu

belirlenen fareler, kontrol ve süperovulasyon gruplarını oluşturmak üzere deneye dahil edilmiştir.



Şekil 3.2. Balb/C ırkı dişi farelerden alınan vajinal yayma örnek mikrografları. Proöstrus yoğun boyanan, çok yüzlü veya oval hücrelerin bulunduğu faz olarak tanımlanmaktadır. Östrus fazı ise hücreler mavi-mor tonlarında kümelenmiş çekirdeksiz kronifiye epitel hücrelerinin varlığı ile karakterizedir. Metöstrüs fazında kornifiye epitel hücreler ve lökositler bir arada bulunurken; diöstrus fazı, yoğun olarak lökositler ve az miktarda çok yüzlü çekirdekli hücreleri içermektedir. Skala bar = 20 µm.

3.1.2. Gonadotropinlerin Hazırlanması

Çalışmamızda, FSH analoğu olan PMSG (MSD Animal Heaths, Katalog no: 182779R1) ve LH analoğu olan hCG (MSD Animal Heaths, Katalog no:194225R2) hormonları kullanıldı. Bu hormonlar, içeriğinde bulunan çözücü ile çözüldükten sonra, steril enjeksiyonluk su kullanılarak 80 IU/ml olacak şekilde seyreltildi. Hazırlanan bu solüsyon, uygun miktarlarda küçük hacimlere (aliquatlara) bölünerek enjeksiyonun yapılacağı zamana kadar -80 °C’de saklandı.

3.1.3. Vazektomize Erkek Modelin Oluşturulması

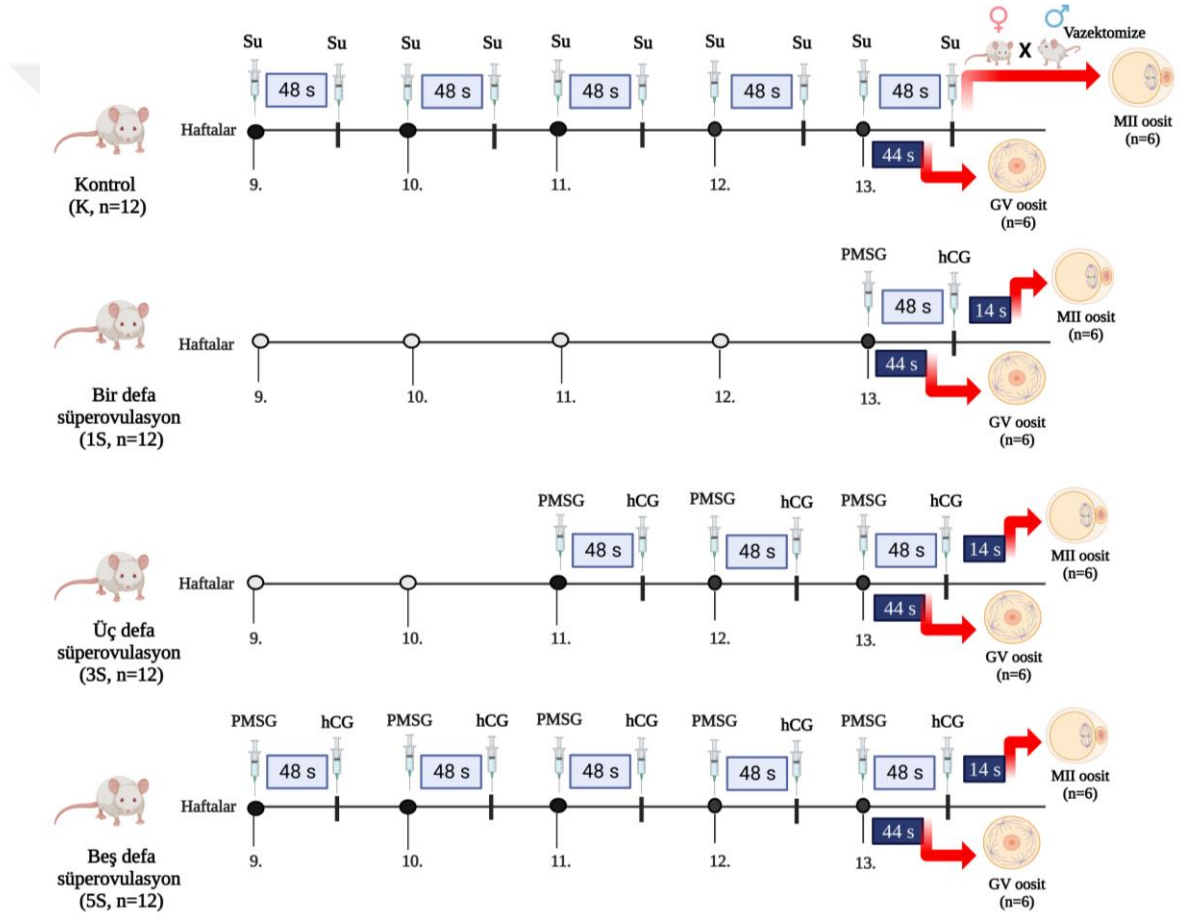
Vazektomize erkek fare modeli, anestezi madde verilerek oluşturuldu. Anestezi madde olan ksilazin ketalar, 0.4 ml ksilazin (20 mg/ml konsantrasyonda), 0.8 ml ketalar (100 mg/ml konsantrasyonda) ve 8.8 ml serum fizyolojik kullanarak hazırlandı. Ergin dönemdeki erkek farelere ağırlıkları ile orantılı miktarda ksilazin-ketalar karışım solüsyonu periton içine enjekte edildi (Örneğin, 25 gram ağırlığındaki fareye 312.5 µl ksilazin-ketalar karışım solüsyonundan kullanıldı.). Farelerin alt abdomen bölgesi, tıraş makinesi ile tıraşlanarak %70 alkol ile temizlendi. Temizlenen bölgeden küçük bir kesik oluşturularak testislerden uzanan vas deferenslere ulaşıldı. Vas deferens'lere dikkatli bir şekilde koter yardımıyla kesik oluşturularak; vazektomize işlemi gerçekteştirildi. Bir haftalık iyileşme sürecinin ardından vazektomize erkekler, kontrol grubu dişi farelerle çiftleştirildi. Böylece, MII oositlerin eldesi gerçekteştirildi.

3.1.4. Kontrol ve Süperovulasyon Gruplarından GV ve MII Oositlerin Eldesi

Bu çalışmada, 9-haftalık Balb/C ırkı dişi farelerden kontrol (K; n=12), bir defa süperovulasyon uygulanan (1S; n=12), birer hafta arayla üç defa süperovulasyon uygulanan (3S; n=12) ve birer hafta arayla beş defa süperovulasyon uygulanan (5S; n=12) olmak üzere 4 grup oluşturuldu (şekil 3.3). Tekrarlayan süperovulasyon, YÜT uygulamasını modellemesi olarak geçmiş araştırmalarda da kullanılmıştır (Xie ve ark., 2016; Tang ve ark., 2019; Zhang S. ve ark., 2023). Süperovulasyon, belirlenen zaman aralıklarında 100 µl 8 IU PMSG ve 100 µl 8 IU hCG periton içine enjekte edilerek gerçekteştirildi (Xie ve ark., 2016; Tang ve ark., 2019; Zhang S. ve ark., 2023). Oositlerin eldesi, kontrol ve süperovulasyon uygulanan farelere, ağırlıkları ile orantılı olacak şekilde ksilazin-ketalar (30 gram ağırlık için 375 µl) periton içine enjekte edildikten sonra gerçekteştirildi.

GV oositler, PMSG enjeksiyonundan 44 saat sonra ovaryumların diseksiyon mikroskobu altında 23-kalibre insülin enjektörü ile parçalanmasını takiben ağız pipeti ile toplandı. MII oositler ise PMSG uygulamasından 48 saat sonra hCG uygulandı ve 14 saat sonra farelerin oviduktları elde edildi. Diseksiyon mikroskobu altında oviduktların ampulla kısımlarının parçalanmasını takiben, ağız pipeti yardımıyla MII oositleri içeren kumulus oosit kompleksleri (KOK'lar) toplandı. Kontrol grubu farelere, birer hafta arayla 5 defa

enjeksiyonluk su verildi. Kontrol grubundan MII oositler ise dişi farelerin vazektomize erkek fareler ile çiftleştirilmesi ile elde edildi. Belirlenen zaman dilimlerinde (her sabah saat 08.00 gibi) yapılan vajinal plak kontrolünde, plak görülmesi durumunda oviduktların ampulla kısımları parçalanarak MII oositleri içeren KOK'lar elde edildi. MII oositlerin etrafındaki kumulus hücrelerin uzaklaşması için KOK'lar, 1 mg/ml konsantrasyondaki hyaluronidaz enzimi içinde, 37 °C'de 1 dakika inkübe edilerek, kumulus hücrelerinin uzaklaşması sağlandı.



Şekil 3.3. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından GV ve MII oositlerin eldesi. Dokuz haftalık Balb/C ırkı dişi farelerin periton içine (intraperitoneal, i.p.) 8 IU (internasyonal ünite) gebe kısırak serum gonadotropini (PMSG) enjeksiyonundan 44 saat sonra ovaryumlardan GV oositler elde edildi. 8 IU PMSG enjeksiyonundan 48 saat sonra 8 IU insan koryonik gonadotropin (hCG) enjekte edilip, 14 saat sonra farelerin oviduktlarından MII oositler elde edildi. Tekrarlayan süperovulasyon etkisinin araştırıldığı bu çalışmada, kontrol (K; n=12), bir defa süperovulasyon uygulanan (1S; n=12), birer hafta aryla 3 defa süperovulasyon uygulanan (3S; n=12) ve birer hafta aryla 5 defa süperovulasyon uygulanan (5S; n=12) olmak üzere 4 grup oluşturuldu. Her grupta, GV (n=6) ve MII (n=6) oosit eldesi için altışar fare kullanıldı. s, saat. Bu şekil, BioRender programı kullanılarak oluşturuldu (BioRender Şirketi; Toronto, Kanada).

Kontrol ve deney gruplarından GV ve MII oosit eldesi her bir oosit aşaması için altışar fareden (toplamda 12) gerçekleştirildi. RT-qPCR ve qPCR parametreleri için ≥ 50 GV ve MII oosit; immüno Floresan boyama için ≥ 18 GV ve MII oosit kullanıldı. Süperovulasyon ve kontrol grubu farelerden elde edilen GV ve MII oositlerden sadece normal görünümde olanlar çalışmaya dahil edildi. GV oositler için normal bir görünümde ve germinal vezikül yapısı net olarak görülenler çalışmaya alındı. Aynı şekilde, normal görünümde ve birinci polar cisimciği görülen MII oositlerde değerlendirme yapıldı.

3.2. *Tert* ve *Terc* Gen Ekspresyonlarının Kontrol ve Süperovulasyon Grubu Oositlerde RT-qPCR ile Belirlenmesi

Projenin bu aşamasında, süperovulasyon (1S, 3S ve 5S olmak üzere) ve kontrol (K) gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde *Tert* ve *Terc* genlerinin kantitatif göreceli ekspresyon seviyeleri, RT-qPCR ile belirlendi. “3.1.2.” bölümünde anlatıldığı gibi, her grup için ≥ 50 sayıdaki GV ve MII oositlerden total RNA izolasyonu, DNaz uygulaması, cDNA eldesi ve RT-qPCR basamakları aşağıda anlatıldığı gibi gerçekleştirildi (Ozturk ve ark., 2016; Uysal ve ark., 2019).

3.2.1. GV ve MII Oositlerden Total RNA İzolasyonu

1. Her bir steril 0.5 ml'lik tüpe en az 50 oosit konularak, üzerine 100 μ l lizis solüsyonu konuldu ve +4 °C'de 10 dakika tutuldu.
2. Her bir tüpe, 50 μ l %100'lük etanol konularak, vorteks ile karıştırıldı.
3. Lizat ve etanol karışımı belirli bir por çapına sahip mikro filtreden 20 saniye 12000 rpm'de döndürülerek geçirildi. Böylece, karışımdaki RNA'nın tamamının filtreye tutunması sağlandı.
4. 180 μ l yıkama solüsyonu 2/3 konularak, filtre 1 dakika 12000 rpm'de döndürülerek yıkama işlemi gerçekleştirildi. İşlemin bu basamağı bir kez daha tekrar edildi.
5. 180 μ l yıkama solüsyonu 1 konularak, filtre 1 dakika 12000 rpm'de döndürülerek yıkama işlemi gerçekleştirildi.
6. Ardından tüp, 13000 rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi.

7. Mikro filtreye sahip tüp, mikro ayırma ya da yıkama tüpüne aktarıldı. Dört derecede saklanan ve kullanım öncesi 75 °C ısıtılan ayırma solüsyonundan 6 µl, filtrenin tam merkezine gelecek şekilde konuldu. Kapağı kapatılıp oda ısısında 1 dakika bekletildikten sonra RNA'nın filtreden uzaklaşması için 13000 rpm hızda 30 saniye santrifüj edildi.
8. Aynı işlem 6 µl ayırma solüsyonu ile bir kez daha gerçekleştirildi. RNA'ların mikro ayırma tüpünde toplanması sağlandı. Tüpün dibindeki yaklaşık 12 µl total RNA, yeni steril bir tüpe alınarak -80 °C'de saklandı.

Not: İzole edilen RNA'ların spektrofotometre ile ölçülerek absorbans değerleri belirlenme basamağı, GV ve MII oositlerden elde edilen RNA'ların az miktarda olması nedeniyle gerçekleştirilmemiştir.

3.2.2. İzole Edilen RNA'lara DNaz Uygulaması

1. Genomik DNA'nın ortamdan uzaklaştırılması için DNaz uygulaması gerçekleştirildi.

Elde edilen RNA	10 µl
DNaz I enzimi	1 µl
10X DNaz I tamponu	1.1 µl
Distile su	12 µl'ye tamamlandı.

0.2 ml'lik PCR tüpüne konulan içerikler, 37 °C'de 45 dakika inkübe edildi.

2. Süre sonunda tüplere 1.2 µl DNaz I inaktivasyon solüsyonundan konuldu. Tüpler iyice karıştırılıp, oda ısısında 2 dakika inkübe edildi.
3. Son olarak tüpler, 13200 rpm'de, +4 °C'de, 3 dakika santrifüj edilip; RNA'yı içeren süpernatantlar yeni steril tüplere alındı.

3.2.3. cDNA (Komplementer DNA) Eldesi

cDNA eldesi için cDNA sentez kiti (Thermo Fisher Scientific, katalog no: K1622) kullanıldı.

1. Örnekler üzerine 1 µl random hekzamer eklenerek vortekslendi.
2. Total RNA ve random hekzameri içeren tüpler, 65 °C'de 5 dakika inkübe edildi. Süre sonunda tüpler buz üzerine alındı.

3. Örnekler ölçülerek, nükleaz içermeyen su ile 12 µl'ye tamamlandı.
4. DNaz uygulaması yapılmış olan tüplerin her birine homojen ve eşit miktarda reaksiyon karışımı ekleyebilmek amacıyla bir ana karışım hazırlandı. Ana karışımdan her bir tüpe 8 µl konuldu.

İçerik	Hacim (µl)	Son konsantrasyon (20 µl'de)
5X reaksiyon tamponu	4	1x
dNTP (10 mM)	2	1 mM
RNaz inhibitör (20 ünite/µl)	1	1 ünite
MMLV-geri transkriptaz (200 µl)	1	10 ünite
Toplam	8	

5. cDNA sentezi için, 25 °C → 5 dakika; 42 °C → 60 dakika; 70 °C → 5 dakika; 4 °C'de → ∞ olacak şekilde düzenlenmiş olan PCR programı kullanıldı.
6. Süre sonunda sentezlenmiş olan cDNA örnekleri, RT-qPCR uygulama basamaklarında kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

3.2.4. RT-qPCR Uygulama Basamakları

Görelî mRNA miktarını belirlemek için sıklıkla tercih edilen bir yöntem olan RT-qPCR, gen ekspresyon çalışmalarında yoğun olarak kullanılan güvenilir bir tekniktir. Çalışmada, her hücrede eşit miktarda ifade edildiği bilinen β -Act gen ekspresyonu temel alınarak; GV ve MII oositlerde, *Tert* ile *Terc* genlerinin görelî ekspresyon seviyeleri belirlendi. GV ve MII oositlerden elde edilen cDNA'lar, bu aşamada kullanıldı.

1. Aşağıdaki tabloda belirtilen içerikler konularak reaksiyon karışımı oluşturuldu.

İçerik	Miktar (µl)
2X Sybr Green süper karışımı	12.5
Primer ileri (10 µM)	0.75

Primer geri (10 µM)	0.75
Nükleaz içermeyen su	10.5
cDNA	1

Gerçek zamanlı PCR aşamasında kullanılan primerler:

	İleri	Geri
<i>Tert</i>	5'-CTCTCTGCTGCGCAGCCGATAC-3'	5'-CCTCGTTAAGCAGCTCAAAG-3'
<i>Terc</i>	5'-CATTAGCTGTGGGTTCTGGTCT-3'	5'-TCCTGCGCTGACGTTTGT-3'
<i>β-Act</i>	5'-TGCGTGACATCAAAGAGAAG-3'	5'-CGGATGTCAACGTCACACTT-3'

2. *Tert*, *Terc* ve *β-Act* için RT-qPCR uygulaması üç kuyucuklu olarak gerçekleştirildi. *Tert*, *Terc* ve *β-Act* için hazırlanmış olan örnekler, RT-qPCR cihazında analiz edildi. Amplifikasyon, 40 siklusa gerçekleştirildi. Ayrıca, erime eğrisi (melting curve) analizi ile ürünlerin beklenen ve gözlenen T_m değerleri karşılaştırılarak, PCR ürünlerinin özgüllüğü değerlendirildi.

RT-qPCR programı:

Başlangıç denatürasyonu (1x): 95 °C'de 3 dakika

10 siklus (Touch-down uygulandı.) (-1 °C/siklus): 92 °C → 20 saniye; 65 °C → 20 saniye; 72 °C → 30 saniye

30 siklus: 92 °C → 20 saniye; 55 °C → 20 saniye; 72 °C → 30 saniye

Erime eğrisi: 1 siklus: 95 °C → 1 dakika; 55 °C → 1 dakika; 80 siklus (her siklusa 0.5 °C artmakta); 55 °C → 10 saniye

4. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, *Tert* ve *Terc* ile *β-Act* ekspresyonları için belirlenen siklus eşik değerleri (Ct) kullanılarak; göreceli değişimler, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile hesaplandı.

$$\Delta C_t = C_t (Terc) - C_t (\beta-Act)$$

$$\Delta C_t = C_t (Tert) - C_t (\beta-Act)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (Terc_{deney\ grubu}) - \Delta C_t (Terc_{kontrol}) \quad \Delta\Delta C_t = \Delta C_t (Tert_{deney\ grubu}) - \Delta C_t (Tert_{kontrol})$$

Elde edilen göreceli değişimler, tek yönlü ANOVA ve post-hoc Tukey testi ile analiz edilerek değerlendirildi. $P < 0.05$, anlamlı kabul edildi.

3.3 TERT Proteininin Kontrol ve Süperovulasyon Grubu Oositlerde İmmüno Floresan ile Değerlendirilmesi

Projenin bu aşamasında, süperovulasyon ve kontrol grubu oositlerde (her fareden ≥ 10 oosit olacak şekilde) TERT proteininin hücre içi yerleşimi ve görelî düzeyinin belirlenmesi için immüno floresan tekniğı uygulandı (Uysal ve ark., 2018).

3.3.1. İmmüno Floresan Boyama Yöntem Basamakları

1. Oositler, %4'lük paraformaldehit (PFA) içerisine alınıp oda ısısında 20 dakika fiks edildi.
2. Fiksasyon işleminden sonra oositler, 3x10 dakika 1XPBS damlasından geçirilerek, yıkandı.
3. Yıkamanın ardından permeabilizasyon solüsyonu (1XPBS içinde hazırlanmış %0.5 Triton X-100) içerisine alınan oositler, oda ısısında 20 dakika bekletildi.
4. Permeabilizasyon işleminin ardından, bloklama solüsyonu (%20'lik normal keçi serumu) içerisine alınan oositler, oda ısısında 30 dakika tutuldu.
5. Bloklama işleminin ardından, antikor dilüent ile 1:400 oranında seyreltilen TERT primer antikor (Tablo 3.1) içerisine alınan oositler, gece boyu +4 °C'de inkübe edildi.
6. Primer antikor ile inkübe edilme işleminin ardından oositler, 3x10 dakika 1XPBS-%2 BSA (sığır serum albümin) damlasından geçirilerek, yıkama yapıldı.
7. Yıkama işlemi sonrasında, oositler antikor dilüent içerisinde 1:2000 oranında seyreltilen floresan işaretli sekonder antikora (Tablo 3.1) alınarak, oda ısısında ve karanlık ortamda 60 dakika inkübe edildi.
8. Sekonder antikor ile inkübe edilme işleminin ardından oositler, 3x10 dakika 1XPBS-%2 BSA damlasından geçirilerek, yıkama yapıldı.
9. Oositler, çekirdek boyaması için distile su ile 1:100 oranında seyreltilerek hazırlanan DAPI solüsyonu (Sigma, katalog no: D8417) içinde 2 dakika tutularak zıt boyama gerçekleştirildi.
10. DAPI ile boyanan oositlerin, 1XPBS-%2 BSA damlasında 5 dakika yıkamaları yapıldı.

11. Son olarak oositler, floresan ışımının solmasını engelleyen 5 µl'lik kapatma solüsyonu ile lamel kullanılarak kapatıldı ve floresans mikroskop (Olympus) ile görüntülendi. Elde edilen görüntülerin ImageJ programı ile analizleri sonucunda, TERT proteinin GV ve MII oositlerdeki hücre içi yerleşimleri ile kontrol ve süperovulasyon gruplarındaki göreceli düzeyleri belirlendi. Elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc istatistiksel testi ile gruplar arasında karşılaştırıldı. $P<0.05$, anlamlı kabul edildi.

Tablo 3.1. İmmüno floresan boyamasında kullanılan primer ve sekonder antikorlar, dilüsyon oranları, marka ve katalog numaraları.

Kullanılan Antikor	Marka	Katalog No	Dilüsyon Oranı
TERT primer antikor	Bioss	BS-0233R	1:400
İmmüno floresan işaretli sekonder antikor	Cell Signaling	4412S	1:2000

3.4. Telomer Uzunluğunun Kontrol ve Süperovulasyon Grubu Oositlerde Belirlenmesi

Telomer uzunluğu, daha önceki çalışmalarda da kullanılan (Callicott ve ark., 2006; Yamada-Fukunaga ve ark., 2013) qPCR yöntemi ile belirlendi. Kontrol ve süperovulasyon gruplarına ait GV ve MII oositlerin telomer uzunluğu, aşağıda anlatılan basamaklarda ölçüldü.

3.4.1. GV ve MII Oositlerden Genomik DNA İzolasyonu

3.1.4.'de anlatıldığı gibi elde edilen oositlerden, QIAmp DNA Mikro Kiti (Qiagen, katalog no: 56304, Valencia, CA, ABD) kullanılarak genomik DNA izole edildi. Bu kitin uygulama basamakları aşağıda sunuldu.

1. Her bir steril 0.5 ml'lik tüpe eşit sayıda olmak koşuluyla yaklaşık 50 oosit konularak, ATL tamponu ile 50 µl'ye tamamlandı.
2. Üzerine 20 µl proteinaz K konuldu ve karışması için vortekslendi.

3. Vorteks işlemi sonrası oositlerin tamamen parçalanması için 56 °C'lik su banyosunda 20 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sırasında, 5 dakikada bir vorteks işlemi uygulandı.
4. İnkübasyon işleminden sonra, 10 µl ATL tamponu eklenerek, vortekslendi.
5. Daha sonra, 1 µl taşıyıcı RNA ve 50 µl AL tamponu kullanılarak bir karışım oluşturuldu ve tüp içerisine eklenip, 15 saniye vortekslendi.
6. Süre sonunda tüpe, 65.5 µl etanol (%96-100'lük) eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Sonrasında 5 dakika oda ısısında inkübe edildi.
7. Elde edilen karışım, QIAamp mini döndürme kolonuna aktarıldı. Sonrasında tüp, 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, akış ve toplama tüpü atıldı.
8. Santrifüj işleminin ardından, QIAamp mini döndürme kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilerek, üzerine 250 µl AW1 tamponu eklenildi. Tüp, 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası, akış ve toplama tüpü tekrar atıldı.
9. Daha sonra, QIAamp Mini döndürme kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi ve üzerine 350 µl AW2 tamponu eklendi. Sonrasında tüp, 8000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
10. Daha sonra tüp, 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminin ardından, akış ve toplama tüpü aynı şekilde atıldı.
11. QIAamp mini döndürme kolonu, yeni bir 1.5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek, üzerine 65 °C'ye ısıtılmış olan AE tamponundan 36 µl eklendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi.
12. İnkübasyon süresi sonunda, tüp 14000 rpm'de 2 dakika boyunca santrifüj edildi. Böylece genomik DNA elde edildi.
13. Kontrol ve süperovulasyon gruplarına ait tüplerin genomik DNA konsantrasyonu, spektrofotometre (Epoch) ile µg/µl olarak ölçüldü. Ayrıca, aynı ölçümde saflık değerleri belirlendi (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. Elde edilen genomik DNA'ların konsantrasyon ve saflık değerleri. K, kontrol; S, süperovulasyon.

	Gruplar	Genomik DNA konsantrasyonu (µg/µl)	Saflık değeri (OD260/OD280)
GV Oosit	K	28.97	1.42
	1S	31.73	1.28
	3S	13.65	3.5
	5S	18.98	3.5
MII Oosit	K	41.15	1.44
	1S	31.25	1.50
	3S	27.31	1.25
	5S	12.92	2.34

3.4.2. qPCR Uygulama Basamakları

Oositlerdeki nükleer genom sayısını belirleyebilmek ve PCR reaksiyonunu normalize etmek için tüm dokularda var olan *B1* geni referans olarak kullanıldı (Berteli ve ark., 2022). Uygulama basamakları, aşağıda sunulmuştur.

1. Aşağıdaki tabloda belirtilen içerikler konularak qPCR reaksiyon karışımı oluşturuldu. Telomer ve *B1* geni için ayrı ayrı qPCR reaksiyonu kuruldu.

İçerik	Telomer (µl)	<i>B1</i> (µl)
Sybr Green PCR süper karışımı	12.5	12.5
Primer ileri	0.5 (200 nM)	1 (400 nM)
Primer geri	0.5 (200 nM)	1 (400 nM)
Genomik DNA	2.5	2
Distile su	9	8.5
Toplam	25	25

Tablo 3.3. qPCR aşamasında kullanılan telomer ve *B1* primerleri.

Telomer	İleri	5'-CGGTTTGGTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3'
	Geri	5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'
B1	İleri	5'-GCACCTTTAATCCCAGCAC-3'
	Geri	5'-TGAGACAGGGTTTCTCTGTA-3'

2. Telomer bölgesi ve *B1* geninin çoğaltılması için aşağıda belirtilen PCR programı kullanıldı. Ayrıca, erime eğrisi analizi ile PCR ürünlerinin özgüllükleri değerlendirildi.

Telomer ve <i>B1</i> geni için		
	°C ve Süre	Siklus sayısı
Başlangıç denatürasyonu	95 °C, 10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C, 15 saniye	40
Bağlanma ve uzama	60 °C, 1 dakika	40

3. qPCR aletinin vermiş olduğu Ct değerlerine göre, görel telomer uzunluğu $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü ile aşağıda anlatıldığı gibi hesaplandı. Elde edilen görel değişimler, tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc istatistiksel testi ile gruplar arasında karşılaştırıldı.

$$\Delta Ct = Ct(\text{Telomer}) - Ct(B1)$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(\text{Telomer}_{\text{deney grupları}}) - \Delta Ct(\text{Telomer}_{\text{kontrol}})$$

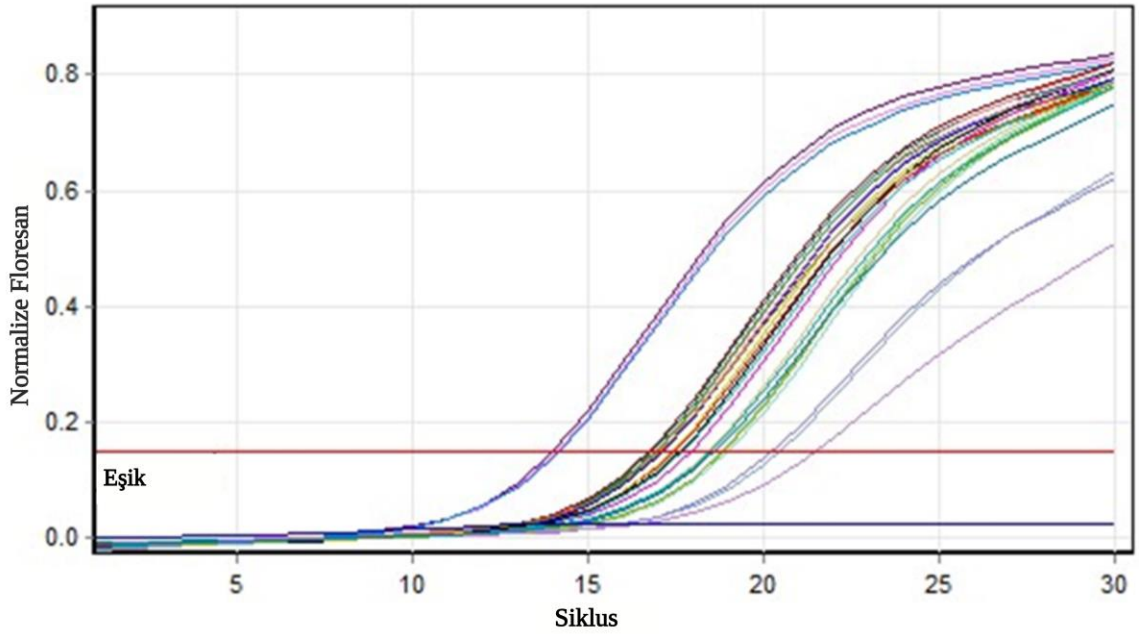
Böylece, kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerin görel telomer uzunlukları belirlendi.

4. BULGULAR

Kontrol ve süperovulasyon (1S, 3S ve 5S olmak üzere) gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, *Tert* ve *Terc* gen ekspresyonu RT-qPCR, TERT protein düzeyi immüno Floresan ve telomer uzunluğu da qPCR yöntemleri ile belirlendi.

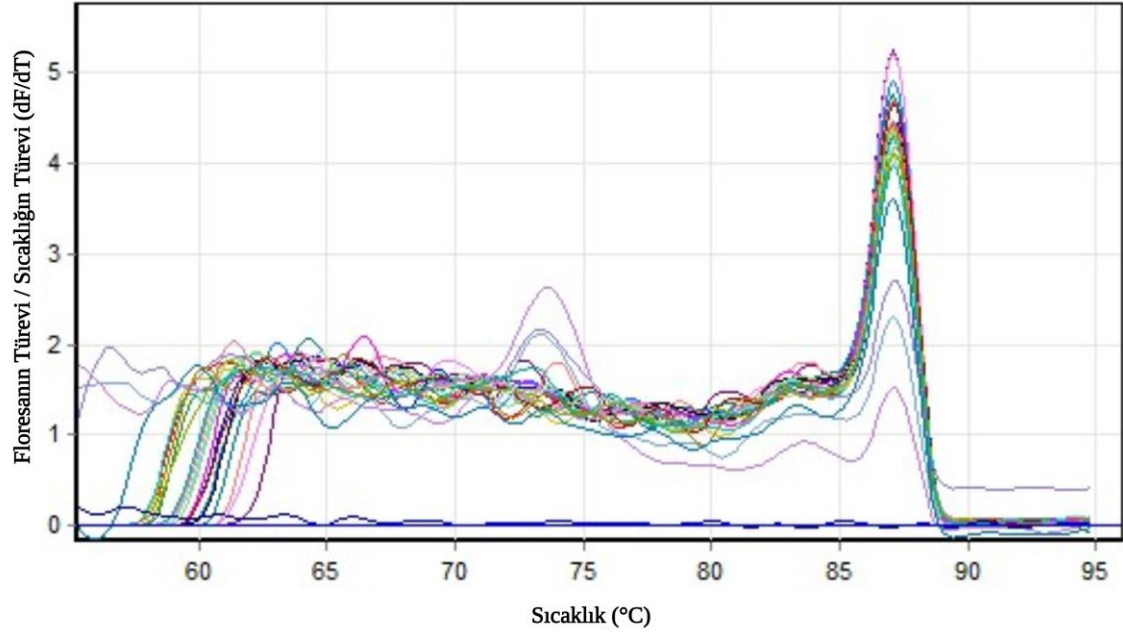
4.1. Kontrol ve Süperovulasyon Gruplarından Elde Edilen GV ve MII Oositlerdeki *Terc*, *Tert* ve β -Act Genlerinin Ekspresyonu

Çalışmada, ilk olarak *Terc* ve *Tert* genlerinin ekspresyon seviyeleri belirlendi. Bu amaç doğrultusunda, her hücrede eşit miktarda ifade edildiği bilinen β -Act gen ekspresyonu normalizasyon işlemi için kullanıldı. β -Act geni için elde edilen RT-qPCR'ın sigmoid eğrisi Şekil 4.1'de; erime eğrisi ise Şekil 4.2'de sunuldu.

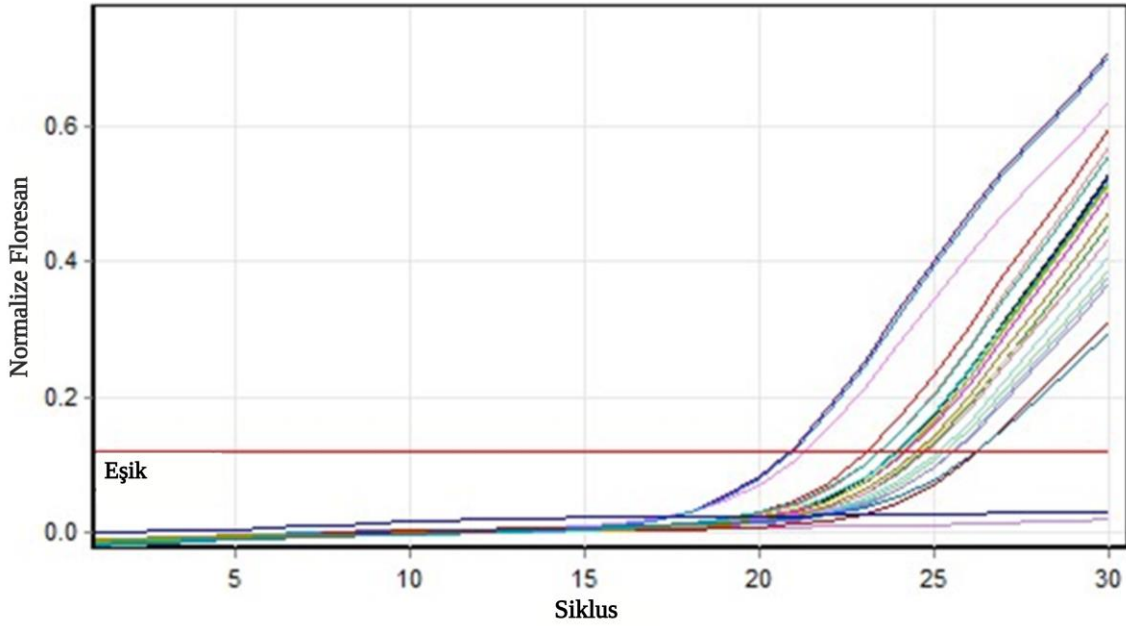


Şekil 4.1 Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, β -Act RT-qPCR sonucu. Beklenildiği gibi, sigmoid eğriler oluşmuştur.

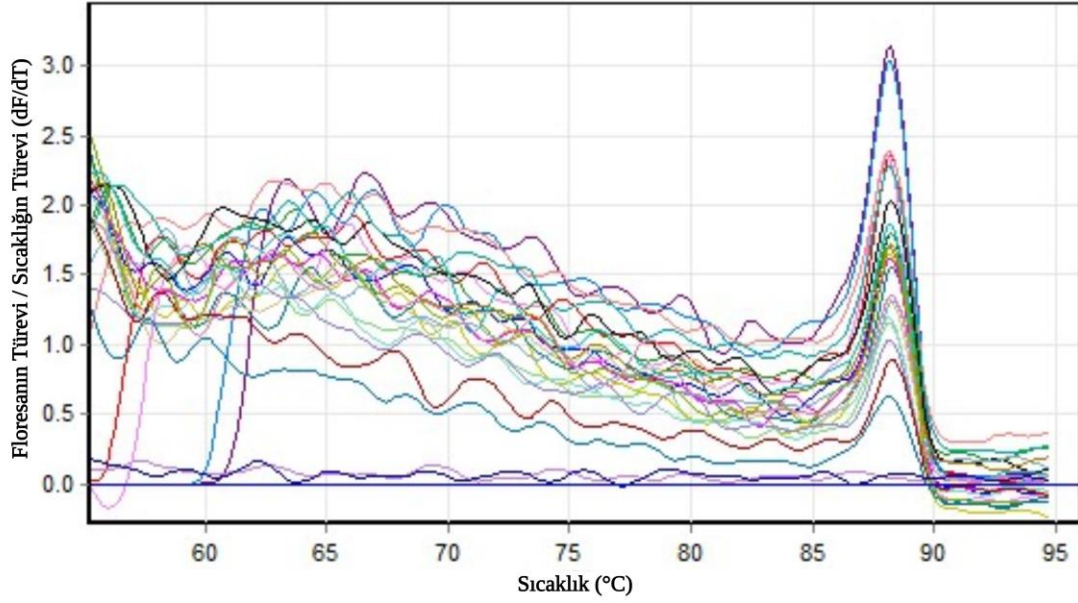
Terc gen ekspresyon seviyesini belirlemek için uygulanan RT-qPCR reaksiyon eğrisi ve erime eğrisi sırasıyla Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te sunuldu.



Şekil 4.2. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, β -Act için uygulanan RT-qPCR erime eğrisi (melting curve) sonucu. Bu sonuç, RT-qPCR uygulaması sonucunda özgül ürünlerin oluştuğunu belirtmektedir.



Şekil 4.3. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, *Terc* geni için uygulanan RT-qPCR sonucu. Bu uygulama sonucunda, beklenildiği gibi sigmoid eğriler oluştu.

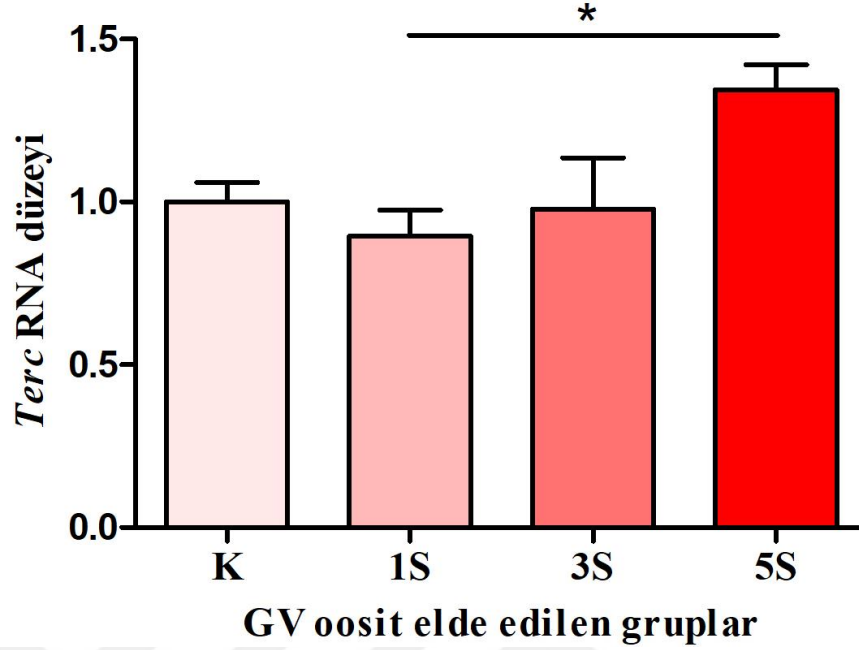


Şekil 4.4. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, *Terc* geni için uygulanan RT-qPCR erime eğrisi (melting curve) sonucu. Elde edilen erime eğrisinin ortak bir bölgede pik vermesi ürünlerin özgül olduğunu göstermektedir.

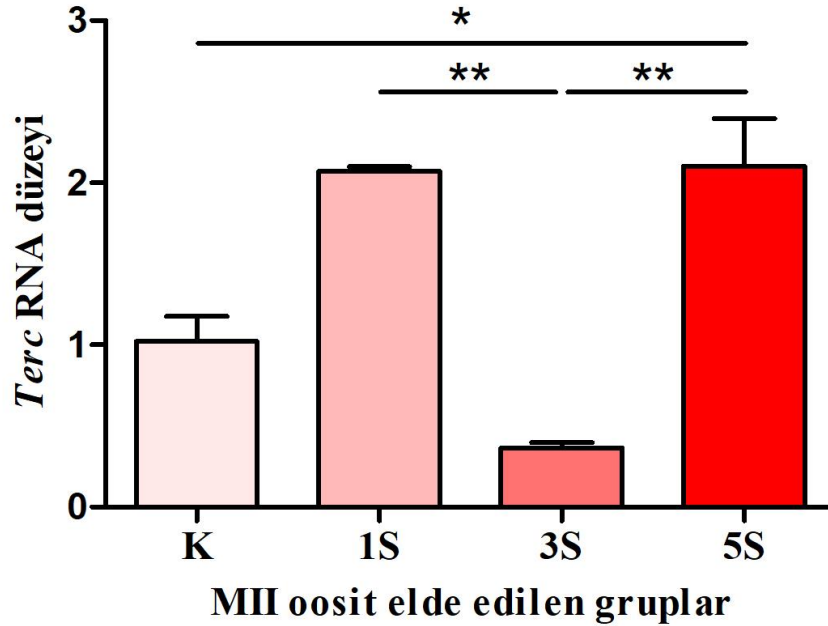
Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde *Terc* gen görelî ekspresyonları belirlendi (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6). GV oosit elde edilen 5S grubunun *Terc* görelî ekspresyon seviyesinin 1S grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edildi (Şekil 4.5; $P<0.05$). MII oosit elde edilen gruplarda ise *Terc* geni ekspresyon seviyesi 5S grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde artış gösterdiği bulundu (Şekil 4.6; $P<0.05$). Ayrıca, 3S grubunda 1S grubuna göre anlamlı bir şekilde *Terc* düzeyi azalış gösterirken; 5S grubunda belirgin bir şekilde yükseldiği belirlendi (Şekil 4.6; $P<0.01$).

Görelî *Tert* mRNA seviyesini belirlemek için uygulanan RT-qPCR reaksiyon eğrisi Şekil 4.7’de; erime eğrisi ise Şekil 4.8’de sunuldu. RT-qPCR sonucunda oluşan eğrilerin sigmoid görünüme sahip olması ve erime eğrisinin ortak bir noktada pik oluşturması elde edilen ürünlerin özgül olduğunu göstermektedir.

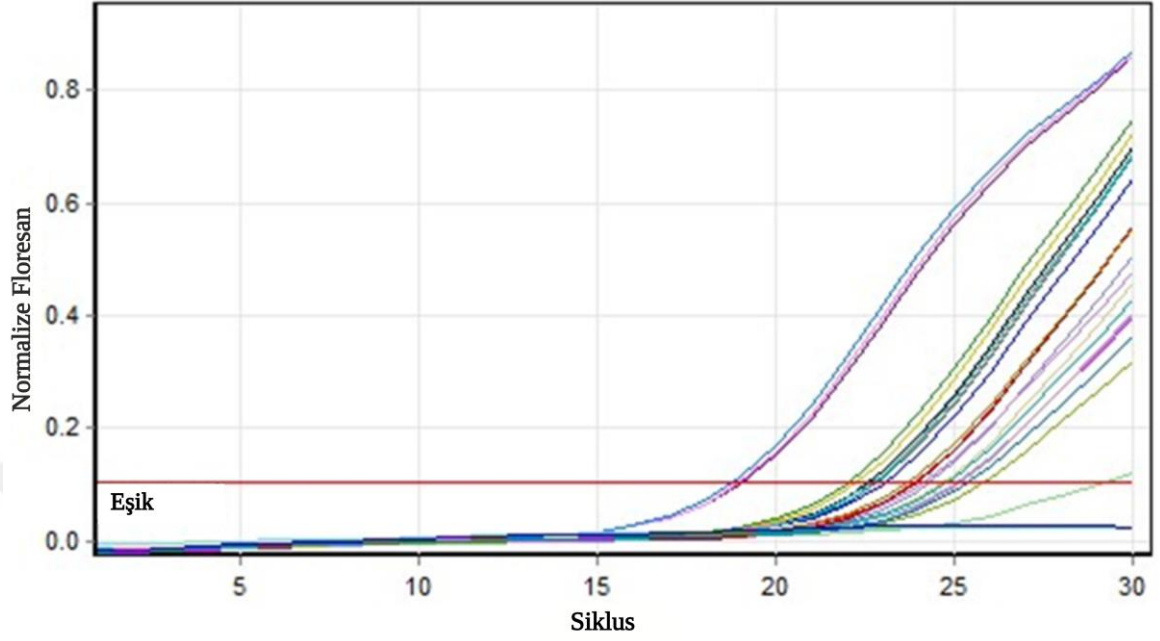
RT-qPCR deneyinde elde edilen Ct kullanılarak, görelî *Tert* mRNA ekspresyon seviyeleri belirlendi (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10). *Tert* mRNA seviyesi, GV oosit elde edilen 1S ve 5S gruplarında kontrol grubuna göre artış gösterdi (Şekil 4.9; $P<0.05$). MII oosit elde edilen 1S grubundaki *Tert* mRNA seviyesinin kontrol, 3S ve 5S gruplarına kıyasla belirgin bir şekilde arttığı tespit edildi (Şekil 4.10; $P<0.001$).



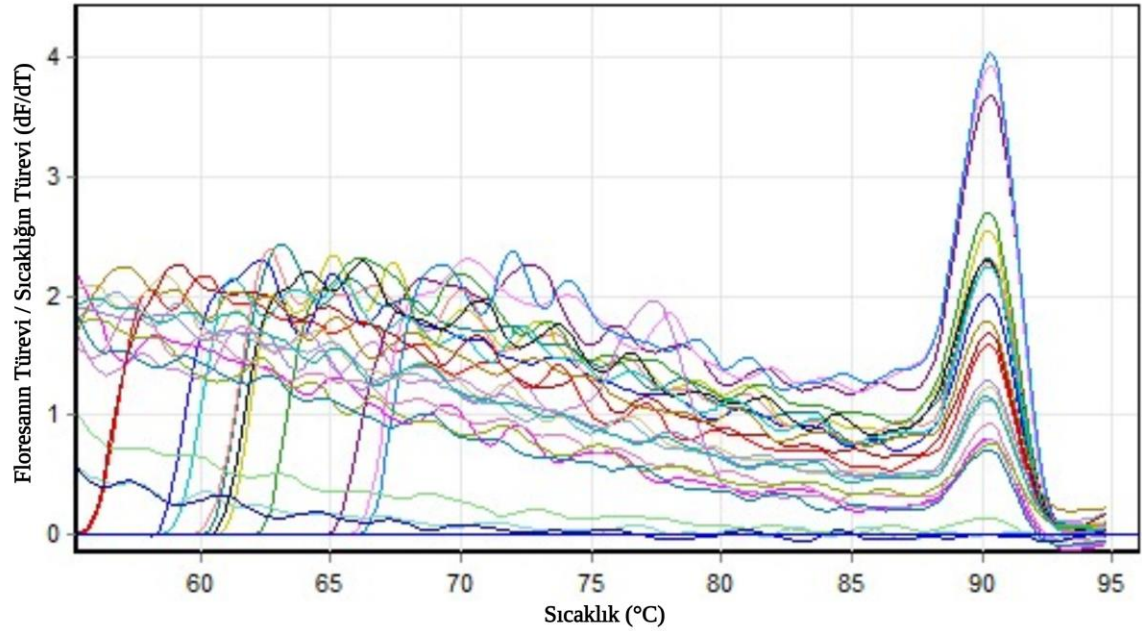
Şekil 4.5. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerdeki görel *Terc* RNA ekspresyonu. Elde edilen görel değişim verileri, tek yönlü ANOVA ve Tukey post hoc istatistiksel testi ile değerlendirildi. 5S grubundan elde edilen GV oositler, 1S grubuna kıyasla anlamlı olarak daha yüksek *Terc* RNA seviyesine sahip olduğu tespit edildi ($P<0.05$). $P<0.05$, anlamlı kabul edildi. ‘*’ işareti istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. * $P<0.05$.



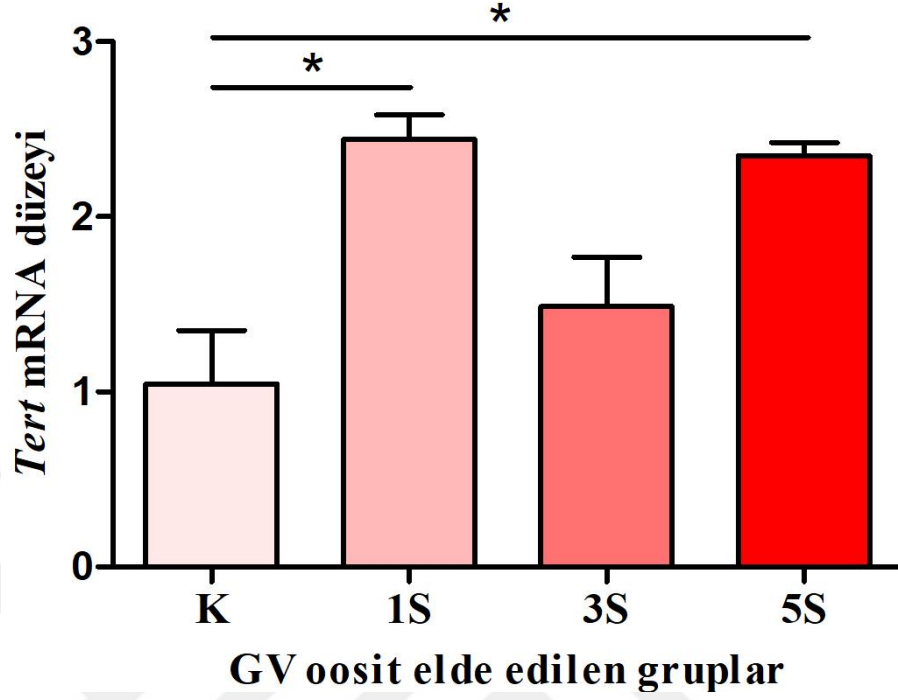
Şekil 4.6. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen MII oositlerdeki görel *Terc* RNA ekspresyonu. MII oosit elde edilen 3S grubunun *Terc* RNA seviyesi, 1S grubuna kıyasla azalırken; 5S grubunda ise tekrar yükseldiği belirlendi ($P<0.01$). Buna ek olarak, 5S grubunun görel *Terc* RNA ekspresyon seviyesi, kontrol grubuna göre anlamlı bir artış gösterdi ($P<0.05$). $P<0.05$, anlamlı kabul edildi. ‘*’ işareti istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$.



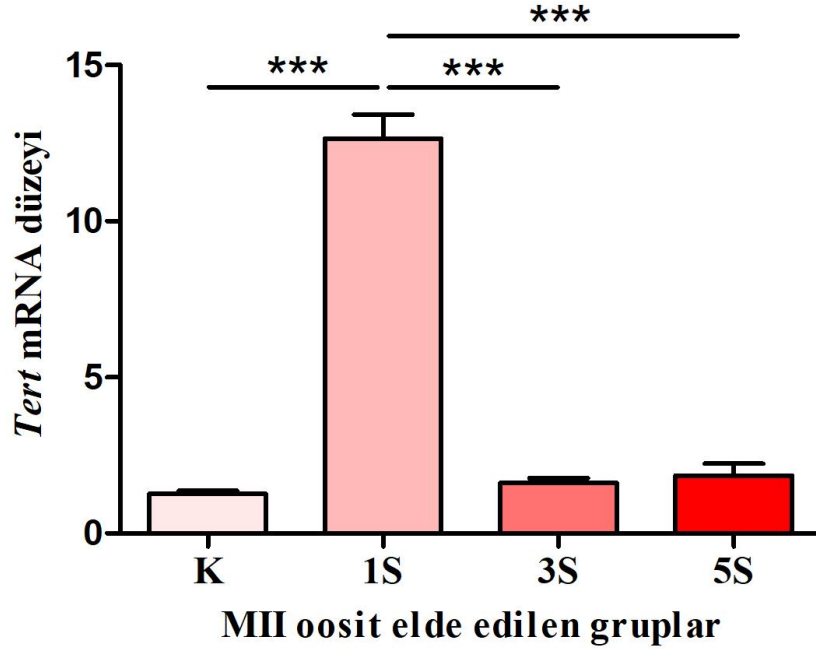
Şekil 4.7. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, *Tert* için uygulanan RT-qPCR sonucu. Bu reaksiyon sonucunda sigmoid eğriler oluştu.



Şekil 4.8. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, *Tert* için uygulanan RT-qPCR erime eğrisi (melting curve) sonucu. Tek bir bölgede pik görülmesi, özgül ürünlerin oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 4.9. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerdeki *Tert* mRNA görelî ekspresyonu. 1S ve 5S gruplarındaki görelî *Tert* mRNA ekspresyon seviyesinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edildi ($P<0.05$). $P<0.05$, anlamlı kabul edildi. ‘*’ işareti istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. * $P<0.05$.



Şekil 4.10. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen MII oositlerdeki *Tert* mRNA görelî ekspresyonu. 1S grubundaki *Tert* mRNA seviyesinin kontrol, 1S ve 5S gruplarına kıyasla belirgin bir şekilde arttığı belirlendi ($P<0.001$). $P<0.05$, anlamlı kabul edildi. ‘*’ işareti istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. *** $P<0.001$.

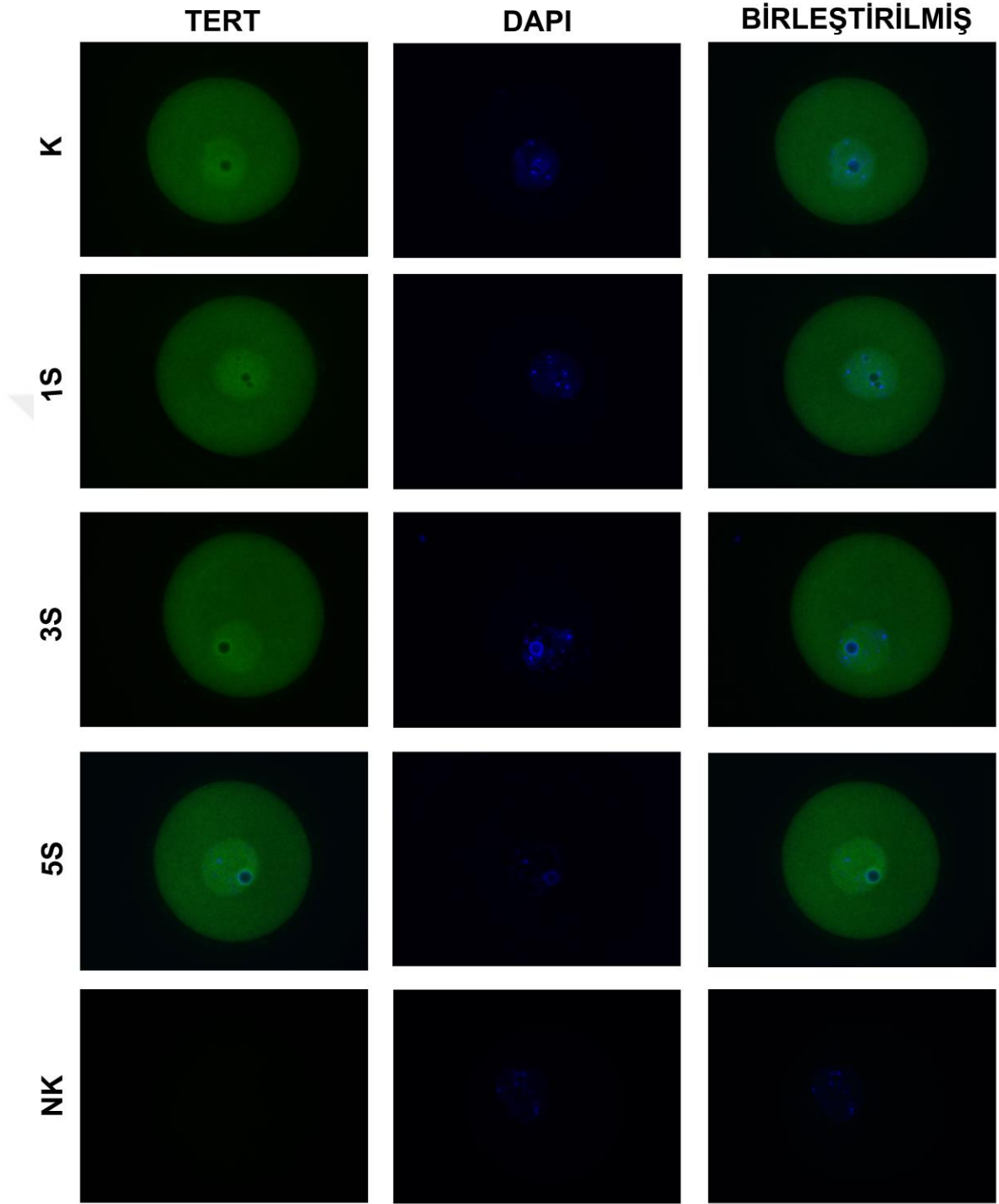
Sonuç olarak *Terc* ve *Tert* gen ekspresyonlarının kontrol ve süperovulasyon grupları arasında anlamlı farklılıklar gösterdiği belirlendi. Bu durum, süperovulasyonun bu genlerin ekspresyon seviyelerini etkileyebildiğini göstermektedir.

4.2. TERT Protein Dağılımı ve Görelî Düzeyinin Kontrol ve Süperovulasyon Grubu Oositlerde İmmüno Floresan Boyama ile Belirlenmesi

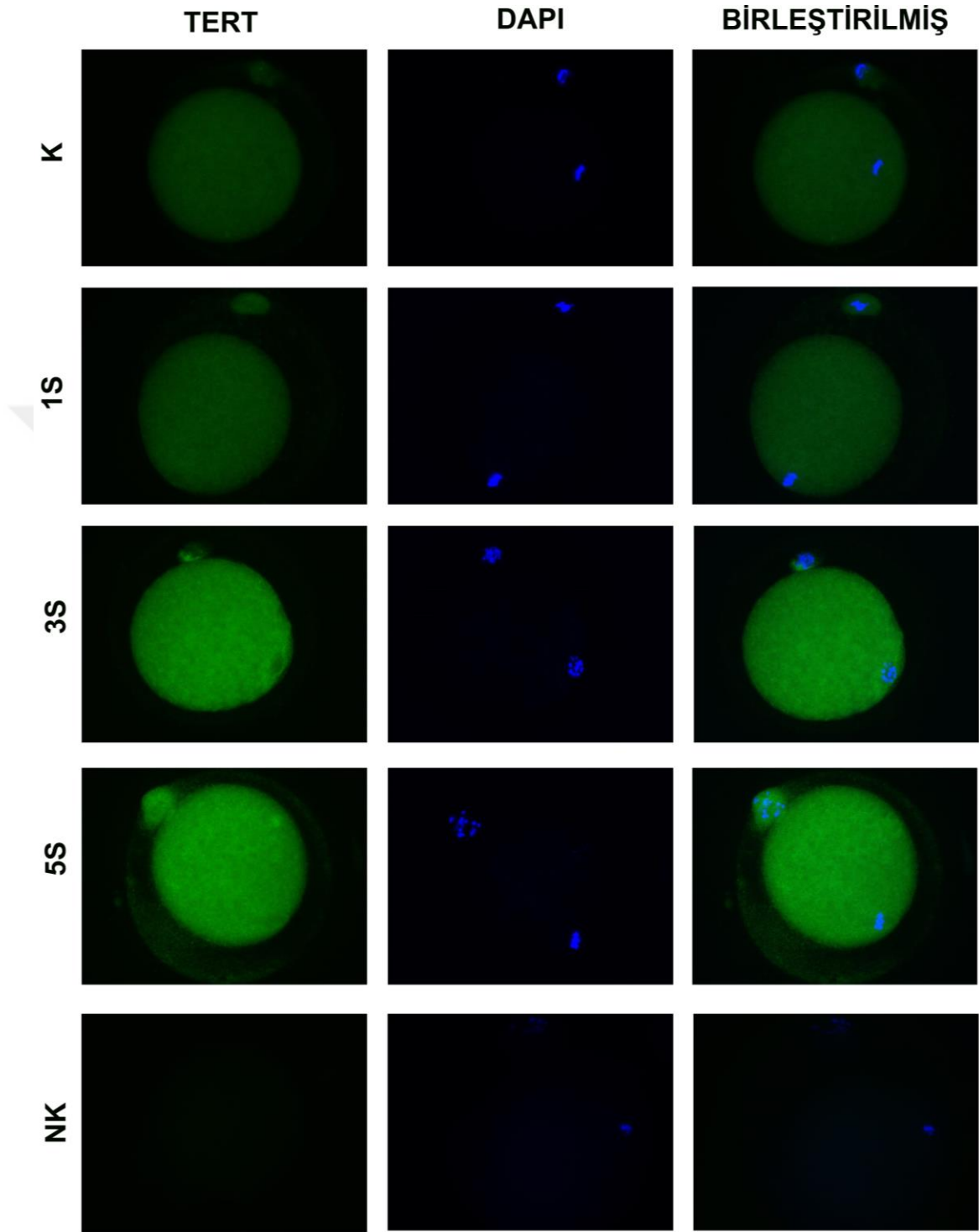
Çalışmamızda, kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, TERT proteininin görelî düzeyi ve hücre içi yerleşimi immüno floresan yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12). TERT proteini, GV oositlerde yoğun olarak çekirdekte ve daha az yoğunlukta ise sitoplazmada yerleşim gösterdiği belirlendi (Şekil 4.11). MII oosit eldesi gerçekleştirdiğimiz kontrol ve süperovulasyon gruplarında, TERT proteinin yoğun olarak sitoplazmada yerleşim gösterdiği tespit edildi (Şekil 4.12). Ayrıca, TERT ekspresyonu MII oositlerin polar cisimciklerinde de bulunduğu belirlendi (Şekil 4.12). Negatif kontrol boyamalarında herhangi bir boyanma gözlenmedi.

İmmüno floresan boyama sonucunda elde ettiğimiz görüntüler, ImageJ programı ile analiz edilerek; GV oosit elde edilen kontrol ve süperovulasyon gruplarındaki görelî TERT protein düzeyleri belirlendi (Şekil 4.13). TERT protein görelî düzeyinin GV oosit elde edilen kontrol ve süperovulasyon grupları arasında anlamlı bir fark göstermediği tespit edildi (Şekil 4.13; $P>0.05$). Ayrıca, GV oositlerdeki TERT protein görelî düzeyi, çekirdek ve sitoplazma için ayrı ayrı analiz edilerek sırasıyla Şekil 4.14 ve Şekil 4.15'te sunuldu. GV oositin çekirdek bölge analizi sonucunda, kontrol ve süperovulasyon grupları arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi (Şekil 4.14; $P>0.05$). Benzer şekilde, sitoplazmadaki ekspresyon değerlendirmesinde de gruplar arası bir fark bulunmadı (Şekil 4.15).

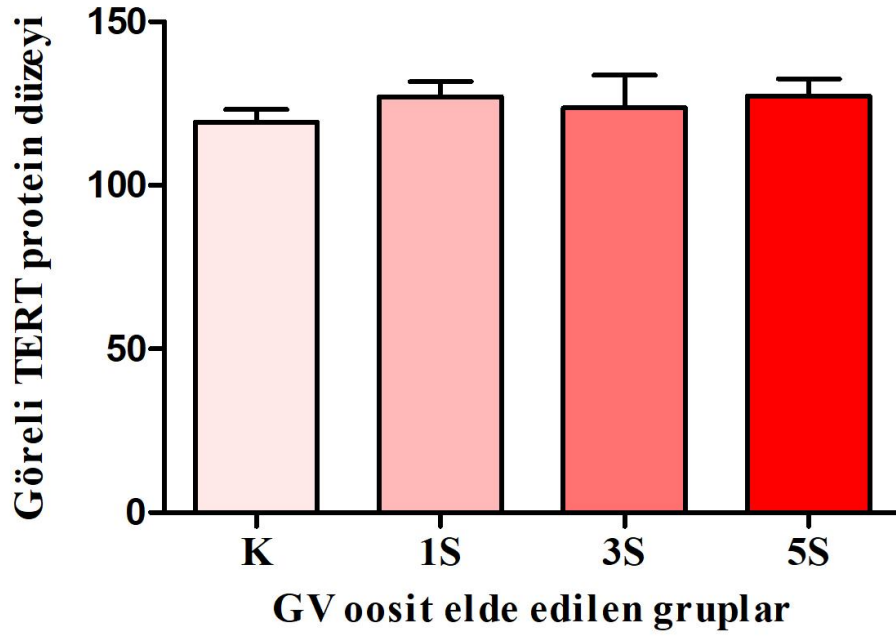
MII oositler için gerçekleştirilen immüno floresan boyamaları da, ImageJ programı ile analiz edildi. Yapılan analiz sonucunda, 3S ve 5S gruplarında TERT protein görelî düzeyinin kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu belirlendi (Şekil 4.16; $P<0.05$). Ayrıca, TERT protein düzeyinin süperovulasyon uygulama sayısı ile doğru orantılı olacak şekilde, 1S grubundan 5S grubuna doğru kademeli olarak yükseldiği de tespit edildi (Şekil 4.16; $P<0.01$).



Şekil 4.11. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerin, immüno Floresan boyama sonucu. TERT proteininin, yoğun olarak çekirdek bölgesinde ve daha az yoğun olarak da sitoplazmada olduğu belirlendi. Mikrograflar, 400X orijinal büyütmede çekildi. K, kontrol; NK, negatif kontrol.

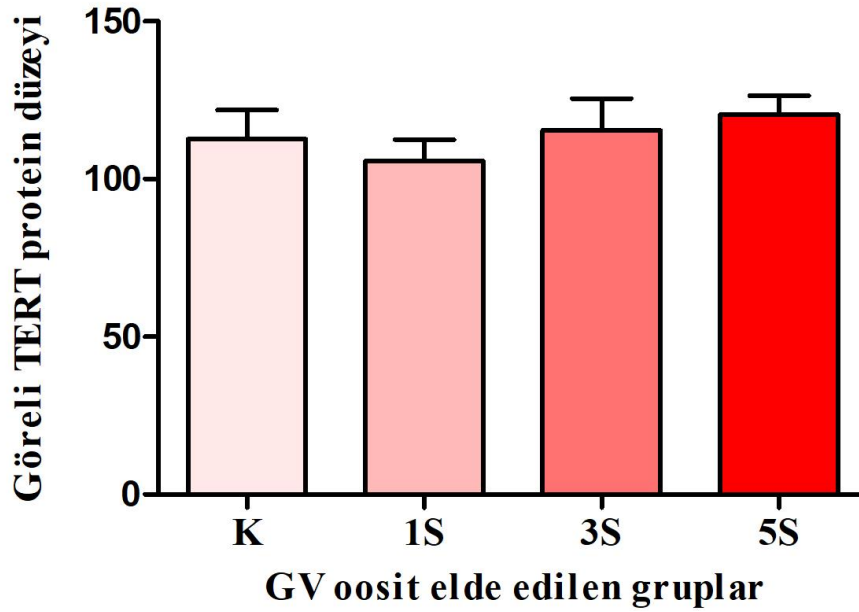


Şekil 4.12. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen MII oositlerin, immüno Floresan boyama sonucu. TERT proteininin, yoğun olarak sitoplazmada yerleşim gösterdiği belirlendi. Ayrıca, MII oositlerin polar cisimciklerinde de TERT proteini gözlemlendi. Mikrograflar, 400X orijinal büyütmede çekildi. K, kontrol; NK, negatif kontrol.



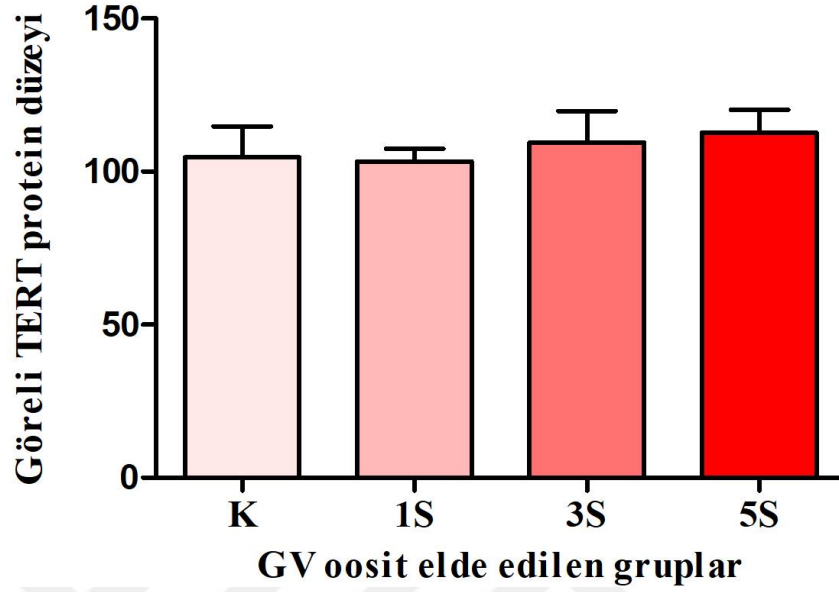
Şekil 4.13. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerdeki TERT protein görelî düzeyi. İmmüno Floresan boyama sonucu elde edilen veriler, tek yönlü ANOVA ve Tukey post-hoc testi ile analiz edildi. İstatistiksel analizler sonucunda, görelî TERT protein düzeyinin GV oosit elde edilen kontrol ve süperovulasyon grupları arasında anlamlı bir fark göstermediği tespit edildi. $P < 0.05$, anlamlı kabul edildi.

Çekirdek Alanı

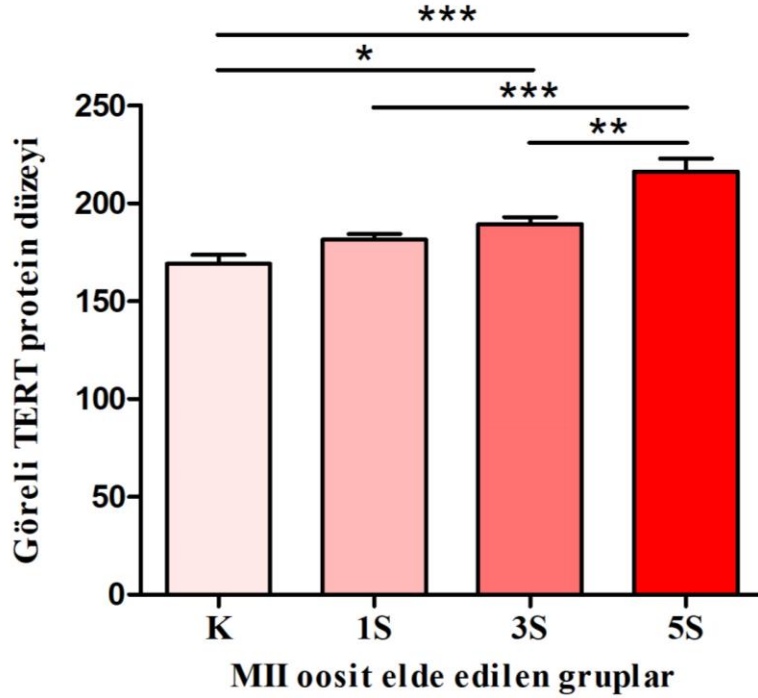


Şekil 4.14. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerin çekirdek alanlarındaki TERT protein görelî düzeyi. GV oositlerin çekirdek bölgesindeki TERT protein düzeyi, kontrol ve süperovulasyon grupları arasında belirgin bir değişim göstermedi. $P < 0.05$, anlamlı kabul edildi.

Sitoplazma Alanı



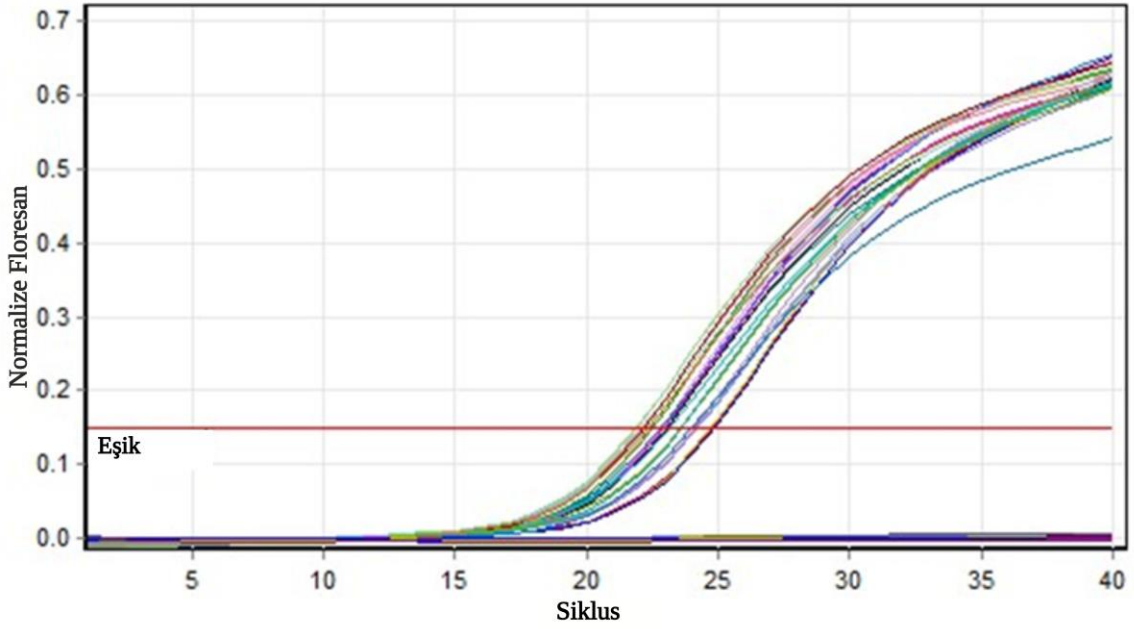
Şekil 4.15. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerin sitoplazma alanlarındaki TERT protein görelî düzeyi. GV oositlerin sitoplazma bölgesindeki TERT protein düzeyi, kontrol ve süperovulasyon grupları arasında anlamlı bir fark göstermediği tespit edildi. $P<0.05$, anlamlı kabul edildi.



Şekil 4.16. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen MII oositlerdeki TERT protein görelî düzeyi. 3S ve 5S süperovulasyon gruplarındaki TERT protein düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu tespit edildi ($P<0.05$). Ayrıca, TERT protein düzeyi 1S grubundan 5S grubuna doğru kademeli olarak artış gösterdiği belirlendi ($P<0.01$). $P<0.05$, anlamlı kabul edildi. ‘*’ işareti istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

4.3. Telomer Uzunluğunun Kontrol ve Süperovulasyon Grubu Oositlerde Belirlenmesi

Çalışmada, telomer uzunluğu qPCR yöntemiyle belirlendi. Bu amaç doğrultusunda, *B1* gen ekspresyonu normalizasyon işlemi için kullanıldı. *B1* primerleri ile elde edilen qPCR sigmoid eğrisi Şekil 4.17’de; erime eğrisi ise Şekil 4.18’de gösterildi.

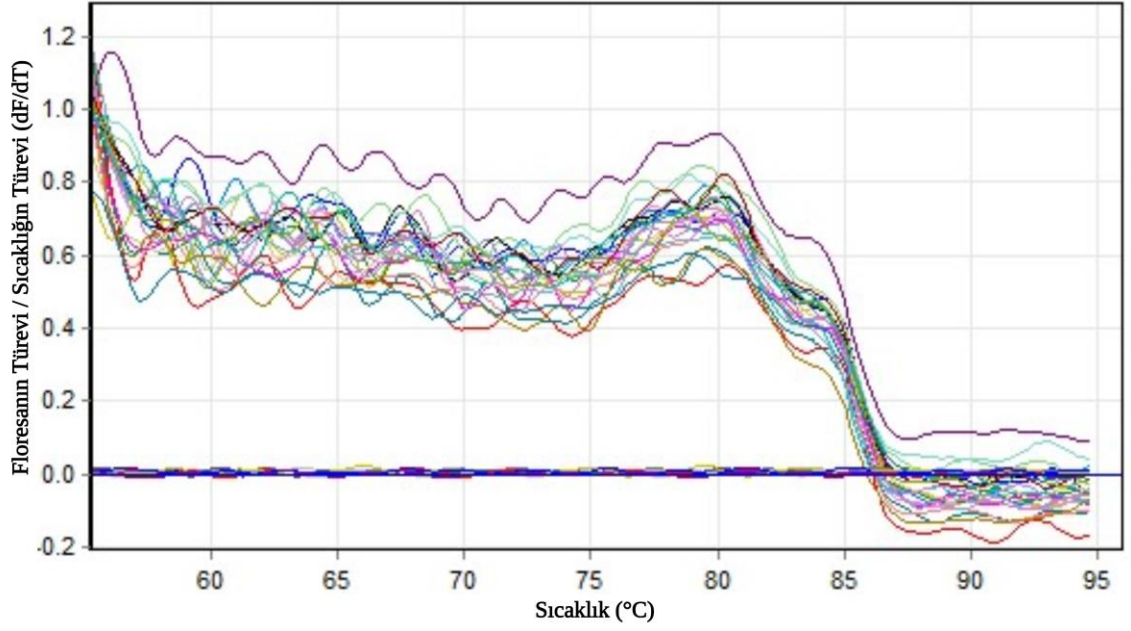


Şekil 4.17. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde, *B1* geni için uygulanan qPCR sonucu. Bu analiz sonucunda sigmoid eğriler oluştu.

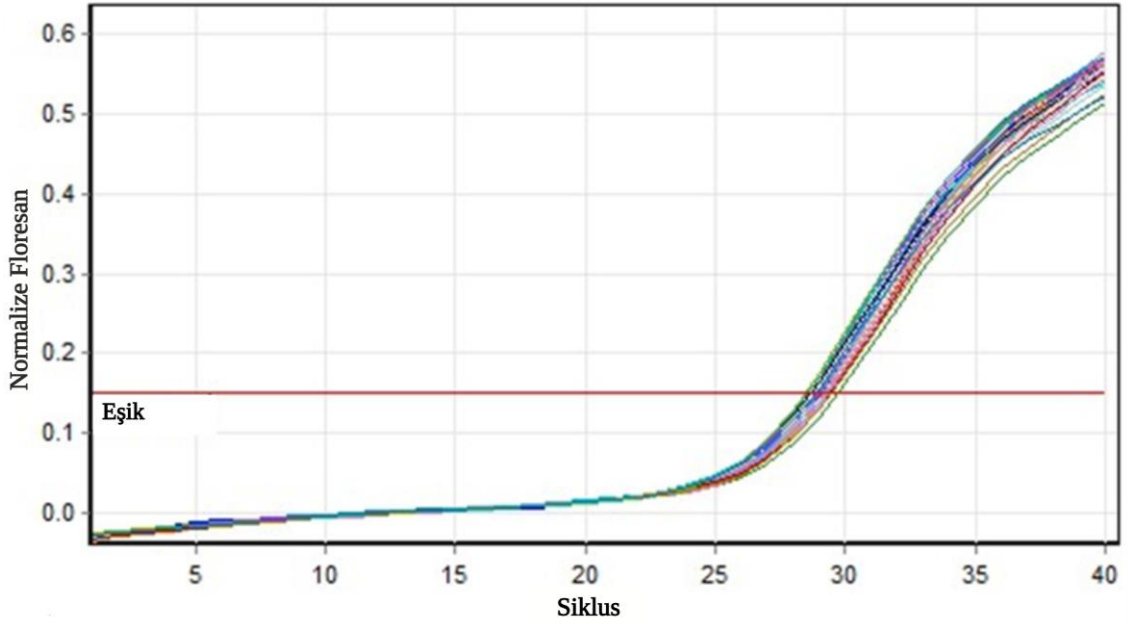
Telomer primerleri için uygulanan qPCR reaksiyon eğrisi ve erime eğrisi sırasıyla Şekil 4.19 ve Şekil 4.20’de sunuldu.

qPCR cihazının vermiş olduğu Ct değerlerine göre, telomer uzunluğunun göreceli değişimi $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülü kullanılarak hesaplandı. Yapılan istatistiksel analizler sonucunda 1S, 3S ve 5S gruplarına ait GV oositlerin telomer uzunluğu, kontrol grubuna göre daha kısa olduğu belirlendi (Şekil 4.21; $P<0.001$). MII oositler üzerinde yapılan analizler sonucunda: 1S ve 5S grupların kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek telomer uzunluğuna sahip olduğu görüldü (Şekil 4.22; $P<0.001$). Ayrıca, 3S grubunda 1S ve 5S gruplarından daha kısa telomer uzunluğuna sahip olduğu tespit edildi ($P<0.001$). Sonuç olarak, süperovulasyon uygulaması GV ve MII oositlerin telomer uzunluğunu etkilemektedir.

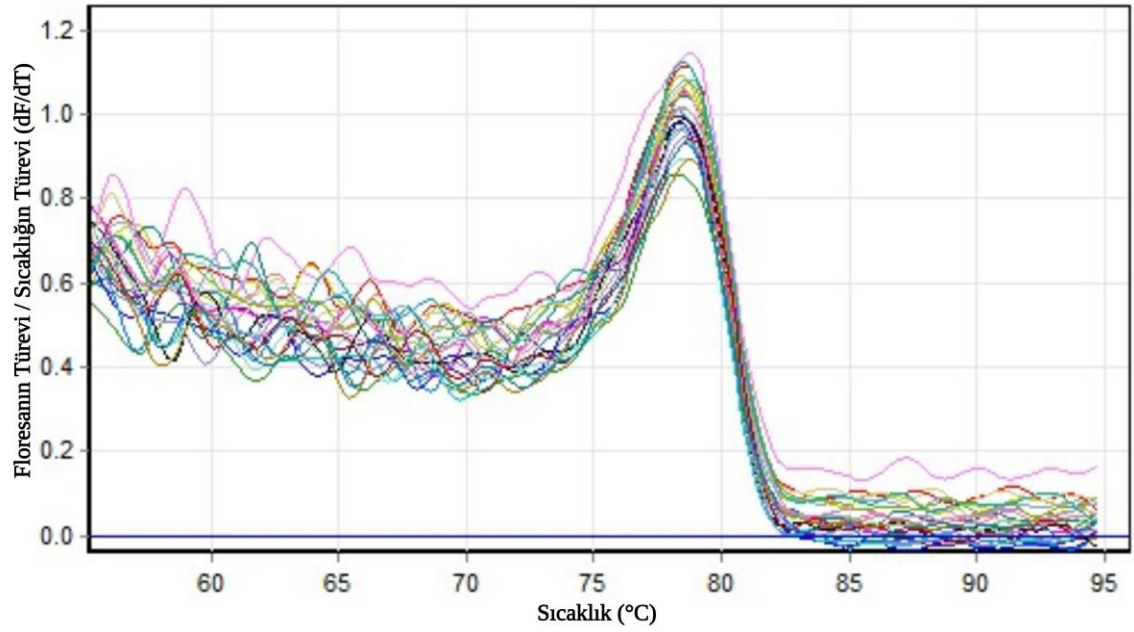
MII oositlerde bu etkinin süperovulasyonun tekrar sayısına bağı olarak değışiklik gösterdiği görölmektedir.



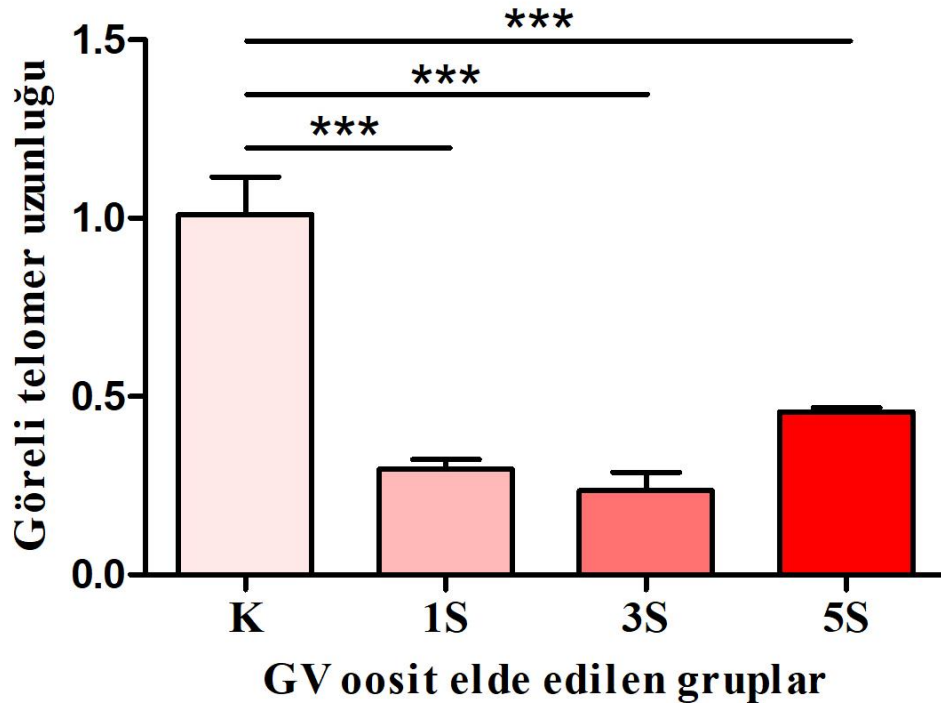
Şekil 4.18. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde *B1* geni için uygulanan qPCR erime eğrisi sonucu. Tek bir bölgede pik oluşması, qPCR sonucunda özgül ürünlerin oluştuğunu gösterdi.



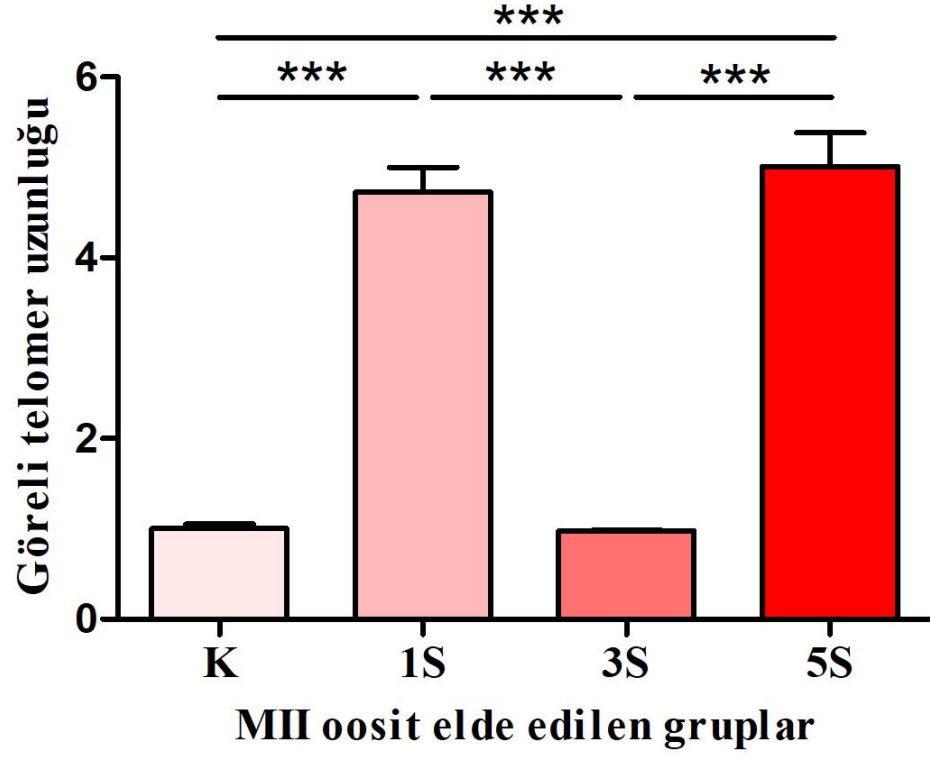
Şekil 4.19. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerin telomer uzunluğunu belirlemek için uygulanan qPCR sonucu. Bu analiz sonucunda, sigmoid eğriler oluştu.



Şekil 4.20. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerde telomer için uygulanan qPCR erime eğrisi (melting curve) sonucu. Kontrol ve süperovulasyon gruplarında elde edilen erime eğrisinin ortak bir bölgede pik vermesi sonuçların özgül olduğunu gösterdi.



Şekil 4.21. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV oositlerin görel telomer uzunluğu. 1S, 3S ve 5S gruplarına ait GV oositlerin telomer uzunluğunun kontrol grubuna göre daha kısa olduğu belirlendi ($P < 0.001$). $P < 0.05$, anlamlı kabul edildi. '*' işareti, istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. *** $P < 0.001$.



Şekil 4.22. Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen MII oositlerin görel telomer uzunluğu. Kontrol ve 3S gruplarından elde edilen MII oositlerin görel telomer uzunluğunun, 1S ve 5S gruplara kıyasla daha kısa olduğu belirlendi ($P<0.001$). $P<0.05$, anlamlı kabul edildi. ‘*’ işareti istatistiksel olarak anlamlılığı ifade etmektedir. *** $P<0.001$.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, tekrarlayan süperovulasyonun fare GV ve MII oositlerindeki *Terc* ve *Tert* genlerinin ekspresyon seviyesi, TERT protein düzeyi ve telomer uzunluğu üzerinde olan etkileri ilk defa detaylı bir şekilde araştırılmıştır. Yapmış olduğumuz analizler sonucunda, tekrarlayan süperovulasyona bağlı olarak *Terc* ve *Tert* genlerinin ekspresyon seviyesinde ve TERT protein düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı değişikliklerin olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, GV ve MII oositlerin telomer uzunluğunda da tekrarlayan süperovulasyona bağlı olarak değişikliklerin olduğu belirlenmiştir. Telomeraz alt bileşen genlerinin mRNA ve protein düzeyleri ile telomer uzunluğunda meydana gelen bu değişimlerin, gonadotropinlere ve bu hormonların uygulanma sayısına/dozuna bağlı olabileceği düşüncesindeyiz.

Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerdeki ilk olarak görelî *Terc* ekspresyon seviyeleri değerlendirilmiştir. Analizler sonucunda, GV oosit elde edilen 5S grubundaki görelî *Terc* ekspresyon seviyesinin, 1S grubuna kıyasla daha yüksek olduğu bulunmuştur. Benzer bir şekilde, MII oosit elde edilen 5S grubundaki görelî *Terc* RNA ekspresyon seviyesinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Yapılan literatür taramasında, süperovulasyon uygulamasının doğrudan *Terc* gen ekspresyon üzerine etkisini araştıran bir çalışmayla karşılaşılmasına rağmen, PMSG uygulamasının telomeraz aktivitesini arttırdığı ortaya konulmuştur (Mordechai ve ark., 2020). Ayrıca, farklı bir çalışmada, *TERC* düzeyindeki küçük değişikliklerin telomeraz aktivitesini ve telomer uzunluğunun düzenlenmesini etkileyebileceği belirtilmiştir (Greider, 2006). Bu bilgiler doğrultusunda, tekrarlayan PMSG uygulamasının *Terc* gen ekspresyon seviyesi için doğrudan arttırıcı bir etkisinin olabileceği düşünülmektedir. Bilindiği üzere, telomeraz enzimi şablon görevi gören *TERC* ve katalitik aktivasyonda görev alan TERT alt birimlerinden oluşmaktadır (Ozturk ve ark., 2014). Tekrarlayan PMSG uygulaması, telomeraz enziminin iki alt biriminin ekspresyonlarını ayrı ayrı etkileyebileceği gibi; tekrarlayan süperovulasyona bağlı olarak değişen *Tert* mRNA ve protein düzeyleri dolaylı olarak *Terc* RNA seviyesinin artışına neden olmuş olabilir. Bu verilere ek olarak, çalışmamızda MII oosit elde edilen 3S grubundaki *Terc* gen ekspresyon seviyesinin, 1S ve 5S grubuna kıyasla belirgin bir şekilde

azaldığı belirlenmiştir. Ekspresyon seviyesindeki bu azalış, belirli sayıda tekrarlanmış süperovulasyon uygulamasının doğrudan ya da dolaylı olarak *Terc* gen ekspresyonunu etkilemesinden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Ayrıca, *Terc* ekspresyon seviyesindeki bu değişim, telomeraz aktivitesini ve telomer uzunluğunun düzenlenmesini etkilemiş olması da olası görülmektedir.

Telomeraz enziminin katalitik proteini olarak görev alan TERT, yapılan birçok çalışmada telomeraz aktivitesinin göstergesi olarak kabul görmektedir (Armstrong ve ark., 2000; Dratwa ve ark., 2020) *Tert* mRNA ekspresyon seviyesi ve telomeraz aktivitesinin düzenlenmesinde rol oynayan faktörleri araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. *Tert* mRNA seviyesinin düzenlenmesinde etkisi olduğu düşünülen olası faktörlerden biri de süperovulasyondur. Mordechi ve arkadaşları (2020) tarafından yapılan bir çalışmada, PMSG uygulamasının *Tert* mRNA ekspresyon seviyesi, TERT protein düzeyi ve telomeraz enzim aktivitesini arttırdığı rapor edilmiştir (Mordechai ve ark., 2020). Buna ek olarak, östrojen ve progesteron hormonları da *Tert* gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığı bilinmektedir (Taheri ve ark., 2022). Bu konuda yayımlanan bazı çalışmalarda östrojen hormonunun, *TERT* promotör bölgesinde bulunan östrojen yanıt elemanına (ERE) bağlanarak bu genin ekspresyonunu düzenlediği bildirilmiştir (Kyo ve ark., 1999; Bayne ve ark., 2011). Bu konuda öne sürülen diğer bir görüş ise östrojen tarafından aktive olan C-MYC'nin dolaylı olarak *Tert* ekspresyon seviyesini düzenleyebildiğidir (Kyo ve ark., 1999). Bu bilgilerle tutarlı olarak, östrojen hormonunun yokluğunda telomeraz aktivitesinin inhibe olduğu ve telomer uzunluğunun kısaldığı rapor edilmiştir (Bayne ve ark., 2011). Progesteron hormonu ise *Tert* gen ekspresyonunu inhibe edici özelliğe sahip olduğu da bilinmektedir (Wang Z. ve ark., 2000; Taheri ve ark., 2022). Tüm bu bilgiler ışığında, projemizde GV oosit elde edilen 1S ve 5S grubundaki *Tert* mRNA seviyesindeki artışın olası nedenlerinden birinin uygulanmış olan tekrarlı PMSG hormonunun *Tert* gen ekspresyonunu etkilemesi olabileceği düşünülmektedir. Diğer bir olası neden ise tekrarlayan süperovulasyon uygulamasına bağlı olarak değişen östrojen seviyesi, *Tert* ekspresyon düzeyini arttırmış olabilir. Ayrıca, GV oosit elde edilen kontrol ve süperovulasyon gruplarının telomer uzunluğu ve *Tert* mRNA düzeyleri arasındaki zıtlık dikkat çekmektedir. Diğer bir deyişle, kısa telomerlere sahip olan süperovulasyon gruplarının daha yüksek *Tert* ekspresyonuna sahip olduğu belirlenmiştir. Bu verilerden

yola çıkarak telomeraz aktivitesiyle karakterize olan *Tert* ekspresyon seviyesindeki artışın, telomer uzunluğunu korumak ve uzatmak amacıyla gerçekleştiği tahmin edilmektedir.

Çalışmamızda, MII oosit elde edilen 1S grubundaki *Tert* mRNA seviyesinin, kontrol, 3S ve 5S grubuna kıyasla belirgin bir şekilde yüksek olduğu tespit edilmiştir. *Tert* mRNA seviyesindeki bu artışın bir kez uygulanmış olan süperovulasyon protokolünün akut etkisinden kaynaklanabileceği düşüncesindeyiz. Buna ek olarak, süperovulasyonun östrojen ve progesteron hormon düzeylerini değiştirebildiği bilinmektedir (Zhang J. ve ark., 2018; Lu ve ark., 2019; Zhang S. ve ark., 2023). Bu nedenle, tekrarlayan süperovulasyon sonucu değişen östrojen ve progesteron düzeyi *Tert* gen ekspresyonunu değiştirmiş olabilir. Bilindiği üzere, yüksek protein seviyesine ulaşıldığında, daha fazla mRNA üretimine ihtiyaç duyulmamaktadır (Maier ve ark., 2009; Liu Y. ve ark., 2016). MII oosit elde edilen 3S ve 5S grubundaki *Tert* ekspresyon seviyesindeki azalış, bu gruplardaki TERT protein seviyesinin yükselmesi ve daha fazla *Tert* mRNA üretimine ihtiyaç duyulmamasından kaynaklanmış olabilir. Süperovulasyonun, *Tert* mRNA ve protein düzeyleri ile telomeraz aktivasyonu arasında doğru orantı olduğu bilinmesine rağmen, bunu hangi mekanizmalar üzerinden gerçekleştirdiği halen bilinmezliğini korumaktadır. *Tert* mRNA üretimini düzenleyen faktör ve mekanizmaların aydınlatılması için daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız.

Çalışmamızda immüno Floresan yöntemi ile TERT proteininin hücre içi yerleşimi ve protein düzeyi değerlendirilmiştir. Daha önce yayımlanmış olan çalışmalarımızla tutarlı olarak, TERT proteininin GV ve MII oositlerde hem nüklear hem de sitoplazmik alanda yerleşim gösterdiği belirlenmiştir (Kosebent ve ark., 2020; Uysal ve ark., 2021). Ayrıca, MII oositlerin polar cisimciklerinde de TERT proteininin varlığı göze çarpmaktadır. TERT proteininin kanonik ve kanonik olmayan rolleri dikkate alındığında hem nüklear hem de sitoplazmik alanda yerleşim göstermesinin beklenen bir sonuç olduğu düşünülmektedir. Tekrarlayan süperovulasyona bağlı olarak, MII oosit elde edilen 1S grubundan 5S grubuna doğru kademeli olarak TERT düzeyinin arttığı belirlenmiştir. Ayrıca, 3S ve 5S grubundaki TERT protein düzeyleri, kontrol grubuna göre belirgin bir şekilde yüksek bulunmuştur. Bu artışın nedeninin, tekrarlayan süperovulasyon

uygulamasý (PMSG ve hCG hormonlarının etkisine baēlı) olduēu dūřúnılmaktadır. Ayrıca, tekrarlayan süperovulasyon uygulamasý sonucu deēiřtiēi dūřúnūlen östrojen ve progesteron hormon düzeyleri, *Tert* mRNA ve protein düzeylerinin artýřını tetiklemiř olabilir. Bilindiēi üzere, tekrarlayan süperovulasyona baēlı olarak oksidatif strete artmaktadır (Chao ve ark., 2005; Zhang J. ve ark., 2018). TERT proteininin mitokondriyondaki kanonikal olmayan rolü göz önüne alındıēında, süperovulasyon sonucu yükselen oksidatif hasar da TERT protein düzeyini arttırmıř olabilir. Bu konulara yönelik *in vitro* alıřmaların, mekanizmanın ortaya konulması açısından deēerli olabileceēi tahmin edilmektedir.

Kontrol ve süperovulasyon gruplarından elde edilen GV ve MII oositlerin görel telomer uzunlukları da qPCR yöntemiyle belirlendi. Yapılan deēerlendirme sonucunda 1S, 3S ve 5S gruplarından elde edilen GV oositlerin telomer uzunluklarının kontrole kıyasla daha kısa olduēu tespit edildi. Bilindiēi üzere, tekrarlayan süperovulasyon uygulamasına baēlı olarak oksidatif stres artışı görülmektedir (Chao ve ark., 2005; Zhang J. ve ark., 2018). Bu bilgi doērultusunda, süperovulasyon gruplarında görülen bu telomer uzunluēundaki azalışın olası nedenlerinden birisinin oksidatif stres artışı olabileceēi dūřúnılmaktadır. Ayrıca, kontrol ve 3S gruplarından elde edilen MII oositlerin telomer uzunluēunun, 1S ve 5S gruplarından elde edilen MII oositlere kıyasla daha kısa olduēu belirlenmiştir. Süperovulasyon uygulamasının, telomer uzunluēu üzerindeki etkilerini araştıran sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Berteli ve arkadaşlarının (2022) fare blastosistleri üzerinde yaptıēı bir çalışmada, süperovulasyon uygulamasının telomer uzunluēunu arttırdıēı bildirilmiştir (Berteli ve ark., 2022). Bu bilgi ışığında, 1S ve 5S gruplarından elde edilen oositlerde telomer uzunluēundaki artışın nedenlerinden birisinin tekrarlayan süperovulasyon olduēu dūřúnılmaktadır. Ayrıca, tekrarlayan süperovulasyona baēlı olarak östrojen ve progesteron hormon düzeyleri telomeraz aktivitesini etkileyerek dolaylı olarak telomer uzunluēunu arttırmış olabilir. Bilindiēi üzere, *TERC* ekspresyon düzeyi telomer uzunluēunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Greider, 2006). Bununla tutarlı olarak, *TERC* yokluēu telomer kısalmasına yol açmaktadır (Blasco ve ark., 1997; Goldman ve ark., 2005). *Terc* görel ekspresyonu deēerlendirmesinde, MII oosit elde edilen 3S grubundaki *Terc* ekspresyonunun daha dūřük olduēu bulunmuştur. Bu veriler göz önüne alındıēında, 3S grubundan elde edilen MII oositlerin telomer uzunluēun daha

kısa olmasının nedenlerinden birisinin *Terc* ekspresyon seviyesinin düşük olması olabileceği kanısındayız.

Sonuç olarak, tekrarlayan süperovulasyon telomeraz alt bileşenleri olan *Terc* ve *Tert* gen ekspresyon seviyeleri, TERT protein düzeyi ve telomer uzunluğunda değişimlere neden olabildiği ilk defa ortaya konulmuştur. YÜT'ün temel basamaklarından biri olan süperovulasyonun, hangi mekanizma(lar) yoluyla telomer uzunluğu ve telomeraz aktivitesini düzenlediğinin belirlenmesine yönelik yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu kanısındayız. Bu etki mekanizmasının aydınlatılması, YÜT sonucunda oosit ve embriyolarda görülebilen bazı gelişimsel bozuklukların alt yapısının belirlenmesinde önemli bir adım olacaktır. Ayrıca, yeni YÜT protokollerinin ve tedavi stratejilerinin geliştirilmesine de katkılar sağlanabileceği düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, tekrarlayan süperovulasyonun fare GV ve MII oositlerindeki *Terc* ve *Tert* genlerinin ekspresyon seviyesi, TERT protein düzeyi ve telomer uzunluğu üzerine olan etkileri ayrıntılı bir şekilde araştırılmıştır. Çalışmadan elde edilen sonuçlar ve öneriler maddeler halinde aşağıda belirtilmiştir.

1. GV oosit elde edilen 5S grubundaki *Terc* görelî ekspresyon seviyesi, 1S grubuna kıyasla daha yüksek bulunmuştur. MII oosit elde edilen 5S grubundaki görelî *Terc* RNA seviyesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı tespit edilmiştir. Ayrıca, MII oosit elde edilen 3S grubundaki *Terc* seviyesi ise 1S ve 5S gruplarına kıyasla daha düşük olduğu bulunmuştur.
2. GV oosit elde edilen 1S ve 5S grubundaki *Tert* mRNA seviyesinin, kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir. MII oosit elde edilen 1S grubundaki *Tert* mRNA seviyesi kontrol, 3S ve 5S gruplarına kıyasla belirgin bir şekilde artmıştır.
3. TERT proteini, GV oositlerde yoğun olarak çekirdekte ve daha az yoğun olarak da sitoplazmada yerleşim gösterdiği belirlenmiştir. Polar cisimcikler ve MII oositlerde ise TERT yoğun olarak sitoplazma ve daha az yoğun olarak da çekirdek bölgesinde tespit edilmiştir. TERT proteinin hem sitoplazmik hem de nüklear yerleşimi göz önüne alındığında, bu proteinin telomer uzaması dışındaki fonksiyonlarının belirlenmesine yönelik yeni çalışmaların gerekli olduğu düşüncesindeyiz.
4. GV oosit elde edilen kontrol ve tekrarlayan süperovulasyon grupları arasında TERT protein düzeyi ile ilgili anlamlı bir fark gözlemlenmemiştir. TERT protein düzeyi, MII oosit elde edilen 1S grubundan 5S grubuna doğru kademeli bir şekilde yükselirken; 3S ve 5S gruplarındaki TERT düzeyinin, kontrol grubuna kıyasla arttığı belirlenmiştir.
5. 1S, 3S ve 5S gruplarından elde edilen GV oositlerin telomer uzunluğunun, kontrol grubundan elde edilen GV oositlere kıyasla daha kısa olduğu belirlenmiştir. Kontrol ve 3S gruplarına ait MII oositlerin görelî telomer uzunluğu, 1S ve 5S gruplarına ait MII oositlere kıyasla daha kısa olduğu tespit edilmiştir. Tekrarlayan süperovulasyon uygulaması sonucunda değişen telomer uzunluğunun, hangi etki mekanizması tarafından düzenlendiğini aydınlatacak yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu düşüncesindeyiz. Tekrarlayan süperovulasyonun telomer yapısı üzerindeki etki

mekanizmasının ortaya konulması durumunda, YÜT uygulamasına bağı oosit ve embriyolarda görülebilen gelişim bozukluklarının altında yatan mekanizmaların aydınlatılması için önemli bir adım olacağı kanısındayız.



KAYNAKLAR

- Armstrong L, Lako M, Lincoln J, Cairns PM, Hole N. Tert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mech Dev.* 2000; 97: 109-116.
- Bayne S, Li H, Jones ME, Pinto AR, van Sinderen M, Drummond A , ve ark. Estrogen deficiency reversibly induces telomere shortening in mouse granulosa cells and ovarian aging in vivo. *Protein Cell.* 2011; 2: 333-346.
- Behringer R, Gertsenstein M, Nagy KV, Nagy A. Administration of gonadotropins for superovulation in mice. *Cold Spring Harb Protoc.* 2018; 2018.
- Benarroch-Popivker D, Pisano S, Mendez-Bermudez A, Lototska L, Kaur P, Bauwens S , ve ark. Trf2-mediated control of telomere DNA topology as a mechanism for chromosome-end protection. *Mol Cell.* 2016; 61: 274-286.
- Berteli TS, Wang F, Kohlrausch FB, Da Luz CM, Oliveira FV, Keefe DL , ve ark. Impact of superovulation and in vitro fertilization on line-1 copy number and telomere length in c57bl/6 j mice blastocysts. *Mol Biol Rep.* 2022; 49: 4909-4917.
- Blasco MA, Funk W, Villeponteau B, Greider CW. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase rna. *Science.* 1995; 269: 1267-1270.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA , ve ark. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase rna. *Cell.* 1997; 91: 25-34.
- Boyraz B, Moon DH, Segal M, Muosieyiri MZ, Aykanat A, Tai AK , ve ark. Posttranscriptional manipulation of terc reverses molecular hallmarks of telomere disease. *J Clin Invest.* 2016; 126: 3377-3382.
- Bryan TM. G-quadruplexes at telomeres: Friend or foe? *Molecules.* 2020; 25.
- Byers SL, Wiles MV, Dunn SL, Taft RA. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS One.* 2012; 7: e35538.
- Cai Y, Liu H, Song E, Wang L, Xu J, He Y , ve ark. Deficiency of telomere-associated repressor activator protein 1 precipitates cardiac aging in mice via p53/pparalpha signaling. *Theranostics.* 2021; 11: 4710-4727.
- Calado RT, Young NS. Telomere maintenance and human bone marrow failure. *Blood.* 2008; 111: 4446-4455.
- Calado RT, Young NS. Telomere diseases. *N Engl J Med.* 2009; 361: 2353-2365.
- Caligara C, Navarro J, Vargas G, Simon C, Pellicer A, Remohi J. The effect of repeated controlled ovarian stimulation in donors. *Hum Reprod.* 2001; 16: 2320-2323.
- Callicott RJ, Womack JE. Real-time pcr assay for measurement of mouse telomeres. *Comp Med.* 2006; 56: 17-22.
- Celli GB, de Lange T. DNA processing is not required for atm-mediated telomere damage response after trf2 deletion. *Nat Cell Biol.* 2005; 7: 712-718.
- Chao HT, Lee SY, Lee HM, Liao TL, Wei YH, Kao SH. Repeated ovarian stimulations induce oxidative damage and mitochondrial DNA mutations in mouse ovaries. *Ann N Y Acad Sci.* 2005; 1042: 148-156.

- Chebly A, Ropio J, Baldasseroni L, Prochazkova-Carlotti M, Idrissi Y, Ferrer J , ve ark. Telomeric repeat-containing rna (terra): A review of the literature and first assessment in cutaneous t-cell lymphomas. *Genes (Basel)*. 2022; 13.
- Chiang YJ, Kim SH, Tessarollo L, Campisi J, Hodes RJ. Telomere-associated protein tin2 is essential for early embryonic development through a telomerase-independent pathway. *Mol Cell Biol*. 2004; 24: 6631-6634.
- Choi J, Southworth LK, Sarin KY, Venteicher AS, Ma W, Chang W , ve ark. Tert promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a myc- and wnt-related developmental program. *PLoS Genet*. 2008; 4: e10.
- de Lange T. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev*. 2005; 19: 2100-2110.
- de Lange T. How telomeres solve the end-protection problem. *Science*. 2009; 326: 948-952.
- de Lange T. Shelterin-mediated telomere protection. *Annu Rev Genet*. 2018; 52: 223-247.
- de Mouzon J, Chambers GM, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, Banker M , ve ark. International committee for monitoring assisted reproductive technologies world report: Assisted reproductive technology 2012daggar. *Hum Reprod*. 2020; 35: 1900-1913.
- Denchi EL, de Lange T. Protection of telomeres through independent control of atm and atr by trf2 and pot1. *Nature*. 2007; 448: 1068-1071.
- Depalo R, Jayakrishan K, Garruti G, Totaro I, Panzarino M, Giorgino F , ve ark. GnRH agonist versus gnrh antagonist in in vitro fertilization and embryo transfer (ivf/et). *Reprod Biol Endocrinol*. 2012; 10: 26.
- Diedrich K, Ludwig M, Felberbaum RE. The role of gonadotropin-releasing hormone antagonists in in vitro fertilization. *Semin Reprod Med*. 2001; 19: 213-220.
- Dong G, Guo Y, Cao H, Zhou T, Zhou Z, Sha J , ve ark. Long-term effects of repeated superovulation on ovarian structure and function in rhesus monkeys. *Fertil Steril*. 2014; 102: 1452-1457 e1451.
- Dratwa M, Wysoczanska B, Lacina P, Kubik T, Bogunia-Kubik K. Tert-regulation and roles in cancer formation. *Front Immunol*. 2020; 11: 589929.
- Dunlop CE, Anderson RA. The regulation and assessment of follicular growth. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2014; 244: 13-17; discussion 17.
- Ertzeid G, Storeng R. Adverse effects of gonadotrophin treatment on pre- and postimplantation development in mice. *J Reprod Fertil*. 1992; 96: 649-655.
- Ertzeid G, Storeng R. The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Hum Reprod*. 2001; 16: 221-225.
- Esencan E, Beroukhim G, Seifer DB. Age-related changes in folliculogenesis and potential modifiers to improve fertility outcomes - a narrative review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2022; 20: 156.
- Fortier AL, Lopes FL, Darricarrere N, Martel J, Trasler JM. Superovulation alters the expression of imprinted genes in the midgestation mouse placenta. *Hum Mol Genet*. 2008; 17: 1653-1665.
- Garrels W, Kues WB, Herrmann D, Holler S, Baulain U, Niemann H. Ectopic expression of human telomerase rna component results in increased telomerase activity and elongated telomeres in bovine blastocysts. *Biol Reprod*. 2012; 87: 95.

- Goldman F, Bouarich R, Kulkarni S, Freeman S, Du HY, Harrington L , ve ark. The effect of terc haploinsufficiency on the inheritance of telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102: 17119-17124.
- Greider CW. Telomerase rna levels limit the telomere length equilibrium. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006; 71: 225-229.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell*. 1985; 43: 405-413.
- Gu P, Jia S, Takasugi T, Tesmer VM, Nandakumar J, Chen Y , ve ark. Distinct functions of pot1 proteins contribute to the regulation of telomerase recruitment to telomeres. *Nat Commun*. 2021; 12: 5514.
- Hiyama E, Hiyama K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer*. 2007; 96: 1020-1024.
- Hu C, Rai R, Huang C, Broton C, Long J, Xu Y , ve ark. Structural and functional analyses of the mammalian tin2-tpp1-trf2 telomeric complex. *Cell Res*. 2017; 27: 1485-1502.
- Huang JY, Rosenwaks Z. Assisted reproductive techniques. *Methods Mol Biol*. 2014; 1154: 171-231.
- Huffman SR, Pak Y, Rivera RM. Superovulation induces alterations in the epigenome of zygotes, and results in differences in gene expression at the blastocyst stage in mice. *Mol Reprod Dev*. 2015; 82: 207-217.
- Jose SS, Tidu F, Burilova P, Kepak T, Bendickova K, Fric J. The telomerase complex directly controls hematopoietic stem cell differentiation and senescence in an induced pluripotent stem cell model of telomeropathy. *Front Genet*. 2018; 9: 345.
- Kalthur G, Salian SR, Nair R, Mathew J, Adiga SK, Kalthur SG , ve ark. Distribution pattern of cytoplasmic organelles, spindle integrity, oxidative stress, octamer-binding transcription factor 4 (oct4) expression and developmental potential of oocytes following multiple superovulation. *Reprod Fertil Dev*. 2016; 28: 2027-2038.
- Kashimada K, Koopman P. Sry: The master switch in mammalian sex determination. *Development*. 2010; 137: 3921-3930.
- Keefe DL, Liu L, Marquard K. Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64: 139-143.
- Kendellen MF, Barrientos KS, Counter CM. Pot1 association with trf2 regulates telomere length. *Mol Cell Biol*. 2009; 29: 5611-5619.
- Kosebent EG, Uysal F, Ozturk S. Telomere length and telomerase activity during folliculogenesis in mammals. *J Reprod Dev*. 2018; 64: 477-484.
- Kosebent EG, Uysal F, Ozturk S. The altered expression of telomerase components and telomere-linked proteins may associate with ovarian aging in mouse. *Exp Gerontol*. 2020; 138: 110975.
- Kotiyal S, Evason KJ. Exploring the interplay of telomerase reverse transcriptase and beta-catenin in hepatocellular carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2021; 13.
- Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Zhuo W, Fujimoto K, Nishio Y , ve ark. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res*. 1999; 59: 5917-5921.
- Lazzerini-Denchi E, Sfeir A. Stop pulling my strings - what telomeres taught us about the DNA damage response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016; 17: 364-378.
- Lee J, Park H, Moon S, Do JT, Hong K, Choi Y. Expression and regulation of cd73 during the estrous cycle in mouse uterus. *Int J Mol Sci*. 2021; 22.

- Lee M, Ahn JI, Lee AR, Ko DW, Yang WS, Lee G , ve ark. Adverse effect of superovulation treatment on maturation, function and ultrastructural integrity of murine oocytes. *Mol Cells*. 2017; 40: 558-566.
- Lin E, Li Z, Huang Y, Ru G, He P. High dosages of equine chorionic gonadotropin exert adverse effects on the developmental competence of ivf-derived mouse embryos and cause oxidative stress-induced aneuploidy. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8: 609290.
- Liu B, Wang JL, Wang XM, Zhang C, Dai JG, Huang XM , ve ark. Reparative effects of lycium barbarum polysaccharide on mouse ovarian injuries induced by repeated superovulation. *Theriogenology*. 2020; 145: 115-125.
- Liu L, Bailey SM, Okuka M, Munoz P, Li C, Zhou L , ve ark. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol*. 2007; 9: 1436-1441.
- Liu L, Blasco M, Trimarchi J, Keefe D. An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development. *Dev Biol*. 2002; 249: 74-84.
- Liu Y, Beyer A, Aebersold R. On the dependency of cellular protein levels on mrna abundance. *Cell*. 2016; 165: 535-550.
- Longhese MP. DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. *Genes Dev*. 2008; 22: 125-140.
- Lopes AC, Oliveira PF, Sousa M. Shedding light into the relevance of telomeres in human reproduction and male factor infertility. *Biol Reprod*. 2019; 100: 318-330.
- Lototska L, Yue JX, Li J, Giraud-Panis MJ, Songyang Z, Royle NJ , ve ark. Human rap1 specifically protects telomeres of senescent cells from DNA damage. *EMBO Rep*. 2020; 21: e49076.
- Lu CL, Yan ZQ, Song XL, Xu YY, Zheng XY, Li R , ve ark. Effect of exogenous gonadotropin on the transcriptome of human granulosa cells and follicular fluid hormone profiles. *Reprod Biol Endocrinol*. 2019; 17: 49.
- Luo C, Zuniga J, Edison E, Palla S, Dong W, Parker-Thornburg J. Superovulation strategies for 6 commonly used mouse strains. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011; 50: 471-478.
- Maier T, Guell M, Serrano L. Correlation of mrna and protein in complex biological samples. *FEBS Lett*. 2009; 583: 3966-3973.
- Mao L, Lou H, Lou Y, Wang N, Jin F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. *Reprod Biomed Online*. 2014; 28: 284-299.
- McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*. 2012: e4389.
- Miyamoto K, Sato EF, Kasahara E, Jikumaru M, Hiramoto K, Tabata H , ve ark. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. *Free Radic Biol Med*. 2010; 49: 674-681.
- Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. The developing human-e-book: Clinically oriented embryology. Elsevier Health Sciences; 2018.
- Mordechai A, Wasserman M, Abramov M, Ben-Menahem D, Har-Vardi I, Levitas E , ve ark. Increasing telomerase enhanced steroidogenic genes expression and steroid hormones production in rat and human granulosa cells and in mouse ovary. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2020; 197: 105551.
- Muller HJ. The remaking of chromosomes. *Collecting net*. 1938; 8: 198.

- Nagahama Y, Chakraborty T, Paul-Prasanth B, Ohta K, Nakamura M. Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. *Physiol Rev.* 2021; 101: 1237-1308.
- Nie X, Dai Y, Zheng Y, Bao D, Chen Q, Yin Y , ve ark. Establishment of a mouse model of premature ovarian failure using consecutive superovulation. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 51: 2341-2358.
- O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010; 11: 171-181.
- Okamoto K, Iwano T, Tachibana M, Shinkai Y. Distinct roles of trf1 in the regulation of telomere structure and lengthening. *J Biol Chem.* 2008; 283: 23981-23988.
- Oktay K, Newton H, Mullan J, Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in scid/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod.* 1998; 13: 1133-1138.
- Ozturk S, Sozen B, Demir N. Telomere length and telomerase activity during oocyte maturation and early embryo development in mammalian species. *Mol Hum Reprod.* 2014; 20: 15-30.
- Ozturk S, Yaba-Ucar A, Sozen B, Mutlu D, Demir N. Superovulation alters embryonic poly(a)-binding protein (epab) and poly(a)-binding protein, cytoplasmic 1 (pabpc1) gene expression in mouse oocytes and early embryos. *Reprod Fertil Dev.* 2016; 28: 375-383.
- Pacchiarotti A, Selman H, Valeri C, Napoletano S, Sbracia M, Antonini G , ve ark. Ovarian stimulation protocol in ivf: An up-to-date review of the literature. *Curr Pharm Biotechnol.* 2016; 17: 303-315.
- Padmanabhan V, Cardoso RC. Neuroendocrine, autocrine, and paracrine control of follicle-stimulating hormone secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 2020; 500: 110632.
- Pardo B, Marcand S. Rap1 prevents telomere fusions by nonhomologous end joining. *EMBO J.* 2005; 24: 3117-3127.
- Rajavel M, Mullins MR, Taylor DJ. Multiple facets of tpp1 in telomere maintenance. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1844: 1550-1559.
- Ray S, Bandaria JN, Qureshi MH, Yildiz A, Balci H. G-quadruplex formation in telomeres enhances pot1/tpp1 protection against rpa binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111: 2990-2995.
- Reichman DE, Chung P, Meyer L, Greenwood E, Davis O, Rosenwaks Z. Consecutive gonadotropin-releasing hormone-antagonist in vitro fertilization cycles: Does the elapsed time interval between successive treatments affect outcomes? *Fertil Steril.* 2013; 99: 1277-1282.
- Rimon-Dahari N, Yerushalmi-Heinemann L, Alyagor L, Dekel N. Ovarian folliculogenesis. *Results Probl Cell Differ.* 2016; 58: 167-190.
- Rodriguez Gutierrez D, Biason-Lauber A. Pluripotent cell models for gonadal research. *Int J Mol Sci.* 2019; 20.
- Rosen J, Jakobs P, Ale-Agha N, Altschmied J, Haendeler J. Non-canonical functions of telomerase reverse transcriptase - impact on redox homeostasis. *Redox Biol.* 2020; 34: 101543.
- Ross MH, Pawlina W. *Histology.* Lippincott Williams & Wilkins; 2006.
- Russo V, Berardinelli P, Martelli A, Di Giacinto O, Nardinocchi D, Fantasia D , ve ark. Expression of telomerase reverse transcriptase subunit (tert) and telomere sizing in pig ovarian follicles. *J Histochem Cytochem.* 2006; 54: 443-455.

- Sadler TW. Langman's medical embryology. 2017.
- Schaetzlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M, Manns MP , ve ark. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101: 8034-8038.
- Schildhorn C, Jacobi C, Weissbrodt A, Hermstedt C, Westhoff JH, Homme M , ve ark. Renal phenotype of young and old telomerase-deficient mice. *Mech Ageing Dev*. 2015; 150: 65-73.
- Shammas MA. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2011; 14: 28-34.
- Shrestha D, La X, Feng HL. Comparison of different stimulation protocols used in in vitro fertilization: A review. *Ann Transl Med*. 2015; 3: 137.
- Sighinolfi G, Grisendi V, La Marca A. How to personalize ovarian stimulation in clinical practice. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2017; 18: 148-153.
- Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G , ve ark. Control of human telomere length by trf1 and trf2. *Mol Cell Biol*. 2000; 20: 1659-1668.
- Solovova OA, Chernykh VB. Genetics of oocyte maturation defects and early embryo development arrest. *Genes (Basel)*. 2022; 13.
- Sullivan MW, Stewart-Akers A, Krasnow JS, Berga SL, Zeleznik AJ. Ovarian responses in women to recombinant follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone (lh): A role for lh in the final stages of follicular maturation. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999; 84: 228-232.
- Taheri M, Ghafouri-Fard S, Najafi S, Kallenbach J, Keramatfar E, Atri Roozbahani G , ve ark. Hormonal regulation of telomerase activity and htert expression in steroid-regulated tissues and cancer. *Cancer Cell Int*. 2022; 22: 258.
- Tan J, Lan L. The DNA secondary structures at telomeres and genome instability. *Cell Biosci*. 2020; 10: 47.
- Tang SB, Yang LL, Zhang TT, Wang Q, Yin S, Luo SM , ve ark. Multiple superovulations alter histone modifications in mouse early embryos. *Reproduction*. 2019; 157: 511-523.
- Teixeira J, Rueda BR, Pru JK. Uterine stem cells. In *Stembook*. Cambridge (MA); 2008.
- Thompson CAH, Wong JMY. Non-canonical functions of telomerase reverse transcriptase: Emerging roles and biological relevance. *Curr Top Med Chem*. 2020; 20: 498-507.
- Tire B, Ozturk S. Potential effects of assisted reproductive technology on telomere length and telomerase activity in human oocytes and early embryos. *J Ovarian Res*. 2023; 16: 130.
- Toupance S, Fattet AJ, Thornton SN, Benetos A, Gueant JL, Kosciński I. Ovarian telomerase and female fertility. *Biomedicines*. 2021; 9.
- Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT, Jr. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet*. 2011; 7: e1002161.
- Turner KJ, Vasu V, Griffin DK. Telomere biology and human phenotype. *Cells*. 2019; 8.
- Turner S, Hartshorne GM. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Mol Hum Reprod*. 2013; 19: 510-518.
- Turner S, Wong HP, Rai J, Hartshorne GM. Telomere lengths in human oocytes, cleavage stage embryos and blastocysts. *Mol Hum Reprod*. 2010; 16: 685-694.

- Uysal F, Kosebent EG, Toru HS, Ozturk S. Decreased expression of tert and telomeric proteins as human ovaries age may cause telomere shortening. *J Assist Reprod Genet.* 2021; 38: 429-441.
- Uysal F, Ozturk S. Embryonic poly(a)-binding protein is differently expressed and interacts with the messenger rnas in the mouse oocytes and early embryos. *J Cell Biochem.* 2019; 120: 4694-4709.
- Uysal F, Ozturk S, Akkoyunlu G. Superovulation alters DNA methyltransferase protein expression in mouse oocytes and early embryos. *J Assist Reprod Genet.* 2018; 35: 503-513.
- Van Blerkom J, Davis P. Differential effects of repeated ovarian stimulation on cytoplasmic and spindle organization in metaphase ii mouse oocytes matured in vivo and in vitro. *Hum Reprod.* 2001; 16: 757-764.
- Van der Auwera I, D'Hooghe T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Hum Reprod.* 2001; 16: 1237-1243.
- van Steensel B, de Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein trf1. *Nature.* 1997; 385: 740-743.
- van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. Trf2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell.* 1998; 92: 401-413.
- Varela E, Schneider RP, Ortega S, Blasco MA. Different telomere-length dynamics at the inner cell mass versus established embryonic stem (es) cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108: 15207-15212.
- Vohhodina J, Goehring LJ, Liu B, Kong Q, Botchkarev VV, Jr., Huynh M , ve ark. Brca1 binds terra rna and suppresses r-loop-based telomeric DNA damage. *Nat Commun.* 2021; 12: 3542.
- Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciú P, Cech TR , ve ark. The pot1-tpp1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature.* 2007; 445: 506-510.
- Wang Q, Zhao SX, He JN, Zhao H, Gu BX, Xie JK , ve ark. Repeated superovulation accelerates primordial follicle activation and atresia. *Cells.* 2022; 12.
- Wang Z, Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Yatabe N, Maida Y , ve ark. Progesterone regulates human telomerase reverse transcriptase gene expression via activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 2000; 60: 5376-5381.
- Wasielak-Politowska M, Kordowitzki P. Chromosome segregation in the oocyte: What goes wrong during aging. *Int J Mol Sci.* 2022; 23.
- Wdowiak A, Bojar I. Ovarian stimulation with human and recombinant gonadotropin - comparison of in vitro fertilization efficiency with use of time-lapse monitoring. *Reprod Health.* 2015; 12: 113.
- Williams CJ, Erickson GF. Morphology and physiology of the ovary. In KR Feingold, B Anawalt, MR Blackman, A Boyce, G Chrousos, E Corpas, WW de Herder, K Dhatariya, K Dungan, J Hofland, S Kalra, G Kaltsas, N Kapoor, C Koch, P Kopp, M Korbonits, CS Kovacs, W Kuohung, B Laferrere, M Levy, EA McGee, R McLachlan, M New, J Purnell, R Sahay, AS Shah, F Singer, MA Sperling, CA Stratakis, DL Trence, DP Wilson (Eds.), Endotext. South Dartmouth (MA); 2000.
- Wright DL, Jones EL, Mayer JF, Oehninger S, Gibbons WE, Lanzendorf SE. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod.* 2001; 7: 947-955.

- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet.* 1996; 18: 173-179.
- Wyatt HD, West SC, Beattie TL. Interpreting telomerase structure and function. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38: 5609-5622.
- Xiao P, Nie J, Wang X, Lu K, Lu S, Liang X. Melatonin alleviates the deterioration of oocytes from mice subjected to repeated superovulation. *J Cell Physiol.* 2019; 234: 13413-13422.
- Xie JK, Wang Q, Zhang TT, Yin S, Zhang CL, Ge ZJ. Repeated superovulation may affect mitochondrial functions of cumulus cells in mice. *Sci Rep.* 2016; 6: 31368.
- Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, Akutsu H, et al. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013; 11: 108.
- Yang Q, Zheng YL, Harris CC. Pot1 and trf2 cooperate to maintain telomeric integrity. *Mol Cell Biol.* 2005; 25: 1070-1080.
- Yu B, Smith TH, Battle SL, Ferrell S, Hawkins RD. Superovulation alters global DNA methylation in early mouse embryo development. *Epigenetics.* 2019; 14: 780-790.
- Yuan X, Larsson C, Xu D. Mechanisms underlying the activation of tert transcription and telomerase activity in human cancer: Old actors and new players. *Oncogene.* 2019; 38: 6172-6183.
- Zahler AM, Williamson JR, Cech TR, Prescott DM. Inhibition of telomerase by g-quartet DNA structures. *Nature.* 1991; 350: 718-720.
- Zhang H, Liu YQ, Lu GX, Gong F. Live birth in a 46-year-old woman using microdose gnRH agonist flare-up protocol combined with gnRH antagonist: A case report. *Clin Case Rep.* 2016; 4: 1107-1111.
- Zhang J, Lai Z, Shi L, Tian Y, Luo A, Xu Z, et al. Repeated superovulation increases the risk of osteoporosis and cardiovascular diseases by accelerating ovarian aging in mice. *Aging (Albany NY).* 2018; 10: 1089-1102.
- Zhang JM, Zou L. Alternative lengthening of telomeres: From molecular mechanisms to therapeutic outlooks. *Cell Biosci.* 2020; 10: 30.
- Zhang S, Ma Y, Zuo Q, Liu M, Yu Z, Sun Y, et al. Repeated controlled ovarian stimulation-induced ovarian and uterine damage in mice through the pi3k/akt signaling pathway. *Hum Cell.* 2023; 36: 234-243.
- Zhao S, Wang F, Liu L. Alternative lengthening of telomeres (alt) in tumors and pluripotent stem cells. *Genes (Basel).* 2019; 10.
- Zheng Q, Huang J, Wang G. Mitochondria, telomeres and telomerase subunits. *Front Cell Dev Biol.* 2019; 7: 274.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Betül	Uyruğu	T.C.
Soyadı	TİRE	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	İbrahim Önal Anadolu Öğretmen Lisesi	2014
Lisans	İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2020
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Üreme Biyolojisi Programı	2023

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YÖKDİL	68.75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Fare oosit ve erken dönem embriyolarda Epab proteininin ilişkili olduğu translasyonel mekanizmaların ve fosforilasyon durumunun belirlenmesi	Tübitak-1001 (Proje no: 218S612)	2018-2021
Tekrarlayan Süperovulasyonun Fare Oositlerindeki Telomeraz Ekspresyonu ve Telomer Uzunluğu Üzerine Etkisinin Belirlenmesi	Tübitak-1002 (Proje no:221S182) Akdeniz Üniversitesi-BAP (Proje no: TYL-2022-5826)	2021-2023

Burslar-Ödüller:

Sözlü Sunum Birincilik Ödülü

10. Ulusal Üreme Sağlığı ve İnfertilitesi Kongresi, 10 Kasım 2022, KKTC.

Yayınlar ve Bildiriler:

1. **Betül Tire**, Günel Talibova, Yeşim Bilmez, Saffet Öztürk. The potential effect of repeated superovulation on the TERT levels in the mouse oocytes. Sözlü bildiri (SS54), 15th National and 1st International Congress of Histology and Embryology (THED). 26-28 Mayıs 2022.
2. **Betül Tire**, Günel Talibova, Yeşim Bilmez, Saffet Öztürk. Repeated ovarian stimulation increases the telomerase component, TERT, levels in the mature oocytes. Sözlü bildiri (SS03), 10. Üreme Sağlığı ve İnfertilite Kongresi (TSRM). 10-14 Kasım 2023, KKTC.
3. **Tire B**, Ozturk S, Potential effects of assisted reproductive technology on telomere length and telomerase activity in human oocytes and early embryos. J Ovarian Res. 2023
4. Ozturk S, Kosebent EG, Talibova G, Bilmez Y, **Tire B**, Can A. Embryonic poly(A)-binding protein interacts with translation-related proteins and undergoes phosphorylation on the serine, threonine, and tyrosine residues in the mouse oocytes and early embryos. J Assist Reprod Genet. 2023.