

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRİMORDİYAL FOLİKÜLDEN ANTRAL FOLİKÜLE BAZI
SİTOKİNLERİN EKSPRESYONU VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

RABİA KOÇ ÖZAK

YÜKSEK LİSANS

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Serpil KALKAN

KONYA 2013

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

**PRİMORDİYAL FOLİKÜLDEN ANTRAL FOLİKÜLE BAZI
SİTOKİNLERİN EKSPRESYONU VE DEĞERLENDİRİLMESİ**

RABİA KOÇ ÖZAK

YÜKSEK LİSANS

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Serpil KALKAN

KONYA 2013

TEZ ONAY SAYFASI

Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi *Rabia Koç Özak*'ın "*Primordiyal Folikülden Antral Foliküle Bazı Sitokinlerin Ekspresyonu ve Değerlendirilmesi*" başlıklı tezi tarafımızdan incelenmiş; amaç, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Histoloji-Embriyoloji A.B.D.

Konya,26/11/2013



Tez Danışmanı

Prof.Dr.Serpil KALKAN

Histoloji-Embriyoloji A.B.D.

Jüri Üyesi

Prof.Dr.Hasan CÜCE

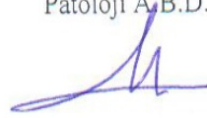
Histoloji-Embriyoloji A.B.D.



Jüri Üyesi

Yrd.Doç.Dr.H.Hasan ESEN

Patoloji A.B.D.



Yukarıdaki tez, Necmettin Erbakan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulununtarih ve ...-..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Neyhan Ergene

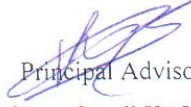
Enstitü Müdürü



APPROVAL

We certify that we have read this dissertation entitled "*Evaluation and Expressions of Some Cytokines from Primordial Follicle to Antral Follicle.*" by "*Rabia Koç Özak*" that in our opinion it is fully adequate, in scope and quality, as dissertation for the degree of *Master of Science* in the Department of "*Histology Embryology*", Institute of Health Sciences, University of Necmettin Erbakan.

Konya, Turkey/ 26.11.2013



Principal Advisor

Professor Serpil KALKAN

Department of Histology Embryology

Examination Committee Member

Professor Hasan CÜCE

Department of Histology Embryology



Examination Committee Member

Assistant Professor Hacı Hasan ESEN

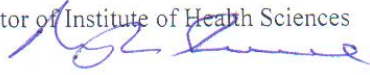
Department of Pathology



This thesis has approved for the University of Necmettin Erbakan Institute of Health Sciences.

Professor Neyhan Ergene

Director of Institute of Health Sciences



BEYANAT

Bu tezin tamamının kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

26/06/2013

RABİA KOÇ ÖZAK

ÖNSÖZ

Tüm yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Serpil Kalkan'a, laboratuvar aşamasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Gökhan Cüce'ye ve öğretim üyesi hocalarım, Prof. Dr. Hasan Cüce, Prof. Dr. Selçuk Duman, Prof. Dr. Aydan Canbilen, Prof. Dr. Murad Aktan'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalıştığım doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma teşekkür ve saygılarımı sunarım. Çalışmalarım boyunca manevi desteğini esirgemeyen aileme ve eşime teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

<i>İç Kapak</i>	<i>i</i>
<i>Tez Onay Sayfası</i>	<i>ii</i>
<i>Approval</i>	<i>iii</i>
<i>Tez Beyan Sayfası</i>	<i>iv</i>
<i>Önsöz</i>	<i>v</i>
<i>İçindekiler</i>	<i>vi</i>
<i>Kısaltmalar ve Simgeler Listesi</i>	<i>vii</i>
<i>Özet</i>	<i>viii</i>
<i>Abstract</i>	<i>ix</i>
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. <i>Ovaryum Anatomisi</i>	2
2.2. <i>Ovaryum Fizyolojisi</i>	3
2.3. <i>Ovaryum Embryolojisi</i>	6
2.4. <i>Ovaryum Histolojisi</i>	7
2.4.1. <i>Primordiyal Follikül</i>	9
2.4.2. <i>Primer Follikül</i>	10
2.4.3. <i>Sekonder Follikül</i>	11
2.4.4. <i>Tersiyer Follikül</i>	12
2.4.5. <i>Ovulasyon</i>	12
2.4.6. <i>Korpus Luteumun Yapısı ve İşlevleri</i>	14
2.5. <i>Oogenezis</i>	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	17
4. BULGULAR	18
5. TARTIŞMA	46
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	52
7. KAYNAKLAR	53
8. EKLER	58
9. ÖZGEÇMİŞ	59

SİMGELER VE KISALTMALAR

A: Antrum

FSH: Folikül Stimüle Hormon

LH: Lüteinleştirici Hormon

GnRH: Gonadotropin serbestleştirici hormon

ER: Östrojen Reseptörü

ER- β : Östrojen Reseptörü Beta

ER- α : Östrojen Reseptörü Alfa

PR: Progesteron Reseptörü

PR-A: Progesteron Reseptörü A

PR-B: Progesteron Reseptörü B

FSHR: Folikül Stimüle Hormon Reseptörü

LHR: Lüteinleştirici Hormon Reseptörü

İGF1: İnsulin Benzeri Büyüme Hormonu-1

İGFR: İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü

EDTA: Etilendiamin Tetraasetik Asit

GEP: Germinal Epitel

TA: Tunika Albuginea

ZP: Zona Pellisuda

PF: Primordial Folikül

SF: Sekonder Folikül

PEH: Primordiyal Eşey Hücreleri

HCG: Human Chorionic Gonadotropin

ÖZET

Bu çalışmada farklı yaş gruplarındaki ratlarda BFGF ve İGF1 markerlerinin sağ ve sol ovaryumlardaki immünohistokimyasal ekspresyonu incelendi ve dişi ratların yaşları arasındaki ilişki değerlendirildi.

Çalışmamızda 21 adet 250-300 gr ağırlığında Sprague-Dawley türü dişi sıçan kullanıldı. A Grubu 4 günlük, B Grubu 1 aylık ve C Grubu ise 3,5 aylık dişi sıçanlardan oluşturuldu. Sıçanlar Ksilazin/ Rompun anestezisi altında sakrifiye edildi, sağ ve sol ovaryumları çıkarıldı ve laboratuvar deneyleri için 6 adet deney grubu oluşturuldu. Tüm ovaryumlar % 10'luk formaldehitte tespit edildi. 2 günlük tespitten sonra rutin histolojik takip yapıldı ve elde edilen parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu parafin kesitlere BFGF ve İGF1 immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. Bu markerlerin ovaryumlardaki ekspresyonları ve dişi ratların yaşları arasındaki ilişki değerlendirildi.

Çalışmamızda BFGF yaş gruplarına göre azalan bir ekspresyon sergilemiştir BFGF primordiyal ve erken folikül gelişimi için önemli gözükmektedir. İGF1 ekspresyonunda ise anlamlı bir istatistiksel değişme olmamıştır. Daha kapsamlı hücre kültürü çalışmaları gerekmektedir.

ABSTRACT

Immunohistochemical expression of IGF1 and BFGF were examined at right and left ovarian in different age groups for this study.

Twenty one old female Sprague Dawley rats weighing 250 to 300 g were used. The rats were divided into three groups each. Group A, Group B and Group C were consisted from 4 days1 monyh and 3.5 month female rats respectively. Rats were sacrificed under anesthesia, the right and left ovaries removed and six experimental groups were consisted for laboratory experiments. All ovaries were fixed in 10% formaldehyde for two days. 4 micron sections were obtained from paraffin blocks. IGF1 and BFGF immunohistochemical stainings were performed to these paraffin sections. The association between the ages of female rats and the expression of two markers in ovaries were evaluated.

BFGF showed a decreasing expression according to age groups in this study. BFGF seem to be important for the development of primordial and early follicles. There was not a statistically significant change in the expression of IGF1. More extensive cell culture studies are required.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Bilim adamlarının erkek ve dişi üreme organlarının işlevlerinin yanında semen ve ovulasyon ile ilgili çalışmaları yüzyıllardır sürmektedir. Bilim adamları 17. ve 18. yüzyıl başlarında, spermin semen içinde yer aldığını ve overlerde oluşan yumurtayı dölediğini bilmelerine karşın bu olayın fizyolojik mekanizmasını tam olarak açıklayamamışlardır (Hassa 2003).

Bilimdeki gelişmeler sonucunda M.Ö 40.000-16.000 dönemlerinden beri devam eden kısırlık, 20. yüzyıldan sonra hızla uygun araştırma ve tedavi olanaklarına kavuşabilmiştir. En çok gözlenen kısırlık sebepleri arasında spermatogenezis ve ovulasyonda meydana gelen bozukluklar, endometriyozis ve yaşla ilgili problemler bulunmaktadır.

Ovaryumda bulunan oosit havuzu, yaşamın erken döneminden itibaren sabittir. Bu nedenle ovaryan yaşlılık, hem ovaryumdaki materyalin azalmasına hem de primordiyal folikül havuzundaki azalışa bağlıdır. Her folikül ya ovulasyona ya da harabiyete girmek üzere gelişimine başlar. Burada, foliküllerin değişiminin belirlenmesini sağlayan unsurlar ve ovaryum foliküllerin gelişimi sırasında gerçekleşen anahtar noktalar önemlidir (Gürer 2003). Ayrıca, normal dişi üremesinde de oositin düzgün gelişmesi yani oogenez oldukça önemlidir (Jamnongjit ve Hammes 2005).

Ovaryum biyolojisinde primordiyal folikül gelişimi ve dominant folikül seçimi hakkında çok az bilgi mevcuttur. Dişiler primordiyal foliküle organize olan oosit havuzu ile doğarlar. Bu havuzdan ömür boyu sürecek oosit desteği sağlanır. Primordiyal folikül gelişimi başladıktan sonra, folliküller oositi geliştirir ve bırakır ya da atreziye uğrar. Tek yumurta yumurtlayan türlerde bir tek folikül seçilir ve oosit atılır. Oosit havuzunun desteği kesildikten sonra, menstruel siklus biter ve insanlar menapoza girer. Bunda dolayı primordiyal folikül gelişimini kontrol eden faktörler üreme periyodunu ve menapoza geçiş yaşını belirlemektedir. Amacımız folikül gelişiminde İGF1 ve BFGF ekspresyonlarının ratlarda yaş gruplarında incelenmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

Dişi üreme sistemine, pelviste yerleşik iç genital organlar kapsamında değerlendirilen bir çift ovaryum ile genital kanallar olan fallop tüpleri, uterus ve vajina dahildir. Labia majör, labia minör ve klitoris ise dış genital organlar kapsamında incelenir. Meme bezleri ve plasenta genital organ olmamakla birlikte fonksiyonel olarak genital sistemle ilişkilidirler (Ovalle ve Nahirney 2009). Meme bezlerinin gelişimi ve fonksiyonel aktiviteleri dişi genital sisteminden salgılanan hormonların kontrolü altındadır. Olgun dişilerde endokrin sistemin kontrolü altında düzenli aralıklarla oluşan oositler, tuba uterinalarda spermatozoa ile karşılaşarak fertilize olurlar. Fertilize olan oositler uterusu yerleşir, burada gelişimini tamamlayan fetus vajina yolu ile dışarı atılır (Eşrefoğlu 2009).

Ovaryumlar ve uterus, menstrual siklus olarak bilinen düzenli aralıklarla tekrarlayan değişikliklere uğrarlar (Ovalle ve Nahirney 2009). İlk menstrüasyon kanamalarının oluştuğu menarştan başlayarak üreme sistemi, yapı ve işlevsel etkinlik bakımından siklik değişiklikler geçirir (Junqueira ve Carneiro 2009). Bu süreç sonunda ovaryumlarda olgun bir veya iki oosit üretilerek döllenmesi için tuba uterinaya taşınır. Döllenme olmadığı takdirde gebelik için hazırlanmış olan uterus duvarının üst bölümü parçalanarak vajina yolu ile atılır. Uterusun kan damarlarının yırtılmasının da eşlik ettiği bu olay menstrasyon olarak bilinir. Menstrual sikluslar belirli bir yaşa kadar devam ederek sonlanır, seyrekleşerek sonlandığı 45-55 yaş dönemi menopoz olarak isimlendirilir (Eşrefoğlu 2009).

2.1.Ovaryum Anatomisi

Ovaryum'lar, erkekteki testis'lerin karşılığı olan, iri badem büyüklüğünde, pelviste sağda ve solda kendilerine ait çukurcuklara yerleşik iki organdır.

Uterusun her iki tarafında lateral pelvik duvarlara yakın konumda fossa ovarica içinde yerleşen ovaryumların her biri, 3-8 g ağırlığında, 2,5-5 cm boyunda, 1,5-3 cm genişliğinde ve 0,7-1,5 cm kalınlığında üreme bezleridir. Ovaryumlar organa, damar ve sinirlerin girip çıktığı yer olan hilusda bulunan kan damarlarını ovaryumlara ileten özel bir periton katlantısı olan ve mezovaryum olarak adlandırılan

bir askı ile uterusun yan kenarlarında uzanan ligamentum latuma asılıdır (Arıncı ve Elhan 1995).

Embriyonal yaşamın başlangıcında ovaryumlar, intraabdominal yerleşimli iken, gelişimin ikinci ayından başlayarak aşağıya pelvis boşluğuna doğru inmeye başlarlar. Bu süreç testisin inişine göre daha kısa sürede tamamlanır. Ovaryum bu inişle pelvis minor'un duvarındaki fossa ovarica denilen çukurlara yerleşirler (Gövsa 2003).

2.2.Ovaryum Fizyolojisi

Siklus sürecinde ovaryumdaki değişikliklerin tümü hipofiz ön lobundan salgılanan gonadotropik hormonlar olan FSH ve LH'a bağlıdır. Gonadotropik hormonlarla uyarılmayan ovaryumlar inaktif durumdadır. Bunu, gonadotropik hormonların hemen hiç salgılanmadığı çocukluk evresinde görebiliriz. 9–10 yaşlarında hipofiz giderek daha çok FSH ve LH salgılamaya başlar, 11–16 yaşlar arasında aylık menstrüal siklusun başlamasıyla en yüksek düzeye ulaşır (Guyton 2001).

Ovaryumlar, fetal yaşam süresinde plasentadan salgılanan, bir diğer gonadotropik hormon olan koryonik gonodotropinle uyarıldıklarından işlev görürler. Ancak doğumdan sonra, birkaç hafta içinde bu uyarı kaybolur ve ovaryumlar puberte öncesi döneme kadar inaktif durumda kalırlar (Guyton 2001).

Hipotalamus'tan nabızsal olarak 90 dakikalık aralıklarla salgılanan GnRH hipofiz ön lobundan gonadotrop hormonların salgılanmasını denetler. Bu hormon yarılanma ömrü 2–4 dakika olan bir decapeptittir. Bunların ovaryumlara etkisiyle menstrüal siklus içinde östrojen ve progesteron salgılanması ardarda gerçekleşir ve ortalama 28 günde bir yinelenir. 28 günün ilk 14 günü foliküler, ikinci 14 günü luteal evredir. Ovulasyon yaklaşık olarak 14. günde olaylanır.

Olgun folikülün granüloza ve teka interna hücrelerinden salgılanan steroid hormonlar hipotalamo-hipofizyal sistemi etkileyerek gonadotrop hormon salgılanmasını düzenler. Siklusun ilk yarısında primer foliküllerin oluşumu gonadotrop hormonlardan bağımsızdır ancak daha sonraki gelişme için FSH gereklidir. Foliküler evrenin başında artan FSH salınımı primer foliküllerin büyümesini uyarır, granüloza hücrelerinde FSH reseptörlerinin sayısını artırır. Bu etkiyle granüloza hücreleri çoğalır ve bu hücrelerde aromataz enzimi yapılır. Yüksek östrojen düzeyi FSH'ü azaltırken, LH'ü artırır. LH reseptörleri teka interna hücrelerinde bulunur. Bu hücrelerde kolesterolden androjenler sentezlenerek

salgılanır ve difüzyonla granüloza hücrelerine geçer. Aromataz androjenleri östrojenlere dönüştürür. Östrojen teka internaya geçer ve burada bulunan kılcal damarlarla genel dolaşıma katılır. Artan östrojenler doğrudan hipofizi etkiler ve dolaylı olarak da, GnRH sentezini baskılayarak FSH salgılanmasını kısıtlar. Östrojenler ovulasyon öncesi LH salgısının artmasını sağlar ve ovulasyon gerçekleşir. FSH ve östrojenlerin etkisiyle granüloza ve teka hücrelerinde LH reseptörleri artınca LH'un etkisi gözlenir. Bu da luteal evrede progesteron yapımını artırıp östrojen yapımını azaltır. Progesteron endometriyum'u olası gebeliğe hazırlar, LH'u baskılar ve folikül gelişmesine engel olur. FSH azalması folikülleri olumsuz etkiler. En büyük folikül gelişmeyi sürdürse de diğerleri gerileyip atrezi olurlar (Tekelioğlu 2002).

Östrojenler: İç ve dış genital organlarının büyüme ve olgunlaşmasını destekler. Puberteyle birlikte gelişen dişi cinsiyet karakterlerinden sorumludur. Östrojenler meme bezi üzerine de etki ederler. (Ganong 2002).

Sıçanlarda östrojenin; östrojen reseptörü- α ve östrojen reseptörü- β olmak üzere iki alt tipi tanımlanmıştır. Türler arasında yüksek benzerlik göstermekte olan ER- β , aynı zamanda farelerde ve insanlarda klonlanmıştır. Estradiolün ER- α 'ya bağlanma afinitesinin ER- β ya göre daha yüksek olduğu ve ER- α 'nın transkripsiyonal aktivasyonunu artırdığı belirtilmiştir.

ER- α , orta ve yüksek düzeylerde uterus, testis, hipofiz, böbrek, epididim ve adrenalde; ER- β ise yüksek düzeylerde ovaryum, prostat, akciğer, mesane, kemik ve beyinde eksprese olur (Ganong 2002).

Progesteronlar: Başta uterus olmak üzere iç genital organları gebeliğe hazırlarlar. Bununla birlikte lobular çoğalmayı da destekleyerek meme bezini süt vermeye hazırlar (Guyton 2001).

Progesteron; korpus luteum, plasenta ve az miktarlarda folikülden salınan 21 karbonlu bir hormondur. Az miktarlardaki progesteron testis ve böbreküstü kabuğundan da dolaşıma katılır. Dolaşımdaki progesteronun yaklaşık %2'si serbest, %80'i albümine, %18'i ise kortikosteroid bağlayıcı globuline bağlıdır. Yarı ömrü kısa olan progesteron, karaciğerde, pregnanediol'e dönüştürüldükten sonra glukuronik asitle birleştirilip idrarla atılır.

İki ayrı promotor bölgesinde transkripsiyonla tek bir genden iki progesteron reseptörü izoformu olan PR-A ve PR-B üretilir. Bir genden iki protein izoformunun eksprese edilmesi fare, sıçan, insan gibi birçok türde görülür (Vegeto ve ark. 1993). İnsandaki PR-A izoformu PR-B'den N terminal uçtaki 164 amino asidin yokluğuyla ayrılır. PR-A 94, PR-B 114 kilodaltondur (Shyamala ve ark. 1990). PR-A etkinleştğinde PR-B'nin bazı etkilerini inhibe edebilir. Öte yandan, iki izoformun varlığının fizyolojik anlamı bilinmemektedir (Ganong 2002). İzoformların oranı gelişim boyunca üreme sistemi dokusuna ve östrus döngüsüne bağlı olarak değişir (Mangal ve ark.1997).

Östrojen ve Progesteron Reseptörleri: İnsan ovaryumunda folikülogenezis sırasında östrojen reseptörleri (ER) ve progesteron reseptörlerinin (PR) dağılımını belirlemek için immünohistokimyasal boyamalardan yararlanır. Yapılan çalışmalarda primordiyal ve preantral foliküllerde östrojen ve progesteron reseptörleri bulunmadığı görülmüştür.

Antral foliküllerin granüloza hücrelerinde östrojen reseptörü bulunmuş ancak progesteron reseptörü miktarının LH dalgalanmasından önce ihmal edilecek kadar az olduğu görülmüştür. Buna karşın LH dalgası sırasında baskın folikülün granüloza hücrelerinde progesteron reseptörü bulunmuş ancak östrojen reseptörü saptanmamıştır. Diğer yandan, baskın olmayan foliküllerin granüloza hücrelerinde östrojen reseptörü belirlenmiş fakat progesteron reseptörü bulunmamıştır. Ovulasyondan sonra erken gebelik sırasında progesteron reseptörü, lüteinleşmiş granüloza hücrelerinde ve korpus luteum içinde kalmayı sürdürür. Menstruasyon siklus süresinde teka interna ve onu çevreleyen doku hücreleri östrojen reseptörü negatif, progesteron reseptörü ise pozitifdir (Iwai ve ark. 1990).

Östrojen reseptörü'nün iki alt tipi olan ER β ve ER α 'nın immünohistokimyasal olarak yerleşimi, yeni doğan, erken doğum sonrası evrede, immature ve yetişkin sıçanlarda belirlenmiştir ve farklı bölgelerde yerleşmiş oldukları gözlenmiştir. ER β , primer, sekonder ve olgun foliküllerin, granuloza hücrelerinin çekirdeklerinde gözlenmiştir. Atretik foliküllerde ise zayıf boyanma ya da hiç boyanmama gözlenmiştir. Tekal hücrelerde, luteal hücrelerde, germinal epitelde ve oositlerde çekirdekte özgün bir ER β tutulumu belirlenmemiştir. Yeni doğan sıçan ovaryumunda ER β ekspresyonu gözlenmemiştir. 5–10 günlük sıçan ovaryumlarında, primer ve sekonder foliküllerin granüloza hücrelerinde zayıf ER β immünoreaktivitesi gözlenirken, primordiyal foliküllerde saptanmamıştır. ER α ise

granüloza hücrelerinde hiç gözlenmezken germinal epitelde, interstitial hücrelerde ve tekal hücrelerde gözlenmiştir (Rose ve ark. 2000).

Folikül Uyarıcı Hormon : FSH hem erkekte hem de kadınlarda salgılanan, hipofiz kaynaklı, glikoprotein yapısında bir hormondur. FSH iki alt birimden oluşmuştur. α ve β alt birimleri bir miktar etkinlik gösterirlerse de tam fizyolojik etkinlik için iki alt birimin birlikte bulunması gerekir. İnsan FSH'sının yarı ömrü yaklaşık 170 dakikadır (Ganong 2002).

Folikül uyarıcı hormon reseptörü ve luteinleştirici hormon reseptörü karşılıklı etkileşimle çalışır ve üreme fizyolojisinde önemli rol oynar. FSHR temelde germ hücrelerinde bulunan hücre yüzey reseptörüdür ve G proteinleriyle etkileşim yoluyla etkisini gösterir. Bu reseptör, hücre zarını sarmal şeklindeki etki bölgesiyle yedi kez kesen bir proteindir. Hücre dışında amino terminal, hücre içinde ise karboksi terminal uca sahiptir (Lei ve ark. 1993).

FSHR'nin ovaryumda granüloza hücrelerinde, testiste sertoli hücrelerinde eksprese edildiği bildirilmiştir. Ovaryumdan salgılanan cinsiyet hormonlarının etkisiyle siklik değişiklikler gösteren tuba uterinaların, gonadotropinler için doğrudan hedef organ olduğu düşünülmemiştir. Ancak yapılan bir çalışmada; insan tuba uterinasında hem LHR'nin hem de reseptöre bağlanacak olan hormona ait genin eksprese edildiği bildirilmiştir. Bu durum gonadotropinler ve reseptörlerinin tuba uterinaların fizyolojik işlevine katılma olasılığını akla getirmiştir (Camp ve ark. 1991).

2.3.Ovaryum Embryolojisi

Embriyonun cinsiyeti, genetik olarak döllenme sırasında belirlenmiş olmasına rağmen, gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar, erkek ya da dişi yapısal özelliklere sahip değildir. Gonadlar başlangıçta kölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş, bir çift uzunlamasına düzenlenmiş genital ya da gonadal kabartılar halinde belirirler. Gelişimin 6. Haftasına kadar genital kabartılar içinde germ hücreleri görülmez. İlk eşey hücreleri, gelişimin 4. haftasında vitellus kesesinin allontois'e yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında görülmeye başlarlar. Sonbağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameoid hareketlerle ilerleyerek, 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşır, 6. haftada ise genital kabartıları işgal ederler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşamadıklarında gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum ya da testis'e farklılaşmasında ilkel germ

hücrelerinin indükleyici etkisi vardır. İlkel cinsiyet hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartıların epiteli çoğalır ve epitelyum hücrelerinin altındaki mezenşimin içine gömülürler. Bunlar burada ilkel cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kolonlar oluştururlar. Erkek ve dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede, erkek ya da dişi gonadların birbirinden ayırt edilebilmesi olanaksızdır. Bu nedenle bu evre farklılanmamış dönem olarak adlandırılır. Bu gonada da farklılanmamış gonad denir (Sadler 2005).

Dişi embriyolarında gonad gelişimi daha yavaştır. X kromozomları ovaryum'un gelişimi için genler içerir, ovaryumun oluşmasında otozomal bir genin rol oynadığı bilinmektedir. 10. haftaya kadar, ovaryumlar histolojik olarak ayırt edilemezler. Gonad taslağının medullasına kadar uzanırlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Normalde rete ovarii ve ilkel cinsiyet kordonları dejenere olarak ortadan kalkarlar ve yerlerini ovaryum medullasını oluşturan damarlı stromaya bırakırlar. Erken fetal dönemde kortikal kordonlar denilen ikincil cinsiyet kordonları, gelişmekte olan gonadın yüzey kölom epitelinden başlayarak, alttaki mezenşime doğru gelişmeye başlar. Kortikal kordonlar kölom epitelinin çoğalmasıyla kalınlaşırken, ilkel cinsiyet hücreleri kordonların içine karışırlar. Yaklaşık 16. haftada bu kordonlar primordiyal folikül denilen ayrı hücre gruplarına bölünürler. Fetal dönemde milyonlarca oogonyum aktif olarak mitozla çoğalır. Doğum öncesi, oogonyumların bir kısmı dejenere olurken geri kalanı büyüyerek primer oositleri yapar.

Doğumdan sonra oogonyum oluşmaz. Primer oositlerin çoğu doğumdan önce dejenere olur. Doğumdan sonra iki milyon kadar primer oosit kalır. Doğumdan sonra ovaryum yüzey epiteli düzleşir. Ovaryum hilusunda, periton mezoteli ile devam eder. Ovaryum folikülleri biçimlenirken yüzey epiteliyle olan bağlantılarını yitirirler. Yüzey epiteli ile ovaryum korteks'i arasında tunika albuginea denilen ince fibröz bir kapsül gelişir. Mezonefroz gerilerken, ovaryum ondan ayrılır ve mezovaryum denilen kendi mezoteriyle vücut duvarına asılır (Moore ve Persaud 2002).

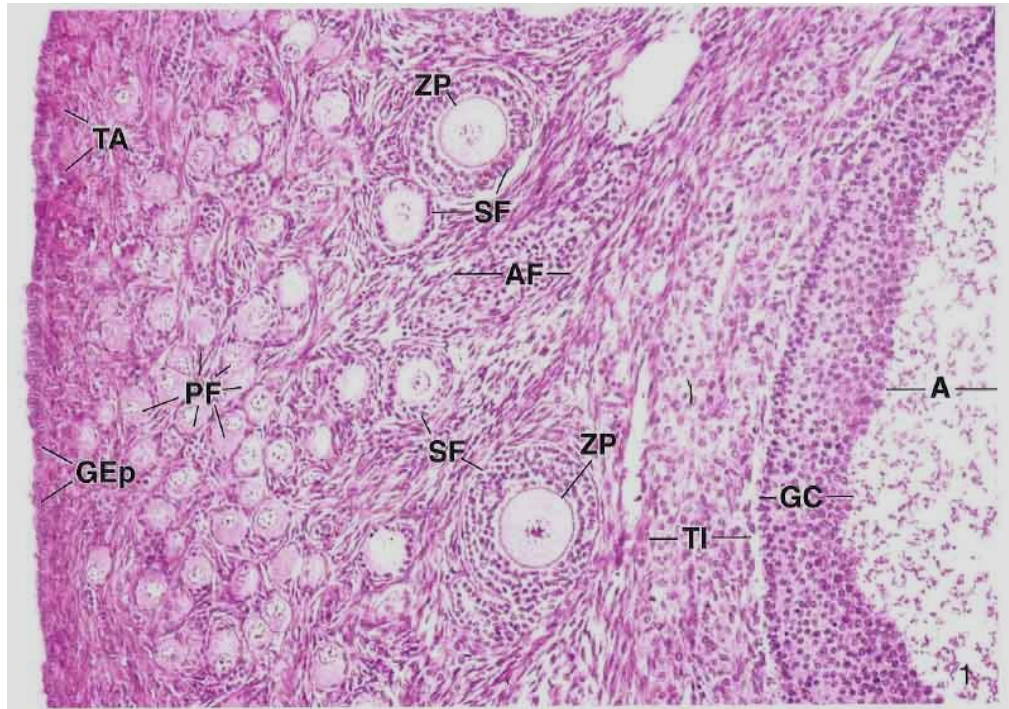
2.4. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumlar gamet üretimi nedeni ile ekzokrin, steroid yapısındaki hormonların sentezi ve salgılanması nedeni ile endokrin bez olarak kabul edilir (Eşrefoğlu 2009). Yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan basit prizmatik veya

kübik epitel ile döşelidir. Germinal epitel altında tunika albuginea adı verilen yoğun bir düzensiz sıkı bağ dokusu bulunmaktadır. Bu tabakanın altında ise ovaryum foliküllerini içeren korteks bölgesi bulunmaktadır (Ross ve ark. 2003).

Foliküller, korteks bölgesinin bağ dokusu içinde gömülüdür. Bu stroma bölgesi iğ biçiminde fibroblastlar içerir. Ovaryumun en iç kısmı, gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medulla bölgesidir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur (Junqueira ve Carneiro 2009). Kortekste puberteden önce sadece primordiyal foliküller izlenirken puberteden sonra primer, sekonder ve tersiyer foliküllere rastlanır. Seksüel olgunluk döneminde bu foliküllerden başka, korpus luteum ve atretik foliküllerde görülür (Eşrefoğlu 2009).

Erişkin normal bir genç kadında her iki ovaryumda yaklaşık 400.000 folikül bulunur. Bunlardan doğurganlık sürecinde sadece 450-500 tanesi tersiyer folikül safhasına ulaşır. Geri kalanlar atreziye uğrayarak dejenere olur. Menopozdan sonraki birkaç yıl içinde ovaryumlarda kalan tüm oositler dejenere olup, ortadan kalkar (Eşrefoğlu 2009).

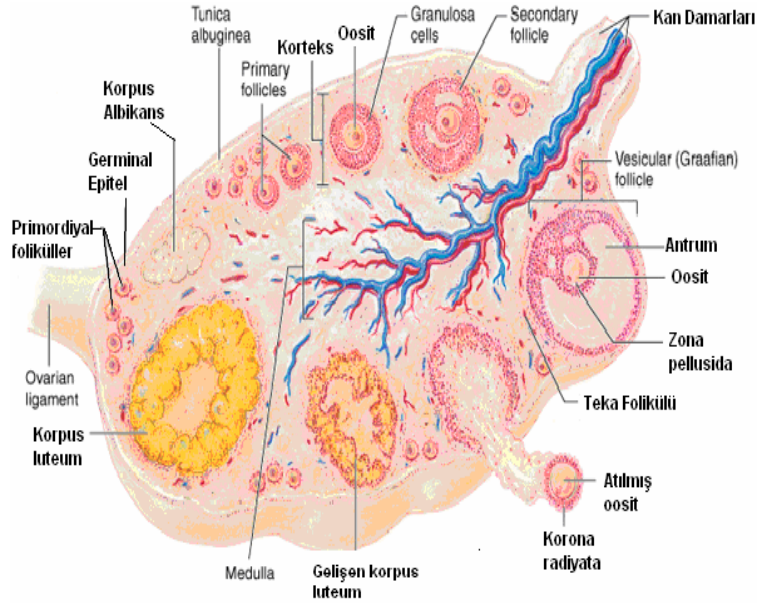


Şekil.2.1.Ovaryum dokusunun hematoksilen-eozin ile boyanmış kesiti. A: antrum GEp: germinal epitel, TA: Tunika albuginea, ZP: zona pellusida, PF: primordiyal foliküller, SF:sekonder foliküller (Ross ve ark. 2003)

Bir ovaryum folikülü belli hücre tiplerinden oluşan oldukça karmaşık bir yapıdan meydana gelir (Gordon 1994).Folikülün çapı oositin gelişim durumunu gösterir. Yapısal olarak gelişim durumlarına göre üç tip folikül bulunur: Primordiyal foliküller, Gelişmekte olan foliküller (Primer ve Sekonder folikülleri) ve Olgun (Matür) foliküller (Graaf folikülleri).

Gelişmekte olan foliküller ayrıca primer (birincil) ve sekonder (ikincil veya antral) foliküller olarak ikiye ayrılırken primer foliküller de kendi içerisinde unilaminar (tek tabakalı veya erken) ve multilaminar (çok tabakalı veya geç) primer foliküller olarak ikiye ayrılır.

Bir ovaryumda tüm folikül tipleri aynı anda görülmektedir ancak primordiyal foliküller en yaygın olan tiptir (Kayalı ve ark. 1992).



Şekil.2.2.Ovaryumun Şematik Yapısı (<http://www.colorado.edu/kines/iphy4480tsai/ovary.jpg> 10.06.2007)

2.4.1. Primordiyal Follikül

Foliküllerin büyük bölümünü oluşturan primordiyal foliküller, korteksde hemen tunika albuginea altında yer alırlar. Yaklaşık 30µm çapındaki oositler, geniş veziküler nükleuslu, belirgin bir veya birden çok nükleoluslu yuvarlak hücrelerdir.

Organelden zengin olan bu hücrelerde elektron mikroskopik olarak belirgin bir golgi kompleksi, yaygın bir endoplazmik retikulumu, bol mitokondriyon, lizozom ve annuler lameller izlenir (Eşrefoğlu 2009).

Primordiyal foliküller, foliküler gelişimin ilk aşamasını temsil eder (Eşrefoğlu 2009) .Primordiyal eşey hücreleri insanın fetal gelişimi sırasında, 4. haftanın başlarında vitellus kesesinin dorsal endoderminde allantoyise yakın bir bölgede belirir. Embriyonun katlanması sırasında vitellus kesesinin dorsal parçası embriyo içerisine dahil olurken, PEH'ler arka barsağın dorsal mezenteri boyunca göç ederek ürogenital kabartıda gonadları oluşturacak bölgeye yerleşirler (Gartner ve Hiatt 2001).

Dişi bireylerde PEH'ler 25. haftada mitozla çoğalarak yaklaşık 7 milyon oogonyum meydana getirir. Bu aşamada yassı epitelyum hücreleri oogumyumların çevresini tek tabaka halinde sararak primordiyal folikülleri oluşturur. Mayoz bölünmeye girmiş primer oositlerin büyük çoğunluğu primer folikül oluşturamayıp atreziye uğrar ve yok olurlar (Gandolfi ve ark. 2005).

2.4.2.Primer Follikül

Primordiyal folliküllerin yassı hücreleri gelişerek, önce kübik daha sonra prizmatik hücrelere dönüşürler. Follikül hücreleri tek katlı kübik hücreler haline geldiğinde folliküle primer follikül denir. İmmatür oosit büyürken çevresine glikoproteinleri ve glikozaminoglikanları salgılar. PAS ile kuvvetle pozitif boyanan bu bölge zona pellusida olarak isimlendirilir. Zona pellusida, oosit yaklaşık 50-80µm çapına ulaştığında görülmeye başlar. Oositi çevreleyen hücreler çoğalarak çok katlı bir epitele dönüşürler. Bu epitele stratum granulozum denir. Tek katlı prizmatik veya çok katlı prizmatik epitel içeren farklı büyüklüklerdeki folliküller de primer follikül olarak değerlendirilir. Tek katlı bir epitel içeren folliküle unilaminer primer follikül, stratum granulozum olarak da isimlendirilen çok katlı bir epitel içeren folliküle multilaminer primer follikül denir (Eşrefoğlu 2009).

Granuloza hücreleri arasında yaygın gap junction tipi bağlantılara rastlanır. Follikülde bu değişiklikler olurken, bağ dokusunda da bazı değişiklikler yaşanır. Stroma, follikül çevresinde teka follikülü olarak isimlendirilen sıkı dokuyu oluşturur. Stratum granulozum ile teka arasında camsı membran olarak bilinen bir bazal membran yer alır. Teka follikülü daha sonra kan damarlarından zengin teka

interna denen iç tabakayı; kollajen liflerden ve düz kas hücrelerinden zengin teka eksterna denen dış tabakayı oluşturur. Teka internada steroid salgılayan hücreler ,fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük kan damarları bulunur. Teka internanın steroid salgılayan hücrelerinden LH' la stimulyasyonlarını takiben östrojenlerin prekürsörleri olan androjenler sentezlenerek salgılanır. Steroid yapısında bir hormon olan androstenedione, teka interna hücrelerinden salgılandıktan sonra, granüloza hücrelerinden FSH etkisi ile üretilen bir enzim olan aromataz ile östrojene dönüştürülür. Follikülü çevreleyen stromaya dönen östrojen, damar yolu ile bütün vücuda dağılır (Eşrefoğlu 2009).

Primer follikül gelişimine devam ederken, oosit de olgunlaşır. Balbiani bölgesinde yoğunlaşmış olan Golgi kompleksi sitoplazmaya yayılır. Serbest ribozom ,mitokondriyon, vezikül ve multiveziküler cisimlerin sayıları artar, granüler endoplazmik retikulumu yaygınlaşır. Memelilerde plazma membranının hemen altında kortikal granüller denen granüller görülür. Bu granüllerin proteaz yönünden zengin olan içerikleri, oosit spermiumla karşılaşınca salgılanır. Oosit membranının oluşturduğu mikrovilluslar, oosit ile granüloza hücreleri arasındaki perivitellin aralığına uzanır. Granüloza hücrelerinin ince uzantıları da oosite doğru uzanarak mikrovilluslarının aralarına karışır, bazıları plazma membranına sokulur. Bu yakın temasa rağmen sitoplazmik devamlılık oluşmaz (Eşrefoğlu 2009).

2001 yılında yapılan bir çalışmada, oogonyumların çevresini saran follikül epitel hücrelerinin, oogonyumlar için kontrollü bir çevre sağlayarak, kan akışıyla gelebilecek zararlı maddelere karşı korudukları belirlenmiştir (Gandolfi ve ark. 2005).

2.4.3.Sekonder Follikül

Stratum granulozum 8-12 hücre katına sahip çok katlı prizmatik epitele dönüşünce bu hücreler arasında şeffaf bir sıvı ile dolu düzensiz boşluklar ortaya çıkmaya başlar. Bu boşluklar birbirleri ile birleşerek antrum adı verilen büyük bir boşluğu oluştururlar. Bu folliküle artık sekonder follikül veya antral follikül denir. Sekonder follikülün antrumu hiyaluronik asitten zengin follikül sıvısını içerir. Bu dönemde oositin çapı 250 µm'ye ulaşır. Follikülün gelişimi devam ederken, follikül içinde biriken sıvı artıp antrum genişledikçe, bir grup granüloza hücreleri tarafından çevrelenmiş olan oosit follikülün bir tarafına itilir. Bu dönemde sekonder follikül

yavaş yavaş tersiyer follikül özelliklerini kazanmaktadır. Oosit ve çevresindeki granüloza hücreleri follikül lümenine doğru uzanan bir tümsek oluştururlar. Bu tümseğe kumulus ooforus denir (Eşrefoğlu 2009).

Ovumu çevreleyen granüloza hücrelerine ise korona radyata adı verilir. Korona radyata hücrelerinin yüzeyindeki mikrovilluslarla, oosit yüzeyindeki mikrovilluslar arasında gap junction tipi bağlantı kompleksleri bulunur. İntersellüler ortamda PAS+ boyanan, Call-Exner cisimleri olarak isimlendirilen bir materyal görülür. Granüloza hücreleri tarafından üretilen bu materyal hyaluronik asit ve proteoglikanlardan zengindir. Folliküllerin büyüklükleri granüloza hücreleri tarafından üretilerek, antrum sıvısına salgılanan inhibitör faktörlerin etkisinin kontrolü altındadır (Eşrefoğlu 2009).

2.4.4. Tersiyer Follikül (Graaf Follikül)

Folliküldeki büyüme devam ettikçe ovumda gelişerek ovulasyondan hemen önce birinci olgunluk bölünmesini bitirir. Tersiyer follikül veya Graaf folikülü olarak isimlendirilen bu follikülün içindeki oosit artık sekonder oositir. Graaf follikülü follikül sıvısı içeren büyük bir antruma sahiptir. Korona radyatayı oluşturan follikül hücrelerinin çevresinde zona pellusida bulunur. Oosit ve korona radyata kumulus ooforustan ayrılıp follikül içinde serbestçe yüzebilir. Büyüklüğü 10 mm'e ulaşan follikül ovaryum yüzeyine doğru kabarrır. Oosit ve oositi çevreleyen hücrelerin diğer granüloza hücreleriyle olan bağlantıları gevşer. Böylece oosit atılmaya hazırlanır (Eşrefoğlu 2009).

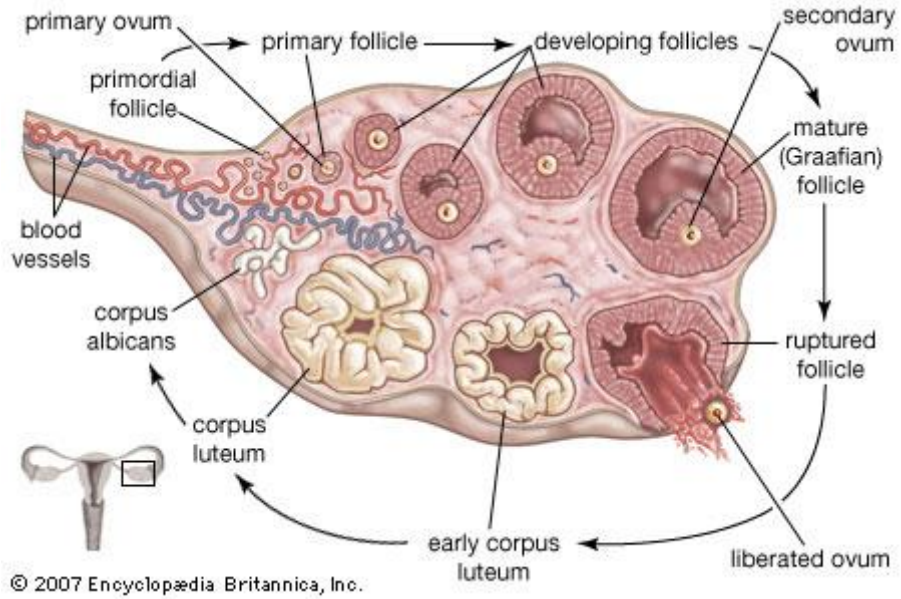
2.4.5. Ovulasyon

Follikül gelişimine paralel olarak büyüyen ve olgunlaşan oositin ovaryum yüzeyinden karın boşluğuna bırakılması olayıdır. Her menstrual siklusta bir veya iki adet oosit olgunlaşarak atılır. Atılırken sekonder oosit döneminde olan bu hücre, buradan tuba uterinaların uçlarındaki fimbriyaların yardımıyla alınarak uterusu doğru taşınır. Karın boşluğuna bırakılmasını takiben 24 saat canlı kalan oosit, bu dönemde döllense dejenere olup ortadan kalkar. Ovulasyondan hemen önce tersiyer follikülün ovaryum yüzeyine çıkıntı yaptığı küçük bir alanın kanlanması bozulur. Bu alana makula pellusida veya stigma denir. Ovulasyonda stigma incelip yırtılır.

Ovulasyonda oosit, zona pellusida ve çevresindeki korona radiata hücreleri ,tuba uterinaların giriş yerleri çevresine yani periton boşluğuna sürüklenirler. Oositin ikinci olgunluk bölünmesi bir spermatozoon ile döllenmesine kadar tamamlanmaz. Ovulasyondan sonra teka internadaki kapillerlerin yırtılması sonucunda follikül boşluğuna az miktarda kanama olması ile korpus hemorajikum oluşur. Büzüşen follikül duvarı kıvrımlar yapar. Bağ dokusu hücrelerinin follikülü istila etmesini takiben granüloza ve teka interna hücreleri morfolojik değişikliklere uğrarlar. Bu hücreler stoplazmalarında yaygın agranüler endoplazma retikulumu, bol mitokondriyon ve lipid damlaları bulunan steroid sentezleyen hücre özelliği kazanırlar. Eğer ovulasyon ile atılan ovum döllenmez ise korpus luteum geri gelişerek ovulasyondan yaklaşık dokuz gün sonra dejenere olup ortadan kalkar. Buna menstruasyon korpus luteumu denir. Hücreleri küçülen ,vaskularizasyonu zayıflayan korpus luteumda yağlı dejenarasyon gelişir. Genişleyen bağ dokusunda hiyalinizasyon izlenir. Korpus luteum kademeli olarak beyaz bir skar dokusu olan korpus albikansa dönüşür. Ovulasyonla atılan ovum döllenirse korpus luteum ileri gelişerek gebelik korpus luteumunu oluşturur. Hücreler gebeliğin orta dönemlerine kadar büyümeye devam ederler. Gebelik korpus luteumu daha sonra yavaşça gerileyerek, doğumdan sonra hızla dejenere olur. Sonuçta oluşan korpus albikans ,menstruasyon korpus luteumundan gelişenden daha geniştir (Eşrefoğlu 2009).

Menstrual siklus ovulasyon öncesi dönem olan folliküler dönem ve ovulasyon sonrası dönem olan luteal dönemden oluşur. Folliküler dönemde oosit ve follikül gelişimi FSH ve LH 'ın etkisi altında gerçekleşir. Etkisi siklusun ilk 10 günlük döneminde baskın olan FSH sayesinde folliküller gelişir, granüloza ve teka hücreleri uyarılarak steroid yapısındaki hormonları salgılamaya başlarlar. Salgılanan yüksek miktarlardaki östrojen follikül lümeninde birikir. Lümendeki östrojen follikülün büyümesini ve gelişmesini uyarır. Ovulasyona yaklaşırken artan LH seviyeleri progesteron sentezini stimüle eder. Kan östrojen seviyesinin artışı negatif feed back mekanizması ile FSH üretimini baskırlar. Ani ve şiddetli bir LH artışı ve hafif FSH artışı ovulasyonun gerçekleşmesini sağlar. Ovulasyondan hemen sonra luteal dönem başlar. Primer olarak LH etkisi ile oluşan corpus luteumdan salgılanan östrojen ve yüksek miktarlarda progesteronların etkisi ile endometriyum sekretuar döneme girer. Bu dönemde uterusda döllenmiş yumurtanın yerleşmesi ve canlılığının yaşamını sürdürmesi için uygun ortam hazırlanmaya çalışılır. Döllenme olursa corpus luteum

östrojen, progesteron, hCG gibi hormonları salgılamaya devam eder. Bu hormonlar gebeliğin devamı için esastır. Döllenme olmazsa corpus luteum dejenere olur, dolayısı ile buradan salgılanan hormonların da seviyesi hızla düşer (Eşrefoğlu 2009).



Şekil 2.3. Ovulasyon (<http://www.britannica.com/EBchecked/media/99761/The-steps-of-ovulation-beginning-with-a-dormant-primordial-follicle>)

2.4.6. Korpus Luteumun Yapısı Ve İşlevleri

Graaf follikülü ovulasyonda rüptüre olduktan sonra sekonder oosit serbestleşir, folliküler yapının geri kalanı ise korpus luteum (sarı cisim) olarak bilinen geçiçi glandüler bir yapıyı oluşturur. (Ovalle ve Nahirney 2009).

2.5. Oogenezis

Oogenezis; oogonia denilen primitif germ hücrelerinin, olgun oositlere dönüşmesiyle gerçekleşen olaylar dizisidir. Hücrelerdeki bu olgunlaşma süreci, doğumdan önce başlar, cinsel olgunluğa erişildiğinde tamamlanır.

Primer oosit ilk mayoz bölünmesine, doğumdan önce başlar ancak profaz puberteye kadar tamamlanamaz. Primer oosit, puberte boyunca cinsel olgunluğa

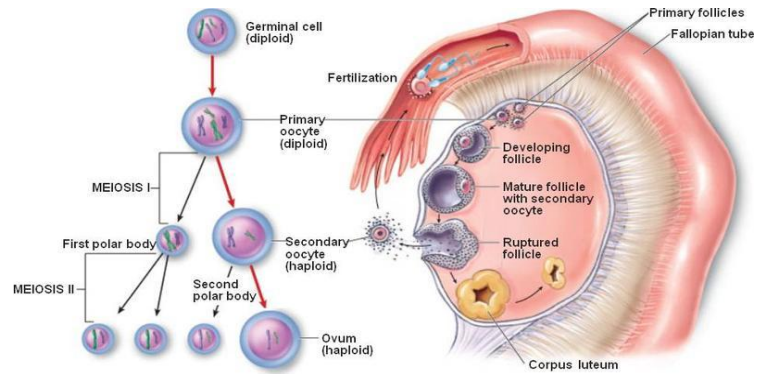
ulaşıncaya ve üreme siklusları başlayıncaya kadar profazda bekler. Primer oositi çevreleyen folliküler hücrelerin oosit maturasyon inhibitörü adındaki bir maddeyi salgılayarak, oositin mayotik bölünme sürecini durdurduğu düşünölmektedir.

Oositlerin doğum sonrası olgunlaşması puberte ile başlar, her ay genellikle bir folikül olgunlaşır ve ovulasyon olur. İlk mayotik bölünmenin uzun sürmesi mayotik hataların sıklığındaki yüksekliği kısmen açıklayabilir (Moore 2002). Oositlerin mayoz I'de beklediği süre ne kadar uzarsa dış etkenlere maruz kaldığı süre de artacağından sonraki bölünmelerde trizomi 21 (DownSendromu) gibi yapısal bozukluklarının meydana gelme olasılığı artar (Ross ve ark. 2003).

Doğumdan sonra kızlarda primer oosit oluşmaz, erkeklerde ise puberte sonrası da primer spermatoisit yapımı devam eder. Primer oositler puberteye kadar ovaryum foliküllerinde bekler. Folikül olgunlaştıka primer oositin boyutları artar, ovulasyondan hemen önce birinci mayoz bölünmeyi tamamlar. Spermatogenezdeki benzer aşamalardan farklı olarak, sitoplazma eşit olarak bölünmez.

Sekonder oosit hemen hemen tüm sitoplazmayı alır, birinci polar cisimciğe çok azı kalır. İlk polar cisimcik; küçük, işlevsel olmayan ve kısa süre içinde dejenere olacak bir hücredir. Ovulasyondan sonra sekonder oositin çekirdeği ikinci mayoz bölünmeye başlar, ama bölünme durduğunda sadece metafazı ilerlemiştir. Eğer bir sperm sekonder oositin içine girerse, ikinci mayotik bölünme tamamlanır ve yine sitoplazmanın çoğu bir hücreye, fertilize olmuş bir oosite veya olgun ovuma geçer. Diğer hücre kısa sürede dejenere olan, küçük ve işlevsiz bir hücredir. İkinci polar cisimcik atıldığında oositin olgunlaşması tamamlanır (Moore 2002).

Yeni doğanın ovaryumlarında yaklaşık 400 bin primer oosit vardır fakat çocuklukta bunların çoğu geriler, adölasan dönemde ise 40 binden fazla değildir. Bunlardan sadece 400 kadarı sekonder oosit olur ve üreme döneminde ovulasyon sırasında atılır. Bu oositlerin çok azı olgunlaşır. Kontraseptif ilaç kullanan kadınlarda yumurtlanan oosit sayısı oldukça azalır. Çünkü, bunların içindeki hormonlar ovulasyonun olmasını engeller (Moore 2002).



Şekil 2.4.Oogenesis (<http://buffonescience9.wikispaces.com/UNIT+3+-+Cell+Reproduction>)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Merkezi'nden 2011-134 karar sayısı ve 14.12.2011 karar tarihiyle elde edilen 21 adet dişi rat, her grupta 7 adet olmak üzere 3 gruba ayrıldı. 1. Grupta 4 günlük dişi ratlar, 2. Grupta 1 aylık dişi ratlar ve 3.Grupta ise 3,5 aylık dişi ratlar kullanıldı. Ratlar Ksilazin/ Rompun anestezisi altında sakrifiye edildi, sağ ve sol ovaryumları çıkarıldı ve % 10'luk formaldehitte tespit edildi. 2 günlük tespitten sonra rutin histolojik takip yapıldı ve elde edilen parafin bloklardan 5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Bu parafin kesitlere Bioss(bs-3511R) Rb α CD64/IGFR-1,Bioss bs-0014R Rb α IGF-1 ve Anti-Fibroblast Growth Factor Receptor 2 Extracellular (SIGMA),Anti-Fibroblast Growth Factor Basic antibody(SIGMA) ile immünohistokimyasal boyamalar yapıldı. Bu markerlerin ovaryumlardaki ekspresyonları ve dişi ratların yaşları arasındaki ilişki değerlendirildi. Tüm laboratuvar çalışmaları N.E. Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji ABD'nda gerçekleştirildi.

4.BULGULAR

Tablo 4.1. Sol ve sağ ovaryumlarda primordiyal folikül granuloza hücrelerinde İGF1 , İGFR, bFGF ve bFGFRs ekspresyonu.

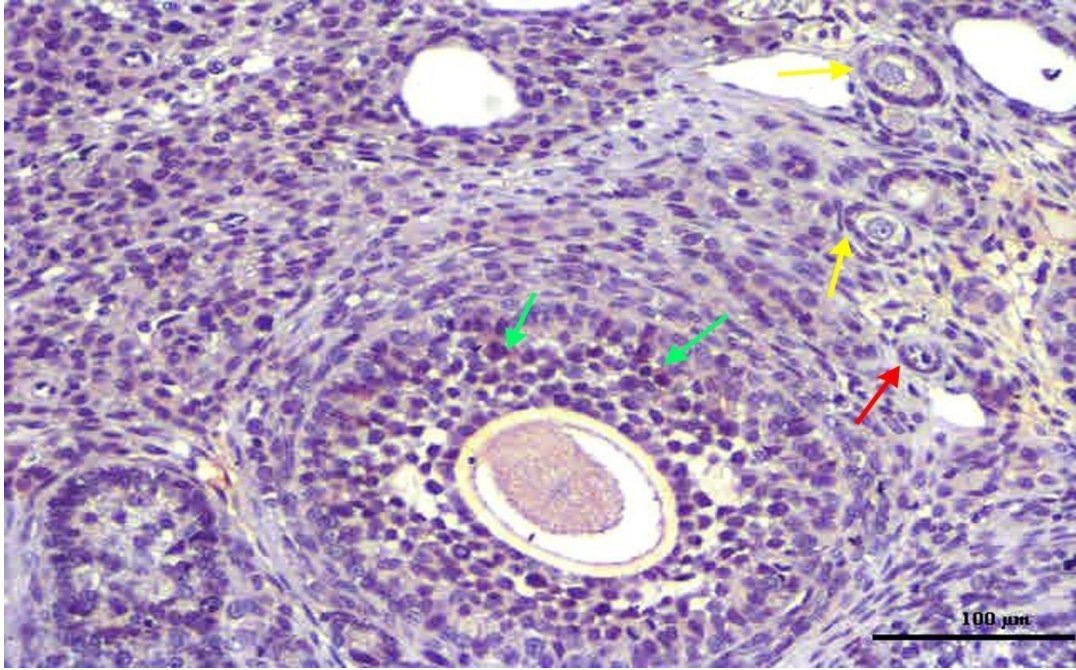
Primordiyal	İGF1		İGFR		bFGF		bFGFRs	
	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ
A1	1	1	1	2	1	1	1	1
A2	2	2	0	0	2	1	0	1
A3	1	1	1	1	0	1	0	0
A4	1	0	1	1	2	1	1	0
A5	1	1	1	1	1	1	1	1
A6	0	1	1	0	1	1	0	0
A7	0	2	1	1	1	0	0	1
B1	0	1	0	1	0	0	1	1
B2	1	1	1	0	1	0	0	1
B3	0	0	1	1	0	1	1	1
B4	1	1	0	2	1	0	1	2
B5	1	0	2	1	1	1	1	0
B6	0	2	0	1	0	1	2	0
B7	2	1	0	1	0	1	1	2
C1	1	0	1	2	1	1	1	1
C2	1	1	2	0	1	0	1	1
C3	1	1	1	1	2	0	0	2
C4	1	0	2	2	1	2	1	0
C5	1	1	2	2	2	1	0	0
C6	0	0	2	2	1	1	1	0
C7	1	2	2	2	1	2	1	1

Tablo 4.2. Sol ve sağ ovaryumlarda primer folikül granuloza hücrelerinde İGF1 , İGFR, bFGF ve bFGFRs ekspresyonu.

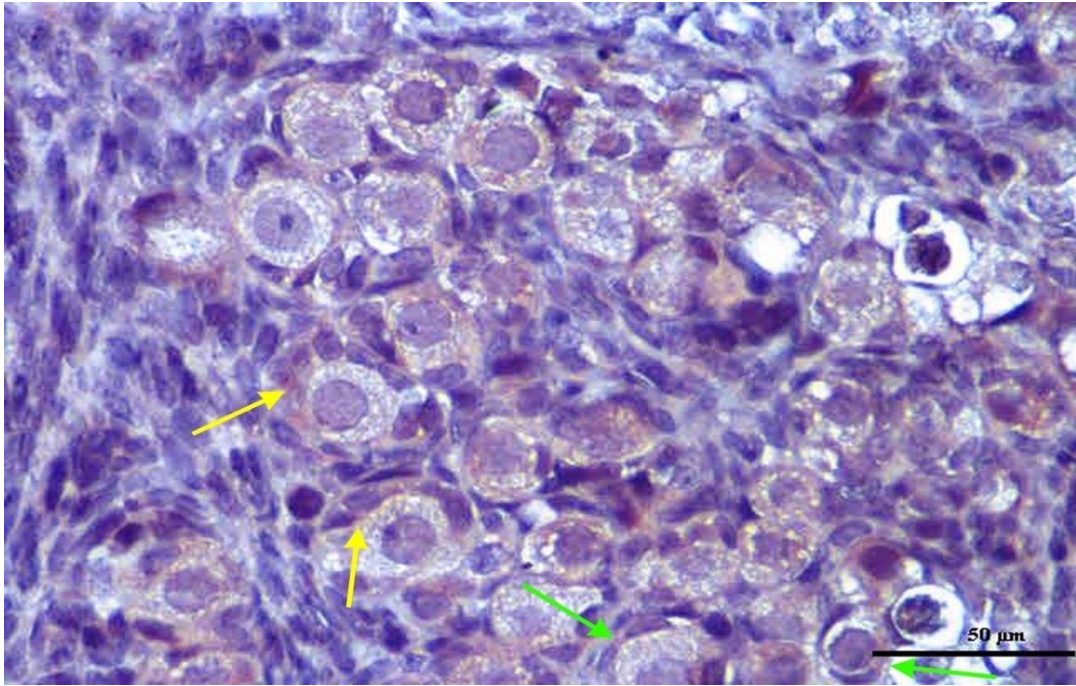
Primer	İGF1		İGFR		bFGF		bFGFRs	
	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ
A1	0	2	1	1	1	1	1	0
A2	1	1	0	1	1	1	1	1
A3	1	1	1	1	0	0	0	1
A4	1	1	0	0	0	1	1	1
A5	1	1	1	1	1	0	1	1
A6	1	0	2	1	1	1	1	1
A7	1	1	1	1	1	0	0	1
B1	0	0	0	1	1	0	1	1
B2	1	0	0	0	0	1	0	0
B3	0	0	1	1	1	1	1	1
B4	1	0	0	2	1	1	1	1
B5	1	1	1	1	0	0	1	0
B6	0	2	1	2	0	1	1	0
B7	0	0	0	1	1	0	0	1
C1	0	1	2	1	3	2	1	1
C2	1	1	1	1	2	2	1	1
C3	0	1	2	2	2	2	2	1
C4	1	0	2	1	1	2	2	1
C5	1	2	3	1	2	2	1	1
C6	1	1	1	2	2	0	1	0
C7	2	1	2	3	2	1	2	1

Tablo 4.3: Sol ve sağ ovaryumlarda sekonder folikül granuloza hücrelerinde İGF1 , İGFR, bFGF ve bFGFRs ekspresyonu.

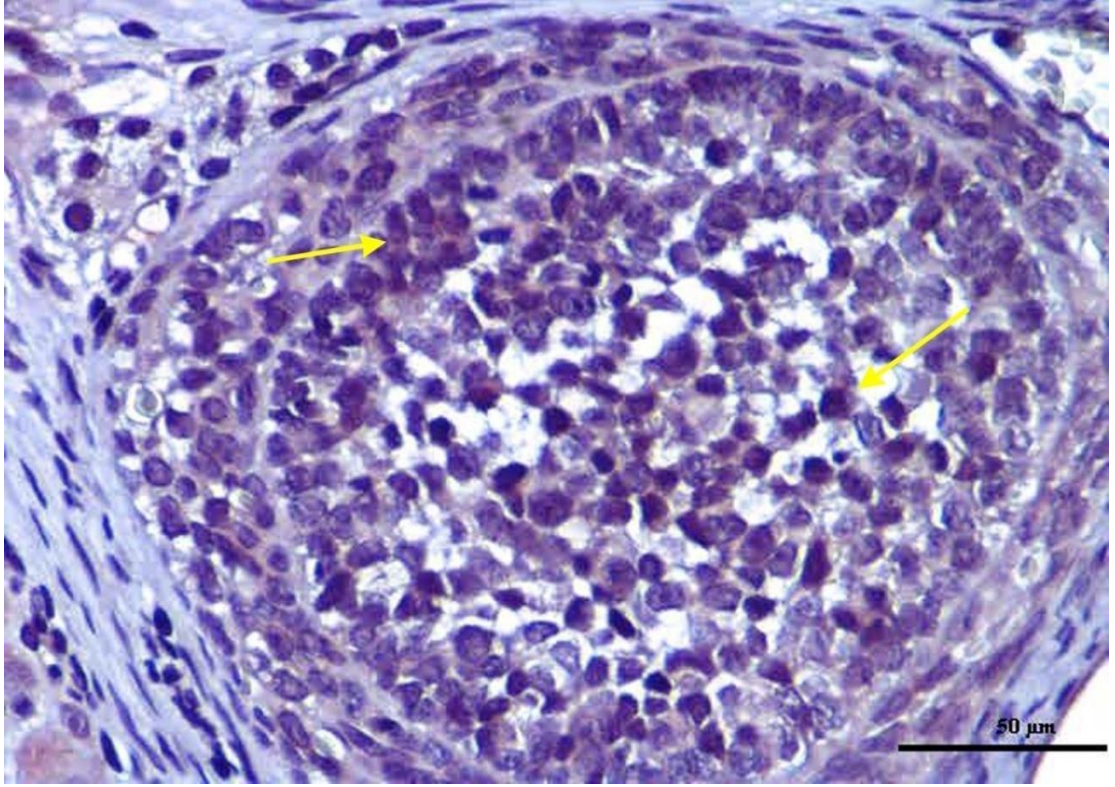
Sekonder	İGF1		İGFR		bFGF		bFGFRs	
	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ	SOL	SAĞ
B1	0	1	0	1	1	1	1	1
B2	1	1	1	1	0	0	1	0
B3	0	0	1	0	0	0	1	0
B4	1	1	1	2	1	1	1	1
B5	1	1	0	3	0	1	0	1
B6	2	2	0	2	1	1	0	0
B7	1	0	0	1	1	0	1	1
C1	2	1	2	1	3	1	1	1
C2	1	1	1	2	2	2	2	1
C3	1	2	2	2	1	2	0	1
C4	2	1	3	2	2	2	1	1
C5	1	1	2	1	2	2	2	1
C6	2	2	2	1	2	2	2	1
C7	2	1	1	2	2	2	2	2



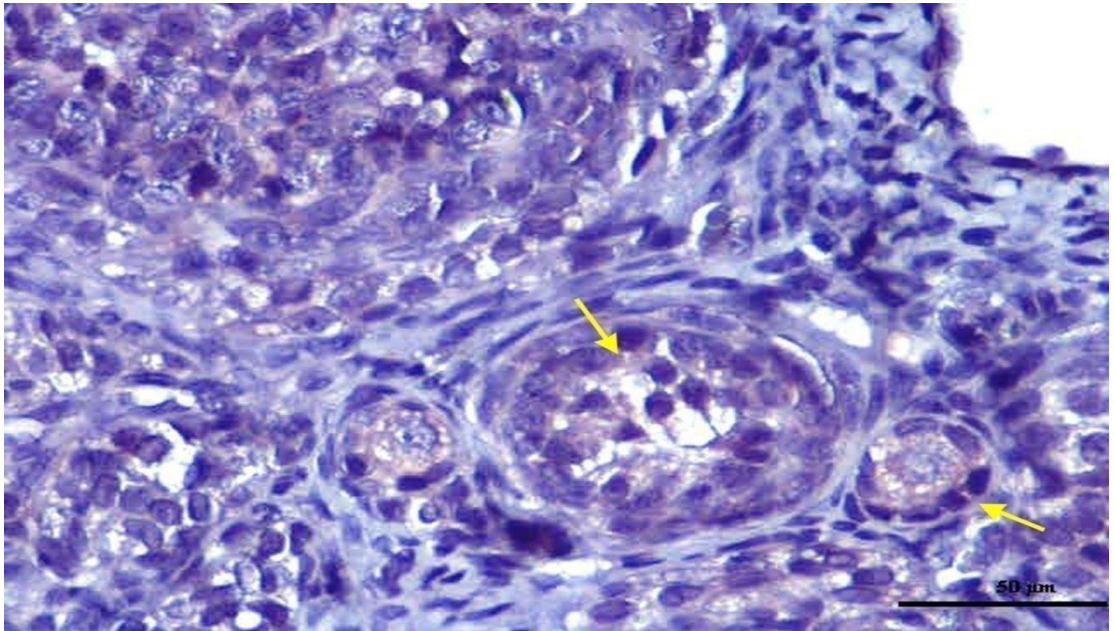
Resim 4.1. A grubu sağ ovaryuma ait bir ovaryumda sarı oklar primer folikülde granüloza hücreleri arasında + 2 İGF1 değerlikli ekspresyonu, yeşil ok ise primordiyal folikülde + 1 değerlikli İGF1 ekspresyonunu göstermektedir.



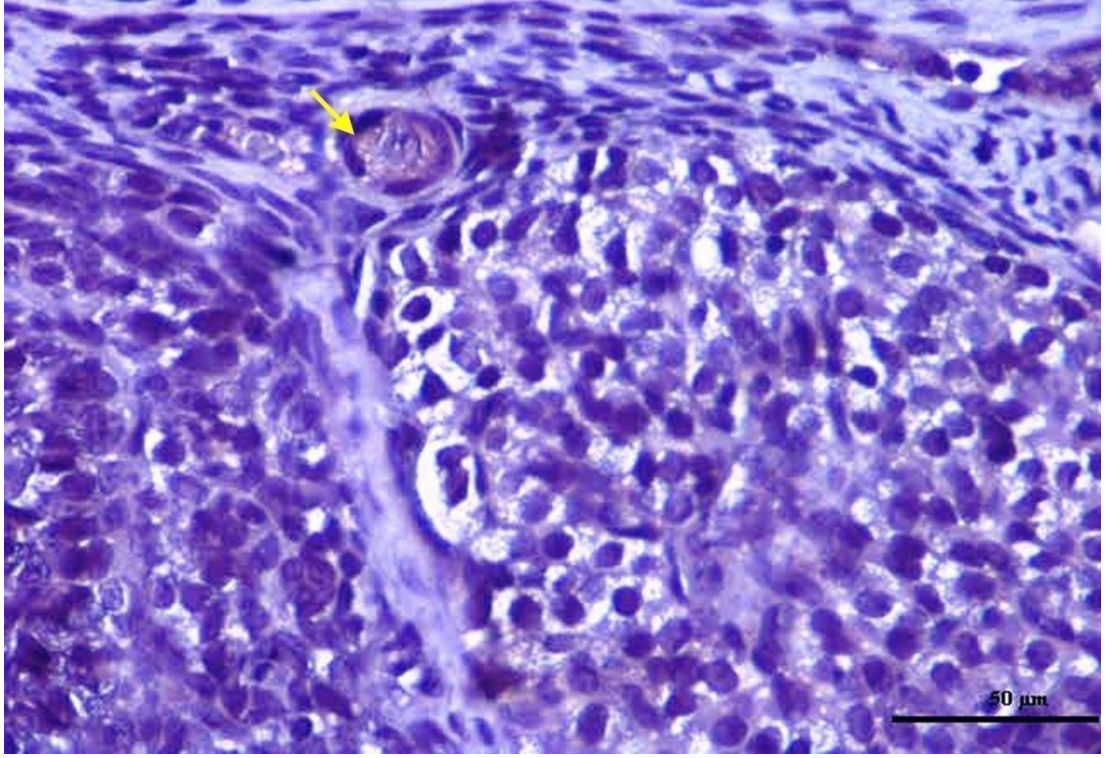
Resim 4.2. A Grubu sağ ovaryumda sarı oklar primer folikül granuloza hücrelerinde + 2, yeşil oklar ise primordiyal foliküllerde + 1 değerlikli İGF1 ekspresyonu göstermektedir.



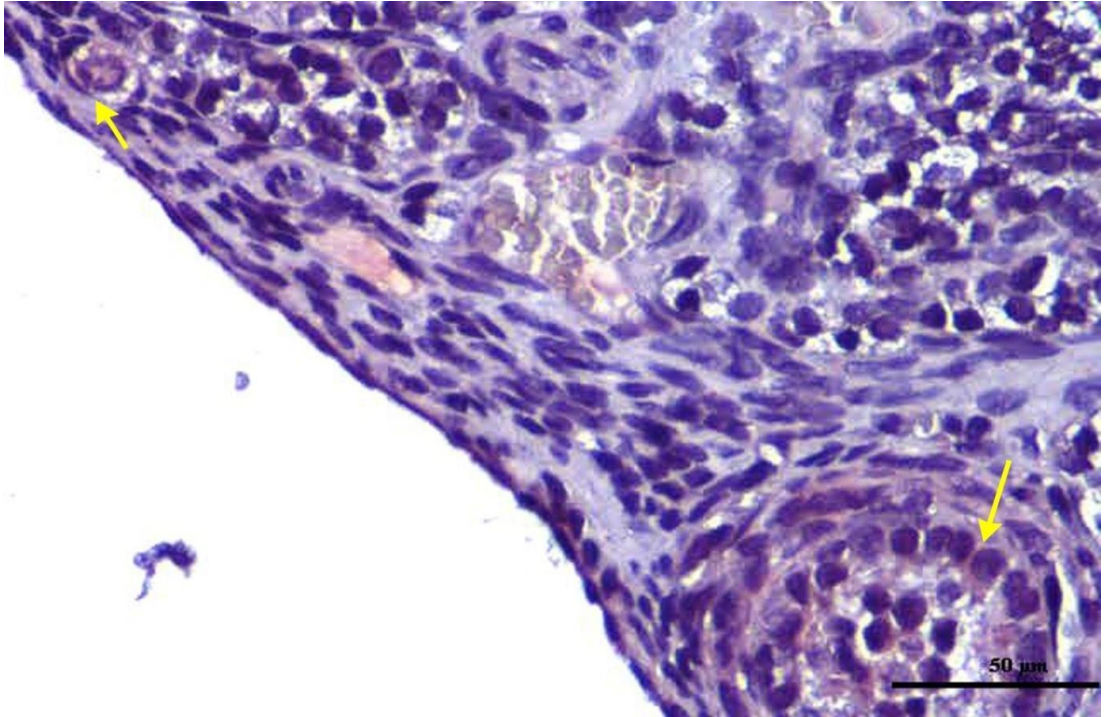
Resim 4.3. B Grubu sağ ovaryumda primer folikülde + 1 değerlikli İGF1 ekspresyonu gözlenmektedir.



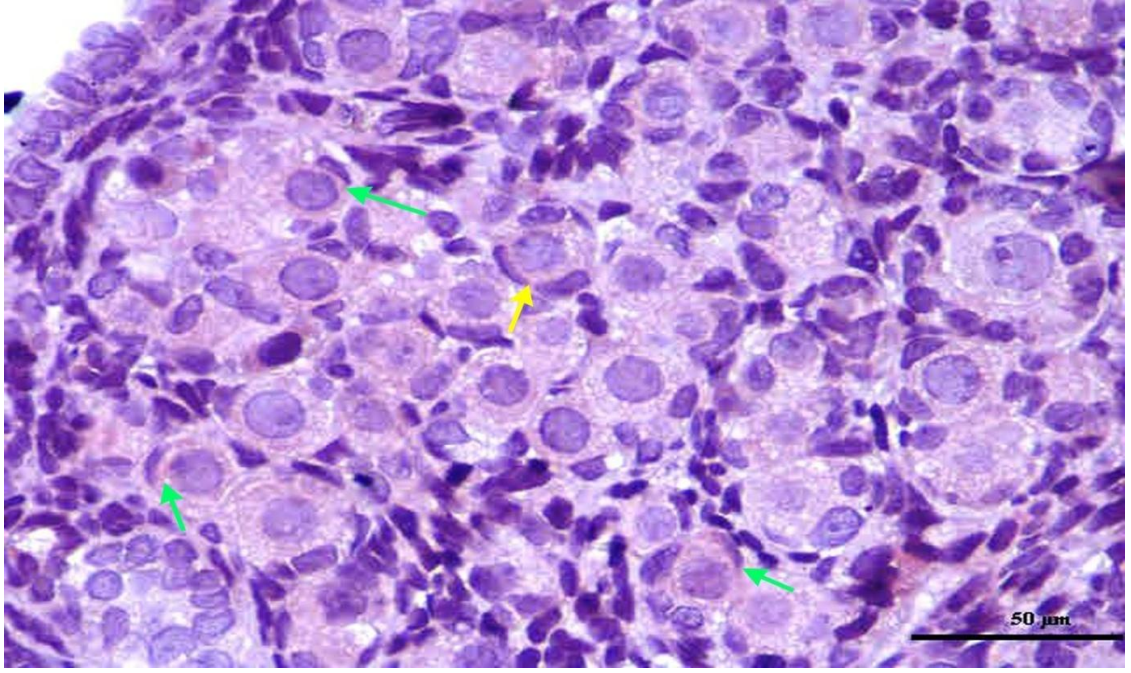
Resim 4.4. C Grubu sol ovaryumda primer foliküllerde +2 değerlikli İGF1 ekspresyonu gözlenmektedir.



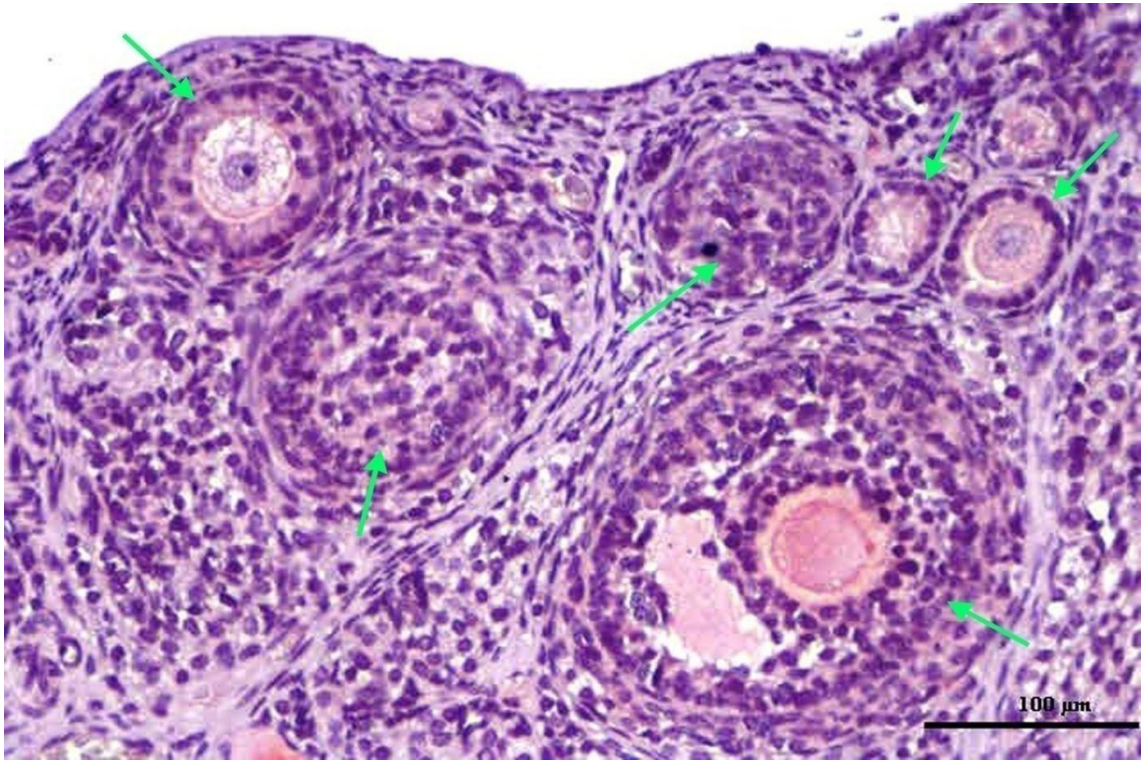
Resim 4.5. C grubu sağ ovaryumda primordiyal folikülde + 2 değerlikli İGF1 Ekspresyonu gözlenmektedir.



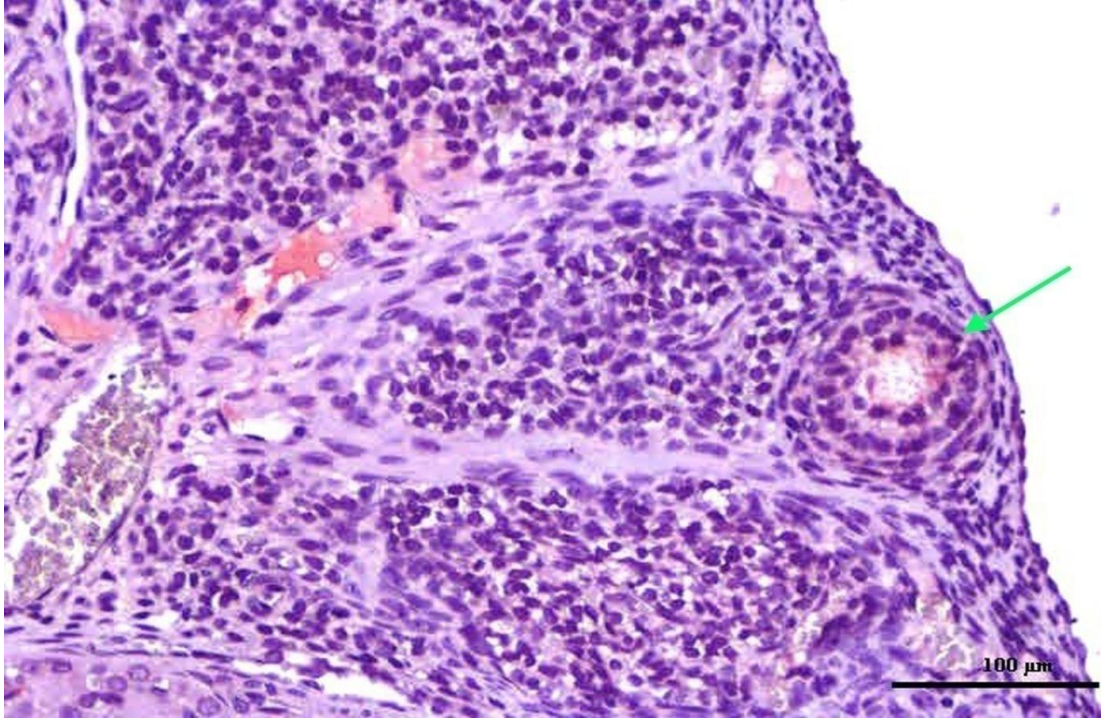
Resim 4.6. B grubu sağ ovaryumda primordiyal folikülde + 1 değerlikli İGF1 ekspresyonu gözlenmektedir.



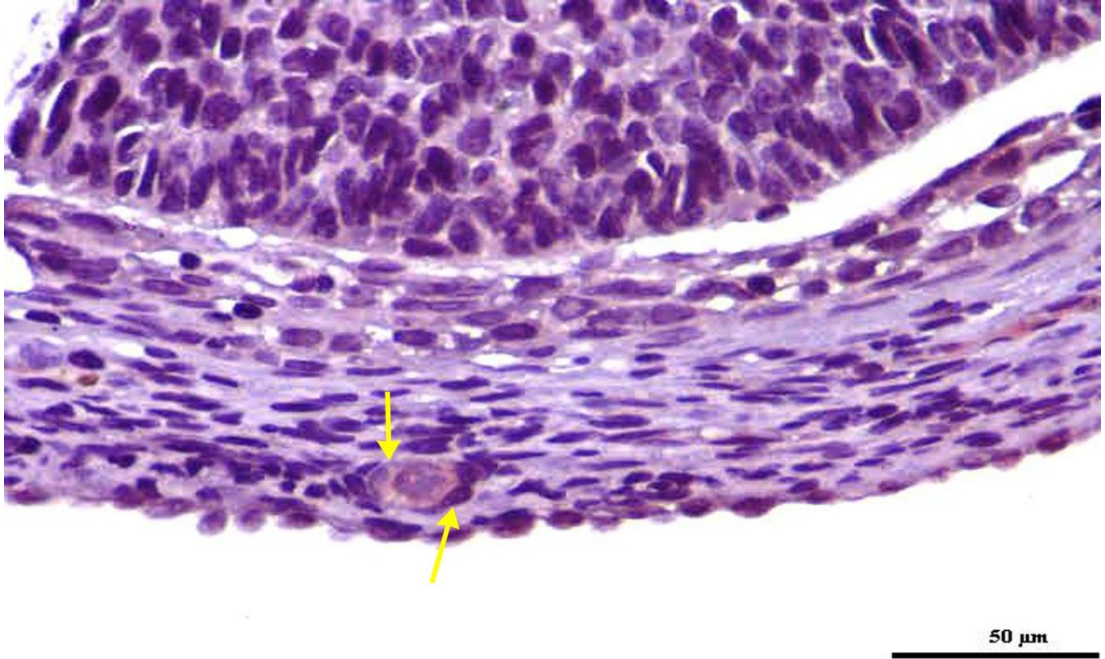
Resim 4.7. A Grubu sol ovaryuma ait bir kesitte yeşil oklar primordiyal folikülde + 1, sarı ok ise primer folikülde + 1 değerlikli İGF1R ekspresyonu göstermektedir.



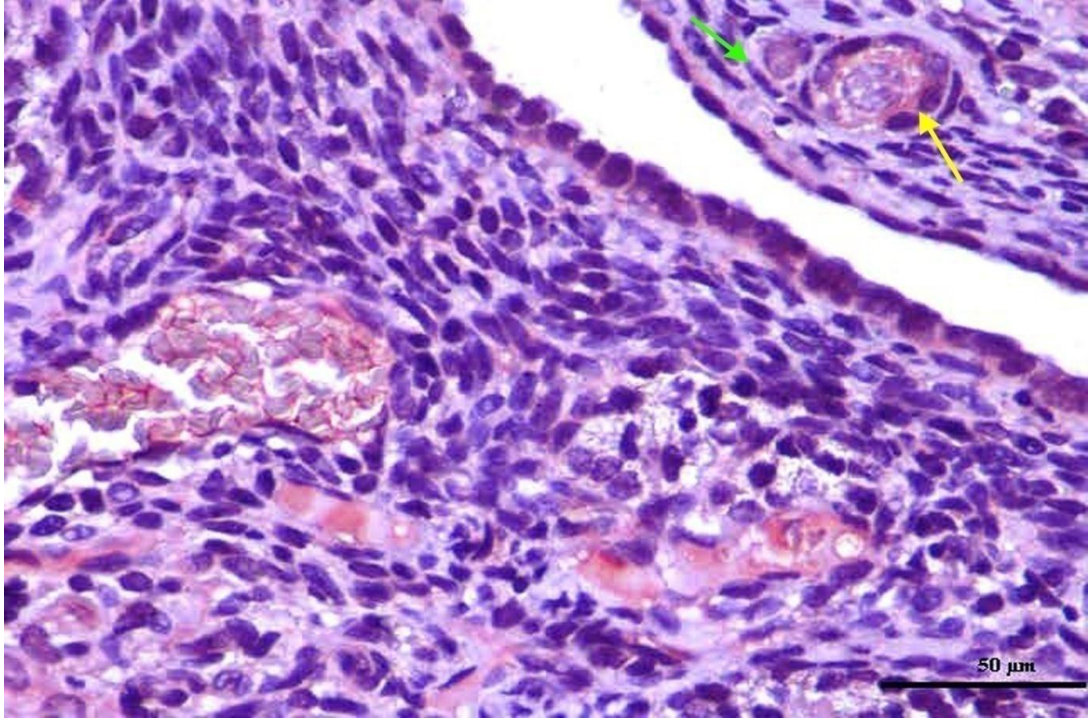
Resim 4.8. B grubu sağ ovaryuma ait kesitte primer foliküllerde + 2 ve sekonder folikülde + 3 değerlikli İGF1R ekspresyonları gözlenmektedir.



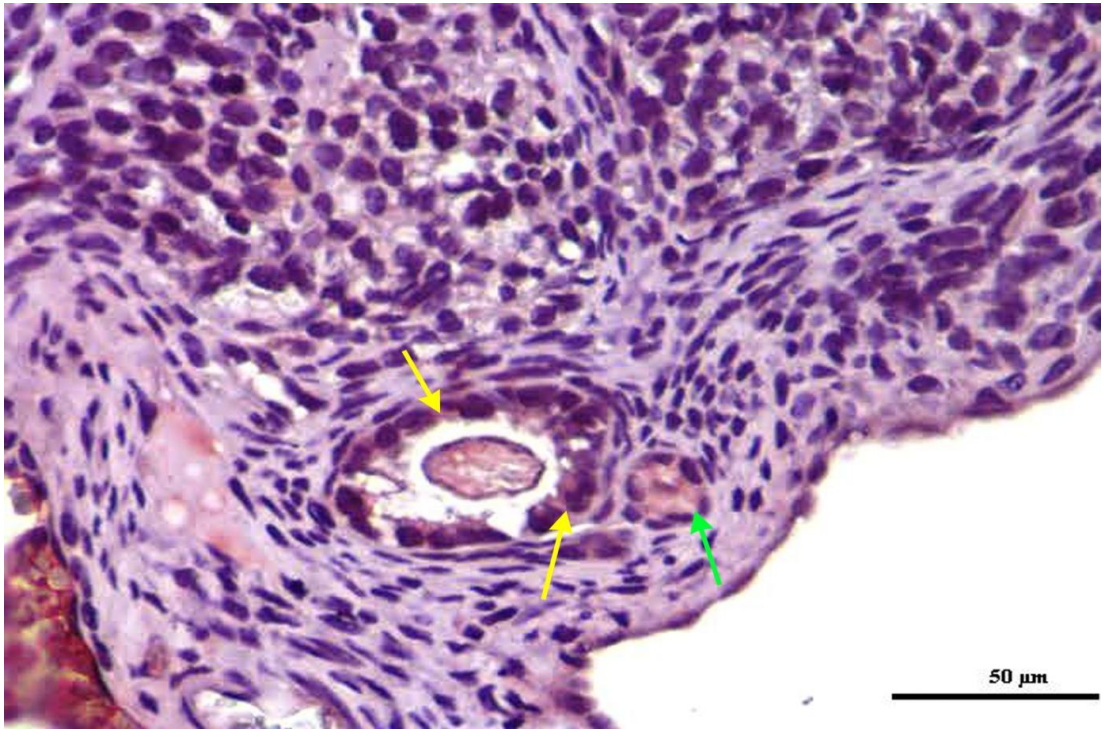
Resim 4.9. B grubu sağ ovaryuma ait bir kesitte primer folikülde + 2 değerlikli İGF1R ekspresyonu gözlenmektedir.



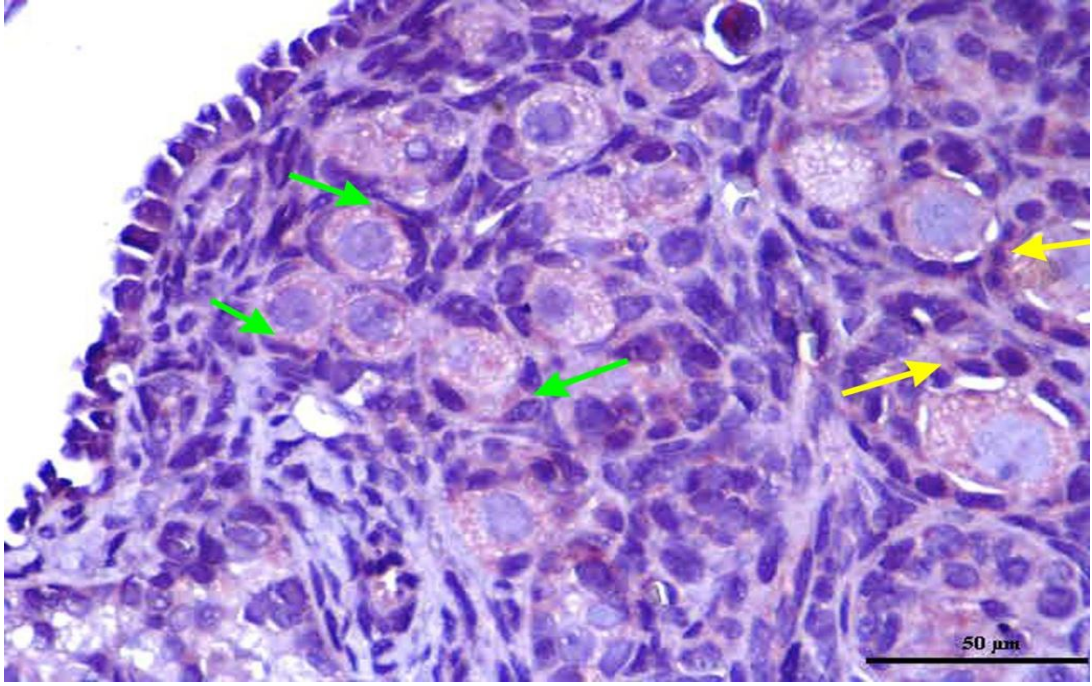
Resim 4.10. C grubu sağ ovaryuma ait bir kesitte primordiyal folikülde +1 değerlikli İGF1R ekspresyonu gözlenmektedir.



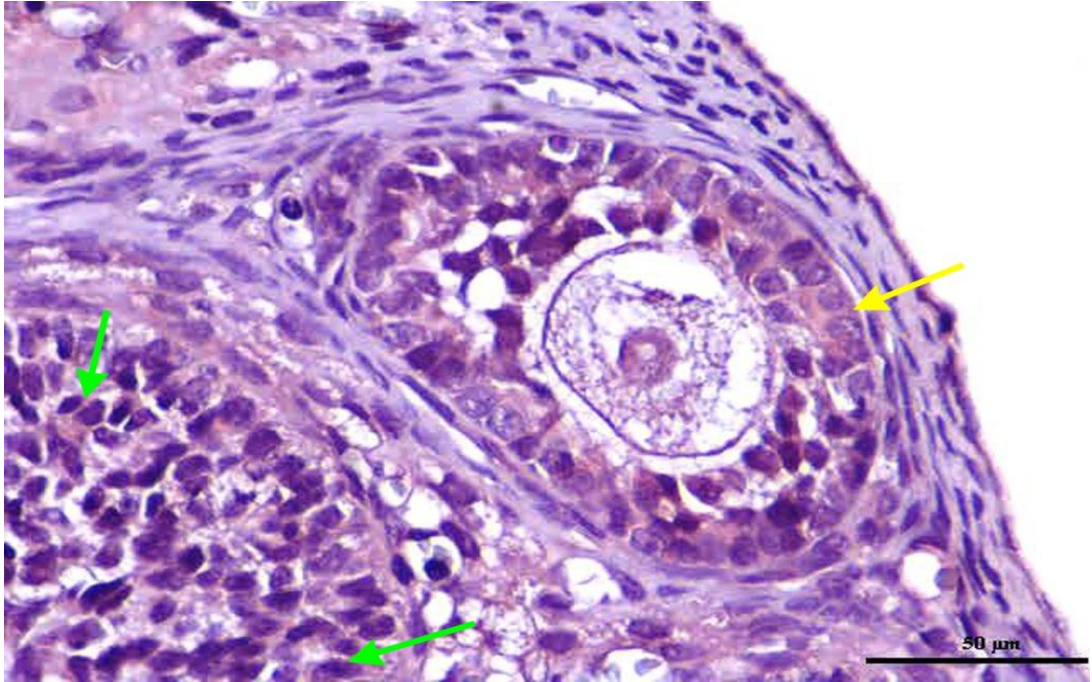
Resim 4.11. C grubu sağ ovaryuma air kesitte yeşil ok primordiyal folikülde negatif ekspresyonu, sarı ok ise primer folikülde +2 değerlikli İGF1R ekspresyonu göstermektedir.



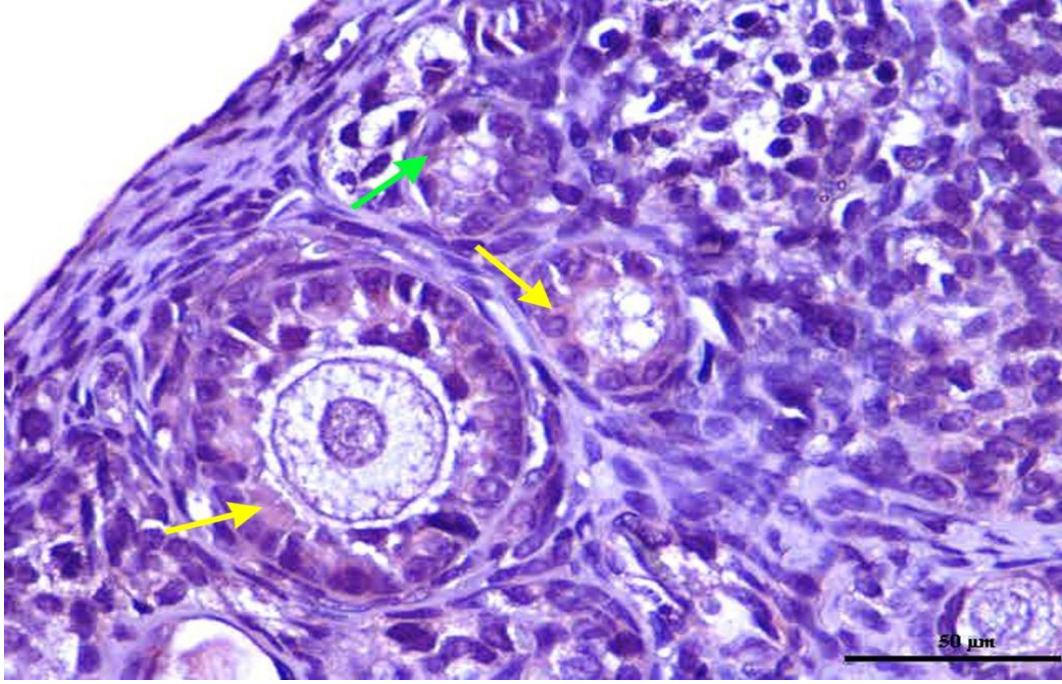
Resim 4.12. C grubu sol ovaryuma air kesitte yeşil ok primordiyal folikülde +1, sarı oklar ise primer folikülde +2 değerlikli İGF1R ekspresyonu göstermektedir.



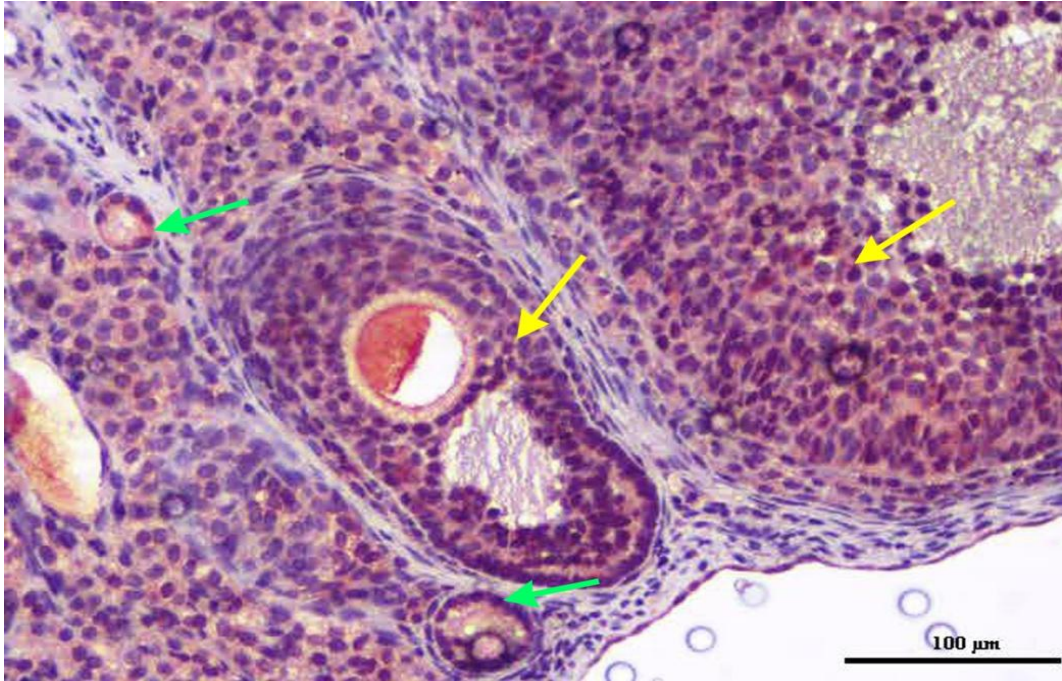
Resim 4.13. A grubu sol ovaryuma bir kesitte yeşil oklar primordiyal foliküllerde + 1, sarı oklar ise primer foliküllerde + 1 değerlikli bFGF ekspresyonunu göstermektedir.



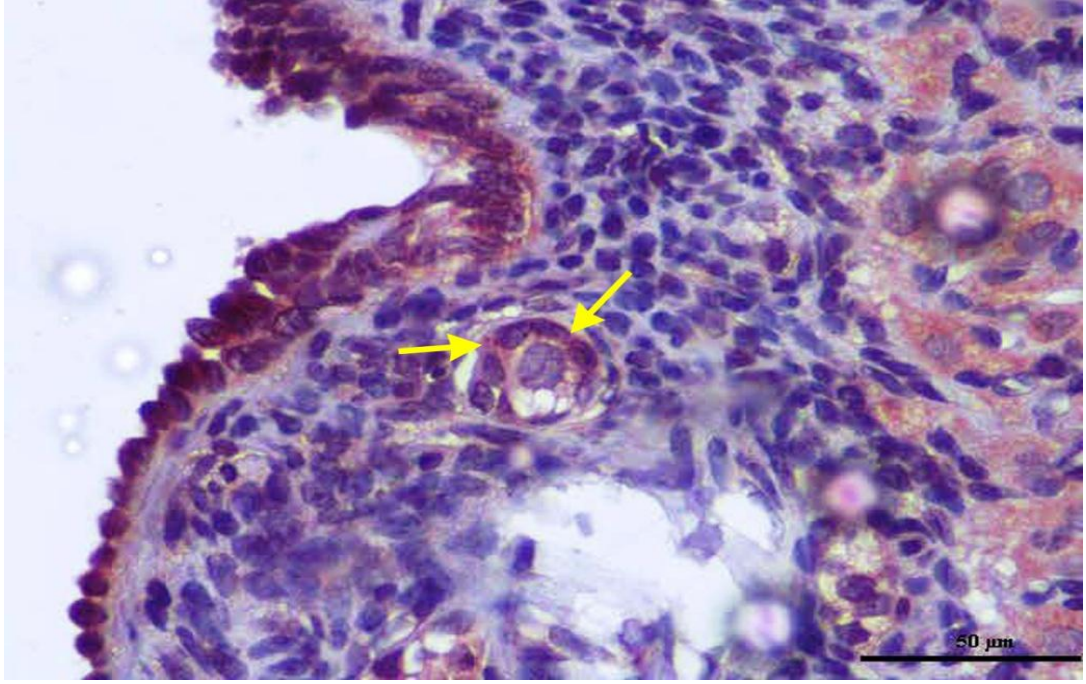
Resim 4.14. B grubu sağ ovaryuma ait bir kesitte sarı ok sekonder folikülde + 1, yeşil oklar ise primer folikülde +1 değerlikli bFGF ekspresyonunu göstermektedir.



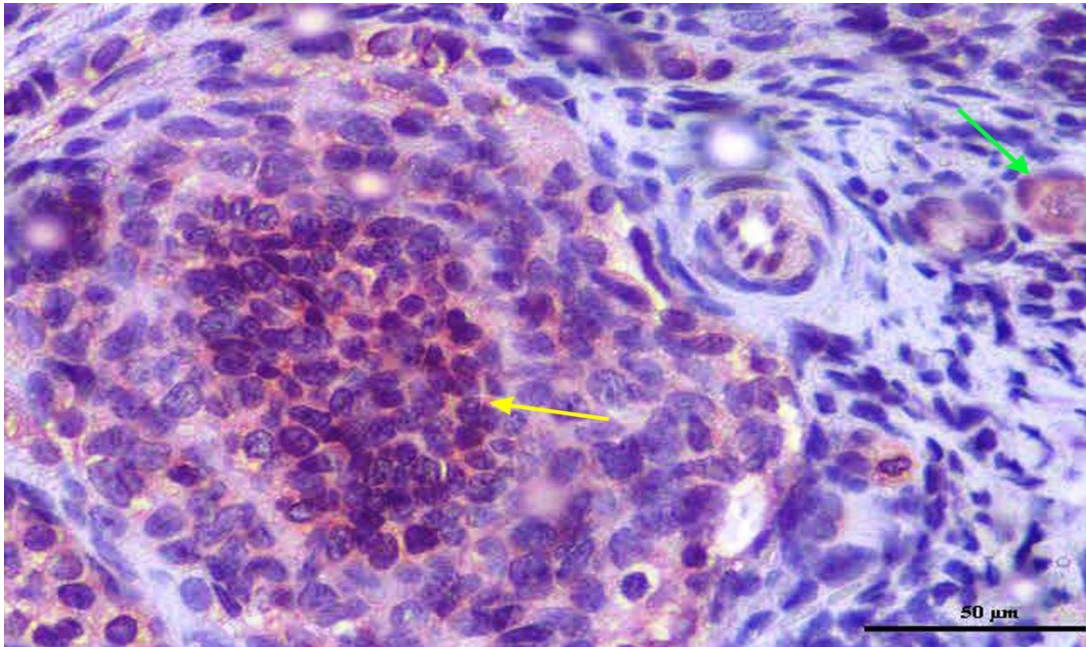
Resim 4.15. B grubu sol ovaryuma bir kesitte sarı oklar primer foliküllerde + 1, yeşil ok ise primer folikülde +1 değerlikli bFGF ekspresyonu göstermektedir. Kesitler değerlendirilirken boyanma yaygınlığı göz önüne alındığından +2 değerlikli olarak kabul edilmiştir.



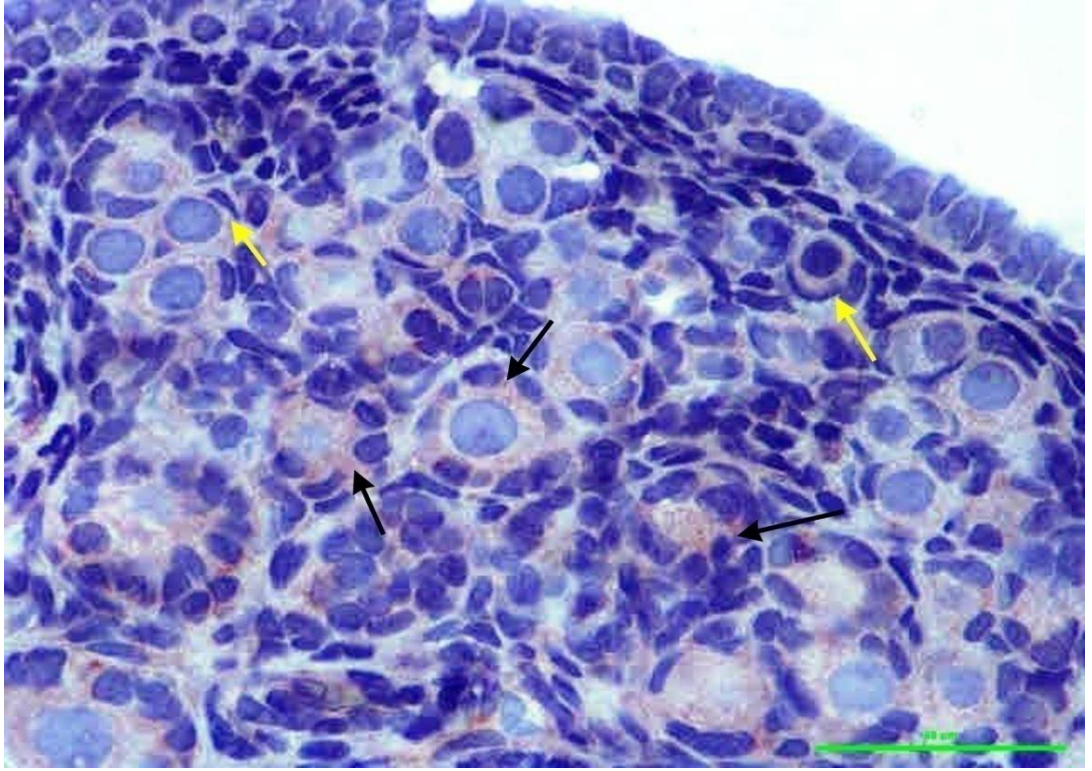
Resim 4.16. C grubu sol ovaryuma ait bir kesitte sarı oklar sekonder foliküllerde + 3, yeşil oklar ise primer folikülde + 2 değerlikli bFGF ekspresyonunu göstermektedir.



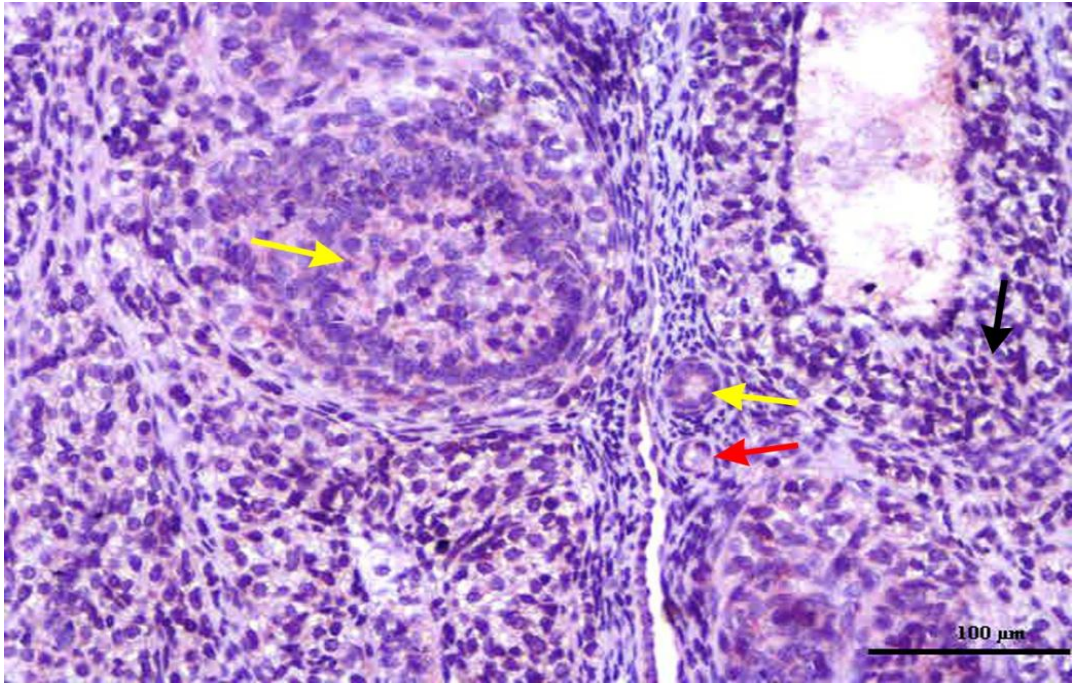
Resim 4.17. C grubu sol ovaryuma ait kesitte oklar primer folikülde +3 değerlikli bFGF ekspresyonunu göstermektedir.



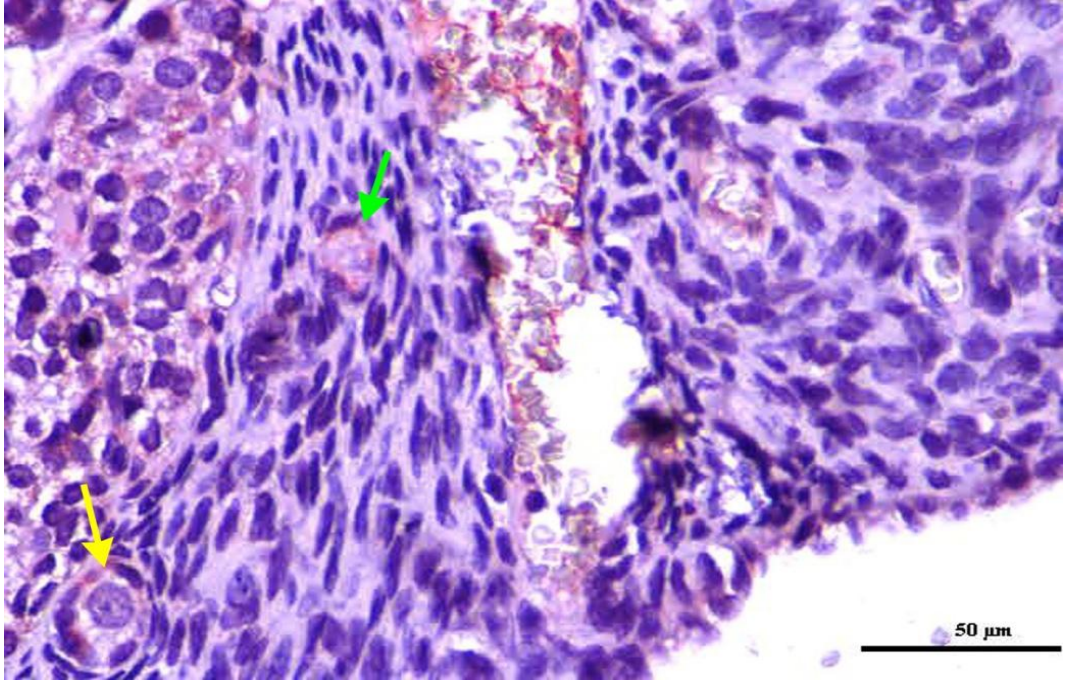
Resim 4.18. C grubu sağ ovaryuma ait bir kesitte sarı ok primer folikülde + 2 değerlikli, yeşil ok ise primordiyal folikülde + 2 değerlikli bFGF ekspresyonu göstermektedir.



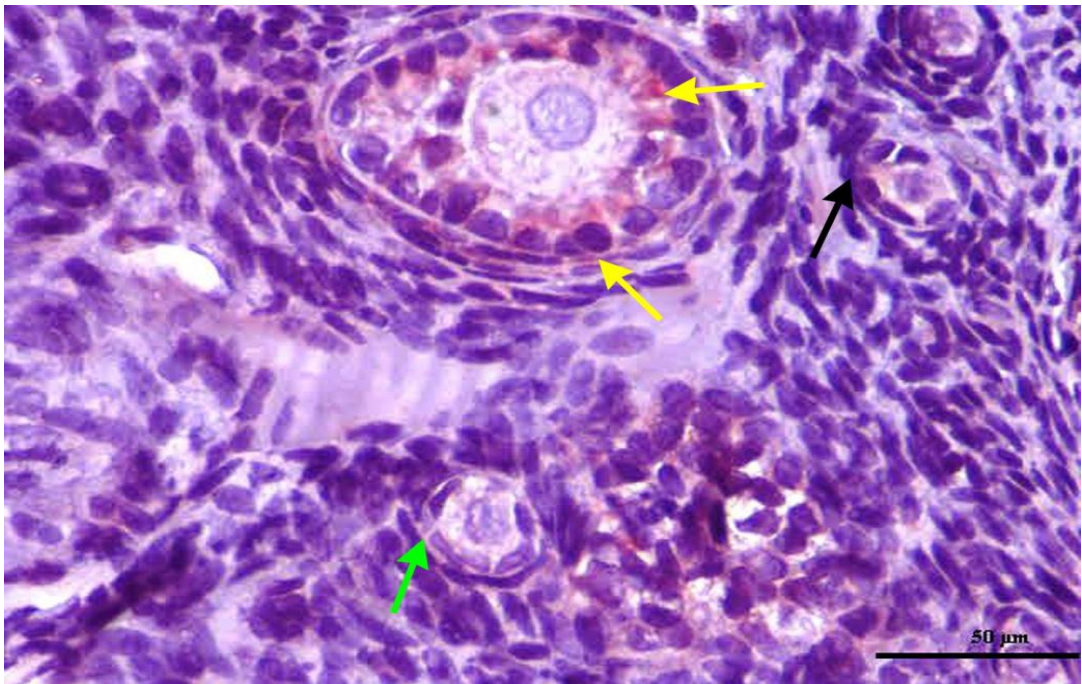
Resim 4.19. A grubu sol ovaryuma ait bir kesitte sarı oklar primordiyal foliküllerde +1, siyah oklar primer foliküllerde +1 değerlikli bFGFRs ekspresyonu göstermektedir.



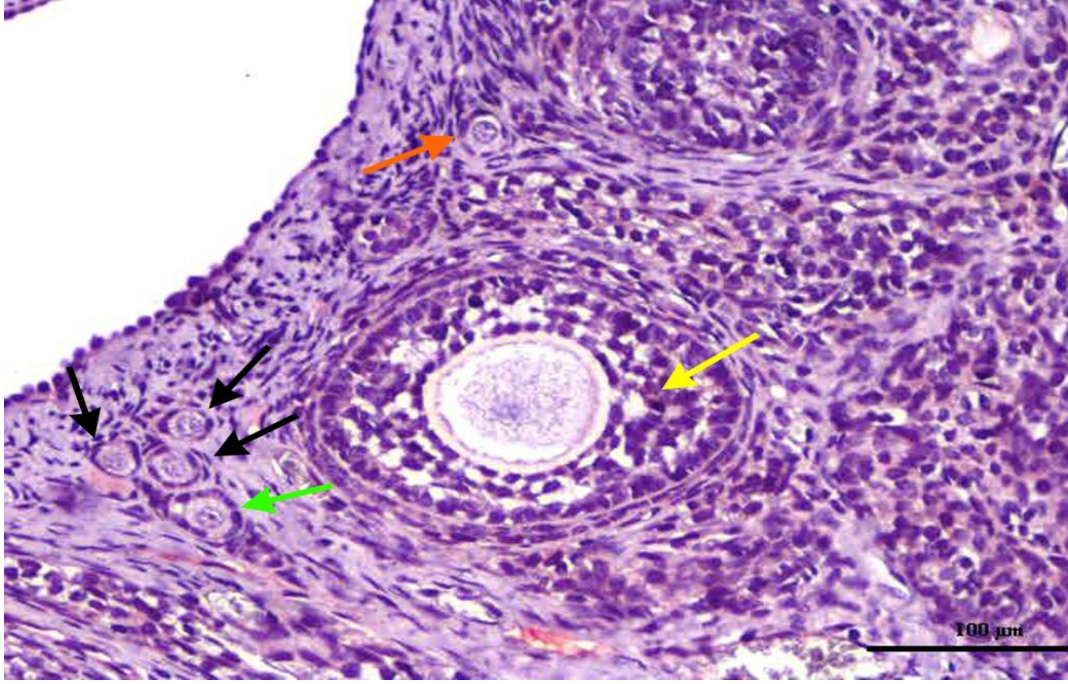
Resim 4.20. B grubu sağ ovaryuma bir kesitte kırmızı ok primordiyal folikülde +1, sarı oklar primer foliküllerde +1, siyah ok ise sekonder folikülde + 1 değerlikli bFGFRs ekspresyonu göstermektedir.



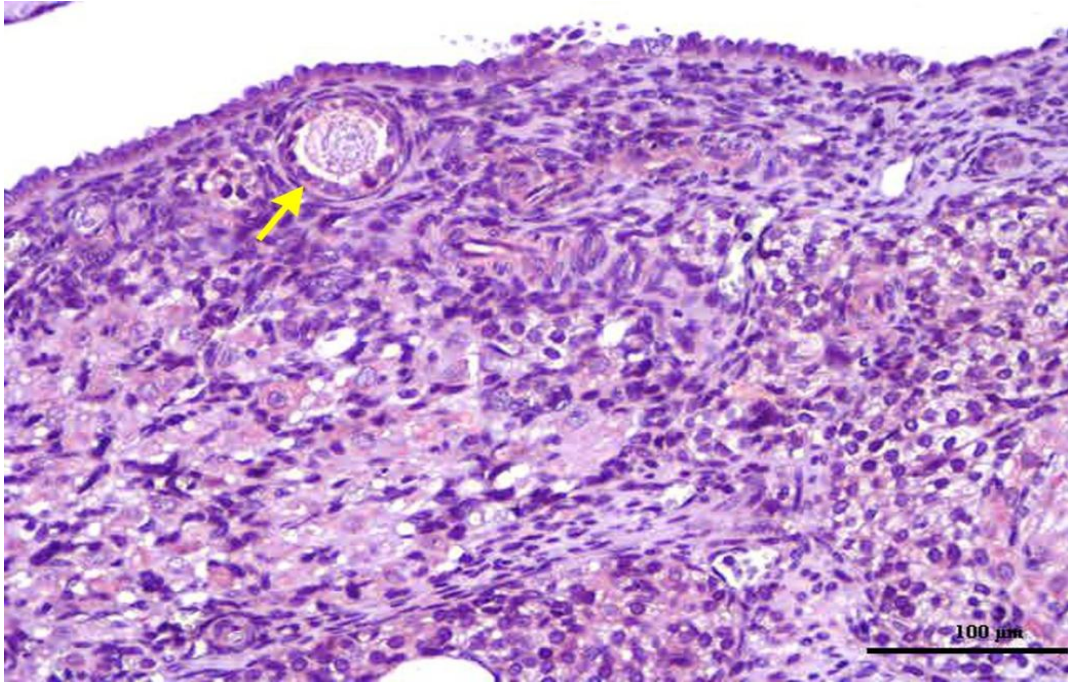
Resim 4.21. B grubu sağ ovaryumda yeşil ok primordiyal folikülde+ 2, sarı ok ise primer folikülde +1 değerlikli bFGFRs ekspresyonunu göstermektedir.



Resim 4.22. C grubu sol ovaryuma bir kesitte sarı ok primer folikülde +2, siyah ok primer folikülde +1 değerlikli bFGFRs ekspresyonunu göstermektedir. Yeşil ok ise boya almayan primer folikülü göstermektedir. Bu kesitin değerlendirilmesi +1 olarak kabul edilmiştir.



Resim 4.23. C grubu sağ ovaryuma ait bir kesitte Sarı ok sekonder folikülde +1, yeşil ok primer folikülde negatif, turuncu ok primordiyal folikülde +1, siyah oklar ise primordiyal folikülde negatif değerlikli bFGFRs ekspresyonunu göstermektedir.



Resim 4.24. C grubu sol ovaryuma ait bir kesitte +2 değerlikli bFGFRs ekspresyonu gözlenmektedir.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ SONUÇLARI

PRİMORDİYAL FOLİKÜLLER

Tablo 4.4. Sol ovaryumda Primordiyal foliküllerde İGF1 ekspresyonu, $P>0,05$, anlamsız.

Primordiyal Sol İGF1	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,85±0,26	0,69	GA-GB, 0,674	0	1	1
GrupB	0,71±0,28	0,75	GA-GC, 0,93	0	1	1
GrupC	0,85±0,14	0,37	GB-GC, 0,545	1	1	1

Tablo 4.5. Sağ ovaryumda Primordiyal foliküllerde İGF1 ekspresyonu, $P>0,05$, anlamsız.

Primordiyal Sağ İGF1	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	1,14± 0,26	0,69	GA-GB, 0,43	0	1	1
GrupB	0,85±0,26	0,69	GA-GC, 0,26	0	1	1
GrupC	0,71±0,28	0,75	GB-GC, 0,67	1	1	1

Tablo 4.6. Sol ovaryumda Primordiyal foliküllerde İGF1Rs ekspresyonu, P<0,05*.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,85 ±0,14	0,37	GA-GB, 0,275	1	1	1
GrupB	0,57± 0,29	0,78	GA-GC, *,007	0	0	1
GrupC	1,71±0,18	0,48	GB-GC, *,014	1	2	2

Tablo 4.7. Sağ ovaryumda Primordiyal foliküllerde İGF1Rs ekspresyonu, P>0,05, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,85±0,26	0,69	GA-GB, 0,653	0	1	1
GrupB	1,00± 0,21	0,57	GA-GC, 0,075	1	1	1
GrupC	1,57±0,29	1,57 0,29	GB-GC, ,095	1	2	2

Tablo 4.8. Sol ovaryumda Primordiyal foliküllerde bFGF ekspresyonu, $P < 0,05^*$.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	1,14±0,26	0,69	GA-GB, ,058	1	1	2
GrupB	0,42±0,20	0,53	GA-GC, ,705	0	0	1
GrupC	1,28±0,18	0,48	GB-GC, *,015	1	1	2

Tablo 4.9. Sağ ovaryumda Primordiyal foliküllerde bFGF ekspresyonu, $P > 0,05$, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,85±0,14	0,37	GA-GB, 0,25	1	1	1
GrupB	0,57±0,20	0,53	GA- GC,0,70	0	1	1
GrupC	1,00±0,30	0,81	GB-GC, 0,293	0	1	2

Tablo 4.10. Sol ovaryumda Primordiyal foliküllerde bFGFRs ekspresyonu, $P>0,05$, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,42±0,20	0,53	GA-GB, ,081	0	0	1
GrupB	1,00±0,21	0,57	GA-GC, ,298	1	1	1
GrupC	0,71±0,18	0,48	GB-GC, ,334	0	1	1

Tablo 4.11. Sağ ovaryumda Primordiyal foliküllerde bFGFRs ekspresyonu, $P>0,05$, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,57±0,20	0,53	GA-GB, ,293	0	1	1
GrupB	1,00±0,30	0,81	GA-GC, ,633	0	1	2
GrupC	0,71±0,28	0,75	GB-GC, ,493	0	1	1

PRİMER FOLİKÜLLER

Tablo 4.12. Sol ovaryumda Primer foliküllerde İGF1 ekspresyonu, $P>0,05$, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,85±0,14	0,37	GA-GB, ,107	1	1	1
GrupB	0,42±0,20	0,53	GA-GC, ,936	0	0	1
GrupC	0,85±0,26	0,69	GB-GC, ,225	0	1	1

Tablo 4.13. Sağ ovaryumda Primer foliküllerde İGF1 ekspresyonu, $P>0,05$, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	1,00±0,21	0,57	GA-GB, ,095	1	1	1
GrupB	0,42±0,29	0,78	GA- GC,1	0	0	1
GrupC	1,00±0,21	0,57	GB-GC, ,095	1	1	1

Tablo 4.14. Sol ovaryumda Primer foliküllerde İGF1Rs ekspresyonu, P<0,05*.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,85±0,26	0,69	GA-GB, ,225	0	1	1
GrupB	0,42±0,20	0,53	GA-GC, *,024	0	0	1
GrupC	1,85±0,26	0,69	GB-GC, *,004	1	2	2

Tablo 4.15. Sağ ovaryumda Primer foliküllerde İGF1Rs ekspresyonu, P<0,05*.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,85±0,14	0,37	GA-GB, ,335	1	1	1
GrupB	1,14±0,26	0,69	GA-GC, *,045	1	1	2
GrupC	1,57±0,29	0,78	GB-GC, ,351	1	1	2

Tablo 4.16. Sol ovaryumda Primer foliküllerde bFGF ekspresyonu, P<0,05*.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,71±0,18	0,48	GA-GB, ,591	0	1	1
GrupB	0,57±0,20	0,53	GA-GC, *,003	0	1	1
GrupC	2,00±0,21	0,57	GB-GC, *,002	2	2	2

Tablo 4.17. Sağ ovaryumda Primer foliküllerde bFGF ekspresyonu, P<0,05*.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,57±0,20	0,53	GA-GB, 1	0	1	1
GrupB	0,57±0,20	0,53	GA-GC, *,0021	0	1	1
GrupC	1,57±0,29	0,78	GB-GC, *,0021	1	2	2

Tablo 4.18. Sol ovaryumda Primer foliküllerde bFGF ekspresyonu, P<0,05*.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,71±0,18	0,48	GA-GB, 1	0	1	1
GrupB	0,71±0,18	0,48	GA-GC, *0,03	0	1	1
GrupC	1,42±0,20	0,53	GB-GC, *0,03	1	1	2

Tablo 4.19. Sağ ovaryumlarda Primer foliküllerde bFGF ekspresyonu, P>0,05, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupA	0,85±0,14	0,37	GA-GB, ,254	1	1	1
GrupB	0,57±0,20	0,53	GA-GC, 1	0	1	1
GrupC	0,85±0,14	0,37	GB-GC, ,254	1	1	1

SEKONDER FOLİKÜLLER

Tablo 4.20. Sol ovaryumlarda Sekonder foliküllerde İGF1 ekspresyonu, $P>0,05$, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupB	0,85±0,26	0,69	,058	0	1	1
GrupC	1,57±0,20	0,53		1	2	2

Tablo 4.21. Sağ ovaryumlarda Sekonder foliküllerde İGF1 ekspresyonu, $P>0,05$, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupB	0,85±0,26	0,69	,202	0	1	1
GrupC	1,28±0,18	0,48		1	1	2

Tablo 4.22. Sol ovaryumlarda Sekonder foliküllerde İGF1Rs ekspresyonu, $P < 0,05$, anlamlı.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupB	0,42±0,20	0,53	0,004	0	0	1
GrupC	1,85±0,26	0,69		1	2	2

Tablo 4.23. Sağ ovaryumlarda Sekonder foliküllerde İGF1Rs ekspresyonu, $P > 0,05$, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupB	1,42±0,36	0,97	0,67	1	1	2
GrupC	1,57±0,20	0,53		1	2	2

Tablo 4.24. Sol ovaryumlarda Sekonder foliküllerde bFGF ekspresyonu, $P<0,05$, anlamlı.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupB	0,57±0,20	0,53	,002	0	1	1
GrupC	2,00±0,21	0,57		2	2	2

Tablo 4.25. Sağ ovaryumlarda Sekonder foliküllerde bFGF ekspresyonu, $P<0,05$, anlamlı.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupB	0,57±0,20	0,53	,002	0	1	0
GrupC	1,85±0,14	0,37		2	2	2

Tablo 4.26. Sol ovaryumlarda Sekonder foliküllerde bFGF ekspresyonu, $P>0,05$, anlamsız.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupB	0,71±0,18	0,48	,061	0	1	1
GrupC	1,42±0,29	0,78		1	2	2

Tablo 4.27. Sağ ovaryumlarda Sekonder foliküllerde bFGF ekspresyonu, $P<0,05$, anlamlı.

	Mean+SE	SD	P	Percentile		
				25	50	75
GrupB	0,57±0,20	0,53	,044	0	1	1
GrupC	1,14±0,14	0,37		1	1	1

Sol ovaryumda primordiyal foliküllerde İGF1Rs ekspresyonu GrupA- GrupC ve GrupB-GrupC arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.6). Sol ovaryumda primordiyal foliküllerde bFGF ekspresyonu GB-GC arasında anlamlı bulunmuştur. Diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Primer foliküller arasında ise İGF1Rs ekspresyonu için sol ovaryumda GA-GC ve GB-GC arasında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.14). Primer foliküller arasında sağ ovaryumda İGF1Rs ekspresyonu için GA-GC (Tablo 4.15), sol ovaryumda bFGF ekspresyonu için GB-GC ve GA-GC (Tablo 4.16), sağ ovaryumda bFGF ekspresyonu için GA-GC ve GB-GC (Tablo 4.17), sol ovaryumda bFGFRs ekspresyonu GA-GC ve GB-GC (Tablo 4.18) için istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur.

Sekonder foliküllerde ise sol ovaryumda İGF1Rs ekspresyonu (Tablo 4.22), sol ovaryumda bFGF ekspresyonu (Tablo 4.24), sağ ovaryumda bFGF ekspresyonu (Tablo 4.25) ve sağ ovaryumda bFGFRs ekspresyonu (Tablo 4.27) 2. Gruba göre 3. grupta istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

5.TARTIŞMA

Çalışmamızda ratlarda yaş gruplarına göre bFGF, BFGFR, İGF1 ve İGF1R ekspresyonları incelenmiştir. Belirttiğimiz büyüme faktörleri ve reseptörlerinin ekspresyonları granuloza hücrelerinde gözlenmiştir. Sol ovaryumda yapılan 25 istatistiki değerlendirmenin 16'sında , sağ ovaryumda yapılan 25 istatistiki değerlendirmenin 5'inde istatistiksel olarak anlamlı fark kaydedilmiştir. Tüm gruplardaki İGF ekspresyonlarında ise anlamlı bir istatistiksel değişme olmamıştır. bFGF ekspresyonu, sağ ve sol ovaryumların primordiyal ve primer foliküllerinde 4 günlük rat grubuna göre (Grup A) 1 aylık ratlarda (Grup B) azalmış fakat 3,5 aylık ratlarda (Grup C) artmıştır. Sekonder foliküllerde ise Grup B ve Grup C'deki ratlar arasında anlamlı istatistiksel artış bulunmuştur.

Son 10-15 senedir birçok büyüme faktörü ve sitokin ovaryum dokusunda bulunmuştur. bFGF'nin hücreleri, kültüre edilmiş granuloza hücreleri de dahil apoptozdan koruduğu belirtilmiştir (Reynolds 1998).

Basic Fibroblast Büyüme Faktörünün primordiyal folikülden primere geçişinde ratlarda önemli olduğu belirtilmiştir. Oositler tarafından üretilen bFGF'nin çevre granuloza ve stroma hücrelerinin primordiyal folikülden primer foliküle geçişini sağladığı belirtilmiştir (Skinner 2005, Nilsson 2004). Antral foliküllerin granuloza ve teka hücreleri, ovaryan stromal hücrelerde olduğu gibi bFGF'ye yanıt olarak çoğalmaktadır. bFGF gelişen foliküllerin granuloza hücrelerinde ekspresse olduğu belirtilmiştir (Nilsson 2004). Bizim çalışmamızda da bFGF primordiyal foliküllerin oosit sitoplazmasında ve gelişen foliküllerin granuloza hücrelerinde ekspresse olmuştur.

Yapılan bir çalışmada 4 günlük rat kültürüne bFGF eklenmiş, 14 gün sonra tespit edilmiş ve parafin bloklardan elde edilen kesitlerde yüksek seviyelerde immünohistokimyasal olarak primordiyal ve erken gelişen foliküllerin oositlerinin

sitoplazmalarında eksprese olduğu, en yüksek ekspresyonun da erken foliküllerde olduğunu belirtmişlerdir. Preantral foliküllerde oosit sitoplazmasındaki ekspresyonunun düştüğü fakat granuloza hücrelerinde aksine arttığı belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da primordiyal foliküllerin oosit sitoplazmasında ekspresyon izlenirken, Grup C'de gelişen foliküllerde granuloza hücrelerinde ekspresyonun arttığı gözlenmiştir (Nilsson 2001). Çalışmamız Nilsson'un sonuçlarıyla uyumludur. Yapılan bir çalışmada keçi preantral folikülleri kültürde bFGF ile muamele edilmiş ve bFGF oositlerin hayatta kalma oranını arttırdığı fakat büyümesine açık bir etkisinin olmadığı belirtilmiştir (Zhou 2005).

Sığırlarla yapılan bir çalışmada ise olgunlaşmamış sığır follüküllerinin oosit sitoplazmalarında yoğun bir bFGF boyanmasının olduğunu fakat primer ve sekonder foliküllerin granuloza hücrelerinde minimal düzeyde boyanma olduğunu belirtmişlerdir (Van Wezel 1995). Bizim çalışmamızda ise ratlarda değişik yaş gruplarında granuloza hücre boyanması oosit sitoplazması boyanmasına göre primer ve sekonder foliküllerde daha şiddetliydi Bunun sebebinin farklı türlerde bFGF üretim ve faaliyetinin değişebileceği ve farklı sonuçların ortaya çıkabileceği şeklinde belirtilmiştir.

Ergin ve ark (2008) bizim çalışmamıza benzer bir çalışmada, 6 adet yeni doğmuş (0 günlük), 6 adet 1 aylık ve 6 adet de yetişkin sığanın ovaryum foliküllerinde yaptıkları boyamada bFGF'nün 3 grupta hiçbir foliküle ait granuloza hücrelerinde ekspresyon göstermediğini belirtmişlerdir. Ergin ve ark (2008) sonuçları ile bizim çalışma sonuçlarının farklı olmasının sebeplerinden bir tanesi olarak büyüme faktörlerinin biyolojik yarı ömürlerinin çok kısa olması düşünülebilir (PDGF-Platelet Derived Growth Factor ve bFGF < 2-3 dak. v.b.) (Çetin ve Çapan 2004).

Literatürde bFGF'nün yaşlanma ile ilgili farklı doku olarak beyin ve dış dokusunda yapılan çalışmalara da rastlanmıştır. 4 aylık, 1 ve 2 yaşlı ratlarda bFGF ekspresyonunun rat hipokampusunda düştüğü, bFGF immün reaktif hücre yoğunluğundaki düşmenin yaş artışı ile ilişkilendirildiğini belirtmişlerdir (Salık 2005).

Sako ve arkadaşları (2010) ise immünohistokimyasal bFGF ekspresyonunun periodental ligamentte en yüksek sırayla 5, 9 ve 15 haftalık, 6, 12, ve 18 aylık ratlarda gerçekleştiğini belirtmişler ve bFGF ekspresyonunun yaş arttıkça periodental ligamentte düştüğünü belirtmişlerdir (Sako 2010).

bFGF ile ilgili literatürde primordiyal folikülden primere geçişte tüm türlerde etkili olduğu belirtilmiştir. Fakat yaş ilerlemesi ile ilgili ovaryum dokusundaki çalışmalar sınırlıdır, bizim çalışmamızda yaşlanma ile ovaryum dokusunda bFGF ekspresyonu artmaktadır.

Ratlarda ve ineklerde granuloza hücrelerinde bFGF reseptörlerinin bulunduğu belirtilmiştir. İnsan primordiyal foliküllerinin granuloza hücrelerinde bulunmadığını belirtmektedirler (Skinner 2005). Shikone ve ark yaptıkları bir çalışmada FSH'nin rat granuloza hücrelerinde bFGF reseptörlerini indüklediğini belirtmişlerdir (Shikone 1992). Sitokinlerin biyolojik aktivitesinin, sitokin reseptör ekspresyonunun seviyelerindeki değişimlerden etkilendiği bildirilmiştir (Lehtimäki ve ark. 2003). Bizim çalışmamızda bFGFRs ekspresyonları tüm gruplarda değerlendirilmiş ve Grup C'de sağ ovaryumda istatistiksel olarak anlamlı artış kaydedilmişken, sol ovaryumda artış gözlenmiş fakat istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

İGF1'in de dahil edildiği çeşitli büyüme faktörlerinin foliküler büyümeyi ve embriyo gelişimini düzenlediği belirtilmiştir (Velazquez 2009).

Evcil türlerde yapılan çalışmalarda İGF'nin folikül gelişiminde önemli bir rolü olduğunu desteklemektedir (Quirk 2004). Yapılan bir çalışmada keçi preantral folikülleri kültürde IGF-1 ile muamele edilmiş ve İGF1'in oositlerin hayatta kalmasını ve büyümesini sağladığı belirtilmiştir (Zhou 2005).

İn vitro olarak rat, koyun, domuz ve insanda İGF1'in granuloza hücrelerinin proliferasyonunu ve diferasyonunu stimüle ettiği belirtilmiştir. In vivo çalışmalarda İGF1 knock out farelerin gonadotropinlerle tedavi edildikten sonra bile antral foliküle sahip olmadığı ve ovulasyon gerçekleştiremediği belirtilmiştir (Monget 2002). Ratlarda İGF-I ve tip 1 İGF-R'nin preantral foliküllerde, özellikle de oositlerde tespit edildiği bildirilmiştir (Silva 2008). Bizim çalışmamızda da İGF1 ekspresyonu, primer ve sekonder foliküllerin (Antral) granuloza hücrelerinde izlenmiştir.

Ratlarda İGF1- ve İGF-2 mRNA'nın sırayla granuloza hücrelerinde ve teka interstisyel hücrelerde lokalize olduğu belirtilmiştir. Erken foliküler fazda granuloza hücrelerinin İGF1'i ekspresse etmeye başladığı ve sağlıklı foliküllerde yüksek seviyelerde İGF1 aktivitesinin granuloza hücrelerinde tespit edildiği belirtilmiştir. Tam tersi ise İGF1 mRNA atretik foliküllerde gözlenmemiştir. Bu bulguların ratlarda dominant folikül seçimi için granuloza hücrelerinde İGF1'in sürekli ekspresyonunu gerektirdiği belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da İGF1 ekspresyonu primer ve sekonder foliküllerin granuloza hücrelerinde ekspresse olmuştur (Wang 1999). Yukarıda belirttiğimiz literatüre zıt sonuçları bir çalışmada kültürde 4 günlük rat ovaryumlarının 8-100 ng/ml konsantrasyonlarda İGF1 ile muamele edilmesi, primordiyal folikülden primer foliküle geçişte kontrol grubu ile herhangi bir değişiklik oluşturmamıştır. Deneysel koşullarda İGF1'in primordiyalden primere geçişini etkilemediğinin gözüktüğünü belirtmişlerdir. Ratlarda, İGF1'in olgun

foliküllerin granuloza hücrelerinde üretildiğini belirtmektedirler (Kezele 2002). Bizim çalışmamızda İGF1 primer ve sekonder foliküllerin granuloza hücrelerinde ekspresyon olmuştur, fakat tüm gruplarda foliküller arası ekspresyonu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Ergin ve ark (2008) bizim çalışmamıza benzer bir çalışmada, 6 adet yeni doğmuş, 6 adet 1 aylık ve 6 adet de yetişkin sıçanın ovaryum foliküllerinde yaptıkları boyamada İGF1'in yeni doğanlarda primordiyal ve primer foliküllerde orta şiddette, 1 aylık ratların sadece primer folikül granuloza hücrelerinde zayıf boyanma, yetişkin sıçan grubunda ise folikül gruplarının hiç birinde boyanma olmadığını belirtmişlerdir. İGF1'in farklı yaşlarda ovaryum foliküllerinin farklı bölgelerini etkilediğini belirtmişlerdir. Yaş ilerlemesi ile birlikte gerçekleşen hormonal değişikliklerin ve folikül gelişmesinin bu değişikliklerin sebebi olabileceğini belirtmişlerdir (Ergin ve ark. 2008). Bizim çalışmamızda da İGF1 ekspresyonu tüm gruplarda gözlenirken istatistiksel olarak anlamlı bir artış kaydedilmemiştir. Farklı çalışma sonuçlarımızın belirtilen hormonal değişiklikler ile ilgili olabileceği düşünülebilir.

Yaşlanan kadınlarda dominant foliküllerde İGF1 seviyesinin foliküler sıvıda düştüğü belirtilmiştir (Klein 2000). Büyüme hormonu ve İGF1'in yaş ile birlikte azaldığı ve bu hormonlarının yönetiminin yaşlı ve ad libitum beslenen hayvanlarda doku bozulmasını düzelteceği belirtilmiştir (Sonntag 1999).

Bizim çalışmamızda 4 günlük, 1 aylık ve 3,5 aylık rat ovaryumunda İGF1'in primordiyal, primer ve sekonder foliküllerde granuloza hücrelerinde istatistiksel değerlendirmede anlamlı bir değişim gözlenmemiştir. İGF1'in protein yapısı, hücre membranını geçmesine engel olmakta ve etkisini gösterebilmek için membran reseptörlerine bağlanması gerekmektedir (Keleş ve Türkeli 2005). Çalışmamızda

İGF1R ekspresyonu yapılan değerlendirmede, tüm gruplarda mevcut olmakla birlikte, Grup C'de primordiyal, primer ve sekonder foliküllerde, istatistiksel değerlendirmeden bağımsız olarak en yüksek ortalama değere sahip olduğu gözlemlendi.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Primordiyal folikül gelişiminin başlamasını kontrol eden faktörler dişi üreme sistemi için gereklidir. Primordiyal folikül gelişiminin başlaması dominant folikül seçimini ve ovulasyonu belirlemektedir. İGF1, İGF1R, bFGF ve bFGFR ekspresyonları, çalışma gruplarımızda gelişen foliküllerin granuloza hücrelerinde gözlenmiştir. İGF1, İGF1R, bFGF ve bFGFR primordiyal, primer ve sekonder folikül gelişiminde önemli bir role sahiptir. Bu önemli rolün daha iyi anlaşılabilmesi için daha kapsamlı çalışmalar planlanmalı ve gerçekleştirilmelidir.

7. KAYNAKLAR

Arıncı K, Elhan A: Anatomi 1. Cilt. Ankara: Güneş Kitap Evi Lm. 2001;337-349.

Aksoy A. Yaşlanmaya koşut sıçan ovaryumunda folikül ince yapısı ve folikül uyaran hormon reseptörlerinin(FSHR),Östrojen reseptörlerinin (ER),progesteron reseptörlerinin(PR)immünohistokimyasal olarak belirlenmesi.Gazi Üniversitesi,Sağlık Bilimleri Enstitüsü,Histoloji-Embriyoloji ABD, Yüksek Lisans Tezi,Ankara,2008;7-10 (Prof.Dr.M.Tahir HATİPOĞLU)

Camp TA, Rahal JO, Mayo KE. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. Mol Endocrinol. 1991;5:1405–1417.

Çetin M, Çapan Y. bFGF (Basic Fibroblast Growth Factor) and A Novel Approach To Its Formulations. Hacettepe University Journal of the Faculty of Pharmacy 2004;24(2):107-124.

Erkoçak A.Özel Histoloji. Ankara: A.Ü. Tıp Fak. Basım Evi,1982

Eşrefoğlu M.Özel Histoloji, 2009;221-232.

Gandolfi F, Brevini TAL, Cillo F, Antonini S. Cellular And Molecular Mechanisms Regulating Oocyte Quality And The Relevance For Farm Animal Reproductive Efficiency. Rev, Sci, Tech, Off, İnt, Epiz. 2005;24 (1): 413-423.

Ganong WF. Tıbbi Fizyoloji. Çeviri: Türk Fizyoloji Bilimler Derneği. 20. baskı. Ankara: Nobel Tıp Kitabevi. 2002;398-436.

Gartner LP, Hiatt JL. Color Textbook of Histology. 2nd Ed., W.B. Saunders comp., Philadelphia, 2001.

Gordon I, Lu KH. Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. Theriogenology. 1990;33:77-87.

Gordon I. Laboratory production of cattle embryos, 2003.

Gövsu F: Sistematik Anatomi. İzmir: Güven Kitapevi. 2003;565-587.

Guyton AC, Hall J E: Tıbbi Fizyoloji. Çavuşoğlu H (Çev) 10. Basım, 2007.

Gürer F. In Vivo ve In Vitro Koşullarda Oosit Maturasyonu. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları. 2003;087: 229-240.

Hassa H. In Vivo ve In Vitro Koşullarda Oosit Maturasyonu. İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları. 2003;087: 229-240 .

<http://buffonescience9.wikispaces.com/UNIT+3+-+Cell+Reproduction>.

<http://www.britannica.com/EBchecked/media/99761/The-steps-of-ovulation-beginning-with-a-dormant-primordial-follicle> *International*, 1994.

<http://www.colorado.edu/kines/iphy4480tsai/ovary.jpg> 10.06.2007.

Iwai T, Nanbu Y, Iwai M, Taii S, Fujii S, Mori T. Immunohistochemical localization of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human ovary throughout the menstrual cycle. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990; 417(5):369–75.

İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri. 2001;1017-1030.

Jamnonjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med.*2005;23:234-41.

Junqueira CL, Carneiro J. Temel Histoloji, Nobel Tıp Kitapevleri.2009;435-443.

Junqueira LC, Carneiro J. Basic Histology. McGraw&Hill 10. Ed. 2003; 449-465.

Kayalı H, Şatıroğlu G, Taşyürekli G. İnsan Embriyolojisi. 7. Baskı, Alfa Basım Yayım Dağıtım, İstanbul, 1992;9-73.

Keleş M, Türkeli M. Insulin-like growth factor system and cancer. *Journal of Medical Research* 2005;3(2): 39-43.

Kezele PR, Nilsson EE, Skinner MK. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 2002;192(1-2):37-43.

Klein NA, Battaglia DE, Woodruff TK, Padmanabhan V, Giudice LC, Bremner WJ, Soules MR. Ovarian follicular concentrations of activin, follistatin, inhibin, insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-II, IGF-binding protein-2 (IGFBP-2), IGFBP-3, and vascular endothelial growth factor in spontaneous menstrual cycles of normal women of advanced reproductive age. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(12):4520-5.

Lehtimäki KA, Peltola J, Koskikallio E, Keränen T, Honkaniemi J. Expression of cytokines and cytokine receptors in the rat brain after kainic acid-induced seizures. *Brain Res Mol Brain Res*. 2003;110(2):253-60.

Lei ZM, Toth P, Rao CV, Pridham D. Novel expression of human chorionic gonadotropin/human luteinizing hormone receptors and ligand hCG in human fallopian tubes. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993;77: 863–87.

Mangal RK, Wiehle RD, Poindexter AN 3rd, Weigel NL. Differential expression of uterine progesterone receptor forms A and B during the menstrual cycle. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1997; 63(4–6):195–202.

Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, Pisselet C, Monniaux D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*. 2002;23(1-2):139-54.

Moore KL, Persaud TVN, Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi, Nobel Tıp Kitapevleri, 6. Baskıdan Çeviri, 2002; 323–329.

Moore KL, Persaud TVN. Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi (Türkçe Çeviri). 6. Baskı, Ankara, Nobel Tıp Kitapevleri, 2002:17-45.

Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2001;175(1-2):123-30.

Nilsson EE, Skinner MK. Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;214(1-2):19-25.

Noyan A. Yaşamda ve Hekimlikte fizyoloji. 13. basım. Ankara: Meteksan Anonim Şirketi; 2003.

O'Malley BW, Roop DR, Lai EC, Nordstrom JL, Catterall JT, Swaneck GE, et al. The ovalbumin gene: organization, structure, transcription and regulation. *Rec, Prog, Horm, Res*. 1979; 35:1–46.

Ovalle K. William, Nahirney C. Patrick, Netter's Essential Histology, Güneş Tıp Kitapevleri, 2009; 400-406.

Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA. Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci.* 2004;82 E-Suppl:E40-52.

Reynolds LP, Redmer DA. Expression of the angiogenic factors, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J Anim Sci.* 1998;76(6):1671-81.

Rose MP, Gaines Das RE, Balen AH. Definition and measurement of follicle stimulating hormone. *Endocr Rev.* 2000; 21: 5– 22.

Ross HM, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas.* 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003; 726-757.

Sadler TW. *Medikal Embriyoloji (Türkçe Çeviri).* 9. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2005;9-12.

Sako E, Hosomichi J. Alteration of bFGF expression with growth and age in rat molar periodontal ligament. *Angle Orthod.* 2010;80(5):904-11.

Salik E, Ercan F, Sirvanci S, Cetinel S, Onat F, San T. Effect of aging on the distribution of basic fibroblast growth factor immunoreactive cells in the rat hippocampus. *Brain Res Bull.* 2005;64(5):409-15.

Shikone T, Yamoto M, Nakano R. Follicle-stimulating hormone induces functional receptors for basic fibroblast growth factor in rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1992;131(3):1063-8.

Shyamala G, Schneider W, Schott D. Developmental regulation of murine mammary progesterone receptor gene expression. *Endocrinology* 1990; 126(6):2882–9.

Silva JR, Figueiredo JR, van den Hurk R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology.* 2009;71(8):1193-208.

Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update.* 2005;11(5):461-71.

Sonntag WE, Lynch CD, Cefalu WT, Ingram RL, Bennett SA, Thornton PL, Khan AS. Pleiotropic effects of growth hormone and insulin-like growth factor (IGF)-1 on biological aging: inferences from moderate caloric-restricted animals. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 1999;54(12):B521-38.

Şeftalioglu Aysel ,Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi,Üçüncü Baskı, Feryal Matbaası,Tıp ve Teknik Yayıncılık Ltd.Şti,1998;41-53.

Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Ankara: Antıp AŞ yayınları,2002.

van Wezel IL, Umaphysivam K, Tilley WD, Rodgers RJ. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles.*Mol Cell Endocrinol.* 1995;115(2):133-40.

Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW,McDonnell DP. Human Progesterone Receptor A Form Is a Cell and Promoter Specific Repressor of Human Progesterone Receptor B Function. *Molecular Endocrinology* 1993; 7:1244–1255.



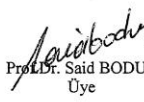

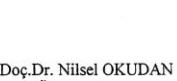


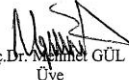



Velazquez MA, Zaraza J, Oropeza A, Webb R, Niemann H. The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. *Reproduction.* 2009;137(2):161-80.

Wang HS, Chard T. IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. *J Endocrinol.* 1999;161(1):1-13.

Zhou H, Zhang Y. Regulation of in vitro growth of preantral follicles by growth factors in goats.*Domest Anim Endocrinol.* 2005;28(3):235-42.

8.EKLER

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ
DENEY HAYVANLARI ETİK KURUL KARARLARI

Karar Sayısı: 2011-134	Karar Tarihi: 14.12.2011		
<p>S.Ü. Meram Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalından Prof.Dr. Serpil KALKAN ve Rabia KOÇ tarafından sunulan “<i>Primordiyal folikülden antral foliküle bazı sitokinlerin ekspresyonu ve değerlendirilmesi</i>” başlıklı tez projesi dokuz üyenin katılımı ile değerlendirildi.</p> <p>Projede toplam 3 grupta 21 sıçanın kullanılacağı, sıçanların yüksek doz anestezi ile sakrifiye edileceği bildirilmiştir.</p> <p>Projenin deney hayvanlarına ilişkin yönlerinin Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinin 6ncı maddesinde belirtilen “Etik Kurallara Uygunluk Esası” dikkate alınarak hazırlandığı belirlenmiştir.</p> <p>Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurul Yönergesinde “Başvuru Sahibinin Sorumlulukları” başlığı altında yer alan kurallar ve madde 6da belirtilen “Hayvan Deneyle İlgili Etik İlkeler” saklı kalmak koşulu ile projenin hazırlanmasında “Etik Kurul Yönergesi İlkelerine Uyulduğuna”, çalışmanın deneysel kısmını yapacak çalışmacının “Deney Hayvanları Kullanım Sertifikasına” sahip olduğu dikkate alınarak projenin hayvan kullanım etiği açısından “uygun” olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.</p>			
 Prof.Dr. K. Esra NURULLAHOĞLU ATALIK Başkan	 Prof.Dr. Lema TAYAN Üye	 Prof.Dr. Said BODUR Üye	 Prof.Dr. A. Saide ŞAHİN Üye
 Doç. Dr. Nilsel OKUDAN Üye-Katılmadı	 Doç. Dr. Bora ÖZTÜRK Üye	 Doç. Dr. H. Serdar GERGERLİOĞLU Üye-Katılmadı	 Doç. Dr. Mehmet GÜL Üye
 Dr. M. Metin ŞENER Üye	 Mehmet ÖZ Üye	 Mustafa ŞİRİN Üye	

9.ÖZGEÇMİŞ

1986 yılı Konya doğumludur. İlköğrenimini 2001 yılında Barbaros İlköğretim okulunda tamamladıktan sonra lise eğitimini Meram Konya Lisesi'nde tamamladı. 2005 yılında girdiği Selçuk Üniversitesi Ahmet Keleşoğlu Eğitim Fakültesi Biyoloji Öğretmenliği bölümünden 2010 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesinde Histoloji - Embriyoloji (Tıp) Ana Bilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.