



**T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**CAPSAİCİN'İN OVARYUM GRANULOZA HÜCRELERİNİN
PROLİFERASYONU VE APOPTOZİSİ ÜZERİNE ETKİSİ**

Sabire PEKER

(DOKTORA TEZİ)

Bursa-2015



T. C.
ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
VETERİNER HİSTOLOJİ EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

CAPSAİCİN'İN OVARYUM GRANULOZA HÜCRELERİNİN
PROLİFERASYONU VE APOPTOZİSİ ÜZERİNE ETKİSİ

Sabire PEKER

(DOKTORA TEZİ)

Danışman: Prof. Dr. Berrin ZİK

Bursa-2015

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Veteriner Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Sabire PEKER tarafından hazırlanan Capsaicinin Ovaryum Granuloza Hücrelerinin Proliferasyonu Ve Apoptozisi Üzerine Etkisi konulu Doktora tezi 16/10/2015 günü, 10:00-11:00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>
Tez Danışmanı	Prof. Dr. Berrin ZİK
Üye	Prof. Dr. Nesrin ÖZFILİZ
Üye	Doç. Dr. Ahmet AKKOÇ
Üye	Prof. Dr. Artay YAĞCI
Üye	Doç. Dr. Korhan ALTUNBAŞ

İmza

BZ
Nesrin
AKKOÇ
Artay Yağcı
Kh

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı toplantısında alınan numaralı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ülgen GÜNAY

Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET	IV
SUMMARY	V
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
1. OVARYUM.....	4
1.1. Ovaryum Anatomisi ve Genel Histolojisi	4
1.2. Ovaryum Embriyolojisi	5
1.3. Ovaryum Follikül Gelişimi (Follikülogenezis)	7
1.3.1. Primordiyal Follikül Oluşumu	8
1.3.1.1. Primordiyal Follikül Oluşumunu Etkileyen Faktörler	8
1.3.2. Primordiyal Folliküllerin Aktifleşmesi ve Primer Follikül Oluşumu.....	9
1.3.3. Preantral Follikül Gelişimi.....	11
1.3.3.1. Preantral Folliküllerde Teka Tabakasının Oluşumu	11
1.3.4. Antral Follikül Oluşumu	13
1.3.5. Ovulasyon ve Korpus Luteum Oluşumu	14
2. ATREZİ / APOPTOZİS.....	15
2.1. Apoptozis'in Mekanizması.....	16
2.1.1. Dış Yolak	16
2.1.2. Perforin/Granzim Yolağı	17
2.1.3. İç Yolak.....	17
2.1.4. İnfaz (Execution) Yolağı / Terminal Yolak	18
2.2. Ovaryumda Apoptozisin Moleküler Mekanizması	18
2.3. Granuloza Hücrelerinde Apoptozis Mekanizması	20
2.3.1. Granuloza Hücre Apoptozisinde Rol Oynayan Başlıca Proteinler.....	22
2.3.1.1. Bcl-2 Ailesi	22
2.3.1.2. TNF süperailisi	23
2.3.1.3. Caspase Proteazlar	23
2.3.1.4. PARP-1	24

2.3.1.5. p53.....	24
2.3.1.6. Büyüme Faktörleri	24
2.3.1.7. Gonadotropinler.....	25
2.3.1.8. Östradiol	26
2.3.1.9. Progesteron	26
2.3.1.10. PI3K/Akt Yolağı	27
3. GRANULOZA HÜCRE SIKLUSU.....	27
3.1. Granuloza Hücre Çoğalmasında PCNA İfadesi.....	29
4. CAPSAİCİN.....	30
4.1. Capsaicinin Ovaryuma Etkisi.....	33
GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
1. HAYVANLARIN ELDESİ.....	35
2. PRİMER GRANULOZA HÜCRELERİNİN ELDESİ.....	36
3. CAPSAİCİN UYGULAMASI.....	36
4. İMMUNİTOKİMYA BOYAMA	37
5. İMMUNFLORESAN BOYAMA	39
6. WESTERN BLOT YÖNTEMİ	41
6.1. Total Protein Analizi	41
6.2. Örneklerin Dikey Jel Elektrophorezde Yürütülmesi.....	42
6.3. Protein Bantlarının Poliakrilamid Jelden PVDF Membrana Transferi.....	43
6.4. Boyama.....	44
7. MTT HÜCRE PROLİFERASYON TESTİ	46
8. İMMUNİTOKİMYA DEĞERLENDİRME.....	47
9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	47
BULGULAR	48
1. MORFOLOJİK BULGULAR	48
2. HÜCRE PROLİFERASYON BULGULARI	49
2.1. Granuloza Hücre Proliferasyonu Üzerine Capsaicinin Etkileri.....	49
2.2. PCNA Western Blot Analiz Bulguları.....	53
2.3. MTT Analiz Bulguları.....	54
3. APOPTOZİS BULGULARI	54
3.1. Granuloza Hücre Apoptozisi Üzerine Capsaicinin Etkileri	54

3.2. Aktif PARP Bulguları.....	58
3.3. Apoptozis Western Blot Sonuçları.....	61
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	62
KAYNAKLAR	66
TEŞEKKÜR	80
ÖZGEÇMİŞ	81



ÖZET

Capsaicin, kırmızı bibere acılığı veren, alkolooid yapıda bir maddedir. Capsaicinin, sensorik sinirler üzerindeki etkilerinden dolayı, birçok çalışmada, farklı organ ve sistemler üzerindeki etkileri incelenerek geniş uygulama alanları bulmasına rağmen, ovaryum üzerindeki etkilerini araştıran çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Sunulan tez çalışmasının amacı, capsaicin farklı doz ve zaman uygulamalarının, primer olarak elde edilen ovaryum granuloza hücreleri üzerinde meydana getirdiği proliferatif ve/veya apoptotik, direk etkilerinin incelenmesidir. Bu amaca uygun olarak, 30 günlük sıçan ovaryumlarından, belirlenen primer hücre kültürü prosedürünün takibi ile granuloza hücreleri izole edildi. Elde edilen granuloza hücreleri ile; kontrol A (hücre kontrol grubu), kontrol B (taşıtt maddenin (DMSO) verildiği kontrol grubu), 10, 50, 100, 150 ve 200 μM olmak üzere capsaicin uygulanacağı 7 farklı doz grubu ve her doz grubu için, iki farklı zaman (24 ve 48 saat) grubu oluşturuldu. Doz ve zaman uygulamalarını takiben capsaicin, granuloza hücreleri üzerindeki olası proliferatif etkilerinin incelenmesi amacıyla PCNA primer antikorlu ile immünohistokimya, immünofloresan ve western blot prosedürleri uygulandı. Ayrıca bu bulguları desteklemek amacıyla MTT hücre proliferasyon testi yapıldı. Capsaicinin apoptotik etkilerini incelemek amacıyla ise, apoptotik yolağın son elemanlarından aktif caspase-3 ve aktif PARP primer antikorları ile immünohistokimya, immünofloresan ve western blot deneyleri gerçekleştirildi.

Deneylerin sonucunda, capsaicin 50 μM 'a kadar düşük uygulama dozlarıyla, granuloza hücrelerinde proliferasyonun arttığı, 100 μM dozdan sonra ise apoptozisin meydana geldiği görüldü. Bu etkilerin 24 ve 48 saatlik zaman uygulamalarında benzer olmasından dolayı, 24 saatlik capsaicin uygulamasının istenen etkilerin görülmesi için yeterli olduğu görüldü.

Sonuç olarak, capsaicin düşük dozlarının, ovaryum granuloza hücreleri üzerinde proliferatif etki gösterdiği, doz arttıkça ise apoptozisin meydana geldiği belirlendi. Bu etkilerinden dolayı, capsaicin düşük dozlarının, reproduktif düzenin devamlılığında kullanılabileceği, yüksek dozlarının ise ovaryum kanserleri için geliştirilecek alternatif tedavi protokollerine temel oluşturabileceği söylenebilir.

Anahtar Sözcükler: Granuloza hücresi, capsaicin, apoptozis, proliferasyon.

SUMMARY

Capsaicin, alkaloid substance, is pungent ingredient in red peppers. Due to the effects on sensory nerve fibers, many studies have examined the effects of capsaicin on different organs and systems. Despite the finding wide application areas on different systems, the studies of the effects on the ovary is very limited.

The aim of the present thesis, the possible proliferative and/or apoptotic effects of various doses and time periods in the application of capsaicin on primarily derived granulosa cells. In accordance with this purpose, identification procedure was followed for granulosa cells isolation from 30-day rat ovaries. The obtained granulosa cells were divided seven dose groups; control A (cell control), control B (vehicle (DMSO) control), 10, 50 , 100, 150 and 200 μM and two different time (24 and 48 hours) groups. As the results of dosage and time administration of capsaicin, the proliferative effects were examined by PCNA primary antibody and immunocytochemistry, immunofluorescence and western blot procedures were performed. In addition, the MTT cell proliferation assay was performed to support these findings. In order to examine the apoptotic effects of capsaicin, immunocytochemistry, immunofluorescence and western blot assays were performed by last elements in the apoptotic pathway; active caspase-3 and active PARP.

As a result of the experiments, granulosa cell proliferation with the lower application doses of up to 50 μM , but after 100 μM and increased doses showed the apoptosis occur. Due to these effects were similar in 24 and 48 hours application time, 24 hours capsaicin application was observed to be sufficient for of the occurrence of the desired effects.

In consequence of the present study, low doses of capsaicin have proliferative effects on granulosa cells and the apoptosis was occurred when the dose increase. Because of these effects, low-dose capsaicin can be used in the continuity of the reproductive pattern and higher doses in development alternative treatment protocols on ovarian cancers.

Key Words: Granulosa cell, capsaicin, apoptosis, proliferation.

GİRİŞ

Capsaicin (CAP) (trans-8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide), alkaloid yapıda bir madde olup, acı biberin etken maddesidir. Kırmızı acı biberin varlığıyla ilgili bilgiler M.Ö. 7000 yılına ait arkeolojik çalışmalarla ortaya konulmuştur. Acı biber, hem kolay ulaşılabilirliği hem de geniş, etkili ve farklı kullanım alanlarıyla popülerliğini günümüze değin sürdürmektedir. İlk olarak gıda katkı maddesi olarak kullanılan acı biber, 19. yy'da ekstraktı olan CAP'ın elde edilmesiyle analjezik olarak kullanılmaya başlanmıştır. Capsaicin bu etkisini, primer duyu nöronlarının terminal bölgelerinde, plazma membranında seçici olmayan katyon kanallarını oluşturan, TRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1)/VR1 (Vanilloid Receptor Subtype 1) reseptöre bağlanarak gerçekleştirir (1). Kronik nöropatik ağrı olgularında uygulanan CAP dozuna bağlı olarak TRPPV1 ifadesi artar ve nöropeptit salınım gerçekleşir. Ancak bir süre sonra nöropeptitlerin aksoplazmik geçişleri engellenir, membran potansiyelleri değişir, ağrıya sebep olan sinir telleri fonksiyon yapamaz ve analjezi oluşur (2).

CAP ağrı giderici etkisinin yanında, immun sistem, gastrointestinal, kardiovasküler ve solunum sistemleri olmak üzere pek çok sistem üzerine de etkilidir. Bununla birlikte CAP'ın etkileri anlaşıldıkça, sistemik, perinöyral ve lokal uygulamaları da yaygınlaşmıştır. TRPV1'den zengin sinir tellerinin yoğun olduğu sindirim sisteminde gastrik koruma ve yangısal tedavide CAP'ın önemli rol oynadığı bildirilmektedir (1). Ayrıca, sıçanlarda alkol ile deneysel olarak oluşturulan mide lezyonlarına karşı capsaicinin koruyucu etki yaptığı gösterilmiştir (3). Bunların yanısıra CAP, postoperatif tedavilerde (4) ve myokardiyal işemi olgularında da (5) kullanılmaktadır.

Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar, capsaicinin karsinojen, ko-karsinojen ve tümör geliştirici özellikte olduğunu belirtirken (6, 7), son yıllarda pek çok araştırmacı, capsaicinin deneysel karsinogenezis ve mutogenezis üzerine koruyucu etki yaptığını ve apoptozisi indükleyerek kanser tedavisinde kullanılabileceğini belirtmektedir (7, 8). Birçok farklı kanser türüyle ilgili, *in vitro* ve ksenograft modellerinin kullanıldığı çalışmalarda da, CAP'ın apoptotik etkileri belirgin şekilde ortaya konulmuştur (9, 10).

Capsaicinin bu iki yönlü etkisinin; capsaicin dozununa, uygulama şekline ve dokunun tipine bağlı olarak değiştiği bildirilmektedir (11, 12). Günümüzde fizyolojik ve farmakolojik etkilerinden dolayı, tıp alanı ve ilaç sanayinde de kullanımı yaygınlaşmıştır.

Yapılan taramalarda capsaicin organizmada pek çok metabolizma üzerine etkili olduğu görülmektedir, ancak capsaicin ovarium üzerine etkisini inceleyen çok az çalışma vardır. Yapılan literatür taramalarında, çoğunlukla sinirsel innervasyonun ovarium üzerine etkisini incelemek amaçlanmış ve bu doğrultuda yüksek dozda capsaicin uygulanarak sinirlerde dejenerasyon oluşturulmuş, sonuç olarak follikül atrezisi ve fertilité üzerine sinirsel innervasyonun önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Moran ve arkadaşları (13), *in vivo* olarak yeni doğan sıçanlara yüksek dozda capsaicin uygulayarak, genital sistemin gelişimi ve fonksiyonu üzerine capsaicin etkisini incelemiştir. Bu araştırmacılar, kontrole göre, capsaicin uygulanan hayvanlarda, ovariumdaki folliküllerin sayısının düşük, atretik follikül sayısının yüksek, gebelik oranının düşük olduğunu belirterek, ovarium fonksiyonlarının düzenlenmesinde sensorik sinirlerin önemli bir rol oynadığını ve yüksek doz (50 mg/kg) capsaicinle sensorik sinirlerde dejenerasyon oluşturulduğunu belirtmişlerdir (13). Ayrıca yine yüksek dozda capsaicin uygulamasının, çiftleşmede nöroendokrin refleksin bozulmasına sebep olduğu bildirilmiştir (14). Bununla birlikte Özer ve arkadaşları (15), 1 günlük yaştan itibaren civciv rasyonlarına toksik olmayan dozlarda kırmızı acı biber ilave ederek, 5 ay sonunda tavukların genital sistemlerini incelemişler, bunun sonucunda genital sistem organlarının daha hızlı geliştiğini ve kırmızı acı biberin biyolojik aktivatör bir madde olduğunu belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar, benzer rasyonla besledikleri horozların deney grubunda, kontrol grubuna göre 1 ay önce, seminifer tubuluslarda spermatogenik hücre serisinde tamamlanma, Sertoli hücrelerinde fonksiyonel faza geçiş ve seminifer tubulus lumenlerinde spermatozoonların varlığını tespit etmişlerdir. Ayrıca epididimal kanalda, deney grubunda, 3. aydan itibaren spermatozoonlar gözlenirken, kontrol grubunda aynı özelliklere bir ay sonra rastlanmıştır (16). Zık ve arkadaşları (17) ise, düşük doz (0.5 mg/kg) CAP'ı ratlara 6, 9, 12 ve 15 gün boyunca subkutan uygulayarak, deney grubunun ovariumunda follikül atrezisinin düşük, proliferasyon faktörü olan Ki 67 ekspresyonunun yüksek olduğunu ve düşük doz CAP'ın follikül gelişimini uyarıcı etki yaptığı sonucuna varmışlardır.

Bölümümüzde daha önce yapılan çalışmalar (17-19) göz önüne alındığında, CAP'ın, düşük dozlarının dişi genital sistem ve özellikle ovaryum üzerine olumlu etkilerinin olduğu kanısına varılmıştır. Sunulan tez çalışmasında, *in vivo* meydana gelen olası indirekt etkiler olmaksızın, ovaryumun farklı elemanlarından granuloza hücrelerini ayırarak, CAP'ın farklı süre ve doz uygulamalarıyla granuloza hücreleri üzerine etkisini incelemeyi amaçladık. Çalışmanın sonucunda, CAP'ın granuloza hücreleri üzerine proliferatif ve/veya apoptotik etkileri belirlenecek ve bu elde edilen veriler, dişi genital sistem, üreme fonksiyonları ve ovaryum tümörleri ile ilgili ileriki çalışmalara ışık tutacaktır.



GENEL BİLGİLER

1. OVARYUM

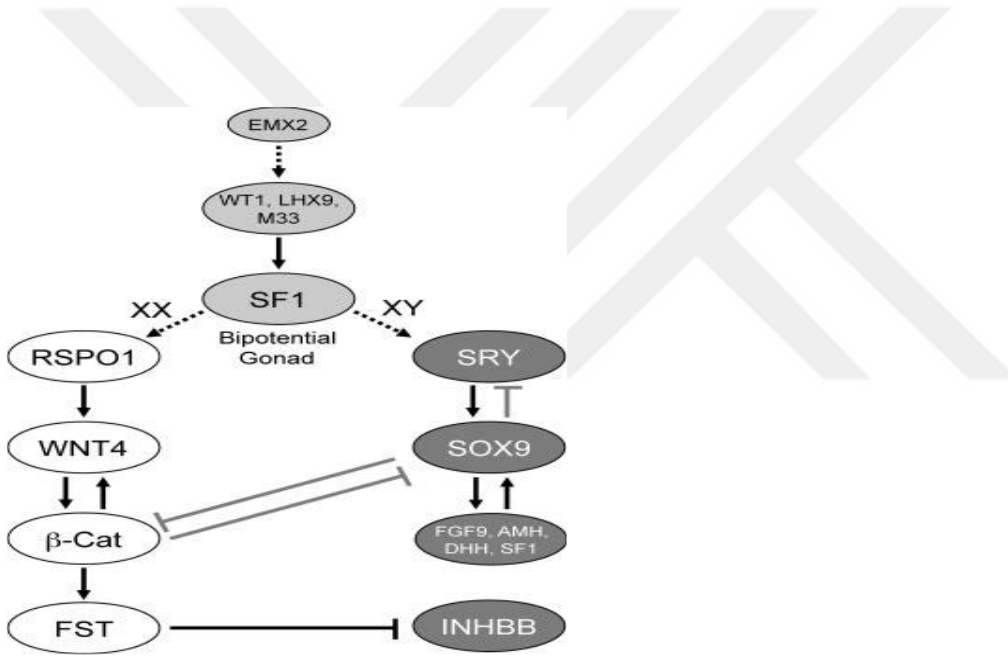
1.1. Ovaryum Anatomisi ve Genel Histolojisi

Yaşamın devamlılığını sağlayan ovaryumlar, dişilerdeki primer üreme organlarıdır. Kavum abdominisin sublungal bölgesinde böbreklerin gerisinde ve ratlarda kornu uterilerin her iki tarafına yerleşen ovaryumlar sağ ve sol olmak üzere bir çift organdır. Şekilleri oval ya da yuvarlak, genellikle pembemsi beyaz veya grimtrak renkte olan ovaryumların üzerleri folliküllerden ötürü tüberküler tipte çıkıntılı bir görünüm sergiler. Ovaryumlar, dıştan mezosalpinks'in, içten ligamentum ovarii proprium ile mezovarium'un oluşturduğu bursa ovarica isimli keseler içerisinde yer alırlar (20). Ovaryumlar, yumurta üretip dişi genital kanala vererek ekzokrin, dişi cinsiyet hormonlarını salgılayarak da endokrin bir bez gibi işlevini yerine getirir. Ayrıca salgıladığı östrojen ve progesteron ile ikincil cinsiyet karakterlerini oluştururken, gebeliğin devamlılığı için de önemli bir organdır (21).

Ovaryumlar morfolojik yapı bakımından, korteks, medulla ve hilus olmak üzere üç bölgeden meydana gelmektedir. Hilus; kan damarlarının ve sinir tellerinin girip çıktığı bölge olup, ovaryumu mezovaryuma bağlar (22, 23). Medulla (zona vaskuloza); ovaryumun iç bölgesinde yer alır, gevşek bağ dokusu, kan ve lenf damarlarından zengin bir yapı gösterir. Arterler; kortekste folliküllerin etrafında kapillar bir ağ oluştururken, venler; postkapillar venül olarak başlayıp arterlere eşlik ederek hilus bölgesine doğru ters yönde seyrederler (24). Ovaryumun fonksiyonel bölgesi olan, follikülogenezisin meydana geldiği korteks, dış bölümde yer alır. Ovaryum stromasında, karakteristik iğ şeklinde fibroblastlar, hormonal uyarılara karşı diğer organlardaki fibroblastlardan farklı yanıt oluşturur (25). Ovaryumun yüzeyi, hormonal değişime bağlı olarak tek katlı kübik, prizmatik ya da yassı hücrelerin döşediği germinatif epitel tarafından çevrelenmiştir. Germinatif epitelin hemen altında sıkı bağ dokusu özelliğinde çeşitli yönlerde farklılaşma yeteneğinde hücreleri içeren tunika albuginea yer alır (24). Bu bölgenin altında ise, farklı gelişim aşamalarındaki folliküller ve korpus luteumlar bulunur.

1.2. Ovaryum Embriyolojisi

Başlangıçta mezonefrozun medialindeki sölomik epitelde oluşan kabartıda (krista genitalis) farklılaşmamış gonad oluşur ve trokal bölgeden lumbal bölgeye kadar uzanır. Daha sonra farklı gen ürünlerinin ifadeleri sonucu farklılaşmamış gonadlar, testis ya da ovaryuma dönüşür. Şekil 1’ de bipotansiyel gonad oluşumunda, ovaryum (beyaz bölge) ve testis (koyu gri bölge) gelişiminde etkili olan ana gen ürünlerinden SOX9, β -catenin seviyesini düşürerek ovaryum yolağını baskımlarken; β -catenin, SOX9 etkisini antogonize ederek testis yolağını baskılar (26).

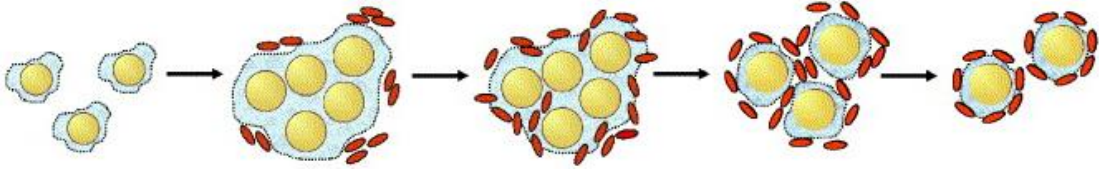


Şekil 1. Gonad oluşumu ve seksüel farklılaşma. (EMX2, empty spiracles homolog 2; WT1, Wilms tumor 1 homolog; LHX9, LIM homeobox protein 9; SF1, steroidogenic factor 1; RSPO1, R-spondin homolog 1; WNT4, wiggless-type MMTV integration site family 4; FST, follistatin; SRY, sex-determining region of chromosome Y; SOX9, SRY-box containing gene 9; FGF9, fibroblast growth factor 9; AMH, anti-Müllerian hormone; DHH, desert hedgehog; SF1, steroidogenic factor 1), (26).

İlkel cinsiyet hücreleri (İCH), gonadların içerisinde oluşmazlar, epiblast hücrelerinden köken alan vitellus kesesinin arka duvarındaki endodermden oluşurlar (27). BMP (Bone Morphogenetic Protein) ailesi üyelerinden, ekstraembriyonik ektodermden salınan BMP4, BMP8B (28, 29) ve visseral endodermden salınan BMP2 protein ifadeleri (30) ilkel cinsiyet hücrelerinin oluşumuna etki eden proteinlerdir. Vitellus kesesi üzerinde kümeler oluşturan

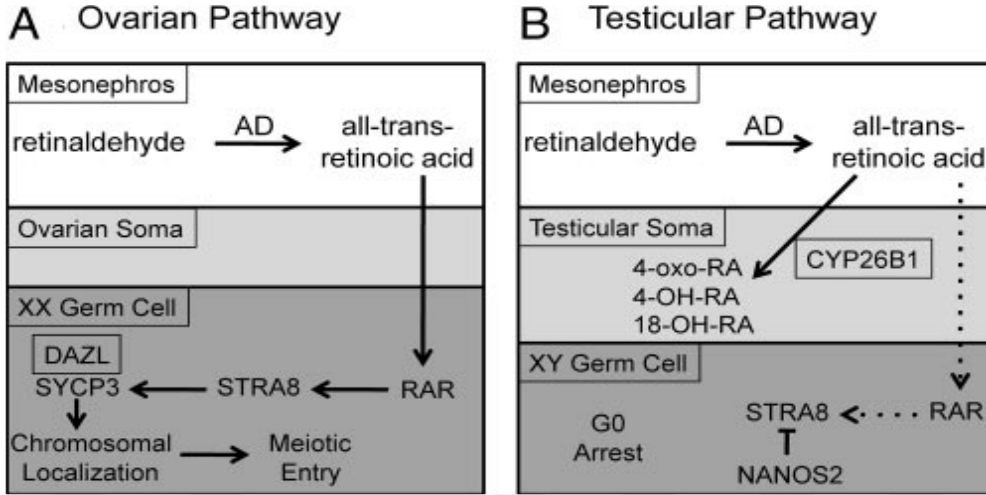
İlkel cinsiyet hücreleri mezonefrozun medialinde yer alan genital kabartıya (krista genitalis) doğru ameboid hareketlerle göç ederler (31). İlkel cinsiyet hücrelerinin göç takibi, yapılarında bulunan interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) ve alkalın fosfataz enzimlerinin işaretlemesiyle yapılır (32, 33). Bu göç esnasında germ hücreleri ve somatik hücreler mitoz bölünmelerle çoğalır ve kendi yapısal özelliklerini kazanırlar (34).

Cinsiyet kromozomları, İCH'leri genital kabartıya girene kadar aktif değildir ya da göçü etkilemezler. İCH'leri genital kabartıya girdikten sonra X kromozomunun aktif olmasıyla mitoz bölünmeye devam ederler. Mitotik bölünmelerin sitokinezleri tamamlanmadığı için oluşan yavru hücreler interselüler köprülerle birbirlerine bağlı halde kalırlar ve germ hücre yuvalarını (kistleri) oluştururlar. Kisti oluşturan hücreler, oosit için gerekli olan molekülleri sağlarlar (Şekil 2), (35, 36).



Şekil 2. Germ hücre kistlerinin birbirinden ayrılması (36).

Farelerde embriyonik (E) 10.5-13.5 günler arasında göçe başlayan germ hücreleri, E 12.5 günde mezonefrozda, retinoik asite cevap oluşturularak mayoz bölünmeye girerler. Seksüel dimorfizmde etkili olan ilk gen Dazl (deleted in azoospermia-like), Sycp3 (Synaptonemal Complex Protein 3)'ün mRNA sına bağlanarak mayozu düzenler. Cytochrome P45026B1, retinoik asiti indirger. Ovaryumda bu molekül baskılanırken, testislerde ifadesi artar ve mayozu girmeyi engeller. Ayrıca ovaryumda retinoik asitin hedef proteini olan Stra8 (Stimulated By Retinoic Acid 8)'in aktivasyonu mayozu girişi tetikler (Şekil 3), (26). Leptoten, zigoten, pakiten evrelerini E 17.5 güne kadar tamamlamış olan germ hücreleri, diploten aşamasına girerler ve postnatal (P) follükülogenezise kadar bu aşamada kalırlar. Germ hücre kistleri yıkılması ise primordiyal follükül oluşumdan hemen önce, farelerde E 20.5-22.5 günler arasında gerçekleşir (35).



Şekil 3. Embriyonik ovaryumlarda mayozun başlangıç şeması (26).

1.3. Ovaryum Follikül Gelişimi (Follikülogenezis)

Ovaryumun temel fonksiyonu, follikülogenezis süreci ile yakından ilişkili olan steroidogenezis ve ovulasyondur. Follikülogenezis, ovulasyondan önce meydana gelir ve otokrin, parakrin, jukstagrın ve endokrin faktörlerin etkisiyle gerçekleşir. Cinsiyet hücreleri ile etkileşen ilk somatik hücre tipi granuloza hücreleri ya da öncü granuloza hücreleridir. Bu etkileşim çift yönlü olarak, follikül şekillenmesi anında kurulur ve follikülün yaşamı boyunca aktif olarak devam eder. Somatik hücrelerin diğer bir popülasyonu olan teka hücreleri, follikülogenezisin daha sonraki safhalarında olaya dahil olurlar. Bu hücreler, direkt ya da indirek olarak kurdukları kesintisiz hücresel haberleşmeyle follikülogenezisin devamlılığını sağlarlar (34).

Ovaryumun korteksinde meydana gelen follikülogenezisin gelişim evreleri;

- 1- Primordiyal Follikül Oluşumu
- 2- Primordiyal Folliküllerin Aktifleşmesi ve Primer Follikül Oluşumu
- 3- Preantral Follikül Gelişimi
- 4-Antral (Graaf) Follikül Gelişimi
- 5- Ovulasyon ve Korpus Luteum Oluşumu

1.3.1. Primordiyal Follikül Oluşumu

Erken follikül gelişiminde, germ hücre kümeleri (kist) şeklinde yer alan oosit yuvalarındaki bazı oositler apoptozis ile yıkımlanırken, diğer oositlerin çevresini yassı öncü granuloza hücrelerinin (pregranuloza) sarmaya başlamasıyla primordiyal follikül oluşumu başlar (37). Histolojik olarak primordiyal follikül, küçük bir primer oosit, tek katlı dizilim gösteren granuloza hücresi ve bazal lamina içermektedir. Bazal lamina sayesinde granuloza hücresi ve oosit, mikroçevrede bulunan diğer hücrelerle direkt temasta olmazlar. Primordiyal folliküller bağımsız bir kanlanmaya sahip değildirler, dolayısıyla endokrin sistemden daha sınırlı olarak etkilenmektedirler. Germ hücreleri ve öncü granuloza hücreleri arasındaki iletişim erken ovaryum gelişimi esnasında primordiyal folliküllerin şekillenmesi açısından çok önemlidir. Follikülogenezisin ilk safhası olan bu bölüm, insanlarda embriyonik 13. haftada gerçekleşmeye başlarken, ratlarda esas olarak E 18 ile P 7. günler arasında gerçekleşir (38, 39).

Oosit-granuloza ve granuloza-granuloza hücreleri, follikül büyümesinde, gelişiminde çok önemli rol oynayan hücre temas ve bağlantılarına, yerel hücre sinyallerine gereksinim duyarlar. Dolayısıyla germ hücreleri ve pregranuloza hücreleri arasındaki iletişim fetal ve neonatal dönemde follikül oluşumun düzenlenmesinde önemlidir (37).

1.3.1.1. Primordiyal Follikül Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Bu erken follikül gelişiminde; apoptozisi düzenleyen proteinler, büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri ve hücre adezyon molekülleri (CAM) gibi birçok düzenleyiciler rol oynamaktadır (37).

Follikül oluşumunun başlaması için oldukça önemli olan factor in the germline α (FIGLA) germ hücresine spesifik basic helix-loop-helix (bHLH) transkripsiyon faktörüdür. FIGLA negatif (-) dişi farelerin steril olduğu belirtilmiştir (40). FIGLA, ilk olarak zona pellusida (ZP) genlerinin (ZP1, ZP2 ve ZP3) düzenleyicisi olarak tanımlanmıştır. ZP genleri olmayan farelerin de subfertil ya da infertil oldukları bildirilmektedir (41, 42).

Bu dönemde etkili olan proteinlerden biri de NOTCH'dur. Notch'lar Delta-like ve Jagged olmak üzere iki farklı aileden liganlarla etkileşime girerler (43). Neonatal farelerde

Notch 2 pregranuloza hücrelerinde, Jagged 1 germ hücrelerinde ifade edilirken, Notch'un hedef genleri Hey1 ve Hey2 her iki hücre tipinde de gözlenmiştir. A-secretase inhibitörleri kullanılarak Notch'un bloke edildiği durumlarda primordiyal follikül oluşumunun azaldığı, germ hücre kümelerinin arttığı belirlenmiştir. Notch modülatörlerinden Lunatic Fringe'in de gelişen folliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde ifade edildiği ve yokluğunda multioosit folliküllerin geliştiği ve infertilite gözlenmiştir (44).

Gen ürünlerinin yanı sıra, progesteron ve östrojen gibi steroid hormonların, neonatal dönemde oluşan kümelerin yıkılmasını bloke ettiği, bunun sonucunda da primordiyal follikül oluşumunun engellendiği bildirilmektedir (45). Yüksek düzeyde salınan maternal antikörlerin da aynı baskılayıcı etkisi olduğu belirtilmiştir (45, 46).

1.3.2. Primordiyal Folliküllerin Aktifleşmesi ve Primer Follikül Oluşumu

Folliküler gelişim genel olarak iki aşamaya ayrılır;

- (i) reproduktif yaşam boyunca primordiyal folliküllerin aktif hale geçmesi,
- (ii) pubertadan sonra, var olan follikül havuzundan belli sayıda follikülün seçilip gelişmesi, dominant follikülün belirlenmesi ve ovulasyon (47).

Fötusdaki yerleşimden sonra bazı primordiyal folliküller gelişim için uyarılırlar. Primordiyal follikülden, primer folliküle geçiş aşamasında en belirgin morfolojik değişiklik, yassı granuloza hücrelerinin, kübik şekilli hücrelere dönüşmesidir.

Erken follikülogeneziste, yassı pregranuloza hücrelerinin, kübik hücrelere dönüşmesine etki eden en önemli faktörler newborn ovary homeobox (NOBOX), spermatogenesis and oogenesis helix-loop-helix 1 (SOHLH1) ve SOHLH2 dir. Bu faktörlerin dışında özellikle Kitl (KIT Ligand) ve KIT tyrosine kinase reseptörü arasındaki etkileşim primordiyal follikül aktivasyonunu ve primer follikül oluşum aşamasını etkiler. KIT, oositte ifade edilirken; Kitl, pregranuloza ve granuloza hücrelerinde görülür (48, 49). KIT Ligand/ KIT etkileşimi, PI3K/AKT yolağını aktive eder, o da forkhead box O3 (FOXO3)'ün fosforilasyonuna sebep olarak primordiyal follikül gelişimini baskılar. FOXO3^{-/-} 2 haftalık farelerin ovaryumlarında, gelişen folliküllerde ve atretik folliküllerde artış görülürken, primordiyal folliküllerin ve zona

pellusidanın var olmadığı bildirilmiştir. Böylece FOXO3'ün yokluğunda, cinsel olgunluk gerçekleşmeden, ovaryumlarda follikül gelişiminin başladığı belirtilmektedir (50, 51). FOXL2 ise yassı granuloza hücrelerinin, kübik hücrelere dönüşmesini sağlar. Kübik hücre formuna geçiş gerçekleşmezse, granuloza hücrelerinin çoğalması ve oosit gelişimi durmakta, sekonder follikül oluşumu başarısızlıkla sonuçlanmaktadır (52, 53).

Bu dönemde etkisini gösteren en önemli hormon Anti-Mullerian Hormone (AMH)'dir. AMH, Müller kanalının gerilemesinden sonra, gelişen folliküllerin granuloza hücrelerinde ifade edilir ve primordiyal follikül oluşumunu baskılar (54, 55). AMH, ovaryum rezervi açısından klinik bir belirteç olarak kullanılır (54). Kadınlar ve farelerde serum AMH seviyesi, yaş arttıkça azalır. Farelerde serum AMH düzeyi ile primordiyal follikül sayısı arasında güçlü bir korelasyon vardır (56).

Erken follikülogeneziste etkili olan faktörlerden birisi de nörotropinlerdir. Nerve growth factor (Ngf), brain-derived neurotrophic factor (Bdnf), neurotrophin 3 (Ntf3), Ntf5 ve bunların reseptörleri Ntrk1, 2, 3, Ngfr ifadeleri ovaryumda belirlenmiştir (57, 58). Özellikle Ngf sinyali granuloza hücrelerinin, kübik hücrelere dönüşümünde rol oynar (59).

Parakrin faktörlerin yanı sıra, somatik hücreler ve oosit arasındaki gap junkşın kanalları ile direk bağlantı, follikülogeneziste oldukça önemlidir. Gap junkşınlarda iyonların, metabolitlerin ve küçük molekülerin transferi önemlidir. Bu bağlantı, konneksin (CX) proteinleri tarafından oluşturulur. Memeli ovaryumlarında birçok konneksin ifade edilse de, özellikle konneksin 43 (CX43) ve konneksin 37 (CX37)'nin follikülogeneziste rolü önemlidir (60, 61). CX43, granuloza hücreleri arasındaki iletişimi sağlarken; CX37, primer aşamadaki oosit- granuloza hücre iletişimini sağlar. CX43 olmayan ovaryumların, primer aşamada kaldığı, granuloza hücre proliferasyonu ve oosit büyümesinin gerçekleşmediği, ayrıca anormal oositler ve mayoz sürecinde defektlerin gözlemlendiği bildirilmektedir (62). CX37 yokluğunda da benzer olumsuzlukların yanısıra, graaf follikülünün oluşmadığı, prematüre luteinizasyonun meydana geldiği, korpus luteuma benzer yapıların çokça görüldüğü belirtilmiştir (63).

1.3.3. Preantral Follikül Gelişimi

Preantral follikülogenezis; oosit büyümesi, granuloza hücre proliferasyonu ve yeni somatik hücre tabakası olan tekanın gelişimiyle karakterizedir. Farelerde P 10-12. günde preantral follikül gelişimi başlar.

Preantral evreye ulaşan folliküllerin özelliği, ortada oosit ve etrafında yerleşen 2 ya da 3 sıralı granuloza hücre tabakasıdır. Gelişen preantral folliküller, otokrin ve parakrin birçok düzenleyicinin etkisi altındadır. Bu aşamadaki folliküller hala gonadotropinlerden etkilenmezler. Preantral follikülogeneziste, oosit ve somatik bölümler arasındaki iletişim çok daha önemlidir (26).

Bu aşamadaki folliküllerin gelişiminde granuloza hücrelerinin rolü olsa da, esas işlevi oosit gerçekleştirir. Oositten sentezlenen faktörlerin en önemlisi growth differentiation factor 9 (GDF-9)'dur. İlk olarak primer folliküllerde ifade edilir ve ovulasyon sonrasına kadar varlığını gösterir.

GDF-9^{-/-} farelerde, granuloza hücre proliferasyonunda azalma, teka tabakasının gelişmemesi ve ardından apoptozise giriş görülmüştür. Ayrıca oositteki Kit ekspresyon seviyesi aynı kalsa da granuloza hücrelerindeki Kitl ve inhibin α ifadelerinde belirgin miktarda azalma olduğu belirtilmiştir (64). GDF-9 ve Kitl arasındaki etkileşim oldukça önemlidir. Öncelikle granuloza hücrelerinden sentezlenen Kitl, oositin uygun büyüklüğe ulaşmasını sağlar. Daha sonra GDF-9 granuloza hücrelerinin Kitl ekspresyonunu baskılayarak follikül gelişimini yavaşlatır ya da durdurur (65). Transforming growth factor beta (TGF β) ailesine ait olan BMP15, oositten sentezlenen diğer bir faktördür. Ayrıca nörotropinlerden NTF5 ve BDNF, preantral follikül gelişim aşamasında önemlidir (26).

1.3.3.1. Preantral Folliküllerde Teka Tabakasının Oluşumu

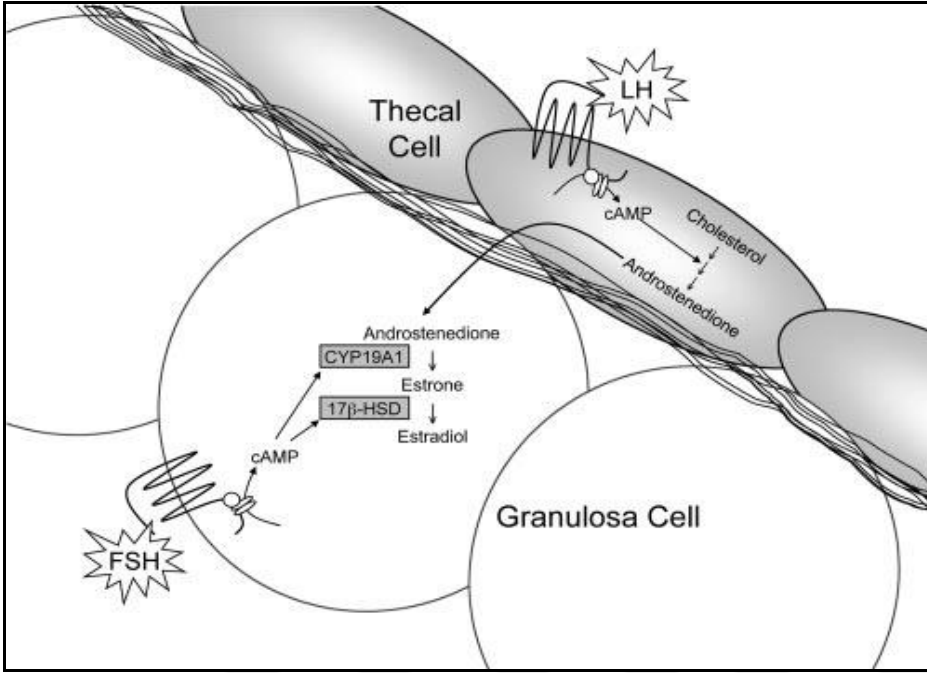
Preantral follikülde, granuloza hücreleri 2 katlı hale geldikten sonra teka tabakası oluşmaya başlar. Bazal laminanın hemen dışında oluşan teka interna hücreleri çok sayıda krista tipi mitokondri, ER ve androjen depolayan lipit vezikülleri içerir (39). Teka eksterna hücreleri ise, fibroblast, düz kas benzeri hücreler ve ovulasyonda önemli olan makrofajlardan oluşur. Teka oluşumuna katılan hücreler, ovaryum stromasında yer alan mezenşimal

prekürsör hücrelerden farklılaşarak oluşur. Teka oluşumu da gonadotropinlerden bağımsızdır. Oluşumda bir katkısı olmasa da, teka internadan üretilen androjen, luteinizing hormone (LH) kontrolü ile olur. Insulin-like Growth Factor (IGF), Kitl ve GDF-9, teka hücrelerinin farklılaşmasında önemli rol alırlar. IGF-1, rat teka hücre kültürüne eklendiğinde, teka hücre belirteçlerinden Lhags, Cyp11a1 ve Hsd3b1 ifade düzeyinde, Kitl eklendiğinde ise steroidogenic acute regulatory protein (Star) ve Cyp17a1'in ifade düzeylerinde artış görülmüştür (66).

Ayrıca Hadgehog ailesi de erken teka hücre farklılaşmasında ve ovulasyon sırasındaki düz kas hücrelerinin farklılaşmasında etkili olan önemli morfojenlerdir (67).

Antral folliküllerde, östrojen üretimi için granuloza hücreleri, başlıca kaynak olmasına rağmen, granuloza hücreleri CYP17A1 enziminden ve östradiol prekürsörü olan andrestenediondan yoksundur. Östrojen üretimi için granuloza hücreleri ve teka hücreleri koordineli olarak çalışırlar. Teka hücreleri, LH'nin bazal seviyelerine karşı bir cevap olarak, STAR, CYP11A1, CYP17A1 ve 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β -HSD) enzimlerinin ifadelerinin arttırılmasını sağlarlar. STAR sayesinde, kolesterol, mitokondri iç membranına taşınır ve orada CYP11A1 ile pregnenolona dönüştürülür. Pregnenolone da CYP17A1 yardımı ile dehydroepiandrostenedione (DHEA)'ya dönüşür. Teka hücrelerinde son olarak DHEA, 3 β -HSD'nin yardımıyla, andrestenedione'a dönüşür. Granuloza hücreleri ise, follicle stimulating hormone (FSH)'nin uyarısıyla, CYP19A1 ve 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17 β -HSD) ifadesini arttırarak, andrestenedionu östrodiol'e dönüştürür (Şekil 5), (67).

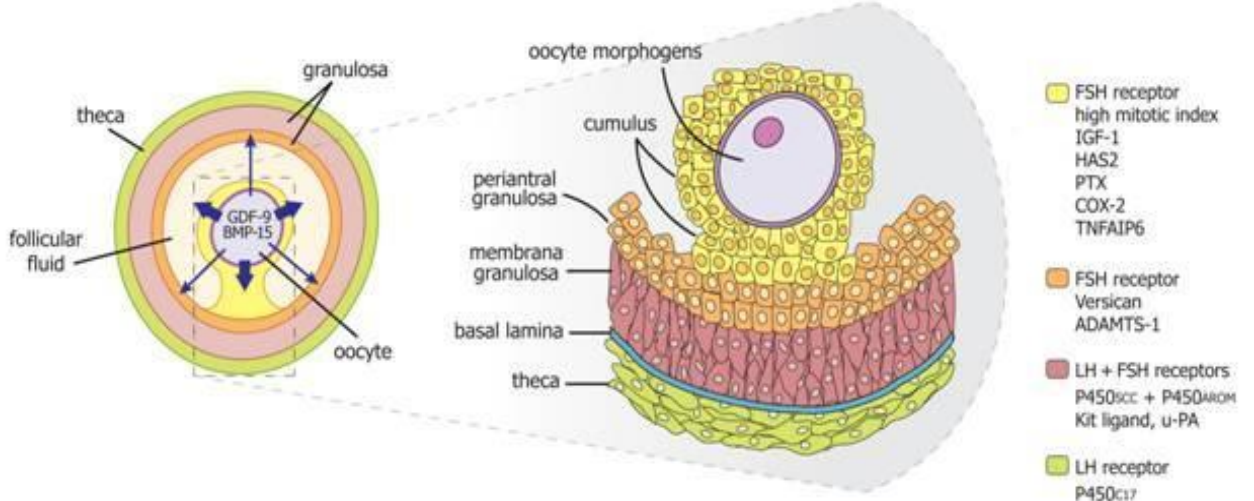
Östradiol, follikülogenezis üzerinde oldukça önemlidir ve bu etkisini iki reseptör tarafından sağlar. Estrogen receptor α ve β (ER ve ER β), nükleer reseptör ailesine aittir (26). ER β , gonadotropinlerin etkisiyle gelişen folliküllerin granuloza hücrelerinde, ER α ise teka ve intersitisyel hücrelerde ifade edilir. ER α 'nın yokluğunda; infertilite, büyümüş kistik ve hemorojik folliküller, korpus luteumun ya da ovulasyonun olmaması gibi defektler gözlenir (68). ER β 'nin yokluğunda ise subfertilite bulguları gözlenmiştir. FSH'nin aksine, östradiol, antral follikül oluşumunda önemli değildir. Bunun yanında, granuloza hücrelerinin gelişmesi ve farklılaşması, antral folliküllerin devamında ve ovulasyonun uyarılmasında kritik bir öneme sahiptir (26).



Şekil 5. Östrojenin oluşumu (67).

1.3.4. Antral Follikül Oluşumu

Antral follikülogenezis sırasında meydana gelen çok sayıda küçük sıvıyla dolu alanın birleşmesiyle, tek bir antrum oluşur. Bu antrumla beraber, granuloza hücreleri hem yerleştikleri bölgelere, hem de sahip oldukları reseptör gruplarına göre 3 farklı bölgeye ayrılır. Bazal lamina üzerine yerleşen membrana granuloza hücreleri, gonadotropin reseptörlerine sahiptir, follikül duvarına yerleşen periantral granuloza hücreleri ise steroidogenezis ve ovulasyonda, oositin çevresini saran kumulus granuloza hücreleri de oositin gelişmesinde rol oynarlar (Şekil 6), (69,70).



Şekil 6. Follikül duvarındaki granuloza hücre bölgeleri (70).

Preantral follükülden, antral follüküle dönüşüm sürecinde, hipotalamus-hipofiz-ovaryum eksenini başlanmış olur. Antral follüküller için FSH gerekliliği, sadece granuloza hücrelerini apoptozisten korumak değil, aynı zamanda granuloza hücrelerinin çoğalması, östrojen üretimi ve LH reseptör ifadeleri bakımından önemlidir (71, 72). FSH, FSH reseptör (FSHR)'e bağlandıktan sonra, G proteinin aktive olmasıyla, AC/cAMP/PKA yolağı üzerinden, cAMP-response element binding (CREB) transkripsiyon faktörü fosforlanır. Bununla birlikte, aromataz, inhibin α ve β alt üniteleri, LH reseptörü gibi daha birçok gen aktive olur. FSH, serum and glukokortikoid- induced kinase (SGK1)'ı, protein kinase A (PKA) yolağı üzerinden ifadesini arttırarak çalıştığı gibi, SGK1, AKT, ve PI3K yolağı üzerinden de cAMP'ye ihtiyaç duyarak aktive olur (73).

IGF-1'in de, FSH gibi PI3K yolağı üzerinden granuloza hücrelerinin proliferasyonu, farklılaşması ve canlı kalması üzerine etkileri vardır. Aynı zamanda IGF-1, FSHR seviyesine etki ederek granuloza hücrelerinin FSH'ya cevabını düzenler (74).

1.3.5. Ovulasyon ve Korpus Luteum Oluşumu

Follikülogenezis evrelerini tamamlayan follükülde artan serum östradiol miktarı, hipofizden FSH salgılanmasını baskılar, LH salgılanmasını sağlar. Ovulatör gonadotropin salınımından, follükülün yırtıldığı zamana kadar tanımlanan sürede (periovulatör aralık), LH

pikiyle beraber granuloza hücre proliferasyonunda artış görülürken, bu preovulatör folliküllerde en yüksek konsantrasyona ulaşan LHCGR (luteinizing hormone / choriogonadotropin receptor) sonucunda zincirleme olaylar başlar; oositin mayoza tekrar başlaması, kumulus genişlemesi, follikülün yırtılması, membrana granuloza ve teka interna ve eksterna hücrelerinin farklılaşarak, korpus luteumu oluşturmasıyla bu olaylar sonlanır (75). Korpus luteum oluşumu granuloza hücrelerinin farklılaşmasının son aşamasıdır; büyüme durur ve hipertrofi başlar, böylece luteinizasyon süreci başlamış olur (76). Oluşan granuloza lutein hücreleri oldukça büyük çapa sahiptir. Sitoplazmasında granülsüz endoplazmik retikulum, tubuler kristal mitokondri ve gruplar halinde birçok lipid damlacıkları görülür. Teka hücreleri ise teka lutein hücrelerine dönüşür. Bunlar granuloza lutein hücrelerinden çok daha küçük çapa sahiptir ve daha koyu boyanırlar. Yapıları, steroid hormon sentezleyen hücrelerin yapısına oldukça benzerdir ve üretecekleri andrestenedion için gerekli olan enzimlerin (P450c17 vve P450AROM) ifadeleri belirgindir (70).

2. ATREZİ / APOPTOZİS

Ovaryumda bulunan folliküllerin çok az bir kısmı ovulasyon yoluna girer. Folliküllerin büyük bir kısmı atrezi olur. Atrezi, programlanmış hücre ölümü yani apoptozis ile gerçekleşir. Apoptozis, ovaryum fonksiyonları ve gelişimi için gereklidir ve dişilerde biyolojik zamanlamayı düzenleyen bir mekanizmadır. Apoptozis, normal embriyonel gelişim sırasında meydana geldiği gibi, doğumdan sonraki süreçte de oldukça önemli mekanizalarda etkili rol oynar (77).

Apoptozisin meydana gelmesi sırasında birçok morfolojik değişiklik, ışık ve elektron mikroskobunda tanımlanmıştır (78). Apoptozisin erken dönemlerinde, ışık mikroskobunda, hücrenin büzüştüğü ve piknosisin olduğu gözlenmiştir (79). Hücrenin büzüşmesiyle, hücrenin boyutları küçülürken, sitoplazmasında yoğunlaşma ve organellerde sıkıca paketlenme görülür. Kromatin kondenzasyonu sonucu oluşan piknosis ise apoptozisin en karakteristik özelliğidir. Apoptotik bir hücre, hemotoksilen eosinle boyanıp, histolojik incelemesi yapıldığında, hücrelerin yuvarlak ya da oval şekilli, koyu, eozinofilik bir sitoplazmaya sahip

olduğu, ayrıca yoğun mor nükleer kromatin fragmentlerinin var olduğu gözlenmiştir. Elektron mikroskopunda ise bu nükleer fragmentasyonun perifere doğru göç ederek, nükleer membranın altında lokalize olduğu saptanmıştır. Karyoreksis ve hücre fragmentlerinin oluşup apoptotik üniteler meydana geldikten sonra plazma membranı tomurcuklanmaya başlar, bu süreç ‘budding / blebbing’ olarak isimlendirilir. Oluşan bu apoptotik üniteler, makrofajlar, parenşimal hücreler ya da neoplastik hücreleri tarafından fagosite edilir ve fagolizaslarda degrade olur (77).

2.1. Apoptozis’in Mekanizması

Apoptozis mekanizması oldukça karmaşık ve gelişmiş, enerji bağımlı birçok basamaktan meydana gelen moleküler olaylardan oluşur. Apoptozis, 3 farklı ana yoldan etkisini gösterir; i) dış (extrinsic) / ölüm reseptör yolağı, ii) iç (intrinsic) / mitokondriyal yolak ve iii) granzyme B yolağı. Üç yolak, farklı noktalardan başlasa da aynı terminal yolakta birleşirler. Bu son yolak caspase-3’ün yarıklanmasıyla başlar ve DNA’nın fragmente olması, hücre iskelet ve nükleer proteinlerin yıkılması, proteinler arasında çarpaz bağların oluşması, apoptotik ünitelerin oluşması, fagositik hücre reseptörleri için ligandların oluşmasıyla devam eder ve son olarak hücrelerin fagositik hücreler tarafından lize edilmesiyle sonuçlanır (77).

2.1.1. Dış Yolak

Dış yolakta, transmembran reseptör kaynaklı etkileşimler apoptozisi başlatır. Bu ölüm reseptörleri, tümör nekrozis faktör (TNF) süperailisine ait üyelerdir (80). TNF reseptör aile üyeleri, sisteinden zengin ekstraselüler ve 80 aminoasitlik sitoplazmik ‘death domaine’ ne sahiptir (81). Bu bölge, ölüm sinyalini, hücre yüzeyinden hücre içi sinyal yolağına iletmede önemli bir role sahiptir. Şimdiye kadar tanımlanan, ligand ve bağlandığı reseptörlerden başlıcaları; FasL/FasR, TNF α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 ve Apo2L/DR5 (82). Fas ligand, reseptörüne bağlandığı zaman FADD sitoplazmik proteinini; TNF ligand, TNF reseptörüne bağlandığında ise TRADD, FADD ve RIP sitoplazmik adaptör proteinlerini aktifleştirir. FADD’ın dimerizasyonu ile procaspase-8 aktive olur. Bu noktada c-FLIP, FADD ya da caspase-8’e bağlanırsa apoptozis meydana gelmez (83).

2.1.2. Perforin/Granzim Yolağı

Sitotoksik T lenfositler, antijen taşıyan hedef hücrelerini, çoğunlukla dış yolak üzerinden FasL/FasR bağlantısı sonucu apoptozise götürürler (84). Fakat tümör hücreleri ve virüsle enfekte hücreler, aynı sitotoksik etkilerini transmembran por oluşturan protein, perforin salgılayarak gerçekleştirirler. Perforin yardımıyla oluşan bu porlardan sitoplazmik granüller hedef hücre içersine taşınır (85). Serin proteazlarından Granzim A ve B bu granüllerin en önemlilerindedir. Granzim B, pro-caspase 10'u aktive eder ve ICAD (Inhibitor of Caspase Activated DNase) gibi faktörlerin yarıklanmasını sağlar (86). Aynı zamanda Granzim B'nin mitokondriyal yolak üzerinden, Bid'in yarıklanması ve sitokrom c'nin serbest bırakılması üzerine etkileri bildirilmiştir. Granzim B, caspase 3'ü direk olarak da aktive edebilir (87, 88).

Granzim A ise, caspase bağımsız yolak üzerinden, tümör supresör gen ürünlerinden NM23-H1'i inhibe ederek, apoptotik DNA degradasyonunu başlatır (89).

2.1.3. İç Yolak

Reseptörlerden bağımsız, hücre içi sinyallerle düzenlenen pozitif ya da negatif etkilerle oluşan yolaktır. Büyüme faktörleri, hormonlar ve sitokinlerin yokluğu, negatif sinyallerdir ve bu faktörlerin ortadan kalkmasıyla hücre apoptozise gider. Radyasyon, toksinler, hipoksi, hipertermi, viral enfeksiyonlar ve serbest radikaller gibi dış etkenler de pozitif sinyaller olarak tanımlanır (77).

Bu uyarımların sonucunda, mitokondri iç membranında bazı değişiklikler meydana gelir. Mitokondriyal geçiş porları açılır, mitokondri transmembran potansiyeli kaybolur ve iç membrandan sitosole 2 grup pro-apoptotik protein geçer (90). Birinci grup; sitokrom c, Smac/DIABLO ve serin proteaz HtrA2/Omi'yi içerir (91, 92). Bu proteinler caspase bağımlı mitokondriyal yolağı uyarır. Sitokrom c, Apaf-1 ve procaspase-9'a bağlanıp aktive ederek, 'apoptosom'u oluşturur (93). Smac/DIABLO ve HtrA2/Omi, IAP (inhibitors of apoptosis proteins)'ın aktivasyonunu engelleyerek, apoptozisi uyarılmış olur. İkinci grup pro-apoptotik proteinler; AIF, endonükleaz G ve CAD, apoptozis sırasında mitokondriden salgılanırlar. AIF, nükleusa giderek, DNA'nın ~50-300 kb lık parçalara fragmente olmasına ve periferel nükleer kromatin kondenzasyonuna sebep olur (1. evre kondenzasyon) (94). Endonükleaz G de nükleusa giderek, nükleer kromatini parçalar ve oligonükleosomal DNA fragmentlerinin

oluşmasına neden olur (95). Bu iki protein de caspaselardan bağımsız hareket ederler. CAD ise caspase-3 tarafından yarılandıktan sonra, nükleusa giderek DNA fragmentasyonuna, daha çok da kromatin kondenzasyonuna sebep olur (2. evre kondenzasyon) (96).

Apoptotik mitokondriyal yolağın kontrolü ve düzenlenmesi Bcl-2 ailesi üyeleri tarafından gerçekleştirilir (97). Bcl-2'nin düzenlenmesi ise tümör supresör protein p53 tarafından olduğu düşünülmektedir (98). Mitokondriyal membran geçirgenliğini, Bcl-2 familyası şu ana kadar bildirilen yaklaşık 25 gen ürünüyle pro-apoptotik ya da anti-apoptotik olarak yönetir. Anti-apoptotik proteinlerden bazıları; Bcl-2, Bcl-x, Bcl-XL, Bcl XS, Bcl-w, BAG; pro-apoptotik proteinler ise Bcl-10, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim, Bik ve Blk' dir. Bu proteinlerin etkilediği birçok mekanizma üzerinde apoptozis düzenlenmiş olur.

2.1.4. İnfaz (Execution) Yolağı / Terminal Yolak

Hem iç, hem de dış yolağın son aşamaları aynı mekanizma üzerinden gerçekleşir. Apoptotik hücrelerde kimyasal ve morfolojik değişikliklere sebep olan birçok protein bu son yolakta aktif rol alırlar. Bunların başında caspase-3, 6 ve 7, sitokeratinler, PARP, alfa fodrin, nükleer protein NuMA gelir (77).

Caspase-3 bu aşamadaki en önemli proteindir ve birçok caspase (caspase 8, 9, 10) tarafından aktive olur ve endonükleaz CAD'ı aktive eder. Çoğalan hücrelerde inhibitörü ICAD ile birlikte bulunan CAD, apoptotik hücrelerde caspase-3'ün aktive olmasıyla yarıklanarak birbirinden ayrılırlar. CAD, kromozomal DNA'yı degrade ederek, kromatin kondenzasyonuna sebep olur. Caspase-3, aynı zamanda hücre iskelet sistemini organize ederek, apoptotik yapıların oluşmasına neden olur (86).

2.2. Ovaryumda Apoptozisin Moleküler Mekanizması

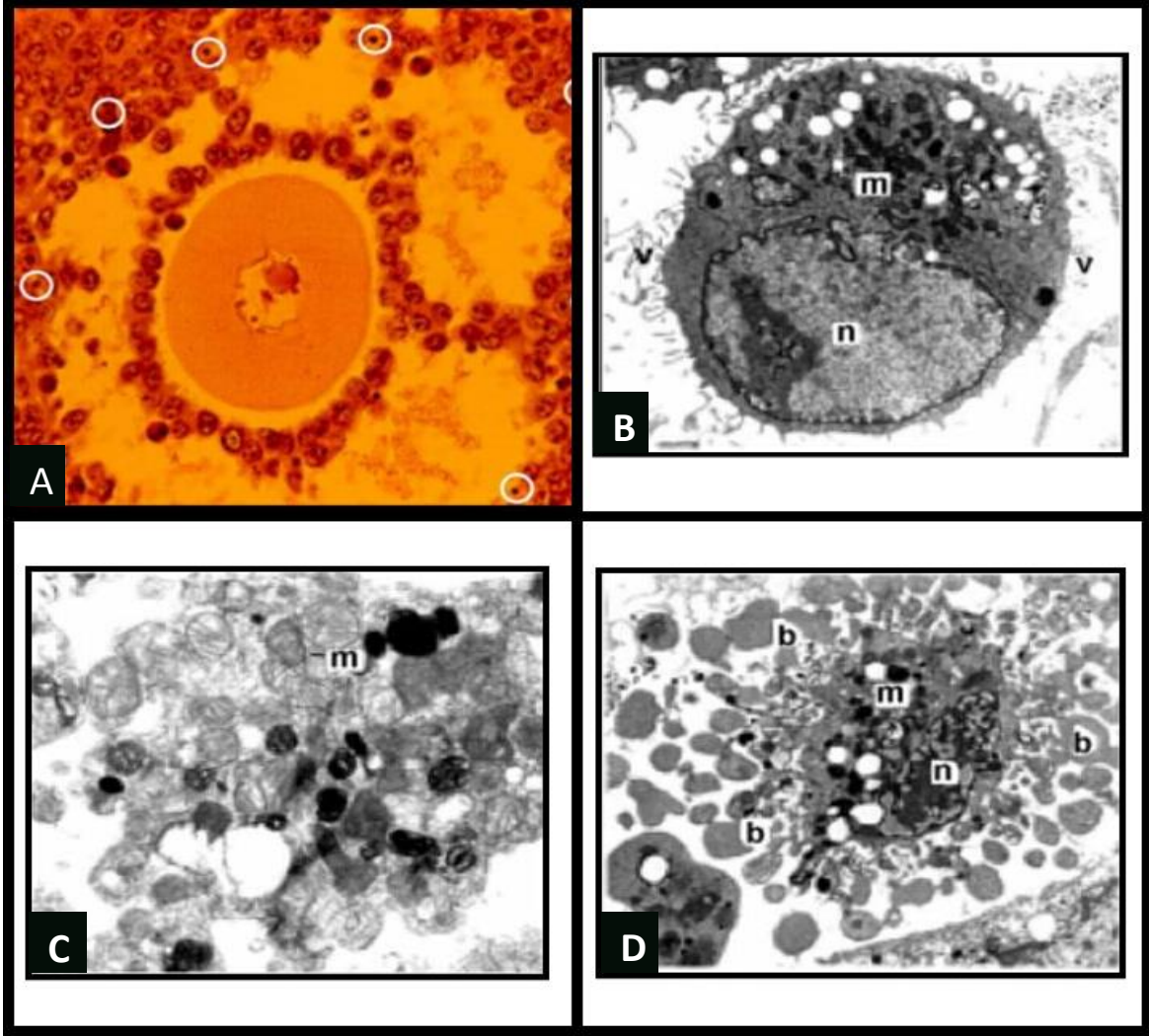
Ovaryumda ölüm ve yaşam kararının altında yatan mekanizma, proapoptotik ve prosurvival moleküllerin arasındaki çarpaz ilişkiyle ilgilidir. Morfolojik olarak, ovaryum folliküllerinde apozisi fetal ve yetişkin dönemde görebiliriz. Fötal dönem boyunca apoptozis oositte lokalize olurken, yetişkin dönemde sekonder ve antral folliküllerin granuloza hücrelerinde görülür. Apoptozis mekanizmasının altında yatan sebepler: i) mayotik anomalileri elemine etmek 'kalite kontrol', ii) survival faktörlerin eksikliği, iii) 'kendi kendini

öldürme' olarak sıralanabilir (99). Bu fizyolojik süreçlerin dışında polikistik ovaryum sendromu ve premature menapoz gibi patolojik durumlarda da folliküler atrezi meydana gelir (100, 101).

Apoptozis ve hayatta kalma için meydana gelen uyarımlar, endokrin, parakrin ya da otokrin olabilir. Hayatta kalma için gerekli olan ana faktörler; gonadotropinler, EGF, IGF, FGF, prolaktin, laminin, leptin, glukokortikoidler ve östradioldür. Bunun yanında apoptotik sinyaller ise, TNF α , cAMP'nin yüksek düzeyleri ve GnRH'dır (102).

İnsanda, embriyonik 20. haftada 7 milyon oosit varken, doğumda bu sayı 1-2 milyona düşer. Puberta başlangıcında ise bu sayı 400.000 den azdır. Fertil yaşamı boyunca bir kadının yaklaşık 400 ovulasyon yaptığı düşünülürse, %99,9'dan fazla oosit ovule olmadan yaşamını sonlandırır. Primatlarda atrezi olan bu folliküllerin %30 u preantral, %15 i küçük antral folliküllerde görülürken, %50-75 oranında büyük antral folliküllerde görülür (103, 104).

Ovaryumda primordiyal ve primer folliküllerde oositin salgılanan faktörler hücrenin kaderini belirlerken, antral folliküllerde bu rolü granuloza hücreleri üstlenir. Ovaryumda apoptozise giden bir follikülde meydana gelen morfolojik değişiklikler şu şekilde özetlenebilir; i) Apoptozis, periantral granuloza hücrelerinin iç tabakalarında başlar (Şekil 7, A), ii) Granuloza hücreleri, folliküler sıvı içerisinde yüzerler ve mitotik aktiviteleri azalmıştır. Hücrelerin %10-20 sinde piknotik nükleus görülür (Şekil 7, B), iii) Follikül duvarındaki %10-50 granuloza hücreleri kaybolmuştur. Bazal membranın bütünlüğü bozulmuştur ve lökositler, granuloza katmanına invaze olmuştur, iv) Hücrelerde tomurcuklanma meydana gelir ve hücrenin bütünlük bozularak, dağılmalar başlar (Şekil 7, C, D), v) Follikül büzüşmüş, follikül ve oositin şekli düzensiz, teka katmanı bazı alanlarda hipertrofiye olmuştur, vi) Dejenerasyonun son safhasında, granuloza ve teka katmanı kaybolmuş ve antrum tamamen fibroblastlarla dolmuştur. Bu morfolojik değişikliklerin yanında P4 (progesteron) sentezi artmış ve E2 (östradiol) sentezi azalmıştır (105).



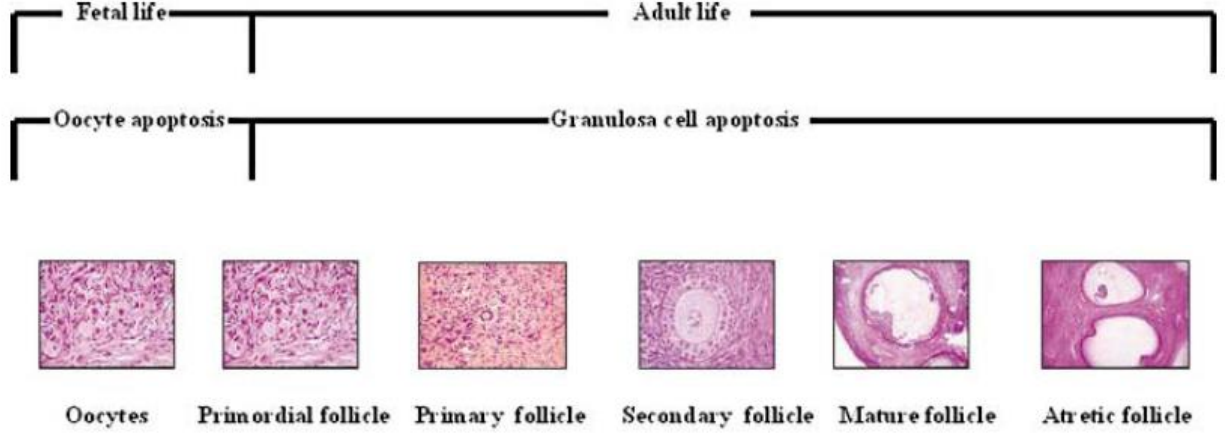
Şekil 7. Granuloza hücre apoptozisinde meydana gelen morfolojik değişiklikler (102).

Normal ovaryum folliküllerinde bazal membranın içerdiği laminin ve bFGF, ovaryum folliküllerini apoptozisten korur. Laminin, steroidogenesisi etkilemeden; bFGF ise preovulator follikül hücrelerinden progesteron oluşumunu artırarak follikülleri apoptozisten korur (106, 107).

2.3. Granuloza Hücrelerinde Apoptozis Mekanizması

Ovaryumdaki apoptozis, fetal yaşam boyunca oositlerde meydana gelir. Yetişkin dönemde ovaryumda follikül atrezisi, otokrin ve parakrin; daha sonra da granuloza hücreleri gonodotropinlerin etkisiyle geliştikçe bu hücrelerde başlar (Şekil 8), (99). Granuloza hücre apoptozisi transkripsiyon ve protein sentezine bağımlı aktif hücresel bir olaydır (108).

Granuloza hücre siklusunda, hücrelerin apoptozise en duyarlı oldukları safha ise G1 den S fazına geçiş sürecidir (109).

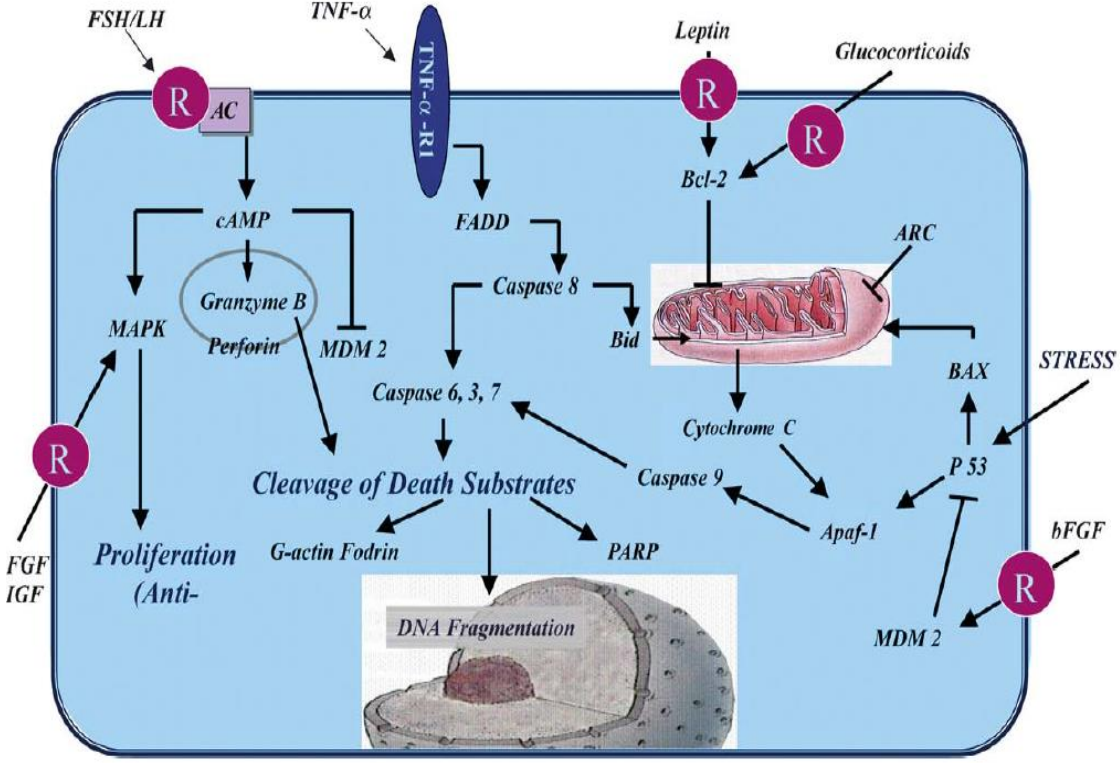


Şekil 8. Ovaryum apoptozisinin follüküler gelişim dönemlerine göre farklılıkları (99).

Granuloza hücrelerinde apoptozisin en az iki mekanizma üzerinden gerçekleştiği bildirilmektedir. Bunlardan birincisi, mitokondriyal yolak üzerinden Bax'ın aktive ettiği p53'ün uyardığı apoptozis mekanizmasıdır. Aynı mekanizma; leptin, glukokortikoidler ve TNF α tarafından Bid ve Bcl2 düzenlenerek engellenmiş olur. Alternatif olan ikinci mekanizma, Granzim B' nin cAMP tarafından uyarılarak düzenlenmesi ya da caspase 8 ve onun alt basamaklarında yer alan caspase-3, 6 ve 7 nin aktivasyonu ile TNF α 'nın uyarılmasıdır. Hangi mekanizmanın daha önce devreye ya da hangi durumlarda devreye girdiği henüz açıklığa kavuşmamıştır (102).

Şekil 9'da, granuloza hücre apoptozisi şematik olarak özetlenmiştir. TNF α 'nın uyarımı sonucunda, BID'in aktivasyonu ve sitokrom c'nin serbest kalması sağlanmış olur. Buna benzer şekilde, p53 ün uyarılmasıyla BAX aktive olur ve sitokrom c serbest kalır. Glukokortikoidler ve leptin, mitokondriyal yıkıma karşı Bcl2'yi up-regule ederek, korurken; bFGF ise MDM2'yi up-regule ederek, p53 tarafından uyarılan apoptozise karşı korur. Mitokondriyal yıkım devam ederken, granuloza hücreleri tarafından sentezlenen bir protein olan apoptotik repression proteinin (ARC) devreye girmesiyle süreç bloke edilmiş olur. Alternatif yolak olarak cAMP, Granzim B'yi aktive ederek apoptozisi uyarır. Granzim B,

salgı granüllerinden, perforin yardımıyla serbest kalır ve direk olarak ölüm substratlarını yarıklar. Gonadotropinler, IGF ve EGF de Mitogen-activated protein kinases (MAPK)'ı aktive ederek apoptotik sinyali ortadan kaldırır (102).



Şekil 9. Granuloza hücre apoptozisini düzenleyen alternatif yollar (102).

2.3.1. Granuloza Hücre Apoptozisinde Rol Oynayan Başlıca Proteinler

2.3.1.1. Bcl-2 Ailesi

Bcl-2 ailesi üyelerinin, ovaryumda hem anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1 gibi), hem de pro-apoptotik (Bax, Bid, Bik, Bod, Bcl-XS gibi) etkileri vardır (110). Bcl-2, Bax ve c-Myc fetal ve erişkin ovaryumların granuloza hücrelerinde ifade edilir (111). Anti-apoptotik ve pro-apoptotik Bcl-2 ailesinin proteinleri arasındaki dengenin bozulması mitokondriyal yolk üzerinden apoptozisi indükler (112). Anti-apoptotik proteinler sitokrom c'nin mitokondri iç

membranında kalmasını sağlayarak, procaspase 9 ve Apaf-1 ile etkileşime girip apoptozom oluşturmasını engeller (99).

Bcl-2/Bax oranı primordiyal follikül apoptozisini düzenler. Gonadotropin seviyesi arttıkça Bcl-2 ekspresyonu artarken, Bax ekspresyonunda azalma görülür (113). Bcl-2^{-/-} farelerin follikül sayılarında azalma olduğu bildirilmiştir (114). Aşırı Bcl-2 ifadesi ise apoptozis ve atrezide azalmalara sebep olmaktadır (115). Bax ifadesi olmayan farelerde aşırı sayıda granuloza hücrelerine sahip anormal folliküller olduğu bildirilmiştir (116).

2.3.1.2. TNF süperailisi

TNF'ler iki farklı reseptöre bağlanarak etkilerini gösterirler. TNF reseptör 1'e (TNFR1) bağlandıklarında sitotoksik etki meydana getirirken, TNFR2'ye bağlandıklarında proliferasyonu uyarırlar. TNFR1'e bağlanıldığında sitoplazmadaki DD (death domainler) aktive olur ve caspaselerin aktivasyonu gerçekleşir ve apoptozis meydana gelir. İkinci bir yol da, TNF associated proteinlerden olan TRAFF'ın indüklenmesidir. Bunun sonucunda da nucleer factor kappa B (NFκB) aktifleşir (99).

TNF reseptör aile üyelerinden, TNF-α, Fas ve TRAIL ovaryum atrezisinde oldukça kritik bir rol oynar. Sadece sağlıklı ya da atretik antral folliküllerin granuloza hücrelerinde değil, embriyonik gonadlarda da ifade edilmektedirler (117, 118). TNF üyeleri, hem granuloza hücrelerinde, hem oositte üretilirlerken, granuloza hücre apoptozisi FasL tarafından uyarılır (99). FasL, mRNA miktarı atretik folliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde sağlıklı folliküllerden daha fazla gözlenmiştir (118).

2.3.1.3. Caspase Proteazlar

Caspaşlar, apoptotik hücre ölümünde rol alan sistein proteazlardır. Ovaryum apoptozisinde primer görev alırlar. Granuloza hücrelerinde hücre yüzey reseptörleri ve Bcl-2 aile üyeleri üzerinden aktive olurlar; Caspase-3 ovaryumda atretik granuloza hücrelerinde ve korpus luteumun, tekal/luteal hücrelerinde görülür. Sağlıklı folliküllerin granuloza hücrelerinde caspase-3 ifadesi gözlenmez. Bu düzenlemede gonadotropinlerin rolü oldukça önemlidir (119). Caspaselerin en önemli fonksiyonlarından birisi de, caspase bağımlı DNAazları (CAD) aktive ederek, internükleosomal DNA fragmentasyonuna sebep olmalarıdır.

CAD'ların aktivitesi, baskılayıcı alt ünitesi olan, inhibitor of caspase activated DNase (ICAD)'ın aktivitesi sonucunda bloke olmuş olur (108).

Protease apoptosis activating factor-1 (Apaf-1) ve sitokrom c, procaspase 9 u yarıklar, aktive olan caspase 9'la beraber Apaf-1 ve sitokrom c apoptozomu oluşturarak caspase 3'ü aktive eder sonuçta apoptozisin terminal yolağı uyarılmış olur. Erken antral folliküllerin granuloza hücrelerinde olmayan Apaf-1, gonadotropinlerin artışına bağlı olarak tamamen ortadan kalkar (112).

2.3.1.4. PARP-1

Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), birçok transkripsiyonal faktörle etkileşim halindedir. Özellikle caspase 3 ya da 7'nin, PARP-1'i yarıklaması apoptozis metabolizması için ayırt edici bir özellik olarak kabul edilir (119, 120).

2.3.1.5. p53

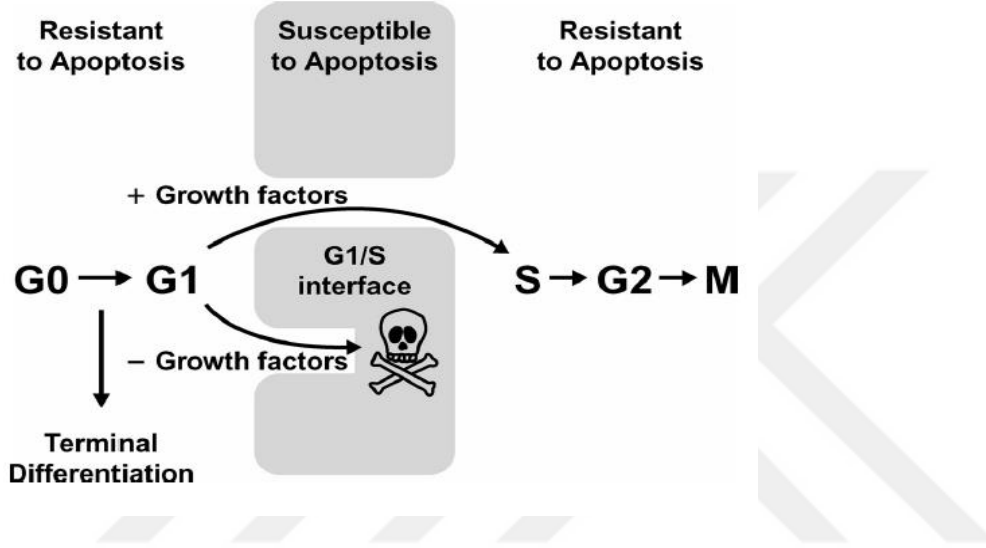
Ovaryum granuloza hücrelerinde hücre siklusunun durdurulmasında, apoptozise girmesinde rol oynayan en önemli faktörlerden biri p53'tür. p53 ün inhibisyonuyla, apoptotik granuloza hücre sayısında ve atretik follikül sayısında önemli derecede azalma görülmüştür. p53, mitokondriyal proteinler olan Bcl-2 ve Bax'ın gen transkripsiyonel aktivitesini de düzenler (112).

2.3.1.6. Büyüme Faktörleri

Birçok büyüme faktörleri ve hormonlar, granuloza hücre apoptozisi üzerine etkilidir. TGF- β süperailisi üyeleri granuloza hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında oldukça önemlidir. AMH, inhibin, aktivin, BMP 2, 5, 6 granuloza hücreleri tarafından sentezlenirken, oositte sentezlenen GDF-9, BMP 6 ve 15'de granuloza hücrelerinin düzenlenmesinde rol alırlar. Yine TGF- β aile üyesi olan Nodal, granuloza hücrelerinde ifade edilen AKL-7 reseptörüne bağlanarak Akt üzerinden Smad 4'ü uyarır ve nükleusa giderek hedef proteinlerin transkripsiyonu ile granuloza hücrelerini apoptozisten korur (112).

IGF-I, granuloza hücre poliferasyonunda östradiolle koordineli olarak hücrelerin G1/S kontrol noktasından geçmesinde önemli rol oynarlar (Şekil 10). Eksikliğinde siklus bu

noktada kalır ve hücrede apoptozis meydana gelir. IGF-I, ayrıca granuloza hücrelerinde PI₃K/AKT yolağını kullanarak folliküler gelişim üzerinde önemli etkiler yaparken, aynı yolak üzerinden FasL'ın indüklediği apoptozisten de granuloza hücrelerini korur. IGF, FSH'ya verilecek cevabın oluşturulmasında ve östrojen salınımının artırılmasında da önemlidir (109, 121).



Şekil 10. Granuloza hücre siklus mekanizmasında IGF-1'in etkisi (109).

Basic fibroblast growth factor (bFGF), epidermal growth factor (EGF) ve GDF-9 da PI₃K/AKT yolağı üzerinden etkisini gösterir ve FasL üzerinden gerçekleşen apoptozise karşı granuloza hücrelerini korur. bFGF, MDM-2 yi up-regule ederek, p53 tarafından uyarılan apoptozisi bloke eder (122). EGF, DNA fragmentasyonunu inhibe eder. Ayrıca P4 üretimi ve intraselüler serbest Ca konsantrasyonunu düzenleyerek apoptozise karşı granuloza hücrelerini korur (123). GDF-9'un caspase3 aktivasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir. Keratinosit growth factor (KGF), teka hücrelerinden sentezlense de, granuloza hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanarak, preantral folliküllü apoptozisten korur (109).

2.3.1.7. Gonadotropinler

Gonadotropinler folliküler gelişimi ve granuloza hücre proliferasyonunu farklı yönlerde etkilerler.

FSH'nın, cAMP düzeyinde meydana getirdiği hafif artışla, Siklin D2 ve E ekspresyonları artar ve hücre siklusu üzerinde pozitif regülatör olarak işlev yaparlar. Ayrıca FSH, Bcl-2, FLIP ve XIAP gibi survival moleküllerin ekspresyonunu indükler. Orta ve geç folliküler fazlarda XIAP'ın ekspresyonunun artmasıyla PI₃K/AKT yolağı aktive olur, o da mitokondriyal ölüm proteinlerinin salınımını baskılar. FSH'nın, PKA-PI3K-AKT-FoxO1 yolağı ve FOXO1-FoxO1 pozitif feedback mekanizması üzerinden, apoptosini inhibe ederek, GH'lerini koruduğu da bildirilmiştir (124). eCG uygulamasından sonra, FSHR ve PCNA ekspresyonlarında artış, Fas ve FasL ekspresyonlarında azalma meydana gelmiştir (125).

LH pikinin ise granuloza hücre proliferasyonu üzerine etkileri FSH ile zıt etkilidir. LH pikinden sonra cAMP'nin ekspresyonunun aşırı yükselişi granuloza hücrelerini apoptozise duyarlı hale getirir (109). Buna karşılık LH pikinden sonra progesteron reseptör sayısındaki artış granuloza hücre proliferasyonu ve canlılıkları açısından önemlidir (109, 112).

Gonadotropinlerin ayrıca p53 ekspresyonu üzerine etkileri vardır. Antiproliferatif transkripsiyon faktörü olan p53 ekspresyonunun artışıyla, granuloza hücreleri özellikle G1/S geçiş noktasında apoptozise duyarlı hale gelirler (112).

2.3.1.8. Östradiol

Östradiol, ovaryumdaki folliküllerin gelişimi ve farklılaşmasında oldukça önemlidir (112). Granuloza hücre proliferasyonunu uyarırken, apoptozisten de korur (109). Östradiol, FSH'nın LH reseptör sayısını arttırmasında etkilidirler (112). Ayrıca östradiolün, domuz granuloza hücrelerinde IGF-I reseptör sayısını arttırdığı bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar, östradiolün, FasL tarafından indüklenen apoptozise karşı granuloza hücrelerini koruduğunu bildirmişlerdir (109).

Ratlarda yapılan bir çalışmada, östradiolün, granuloza hücre siklus düzenleyicisi olan Siklin D2 ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir (126).

2.3.1.9. Progesteron

İmmatür rat granuloza hücreleri nükleer progesteron reseptörü içermemelerine rağmen, progesteron etkisiyle apoptozisten korundukları bildirilmiştir. Granuloza hücreleri, progesteron reseptörünü ovulasyondan hemen önce eksprese etmeye başladığından, özellikle

periovulator dönemde progesteronun antiapoptotik etkileri, granuloza hücreleri üzerinde etkindir (127). Progesteron bu etkisini, intraselüler kalsiyum iyon seviyesini bazal düzeyde tutup, membran bağımlı olayların başlamasını engelleyerek yaptığı düşünülmektedir (128).

2.3.1.10. PI3K/Akt Yolağı

PI₃K/Akt yolağı, granuloza hücre apoptozisini düzenlemede oldukça önemli bir rol oynar. Özellikle büyüme faktörleri bu yoldan etkilerini gösterir. Antiapoptotik bir protein olan Akt, BAD, caspase 9 ve FOXO'ya bağlanarak apoptozisi engeller (129).

3. GRANULOZA HÜCRE SIKLUSU

Bir hücrenin kendini çoğaltabilmesi için en önemli basamak, hücrenin genetik materyalini kopyalamasıdır. Genetik materyali taşıyan çekirdeğin, mitozla bölünmesi ve sitokinezin de gerçekleşmesiyle hücre iki yavru hücreye bölünmüş olur. Hücre döngüsünün yaklaşık %95 lik kısmı mitozlar arası dönem olan interfazda geçer. Hücrenin interfazdaki döngüsü, DNA sentezinin zamanlanmasına bağlı olarak 3 safhaya ayrılır. G1 safhasında; DNA kopyalanması başlar, hücre metabolik olarak aktif olup, büyümeye devam eder, ancak DNA henüz replike olmamıştır. S safhasında; DNA kopyalanır. G2 safhasında ise; hücre büyümeye ve mitoz için protein sentezlemeye devam eder (130). Tüm ökaryotik hücrelerde olduğu gibi, granuloza hücreleri de, çoğalmak için bu evreleri takip ederler. Tüm bu mekanizma, hücre siklus regülatörleri ve hormonlar tarafından kontrol edilir.

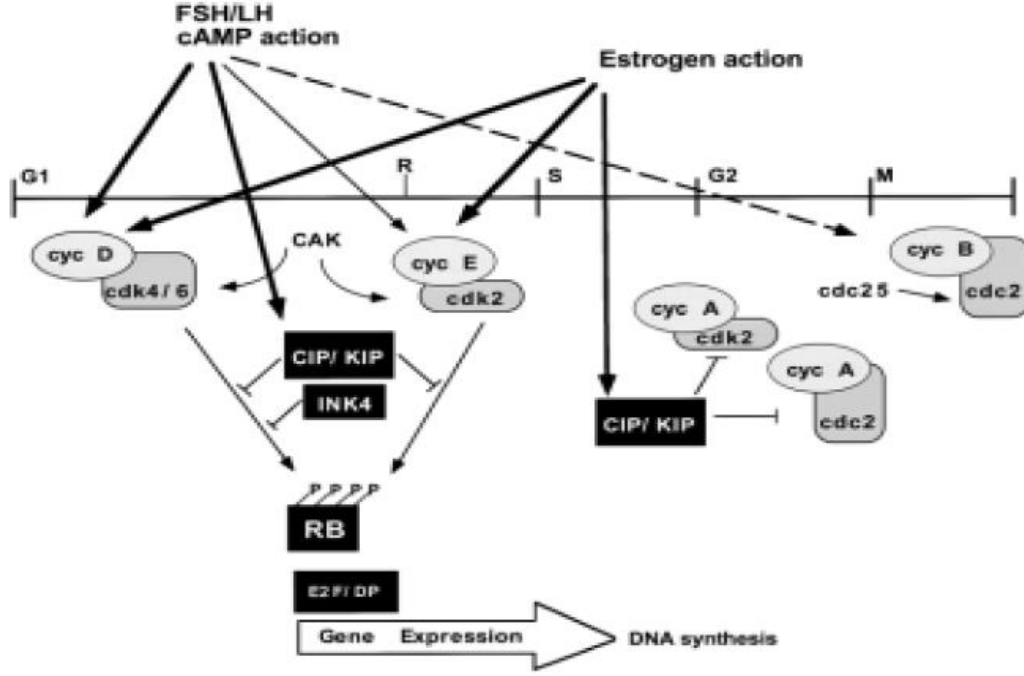
Primordiyal folliküllerin granuloza hücreleri G0 fazında beklerler. Bu sessiz fazda kalan folliküller, oldukça yavaş bir şekilde büyümeye başlarlar (131). FSH ve LH ya cevap oluşturup, östradiol sentezlemeye başlayan folliküllerde büyüme ve çoğalma hızlı bir şekilde gerçekleşir (132, 133). Hücre siklus süreci ve çoğalma, hücre siklus kinazlarının pozitif ve negatif etkileriyle dengelenir (126). FSH ve LH, cAMP'ye etkiyerek, protein kinaz A yolağını aktive eder. Siklin D ve p27'nin selektif ekspresyonları ve düzenlenmeleriyle ovaryumda folliküllerin büyüme ve farklılaşması düzenlenmiş olur (134). G1 fazının başlarında, Siklin D2 pozitif bir regülatör olarak görev yapar ve siklin bağımlı kinazlardan 4 ya da 6'ya bağlanarak sürecin devamına izin veren olaylar zincirini tetikler. Fazın geç döneminde, Siklin E, cdk2'ye

bağlanarak G1'den S fazına geçişte pozitif düzenleyici olarak görev yapar. p27^{Kip1} ise, aynı cdk'ları inaktive ederek hücrenin G1 fazında kalmasına sebep olur (135). S fazı, Siklin A ile düzenlenirken, Siklin B-cdc2 kompleksinin oluşmasıyla M fazına girilmiş olur. Siklin D ve cdk4/6'nın birleşmesiyle oluşan yapı, cdk-activating kinase (CAK) tarafından fosforillenir ve DNA sentezi başlamış olur. Fosforillenmemiş hali hücre bölünmesini baskılayan retinoblastoma (Rb) protein, DP/E2F transkripsiyon faktörlerine bağlanır, hücre bölünmesi ve çoğalma için gerekli olan genlerin transkripsiyonunu engeller. Rb, bu etkisini histone deasetilaz aracılığı ile gerçekleştirir. Siklin D-cdk4/6 ve Siklin E-cdk2 yardımıyla Rb'nin fosforillenmesi sonucu baskılayıcı etki ortadan kalkar ve hücre G1'den S fazına geçişteki kontrol noktasından ilerlemiş olur. Bu geçiş emri, hücrenin geri dönüşü olmayan bölünme sürecini başlatmış olur (Şekil 11), (126).

p27'yi de içeren Cip/Kip ailesi (p21^{Cip1}, p27^{Kip1}, p57^{Kip2}), cdk'lara (cdk4/6, cdk2, cdc2) bağlanıp, aktivitelerini inhibe ederek, birçok noktada hücre siklus sürecini bloke etmiş olur. Bunun yanında Ink4 ailesi de sadece cdk4 ve cdk6'ya bağlanarak, G1'in spesifik inhibitörleri olarak görev yaparlar (126).

Tüm dokularda, hücre siklusu benzer şekilde etki gösterse de, bu sürece etki eden bazı moleküller dokuya spesifik olarak gözlenirler. Ovaryum granuloza hücrelerinde Siklin D2, yüksek oranda eksprese edilirken, Siklin D1 ve D3 daha çok teka hücrelerinde görülür. FSH'nın cAMP'ye etkimesiyle, cAMP düzeyinde hafif bir artış görülür. Böylece, Siklin D2 ve Siklin E seviyelerinde artış meydana gelir. Tam tersi olarak, LH pikiyle cAMP düzeyindeki şiddetli artış, Siklin D2 ve sonrasında Siklin E'nin ekspresyonunu ortadan kaldırır. Ayrıca LH pikiyle p27 ve p21 seviyelerinde önemli oranda artış görülür (126).

Östradiol ise, granuloza hücrelerinde Siklin D2 ve Siklin E'nin ekspresyonunu indüklerken, p27 seviyesini azaltır. Ayrıca preovulator granuloza hücrelerinde bol miktarda sentezlenen aktivin, granuloza hücre DNA sentezini uyarır. Aktivin, FSH ve östrodiolle birlikte etki göstererek, Siklin D2 ekspresyonunu düzenler. Granuloza hücrelerinden sentezlenen IGF-1'nin de, hem proliferasyon hem de farklılaşma üzerinde etkileri vardır (126).

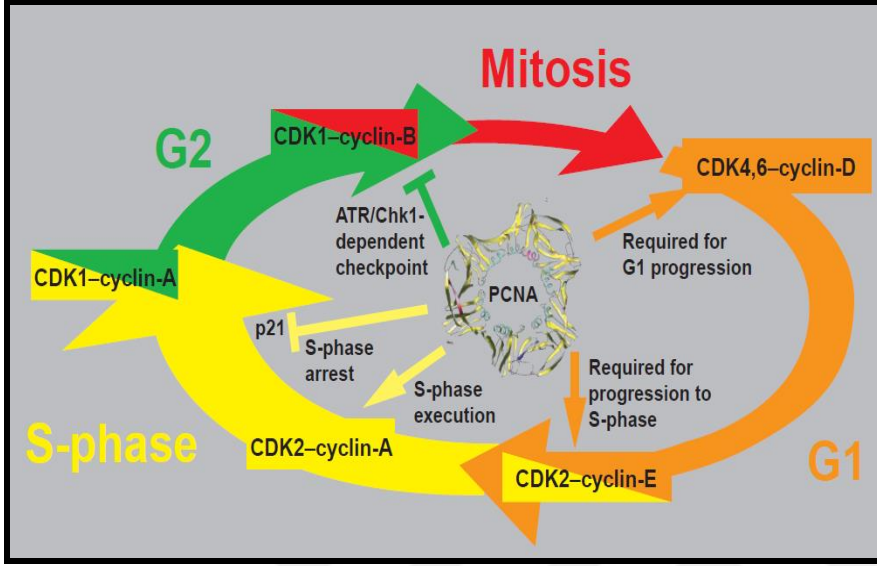


Şekil 11. Gonadotropin ve östradiolle düzenlenen ovaryum hücre siklusu (126).

3.1. Granuloza Hücre Çoğalmasında PCNA İfadesi

PCNA, DNA replikasyon mekanizmasında, kromozomal DNA'nın sentezlenmesinde görev yapan DNA polimeraz α, δ ve ϵ (Pol α, δ, ϵ)'nin fonksiyonlarını gerçekleştirmesinde aynı zaman DNA rekombinasyonu ve yenilenmesinde önemli rol oynar. Hücre siklusunun düzenlenmesinde görev alan hücresel proteinlerle etkileşime girerek, kontrol noktalarını düzenler (136). PCNA seviyesi en yüksek S fazında izole edilmiştir (137). PCNA, S fazına spesifik CDK2/Siklin A kompleksinde CDK2'nin C-terminal ucuna eklenerek, substratla arasında birleştirici bir rol oynar ve fosforillenmesini sağlar (138). Ayrıca p21'in düzenleyici etkisinde, PCNA'nın önemli rolü vardır (139). DNA hasarı ve farklılaşma durumlarında, p53 bağımlı ya da bağımsız yoldan aktive olan p21, CDK'ların N-terminal, PCNA'nın C-terminal ucuna bağlanır (140-142). *In vitro* deneylerde p21'in PCNA'ya bağlanmasıyla DNA replikasyonu baskılanır. İstirahat durumundaki ya da yaşlanan hücrelerde PCNA, mRNA ve protein düzeyi en az seviyededir. Ayrıca, büyümeyi durduran ve DNA hasarına sebep olan

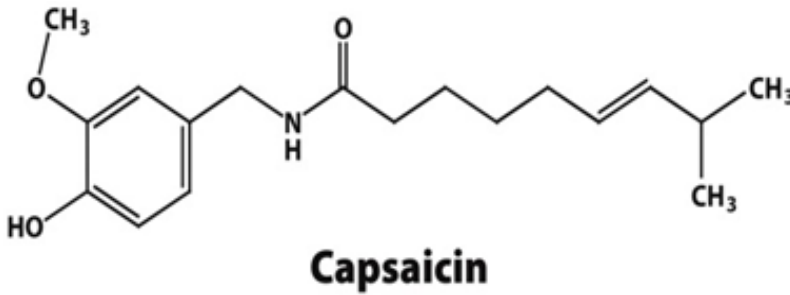
bazı gen ürünleri (Gadd45, MyD118) ya da ING1 gibi bazı proteinler PCNA'ya bağlandığında hücre gelişimi durur ve/veya hücre apoptozise girebilir (Şekil 12), (143).



Şekil 12. PCNA ve hücre siklusu düzenleyicileri arasındaki iletişim (143).

4. CAPSAİCİN

Capsaicin (CAP) (trans -8- methyl-N- vanillyl-6-nonendamid), Capsicum bitki ailesine ait olup, biber acılık veren bir bileşendir (144).



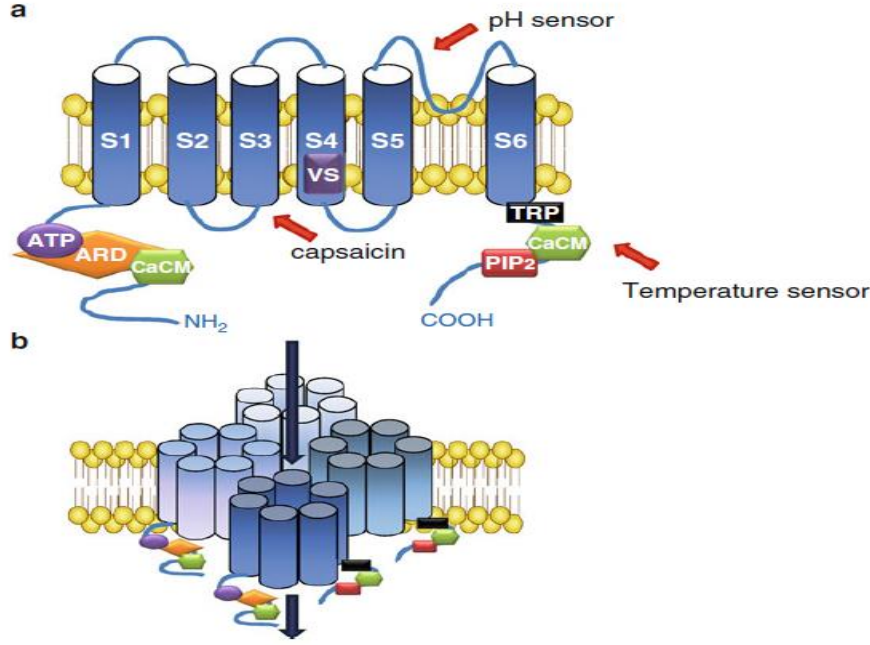
Şekil 13. Capsaicinin biyokimyasal formülü (144).

Kırmızı biberin aktif bileşiği, ilk olarak 1846 yılında Tresh tarafından izole edilmiştir. Tresh bu bileşiğe "capsaicin" adını vermiş ve vanilloidlerle kimyasal yapı bakımından

benzediği için bu gruba dahil etmiştir (145). Erken keşfine rağmen, kimyasal yapısı ancak 1919 yılında Nelson tarafından ortaya konmuştur (Şekil 13), (146). Çok eski yıllarda acı biber yiyenler mazoşist olarak yorumlanırdı ve acı biberler o yıllarda göz yaşatıcı bomba olarak savaşlarda kullanılmıştır. Ayrıca o yıllarda biber kabuklarının ağırlı bölgeye sürülmesiyle ağrı giderici özelliğinden yararlanılmıştır (145).

CAP, pürifiye halde iken yakıcı, acı, beyaz ve kokusuz özellikte alkolooid yapıda bir maddedir. CAP'ın kuvvetli bir alkolooid oluşu, kırmızı bibere kuvvetli bir acılık katmaktadır. Biber türlerinin acılık dereceleri, içerdikleri CAP oranına göre değişmektedir. 1912 yılında Wilbur Scoville acılık ölçü birimi olan Scoville Unit'i geliştirmiştir. Biberin acılık derecesi 50.000 Scoville Unit ise, insan dilinde acılığın algılanabilmesini sağlamak için, biberin alkol ile 1/50.000 oranında dilüe edilmesi gerekmektedir. En acı biber 350.000 Scoville Unit acılığa sahip, 'Mexican habanero' adı verilen biberdir (147).

Vallinoid etkenler belirli tipte reseptörlerle etkileşime girerler. Bu reseptörler büyük çoğunlukla periferel sinirlerin sonlarında yer almaktadır. Capsaicin de etkisini, transient receptor potential vallinoid 1 (TRPV1) aracılığıyla gösterir (Şekil 14). TRPV1 etkisini, kalsiyum ve kalmodulin bağımlı protein kinaz II (CaMK II kinase) ve fosfolipaz C'nin yarıklağığı phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)'ın fosforilasyonu ile gerçekleştirir. Bunun sonucunda, C ve Aδ nosiseptörlerde nonselektif katyon kanallarında, Na⁺, Ca⁺ ve K⁺ iyonlarının hücre içine akışı şekillenmektedir. Bu durumda nöronda depolarizasyona ve nörotransmitter maddelerin, örneğin Substance P (SP) ve Calcitonine Gen Related Peptid (CGRP) salgılanmasına neden olmaktadır. CAP uygulanmasının devam etmesi halinde hemen arkasından duyarsızlık ya da nöro-inhibisyon durumu oluşmaktadır. Capsaicin, reseptör aktivasyonu ile birçok farmakolojik etki gösterir ve etki çeşitliliğinden dolayı birçok uygulama alanı vardır (148).



Şekil 14. (a) TRPV1 reseptör alt birimleri, (b) TRPV1 reseptörünün fonksiyonel hali (148).

Capsaicinin topikal uygulamaları, kutanöz otonom sinir tellerinin dejenerasyonuna sebep olarak, ağrıyı azaltır (149). TRPV1'in aktivasyonu, beynin rostral ventrolateral medullasındaki katekolaminerjik nöronlar aktive olur ve katekolaminler salınır, bu da diyet uygulamalarında ağırlık azaltıcı etki gösterir (150). Ayrıca yüksek yağlı diyetlerle birlikte uygulanan capsaicin, diyete bağlı termogenezisi ve lipit oksidasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (151).

Capsaicinin, pankreas, prostat, mide, kolon, meme, akciğer kanseri, lösemi, hepatosellüler karsinomada anti-kanser etkisinden dolayı alternatif olarak kullanılabilmesine yönelik sonuçlar bulunmuştur (152). Pankreas kanser hücre hatlarında ve ksenograft tümör modellerinde, capsaicin, mitokondriyal yolak üzerinden kanser hücre apoptozisine ve tümör regresyonuna sebep olduğundan alternatif olarak kullanılabilmesi bildirilmiştir (153). Prostatik kanser hücre hatlarında ise CAP, NF- κ B ve TNF- α aktivasyonunu inhibe ederek benzer etkilerin varlığı kanıtlanmıştır (154).

Bunların yanı sıra birçok çalışmada capsaicin, kardiyovasküler, gastrointestinal ve dermatolojik etkileri gösterilmiştir (151, 152).

4.1. Capsaicinin Ovaryuma Etkisi

Rat ovaryumları sinirsel uyarıyı, sempatik, kolinerjik, peptiderjik ve duyu sinirleri aracılığıyla alır. Bunlardan sempatik ve ekstrinsik duyu sinirleri, folliküler büyüme, intersitisyel doku oluşumu ve ovaryumun damarlaşmasında rol oynar. Ovaryumu innerve eden sensorik sinir sonları, SP, CGRP ve vasoactive intestinal peptide (VIP) içerirler. SP, ovaryumdaki kan damarların çevresinde fazla miktarda bulunur ve folliküllerin gelişiminin düzenlenmesine katılırlar (155, 156). Bazı araştırmacılar, neonatal ratlara yüksek dozda capsaicin enjeksiyonu sonrasında, dişi reproduktif organlarda SP immunreaksiyonun, neurokinin-A, CGRP, VIP, galanin ve somatostatinin belirgin düzeyde azaldığını gözlemişlerdir (145, 157). Trujillo ve arkadaşları, erişkin farelerin bursa ovaricaları içerisine uyguladıkları CAP'ın, CGRP'in olduğu sinir telleri sayısında azalma olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, ovaryum folliküler gelişiminin, duyu sinirleri sayesinde merkezi sinir sistemine iletiildiği, bunun sonucunda da nöral ve endokrin yolların kullanılmasıyla gonadotropinlerin salımının olduğu belirtilmiştir (158).

CAP'ın farklı uygulamalarının ovaryum üzerine etkileri vardır. Nance ve arkadaşlarının intratekal yolla uygulanan CAP'ın, östrus siklusu, ovarian compensatory hipertrofi ve dişi seksüel davranışları üzerine etkisi gözlenmezken, fertilitedeki azalma görülmüş ve yalancı gebeliklerin olduğu bildirilmiştir (159). Traurig ve arkadaşlarının çalışmasında ise, neonatal sıçanların capsaicinle tedavisi vücut gelişimi, seksüel olgunluk ve fertilitayı etkilemiştir. Bu sonuçlara göre, çiftleşmenin uyarılmasından sonra, dişi ratlardaki capsaicine duyarlı afferent sinirler, nöroendokrin refleks için duyu komponentlerine kaynak oluşturduğu ve hipofizden LH ve prolaktin salınımını uyardığı sonucuna varılmıştır (157).

Moran ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, 3 günlük yavru ratlara, 50 mg/kg dozda capsaicin, subkutan tedavisinin sonucunda, puberte yaşında, ilk vajinal östrus zamanında ve vajinal açılma zamanında önemli derecede gecikme görülmüştür. Ayrıca 100 µm den büyük folliküllerin sayısında azalma görülmüştür. Aynı deney grubundaki fareler çiftleştirildiklerinde ise, gebelik oranında önemli derece azalma görülmüştür (13).

Oktay ve Olgun, erişkin tavukların yemlerine Kahramanmaraş bölgesi kırmızı acı biberi ilave ederek, yumurta sarısının renginin koyulaştığını, yumurta veriminin, yemden yararlanmanın ve kuluçka üretiminin ise etkilenmediğini gözlemişlerdir (160). Furuze ve

arkadaşları, diyetlerine kırmızı acı biber ilave ettikleri erişkin yumurtacı tavuklarda karın içi yağ miktarında bir değişikliğin olmadığını, yumurta performansında %3 oranında artış olduğunu bildirmişlerdir (161). Özer ve arkadaşlarının çalışmasında, 1 günlük yaştan itibaren puberta dönemine kadar, yemlerine % 0,1 oranında kırmızı acı biber ilave edilen yumurtacı tavuk ve horozlarda, karın içi yağlanmanın ve canlı ağırlık artışının azaldığı gözlenmiştir. Buna karşılık, ovaryumlarda folliküler gelişimin daha hızlı seyrederek hayvanların yumurtlama dönemine 11 gün önce girdikleri ve yumurta performanslarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (15). Horozlarda ise, kontrol grubuna göre, deney grubunda, seminifer tubuluslarda üçüncü aydan itibaren spermatogenik hücre serisinde tamamlanma, Sertoli hücrelerinde fonksiyonel faza geçiş, seminifer tubulus lumenlerinde spermatozoonların varlığı tespit edilirken, kontrol grubunda benzer özelliklere ancak bir ay sonra rastlanmıştır. Epididimal kanalda ise deney grubunda 3. aydan itibaren spermatozoonlar gözlenirken, kontrol grubunda aynı özellikler bir ay sonra gözlenebilmiştir (16). Ayrıca bu hayvanların hipofiz bezlerindeki gonadotropik hücreler, immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik değerlendirilerek, kırmızı acı biberli diyetle beslenen tavuk ve horozların hipofizinde FSH ve LH hormonlarının sentez aktivitesinin ilk aylardan itibaren arttığı saptanmıştır. FSH ve LH immunreaktif hücre aktivitesinde görülen artış, bu hormonların hedef organları olan gonad gelişimini etkileyeceği kanısına varmışlardır (162).

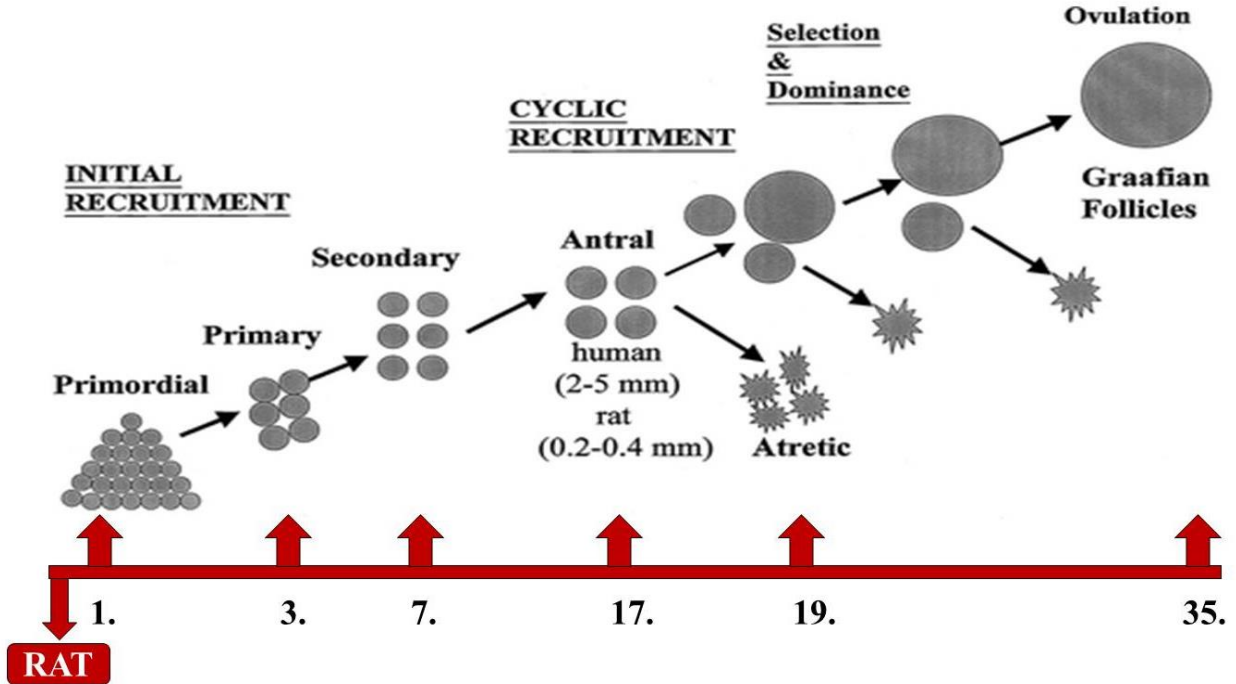
Zık ve arkadaşlarının çalışmasında, günlük diyetle kırmızı biberden alınabilecek miktara eş değer dozda CAP, puberta öncesi ratlara uygulanarak, CAP'ın ovaryum follikül gelişimi üzerine etkisi incelenmiştir. CAP uygulanan grupta follikül atrezisinin düşük, proliferasyon faktörü olan Ki-67 ekspresyonunun, bununla birlikte follikül apoptozisini baskılayan NF-kB ve Xiap protein ekspresyonlarının özellikle 15 günlük CAP uygulamasında kontrol grubuna göre yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak puberta öncesi ratlara uygun doz CAP uygulamasının, anti apoptotik özellikte NF-kB ve Xiap protein ekspresyonlarının granuloza hücrelerinde artırarak follikülleri atresiden koruduğu ve follikül gelişimini uyarıcı etki yaptığı sonucuna varılmıştır (18). Ovaryum follikül gelişiminde önemli bir faktör olan nitrik oksit sentaz'ın izoformlarının ovaryum follikül tiplerinde CAP'a bağlı olarak ekspresyonlarının arttığı ve sonuç olarak ovaryum follikül gelişiminde etkili olan NOS izoformları üzerine de CAP'ın etkili olduğu belirlenmiştir (19).

GEREÇ VE YÖNTEM

1. HAYVANLARIN ELDESİ

Çalışmada, Uludağ Üniversitesi Yetiştirme ve Araştırma Merkezi'nden alınan 30 günlük, prepubertal, 80 adet Sprague-Dawley ırkı dişi sıçanlar kullanıldı. Şekil 15'de belirtildiği gibi 35. günde meydana gelen ovulasyondan kaçınmak ve sonrasında meydana gelecek korpus luteumu kültür ortamına dahil etmemek için çalışmada prepubertal dönemdeki sıçanlar seçildi. Çalışma, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında ve Anabilim Dalı Hücre Kültürü Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Çalışmadaki tüm uygulamalar Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından onaylandı (Karar No: 2011-09/03).



Şekil 15. Ratlarda follüküler gelişim dönemleri (47).

2. PRİMER GRANULOZA HÜCRELERİNİN ELDESİ

Laboratuvara getirilen hayvanlara, dietil eter anestezisi altında servikal dislokasyon yapıldı ve abdominal ensizyon ile batın bölgeleri açıldı. Her iki ovaryum da alınarak, soğuk Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (%1 Penicillin Streptomycin) solüsyonu içerisine konuldu. Stereomikroskop altında ovaryumların etrafındaki tuba uterinalar ve yağ dokusu temizlendi. HBSS solüsyonu iki kez değiştirilerek ovaryumlar yıkandı ve soğuk Dulbecco's Modified Eagle Medium/F12 (DMEM/F12) (%10 FBS+%0.1 Penisillin-Streptomycin) solüsyonu içerisine konuldu. Ovaryumlar, bu solüsyon içinde steril dental iğnelerle delinerek parçalandı. Parçalanmış ovaryumlar, içinde yüzdükleri sıvı ile birlikte 15 ml'lik tüpler içerisinde 250 XG'de 5 dakika, 2 kez santrifüj edildi. Kullanılacak pelet kısmının üzerine, 1 ml DMEM/F12 solüsyonu eklendi ve granuloza hücrelerini, oositlerden ve diğer doku kalıntılarından ayırmak için 0,70 µm aralıklı süzgeçten süzüldü (163).

Elde edilen granuloza hücreleri, 1:1 oranında tripan blue ile muamele edilerek, 3 dakika inkübe edildi ve boyandı. Thoma lamı üzerinde tüm karelerin sayılıp, 10.000 çalışma faktörü ile çarpılmasıyla, 1 ml deki granuloza hücre sayısı hesaplandı. Hücreler, immünohistokimya ve immüno floresan uygulaması için yuvarlak lamel yerleştirilmiş 24 kuyucuklu plakalara, Western Blot uygulaması için 6 kuyucuklu plakalara ve MTT Hücre Proliferasyon Testi için ise 96 kuyucuklu plakalara ekildi.

3. CAPSAİCİN UYGULAMASI

Deneysel uygulamalara göre plakalara ekilen granuloza hücreleri, kontrol A (Hücre kontrol grubu), kontrol B (Taşıt maddesinin (DMSO) verildiği kontrol grubu) ve farklı CAP doz uygulamaları grupları olmak üzere 3 ana gruba ayrıldı. Kontrol A grubu, hazırlanan besiyeri içerisinde bekletilirken, kontrol B grubu, CAP'ın içerisinde eritildiği %0.01 DMSO'lu besiyeri içerisinde bekletildi. Daha sonra %0.01 DMSO içerisinde, 2 mM stok CAP hazırlandı. Stok CAP'dan besiyeri içerisinde 10, 50, 100, 150 ve 200 µM CAP dozları dilüe edilerek hazırlandı. Tüm uygulamalar, 24 ve 48 saat olmak üzere iki zaman grubunda yapıldı.

Tablo 1. Hücre Kültürü Malzeme Listesi

MALZEME	FİRMA	KATOLOG NO
Dietil Eter	Kimetsan	KIM-ER/01EP
HBSS	BIOCOM	P04-34500
DMEM/F12	GIBCO	11039-021
FBS	Biological Industries	04-007-1A
Pen-Strep Solution	Biological Industries	03-031-1B
Aquaguard I	Biological Industries	01-867-1B
Aquaguard II	Biological Industries	01-916-1E
Tripan Blue	SİGMA	T6146-25G
Capsaicin	SİGMA	M2028-250MG
DMSO	AMRESCO	N182-5X10 ML
Steril PBS	Lonza	BE17-516F

4. İMMUNİTOKİMYA BOYAMA

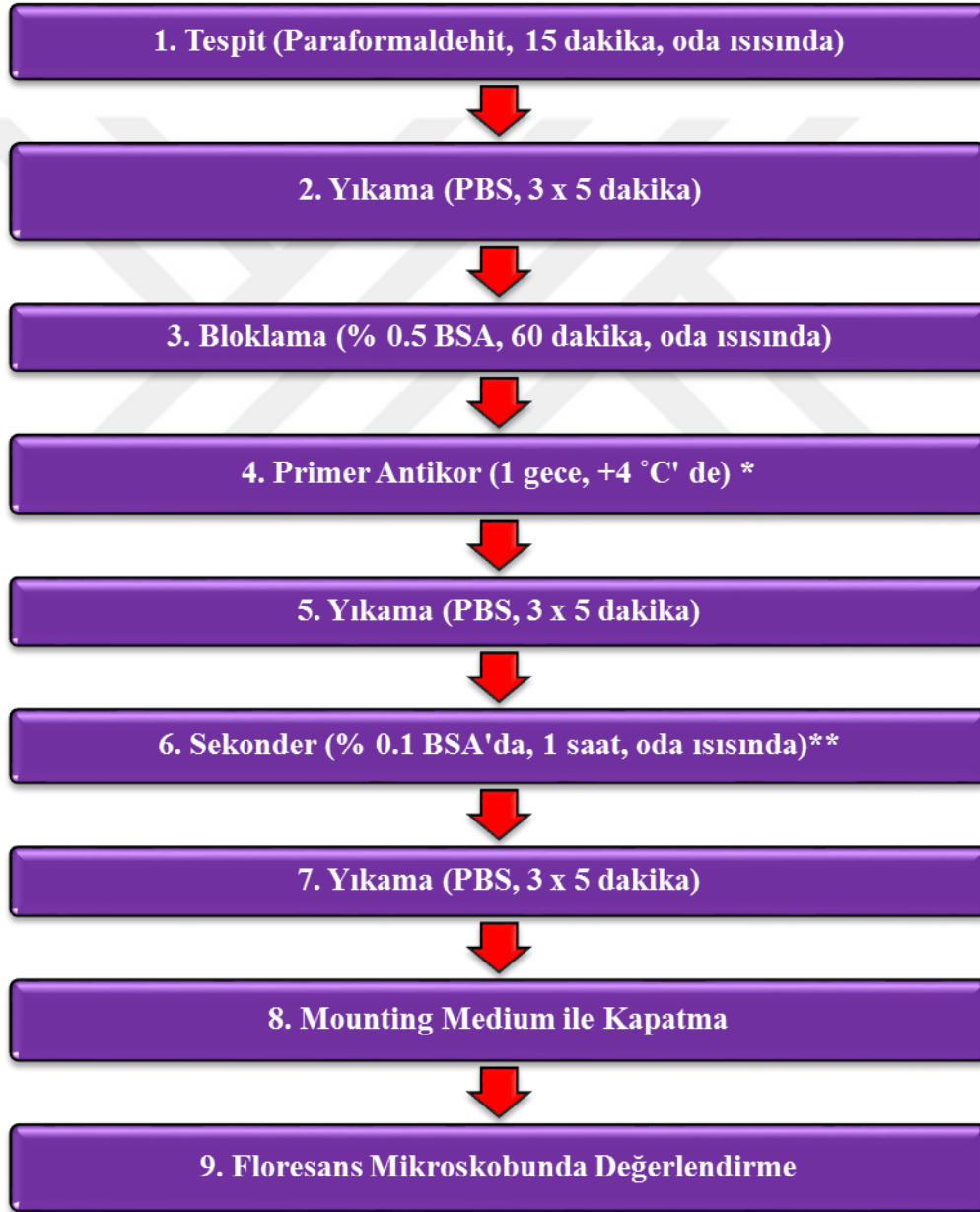
İmmünitokimya (İSK) uygulaması için, yuvarlak lamel yerleştirilmiş 24 kuyucuklu plakaların herbir kuyucuğuna, 4×10^4 adet granuloza hücresi ekildi. Hücrelerin ekilmesinden 1 gün sonra hücrelerin tutunma durumları kontrol edilerek, medyumlarına farklı konsantrasyonlarda hazırlanan CAP uygulandı. Hücreler, 24 ve 48 saat sonra invert mikroskop altında hücrelerin morfolojik durumları incelendi ve hücrelerin medyumları çekilerek PBS ile 2x5 dakika yıkandı. Daha sonra hücrelere immünitokimya boyama prosedürü uygulandı. Bunun için hücrelere, hücre proliferasyonu belirlemek için PCNA, apoptozisi belirlemek için aktif caspase-3, aktif PARP primer antikorları ile immünitokimya boyama protokolü uygulandı (163).



Şekil 16. İmmünohistokimya Boyama Protokolü (163).

5. İMMUNFLORESAN BOYAMA

Yuvarlak lamel yerleştirilmiş 24 kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna 4×10^4 adet granuloza hücresi ekildi. Bir gün sonra, medyuma farklı konsantrasyonlarda CAP ilave edilerek deney gruplarına bağlı olmak üzere 24 ve 48 saat sonra deney sonlandırıldı ve hücrelere immunfloresan (IF) boyama protokolü uygulandı (163).



Şekil 17. İmmunfloresan Boyama Protokolü (163).

Tablo 2. İmmüsitokimya/İmmüfloresan Primer Antikor* Listesi

MALZEME	SULANDIRMA ORANI	FİRMA	KATOLOG NO
PCNA	1/200	Santa-Cruz Biotechnology	sc 7907 Rabbit polyclonal antibody
Aktif Caspase 3	1/400	Cell Signalling	9661 Rabbit polyclonal antibody
Aktif PARP-1	1/200	Santa-Cruz Biotechnology	sc 23461 Rabbit polyclonal antibody

Tablo 3. İmmüsitokimya/İmmüfloresan Sekonder Antikor** Listesi

MALZEME	FİRMA	KATOLOG NO
ImmPRESS HRP Anti-Rabbit Ig (Peroxidase) Detection Kit	Vector Laboratories	MP 7401
Histostain Plus IHC Kit Rabbit Primary	Life Technologies	85-6743

Tablo 4. İmmüsitokimya/İmmüfloresan İncelemede Kullanılan Malzeme Listesi

MALZEME	FİRMA	KATOLOG NO
PBS	BioBasic Inc.	P00435
Paraformaldehide	Merck Chemicals	1.04005.1000
Triton X-100	Sharlow	TR0447
DAB-Plus Substrate Kit	Invitrogen	00-2020
Harris Hemotoxylen	Merck Chemicals	1.09253.2500
Ethanol	Merck Chemicals	1.00986.2500
Xylene	Merck Chemicals	1.08661.2500
Entellan	Merck Chemicals	1.07961.0100
Antibody Diluent	Zymed	003118
BSA (Bovine Serum Albumin)	Santa Cruz	sc-2323
Ultracruz™ Mounting Medium	Santa Cruz	sc-24941

6. WESTERN BLOT YÖNTEMİ

6.1. Total Protein Analizi

Western Blot için 6 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 3×10^5 adet hücre ekildi. Ertesi gün tutundukları gözlenen hücrelere daha önce tarif edildiği gibi capsaicin uygulaması yapıldı. Her doz uygulaması için 24 ve 48 saatlik gruplar, 2'şer kuyucuk çalışıldı. CAP uygulamasının ardından hücreler steril soğuk PBS ile yıkandı ve 300 µl lizis buffer ile kaldırıldı. Dublike çalışılan kuyucuklar birleştirilerek Ependorf tüplere alındı.

Lizis Tampon Hazırlanışı:

RIPA Buffer:

- 1 M Tris HCl pH 7,4 : 50 ml
- 4 M NaCl : 37,5 ml
- 0,5 M EDTA pH 8 : 4 ml
- Triton X-100 : 10 ml
- % 10 SDS : 10 ml

1000 ml'ye dH₂O ile tamamlandı. Kullanılacağı zaman, hazırlanan RIPA stok solüsyondan 10 ml alındı, 0,1 g sodyum deoxycholate ve 1 tablet proteaz inhibitör kokteyli, 1 tablet fosfataz inhibitör kokteyli eklendi. Ependorf tüplere alınan lysis bufferlı hücreler, buz üzerinde 15 dakika bekletildi. Daha sonra hücreler, 10.000 X G, +4 °C'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant toplanarak, hücre lizatları elde edildi. Süpernatantlarda total proteini belirlemek için öncesinde farklı konsantrasyonlarda hazırlanan BSA ile standart eğri çizildi. Daha sonra BCA kit prosedürüne uygun olarak hücre lizatları, BCA solüsyonuyla, 30 dakika 37°C'de inkübe edildi ve süpernatantların absorbans değerleri 562 nm ölçüldü. Numunelerin absorbans ortalamaları alınarak, standartların absorbanslarından elde edilen formüle yerleştirildi. Hücrelerdeki total protein miktarı excell programı kullanılarak hesaplandı. Hücrelerin total protein oranları, 1:1 oranında hazırlanan Laemmli Buffer (Sample Buffer : β merkaptetanol, 20:1) ile örnekler sulandırılarak birbirine eşitlendi. Daha sonra hazırlanan örnekler, 4 dakika, 100° C' de kaynatıldı ve -80° C'ye kaldırıldı.

6.2. Örneklerin Dikey Jel Elektrofrezde Yürütülmesi

Aranacak olan proteinlerin kDa ağırlığına göre özel jel seçimi yapıldı.

Stacking (% 4) Jel (Toplama Jeli) Hazırlanması

- Total Hacim : 5 ml
- dH₂O : 3,1 ml
- % 40 Acrylamide/Bis : 0,5 ml
- 0,5 M Tris pH 6,8 : 1,25 ml
- %10 SDS : 50 µl
- %10 APS : 50 µl
- TEMED : 5 µl

Resolving (% 12) Jel (Ayrırma Jeli) Hazırlanması

- Total Hacim : 8 ml
- dH₂O : 3,4 ml
- % 40 Acrylamide/Bis : 2,4 ml
- 1,5 M Tris pH 8,8 : 2 ml
- %10 SDS : 80 µl
- %10 APS : 80 µl
- TEMED : 8 µl

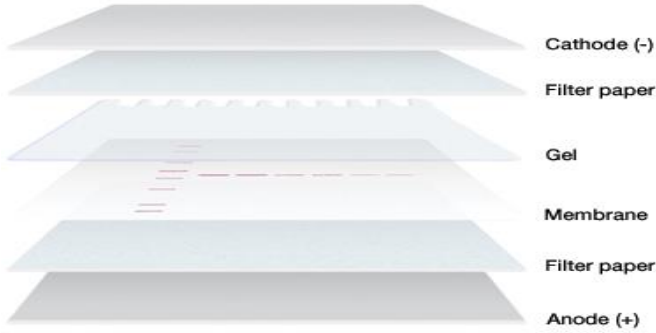
Poliakrilamid jeller yukarıda verilen tarifile hazırlandı. Jelleri dökmeden kısa bir süre önce hazırlanan jel solüsyonlarına, APS ve TEMED hızlıca ilave edildi ve jel dökme işlemine geçildi. Öncelikle ayırma jeli, western blot cihazındaki 2 cam arasına yavaş bir şekilde döküldü, üzerine jeli kapatacak şekilde distile su ilave edilerek 45 dakika bekletildi. Jel donduktan sonra üstteki sıvı dökülerek, iki cam arasına taraklar yerleştirildi ve toplama jeli yavaş bir şekilde döküldü. Daha sonra taraklar bastırılarak 45 dakika jelin donması beklendi.

Jel donduktan sonra camlar dikey yürütme tankına alındı ve tank running solusyonu ile dolduruldu. Taraklar, running solusyonu içerisinde çıkartıldı.

Jeller donduktan sonra çıkartılan tarakların yerlerinde oluşan 1. kuyucuğa 10 µl marker, geri kalan kuyucuklara 18 µl örnekler yüklendi. Örnekler, toplama jelini geçene kadar 80 V, ayırma jelinde ise 120 V elektrik geriliminde, running buffer içerisinde yürütüldü. Yürütme işlemi sırasında blotting buffer hazırlandı. Filtre kağıtları ve PVDF membran kesilerek hazırlandı. 15 dakika önce filtre kağıtları, petler, membran blotting buffer solusyonunda ıslatıldı. Dikey yürütme tankının klipsleri açılıp ve küçük cam kaldırıldı. Üstteki toplama jeli kesilerek o bölge hafifçe su ile temizlendi. Jel camdan ayrılarak, blotting buffer içerisine alındı ve sandviç hazırlandı.

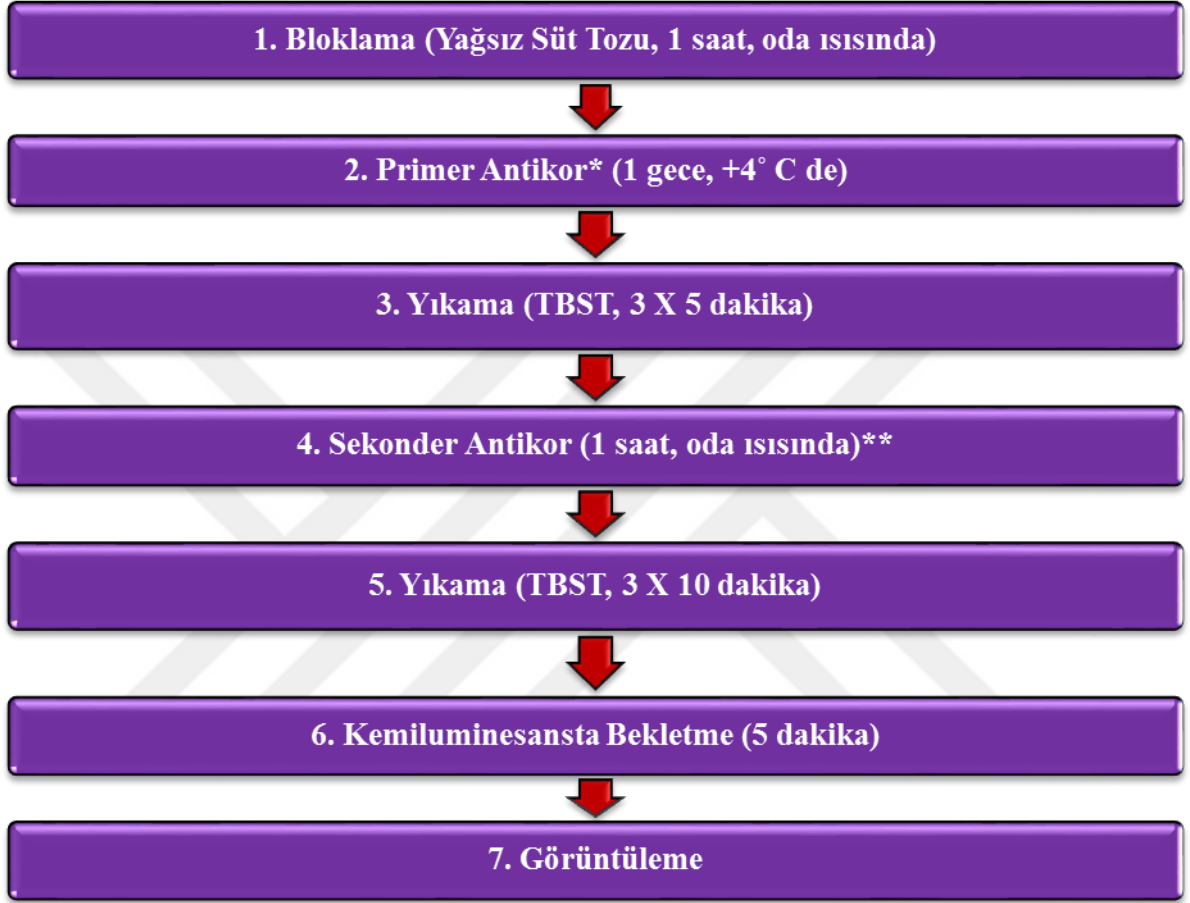
6.3. Protein Bantlarının Poliakrilamid Jelden PVDF Membrana Transferi

Jelde yürüyen ve ağırlıklarına göre ayrılan proteinler, boyama aşamasına geçilmesi için PVDF membrana aktarılması gerekmektedir. Transfer aşaması için özel aparatlara sandviç modeli uygulanır. Aparatın siyah (katod) tarafından başlanarak sırasıyla, sünger, 3 adet blotlama kağıdı, poliakrilamid jel, PVDF membran, 3 adet blotlama kağıdı, sünger üst üste yerleştirildi, üzerine aparatın beyaz (anod) tarafı kapatıp, sıkıştırıldı (Şekil 18). PVDF membranın aktivasyonu için membran metanol içerisinde 30 saniye çalkalanarak bekletildi. Buz dolu kabın içerisinde, karıştırıcı üzerinde, transfer buffer ile birlikte 120 V elektrik geriliminde, 2.5 saat transfer yapıldı. Bu sürenin sonunda tank içerisinden aparattan membran alınarak, TBST ile 2X10 dakika yıkandı ve sonra boyama işlemine geçildi.



Şekil 18. Western Blot transfer sandviç modeli.

6.4. Boyama



Şekil 19. Western Blot Boyama Prosedürü (163).

Yukarıda belirtilen, 1-5. aşamalar çalkalıyıcı üzerinde yapıldı.

Görüntüleme cihazında gözlenen protein bantların dansitometrik değerleri, Image Lab™ programında değerlendirildi ve kontrol olarak kullanılan β -aktine göre normalizasyonları yapıldı.

Tablo 5. Western Blot Primer Antikor* Listesi

MALZEME	SULANDIRMA ORANI	FİRMA	KATOLOG NO
PCNA	1/200	Santa-Cruz Biotechnology	sc 7907 Rabbit polyclonal antibody
Cleaved Caspase 3	1/1000	Cell Signalling Technology	9661 Rabbit polyclonal antibody
Cleaved PARP-1	1/200	Santa-Cruz Biotechnology	sc 23461 Rabbit polyclonal antibody
Actin	1/1000	Santa-Cruz Biotechnology	sc 1616 Goat polyclonal antibody

Tablo 6. Western Blot Sekonder Antikor** Listesi

MALZEME	SULANDIRMA ORANI	FİRMA	KATOLOG NO
Goat Anti Rabbit IgG HRP	1/5000	Santa-Cruz Biotechnology	sc 2030
Bovine Anti Goat IgG HRP	1/5000	Santa-Cruz Biotechnology	sc 2378

Tris-Buffer Salin ve Tween 20 (TBST)'nin Hazırlanması

10X TBS

24,4 g Trisbase

80 g NaCl

800 ml dH₂O içerisinde eritilir, HCl ile pH sı 7,6'ya ayarlanıp ve 1 L'ye dH₂O ile tamamlandı.

1X TBST

100 ml 10X TBS + 900 ml dH₂O + 1 ml Tween 20

Tablo 7. Western Blotta Kullanılan Malzeme Listesi

MALZEME	FİRMA	KATOLOG NO
% 40 Acrilamide/Bis	Bio-Rad	161-0146
Resolving Gel Buffer	Bio-Rad	161-0798
Stacking Gel Buffer	Bio-Rad	161-0799
SDS	Merck Chemicals	1.13760.0100
APS	Merck Chemicals	1.01201.0100
TEMED	Merck Chemicals	1.10732.0100
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad	161-0737
2-Mercaptoethanol	Sharlau	ME0095
10X Tris/Glycine Buffer (Running Buffer)	Bio-Rad	161-0734
10X Tris/Glycine/SDS Buffer (Transfer Buffer)	Bio-Rad	161-0732
Full Range Rainbow Molecular Weigh Markers	Amersham Biosciences	RPN800
Yağsız Süt Tozu	Santa-Cruz Biotechnology	sc2325
Luminata™ Crescendo Western HRP Substrate	Millipore	WBLUR0100
Trisbase	Sigma	T-6066
Sodyum Chloride	Merck Chemicals	1.06404.1000
HCl	Carlo Erba Reagent	302626
Tween-20	Merck Chemicals	8.22184.0500
EDTA	Merck Chemicals	K3215821
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics	11697498001
PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Life Science	04906837001
Methanol	Merck Chemicals	1.060009.2500
BCA Protein Assay Kit	Pierce	23227
BSA Protein Standarts	Sigma	P0914
Sodium Deoxycholate Monohydrate	Sigma	D5670

7. MTT HÜCRE PROLİFERASYON TESTİ

MTT Hücre Proliferasyon Testi için 96 kuyucuklu plakalara 5.000'er hücre ekildi. 24 ve 48 saatlik; kontrol A ve kontrol B grupları ile 10, 50, 100, 150, 200 μ M CAP dozları dublike çalışıldı. İnkübasyonun ardından her kuyucuğa 20 μ l MTT pipetlendi ve 37°C'de karanlıkta 4 saat bekletildi. Süre sonunda MTT ile muamele edilmiş tüm kuyucuklara 100 μ l SDS pipetlendi ve gece boyu, 37°C'de karanlıkta inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün 570 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. Uygulanan protokol üretici firmanın (Sigma) tarifinden uyarlanmıştır.

Tablo 8. MTT Proliferasyon Testinde Kullanılan Malzeme Listesi

MALZEME	FİRMA	KATOLOG NO
Thiazolyl Bluetetrazolium Bromide (MTT)	Sigma	M5655
SDS	Merck Chemicals	1.13760.0100

Tablo 9. Laboratuvarında Kullanılan Cihazlar

CİHAZ	FİRMA	MODEL
Biyolojik Emniyet Kabini	TELSTAR	EN-12469-2000
CO ₂ Etüv	PANASONIC	MCO-18AC-PE
İnverted Mikroskop	NIKON	ECLIPSE Ti
Işık Mikroskobu	NIKON	ECLIPSE 80i
Soğutmalı Santrifüj	SIGMA	3K30
ELISA Reader	BIOTEK	Epoch
Görüntüleme Cihazı	BIO-RAD	ChemiDoc™ MP Imaging System
Western Blot Cihazı	BIO-RAD	Mini Trans-Blot® Cell
Isıtıcı/Soğutucu Blok	BIOER	HB-202
Çalkalayıcı	BIOSAN	Multi Bio 3D
Karıştırıcı	ISOTEX	SH-4

8. İMMUNİTOKİMYA/İMMUNFLORESAN DEĞERLENDİRME

İmmünitokimya ve immünofloresan prosedürü uygulanan her antikor için, boyanan her bir yuvarlak lamelde, 5 farklı alanda 100'er hücre sayıldı. Toplamda sayılan hücrelerin içinde, boyanan antikorlara reaksiyon veren hücreler belirlenerek % değerleri hesaplandı ve istatistiksel incelemeleri yapıldı.

9. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

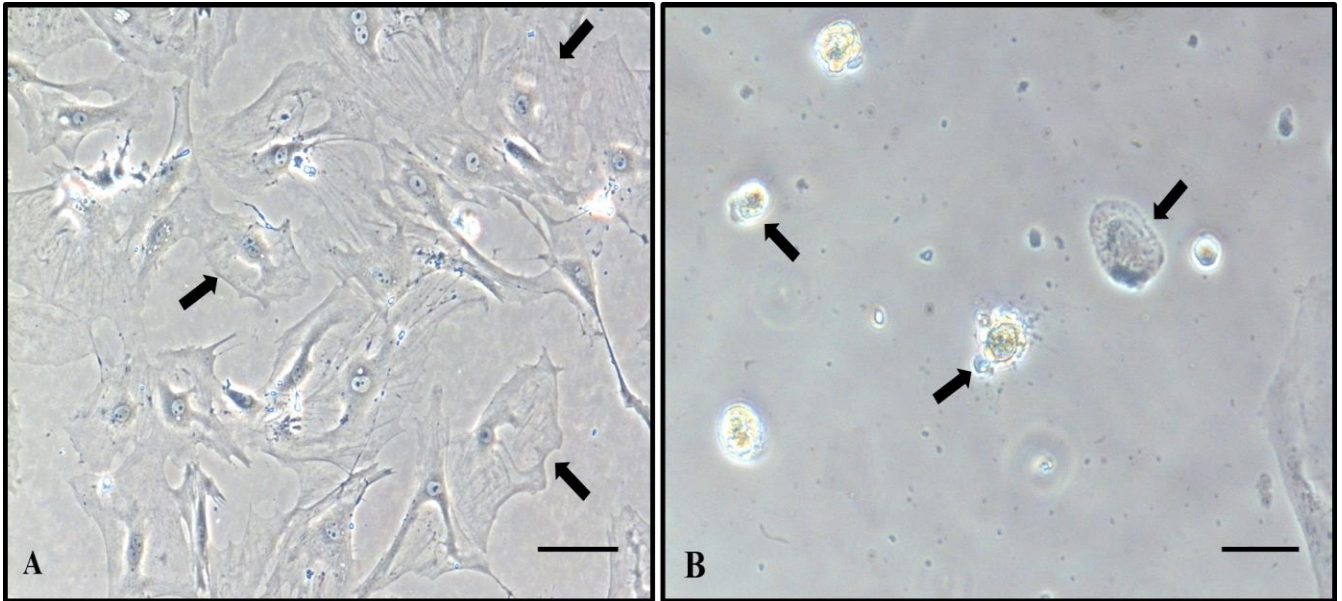
İmmünitokimyasal değerlendirme sonuçları, IBM SPSS Statistics 22 programında istatistiksel olarak incelendi. Gruplar arasında istatistiksel farklılıklar Kruskal Wallis Testi ile araştırıldı. Gruplar arasındaki farklılığın hangi grup(lar) dan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U Testi ile incelendi. Tüm incelemeler $p \leq 0.05$ anlamlılık düzeyinde değerlendirildi.

İstatistiksel değerlendirmeleri yapılan sonuçların grafikleri, Sigma Plot programında çizildi.

BULGULAR

1. MORFOLOJİK BULGULAR

Kontrol A, kontrol B ve farklı konsantrasyonda CAP uygulanan granuloza hücrelerinin morfolojik yapıları, proliferasyon/apoptozis bulguları, 24. ve 48. saat sonunda araştırma mikroskopunda incelendi. 24 ve 48 saat sonrası, özellikle 10 ve 50 μM CAP uygulanan granuloza hücrelerinin, kontrol gruplarına göre, hücre sayılarının oldukça arttığı ve bu hücrelerin sağlıklı yapıda oldukları gözlemlendi (Şekil 20 A). Bununla birlikte ölen hücre sayısının her iki zaman uygulamasında kontrol gruplarına göre, 100, 150, 200 μM CAP uygulanan granuloza hücrelerinde doza bağlı olarak arttığı ve bu hücrelerin çoğunda apoptozise ait bulguların olduğu gözlemlendi. Özellikle 48 saat 150 ve 200 μM CAP uygulamalarında, hücreler arasında bağlantıların koptuğu ve apoptozis bulgularının oldukça belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 20 B).



Şekil 20. Granuloza hücrelerinin morfolojik yapıları, **A.** Kontrol A grubunda sağlıklı granuloza hücreleri (ok), (Bar: 50 μm), **B.** 48 saat 200 μM CAP uygulaması, apoptotik granuloza hücreleri (ok), (Bar: 50 μm).

2. HÜCRE PROLİFERASYON BULGULARI

2.1. Granuloza Hücre Proliferasyonu Üzerine Capsaicinin Etkileri

Mitotik aktivite gösteren granuloza hücrelerinde, PCNA ifadesi immünohistokimyasal boyama sonrası, hücrelerin çekirdeklerinde gözlemlendi. IF boyama sonrası ise, PCNA reaksiyonu hücrelerin çekirdeklerinde, bazı hücrelerin ise sitoplazmalarında belirlendi (Şekil 23 A). PCNA ifadesi gözlenen hücreler, DAB kromojeni ile kahverengi, Alexa Flour işaretli sekonder antikor ile yeşil renkte boyandı.

24 saat CAP uygulaması sonrasında granuloza hücre proliferasyonu immünohistokimyasal ve immüno floresan boyama sonrasında değerlendirildi (Tablo 10). Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirilmesi sonucunda, kontrol A (70.2 ± 1.32) ve kontrol B (72.6 ± 0.6) grupları ile 10 μM CAP (73.7 ± 2.32) ve 100 μM CAP (62.78 ± 3.71) uygulama grupları arasında istatistiksel farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$). Buna karşılık PCNA immünreaksiyon gösteren hücrelerin sayısının, kontrol gruplarına göre 50 μM CAP (90.74 ± 1.76) uygulanan hücrelerde arttığı ($p \leq 0.05$), 150 μM (26.53 ± 3.31) ve 200 μM CAP (19.79 ± 6.38) uygulanan gruplarda ise kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde bir azalma olduğu gözlemlendi ($p \leq 0.05$). 24 saat sonrası CAP dozları arasındaki farklılığa bakıldığında, 10 μM ve 100 μM CAP dozları arasında anlamlı düzeyde istatistiksel farklılık gözlenmezken ($p > 0.05$); 10 μM ile 50, 150 ve 200 μM CAP dozları arasında anlamlı farklılık belirlendi ($p \leq 0.05$). 50 μM ve 100 μM CAP dozları arasında istatistiksel anlam gözlenmezken ($p > 0.05$); 150 ve 200 μM CAP dozları arasındaki fark anlamlı düzeydeydi ($p \leq 0.05$). Bununla birlikte 24 saatlik süreçte, 100, 150 ve 200 μM CAP dozları arasında, hücre proliferasyonu bakımından istatistiksel bir farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$), (Tablo 10), (Şekil 21), (Şekil 23 B, C).

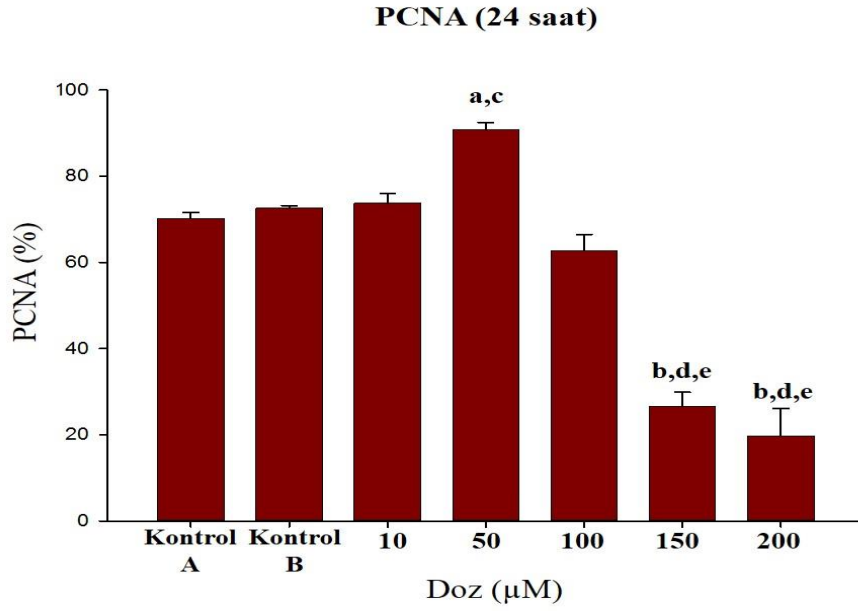
48 saatlik CAP uygulamasında ise, kontrol A (37.45 ± 2.2) ve kontrol B (37.09 ± 2.85) grupları ile 10 μM CAP (36.61 ± 7.53), 150 μM CAP (31.23 ± 6.31) uygulamaları arasında istatistiksel düzeyde anlamlı bir farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$). Her iki kontrol grubuna göre, PCNA immünreaksiyon gösteren hücre sayısında 50 μM CAP (86.85 ± 3.18) ve 100 μM CAP (58.73 ± 3.18) doz uygulamasında artma ve 200 μM CAP (24.6 ± 11.7) uygulamasında ise istatistiksel düzeyde anlamlı azalma gözlemlendi ($p \leq 0.05$), (Şekil 23 D). 48 saat sonunda CAP

dozları karşılaştırıldığında, 50 ve 100 µM CAP dozları arasında istatistiksel anlam gözlenirken ($p \leq 0.05$); 150 ve 200 µM CAP dozları arasında istatistiksel farklılık gözlenmedi ($p > 0.05$). 50 µM CAP dozu ile 100, 150 ve 200 µM CAP dozları arasında, ayrıca 100 µM CAP dozu ile 150 ve 200 µM CAP dozları arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı düzeyde belirlendi ($p \leq 0.05$). Bununla birlikte 150 ve 200 µM CAP dozları arasında ise anlamlı düzeyde farklılık belirlenmedi ($p > 0.05$), (Tablo 10), (Şekil 22).

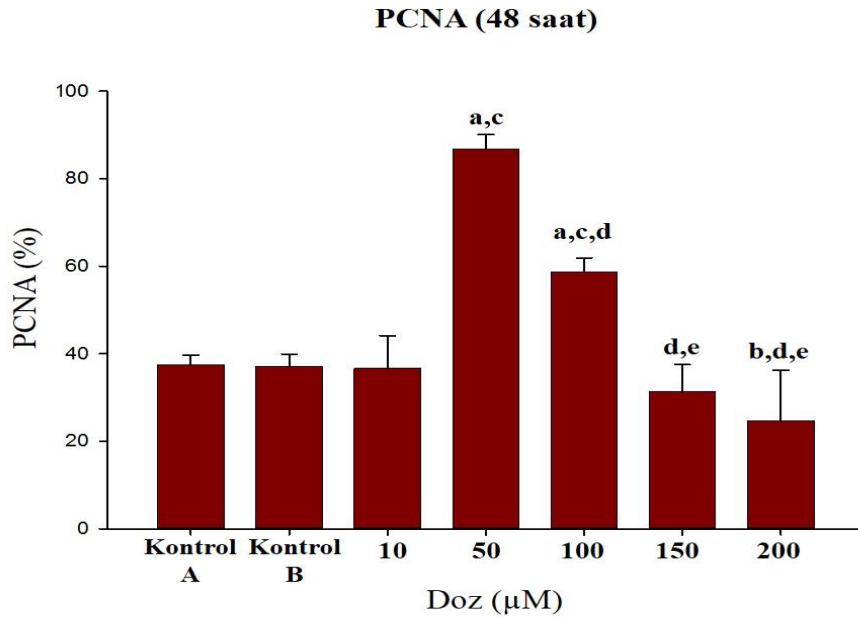
24 ve 48 saatlik farklı doz CAP uygulamalarının hücre proliferasyonu üzerine etkilerine bakıldığında, 48 saatlik uygulamada belirgin şekilde tüm doz gruplarında azalma gözlemlendi. Bu azalma kontrol A, kontrol B, 10 ve 50 µM CAP uygulama gruplarında istatistiksel olarak anlamlı düzeydeyken ($p \leq 0.05$), 100, 150 ve 200 µM CAP uygulama dozlarındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı düzeyde belirlenmedi ($p > 0.05$).

Tablo 10. 24 ve 48 saat CAP uygulaması PCNA pozitif immunreaksiyon (%) değerleri.

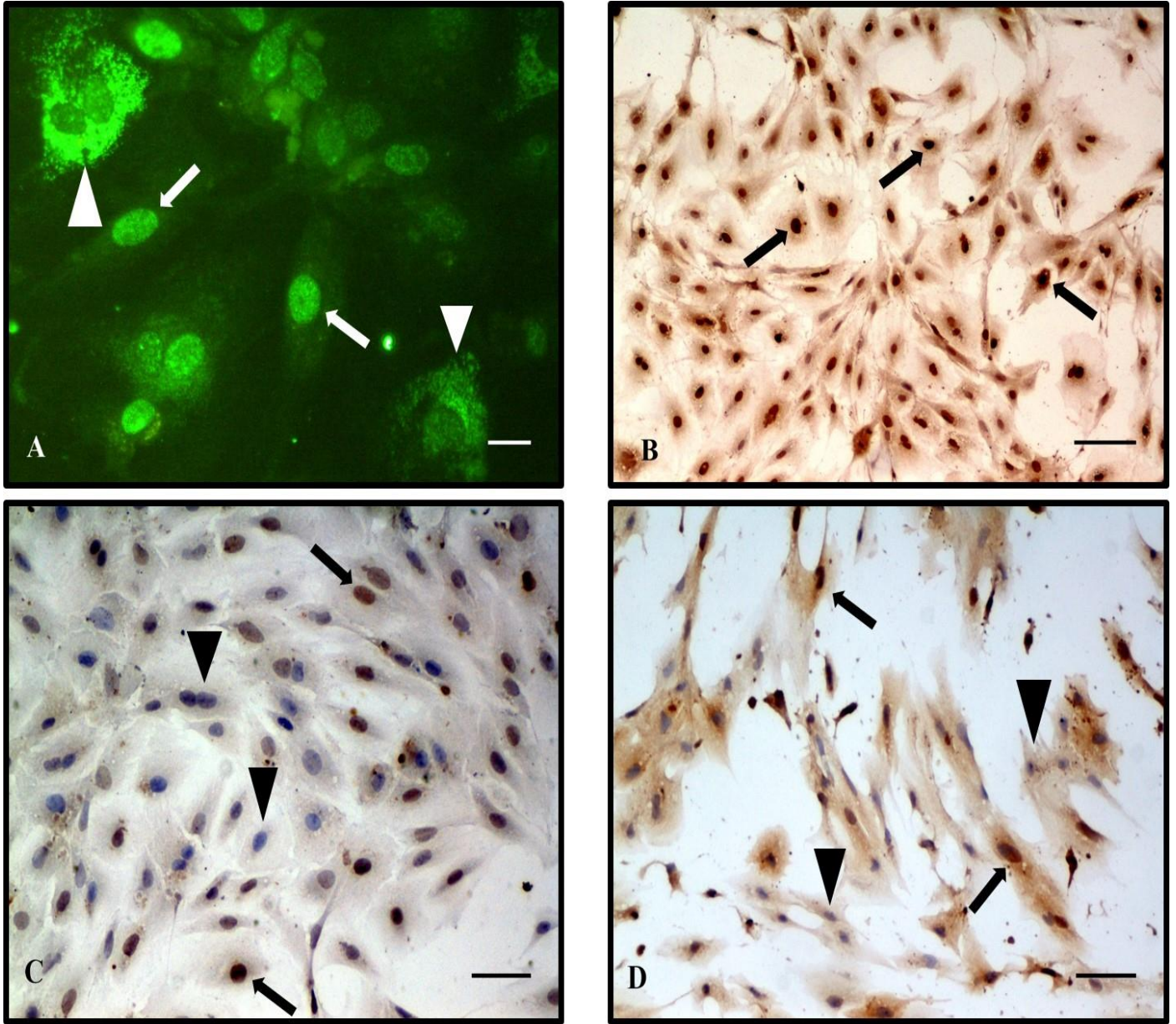
Zaman/ Doz (µM)	Kontrol A $\bar{X} \pm S_x$	Kontrol B $\bar{X} \pm S_x$	10 $\bar{X} \pm S_x$	50 $\bar{X} \pm S_x$	100 $\bar{X} \pm S_x$	150 $\bar{X} \pm S_x$	200 $\bar{X} \pm S_x$
24 saat	70.2±1.32	72.6±0.6	73.7±2.32	90.74±1.76 ^{a,c}	62.78±3.71	26.53±3.31 ^{b,d,e}	19.79±6.38 ^{b,d,e}
48 saat	37.45±2.2	37.09±2.85	36.61±7.53	86.85 ± 3.18 ^{a,c}	58.73±3.18 ^{a,c,d}	31.23±6.31 ^{d,e}	24.6±11.7 ^{b,d,e}



Şekil 21. 24 saat CAP uygulaması, PCNA immunsitokimya sonuçları.
a, b : Doz gruplarının, kontrol gruplarına göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). c, d : Doz gruplarının, 10 µM CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). e : Doz gruplarının, 50 µM CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$).



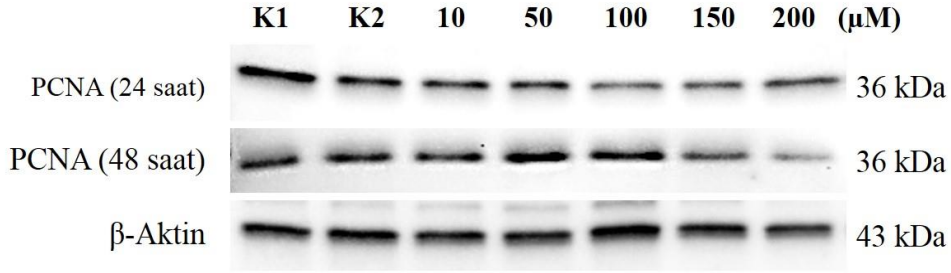
Şekil 22. 48 saat CAP uygulaması, PCNA immunsitokimya sonuçları.
a, b : Doz gruplarının, kontrol gruplarına göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). c : Doz gruplarının, 10 µM CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). d : Doz gruplarının, 50 µM CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). e : Doz gruplarının, 100 µM CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$).



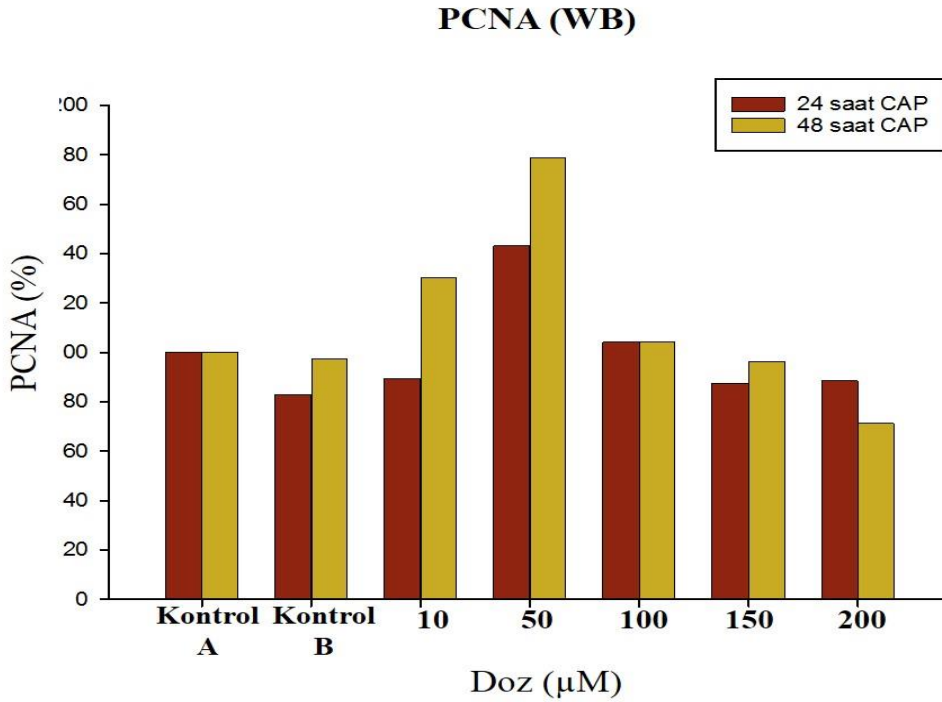
Şekil 23. Primer granuloza hücrelerinde PCNA ifadesi, **A.** Kontrol A grubunda primer granuloza hücrelerinde IF boyama metoduyla hücrelerin nükleus (ok) ve sitoplazmalarında (ok başı) gözlenen PCNA aktivitesi (Bar: 20 μ m), **B.** 24 saat, 50 μ M CAP uygulaması, İSK boyama metodu, PCNA aktivitesi (ok), (Bar: 100 μ m), **C.** 24 saat, 200 μ M CAP uygulaması İSK boyama metodu PCNA aktivitesi (pozitif reaksiyon,ok; negatif reaksiyon, ok başı), (Bar: 50 μ m), **D.** 48 saat, 200 μ M CAP uygulaması İSK boyama metodu PCNA aktivitesi (pozitif reaksiyon,ok; negatif reaksiyon, ok başı), (Bar: 50 μ m).

2.2. PCNA Western Blot Analiz Bulguları

Total protein oranları eşitlenmiş lizatlardan yapılan western blot deneyinde PCNA ile boyanan membranda 36 kDa ağırlığında bantlar gözlemlendi (Şekil 24). Gözlenen bantların densitometrik sonuçları, β -aktinle normalize edildikten sonraki değerler, Şekil 25’de gösterildi.



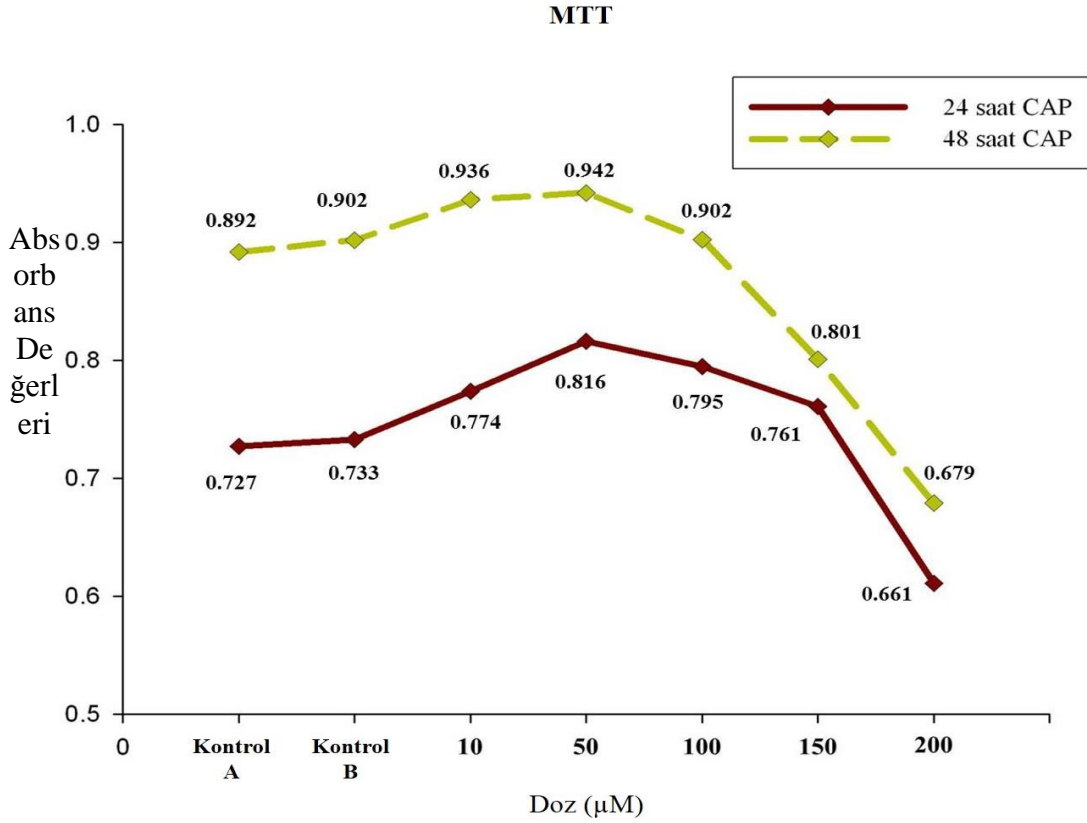
Şekil 24. 24 ve 48 saat CAP doz gruplarında WB metodu PCNA ve β -Aktin bant sonuçları.



Şekil 25. 24 ve 48 saat CAP uygulaması PCNA western blot sonuçları.

2.3. MTT Analiz Bulguları

Hücre proliferasyon bulgularını desteklemek için uygulanan MTT analiz spektrofotometrik sonuçları Şekil 26’da gösterilmiştir.



Şekil 26. 24 ve 48 saat capsaicin uygulaması MTT analiz sonuçları.

3. APOPTOZİS BULGULARI

3.1. Granuloza Hücre Apoptozisi Üzerine Capsaicinin Etkileri

Apoptozis mekanizmasının son basamaklarından biri olan caspase 3’ün yarıklanmasıyla ortaya çıkan ürün aktif caspase 3 ifadesi, apoptozisin meydana geldiği granuloza hücrelerinde immünohistokimyasal ve immünofloresan boyama sonucu çekirdekte gözlemlendi (Şekil 29 A).

Aktif caspase 3 ifadesi gözlenen hücreler, DAB kromojeni ile kahverengi ve Alexa Flour işaretli sekonder antikor ile yeşil renkte boyandı.

24 saatlik CAP uygulamasında elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirmesi sonucunda; kontrol A (10.36 ± 1.71) ve kontrol B (11.42 ± 1.4) grupları arasında aktif-caspase 3 ifadesi bakımından anlamlı farklılık gözlenmezken ($p>0.05$); tüm doz gruplarının kontrol gruplarıyla ve birbirleri arasındaki farklılıkları istatistiksel olarak anlamlı düzeyde belirlendi ($p\leq 0.05$), (Tablo 11), (Şekil 27), (Şekil 29 B, C).

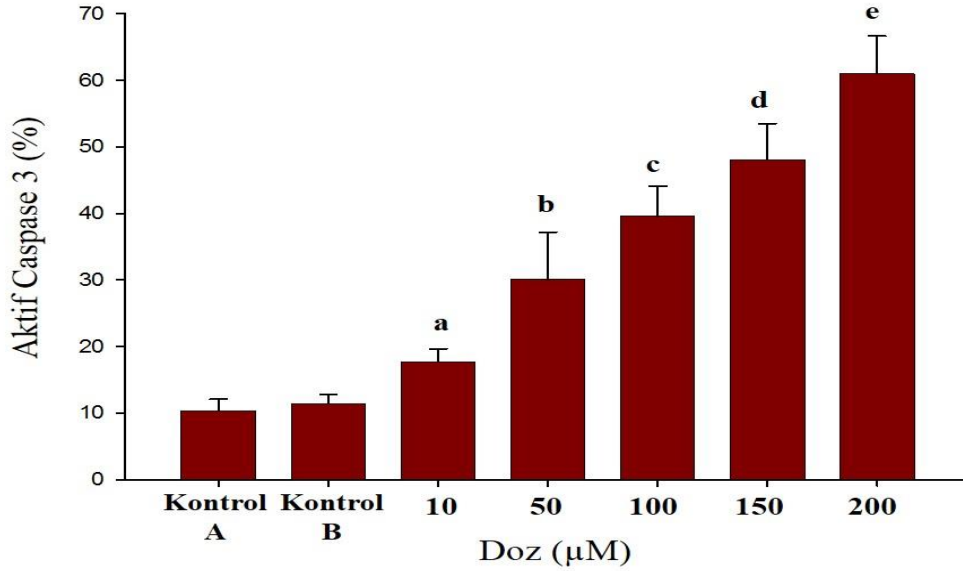
48 saatlik CAP uygulama sonrasında, granuloza hücrelerinde aktif caspase 3 pozitif reaksiyon veren hücrelerin sayısının, 24 saatlik CAP uygulamasına göre daha yüksek olduğu gözlemlendi. Kontrol A (15.68 ± 3.38) ve kontrol B (15.58 ± 3.03) grupları arasında ve kontrol gruplarıyla 10 μM CAP (23.53 ± 7.11), 10 μM ile 50 μM CAP (37.99 ± 10.75) ve 50 μM ile 100 μM CAP (46.37 ± 11.33) doz grupları arasında istatistiksel yönden farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Buna karşın diğer doz gruplarının birbirleriyle arasındaki farklılık anlamlı düzeyde belirlendi ($p\leq 0.05$). Özellikle 150 μM (68.4 ± 5.83) ve 200 μM (86.58 ± 3.49) CAP doz uygulaması sonrasında aktif caspase 3 immunreaksiyonu veren hücrelerin sayısında belirgin bir artış gözlemlendi (Tablo 11), (Şekil 28).

24 ve 48 saatlik uygulamalarının, aktif caspase 3 pozitif immunreaksiyon sonuçları karşılaştırıldığında, kontrol gruplarının, 150 μM CAP ve 200 μM CAP doz gruplarında farklılık olduğu, diğer doz gruplarında ise mikroskobik düzeydeki artışın, istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi.

Tablo 11. 24 ve 48 saat CAP uygulaması aktif caspase 3 pozitif immunreaksiyon (%) değerleri.

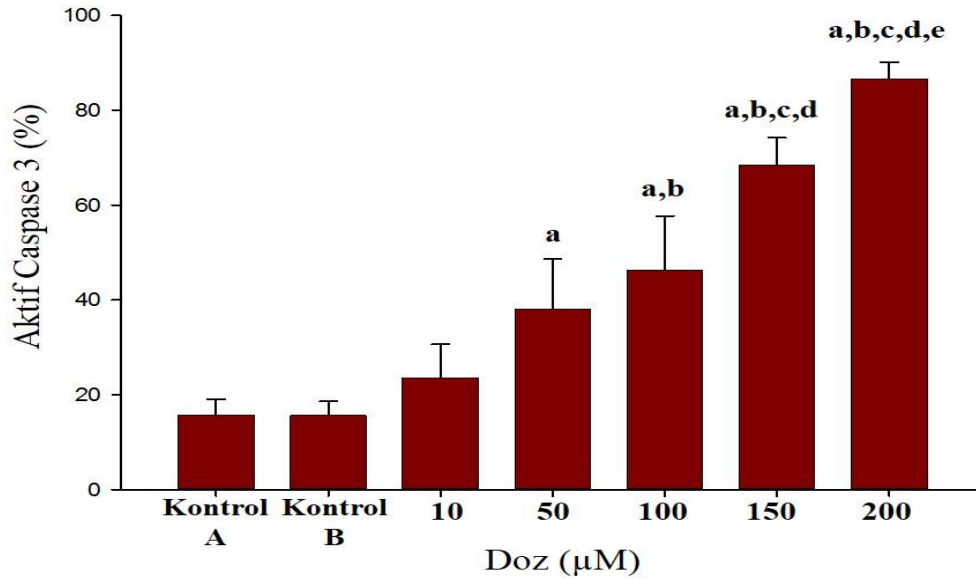
	Kontrol A	Kontrol B	10	50	100	150	200
Doz (μM)/Zaman	$X\pm Sx$	$X\pm Sx$	$X\pm Sx$	$X\pm Sx$	$X\pm Sx$	$X\pm Sx$	$X\pm Sx$
24 saat	10.36 ± 1.71	11.42 ± 1.4	17.71 ± 1.97^a	30.08 ± 7.11^b	46.37 ± 11.33^c	68.4 ± 5.83^d	86.58 ± 3.49^e
48 saat	15.68 ± 3.38	15.58 ± 3.03	23.53 ± 7.11	37.99 ± 10.75^a	$46.37\pm 11.33^{a,b}$	$68.4\pm 5.83^{a,b,c,d}$	$86.58\pm 3.49^{a,b,c,d,e}$

AKTİF CASPASE 3 (24 saat)

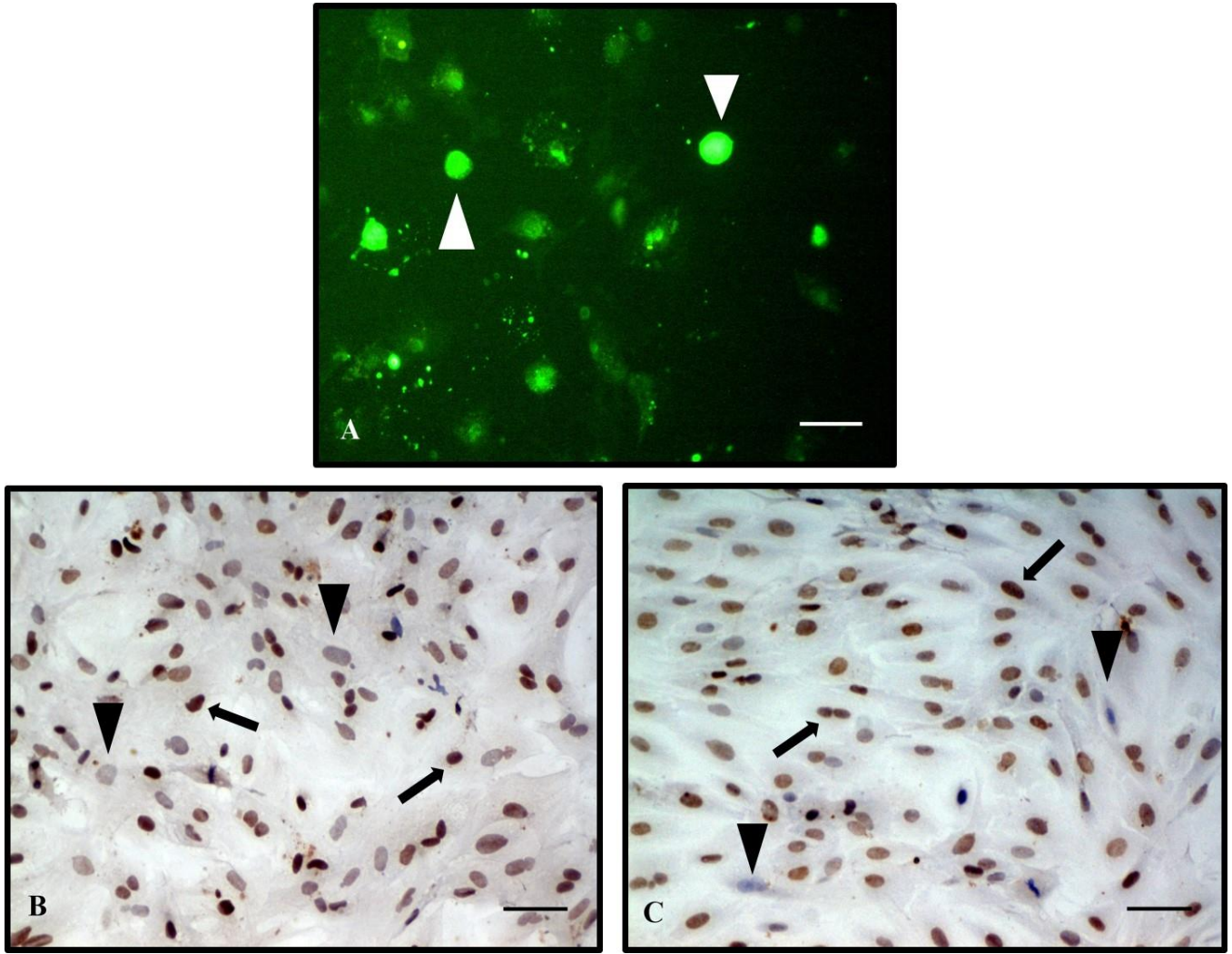


Şekil 27. 24 saat CAP uygulaması, aktif caspase 3 immunsitokimya sonuçları. (a, b, c, d, e, : Tüm doz gruplarının, kontrol gruplarına göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$).)

AKTİF CASPASE 3 (48 saat)



Şekil 28. 48 saat CAP uygulaması, aktif caspase 3 immunsitokimya sonuçları. a : Doz gruplarının, kontrol gruplarına göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). b : Doz gruplarının, 10 µM CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). c : Doz gruplarının, 50 µM CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). d : Doz gruplarının, 100 µM CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). e : Doz gruplarının, 150 µM CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$).



Şekil 29. Primer granuloza hücrelerinde Aktif Caspase3 ifadesi, **A.** Primer granuloza hücrelerinde IF boyama metoduyla hücrelerin nükleuslarında gözlenen Aktif Caspase3 ifadesi (ok başı), (Bar: 50 μ m), **B.** 24 saat, 50 μ M CAP uygulaması, İSK boyama metodu, Aktif Caspase3 ifadesi (pozitif reaksiyon,ok; negatif reaksiyon, ok başı), (Bar: 100 μ m), **C.** 24 saat, 200 μ M CAP uygulaması, İSK boyama metodu, Aktif Caspase3 ifadesi (pozitif reaksiyon,ok; negatif reaksiyon, ok başı), (Bar: 50 μ m),

3.2. Aktif PARP Bulguları

Apoptozis mekanizmasında, son basamakta PARP'ın yarıklanmasıyla çekirdeğe gidip kromatin kondenzasyonuna sebep olan aktif PARP ifadesi, granuloza hücrelerinde çekirdekte saptanmıştır. Aktif PARP ifadesi gözlenen hücreler, DAB kromojeni ile kahverengi ve Alexa Flour işaretli sekonder antikor ile yeşil renkte boyandı.

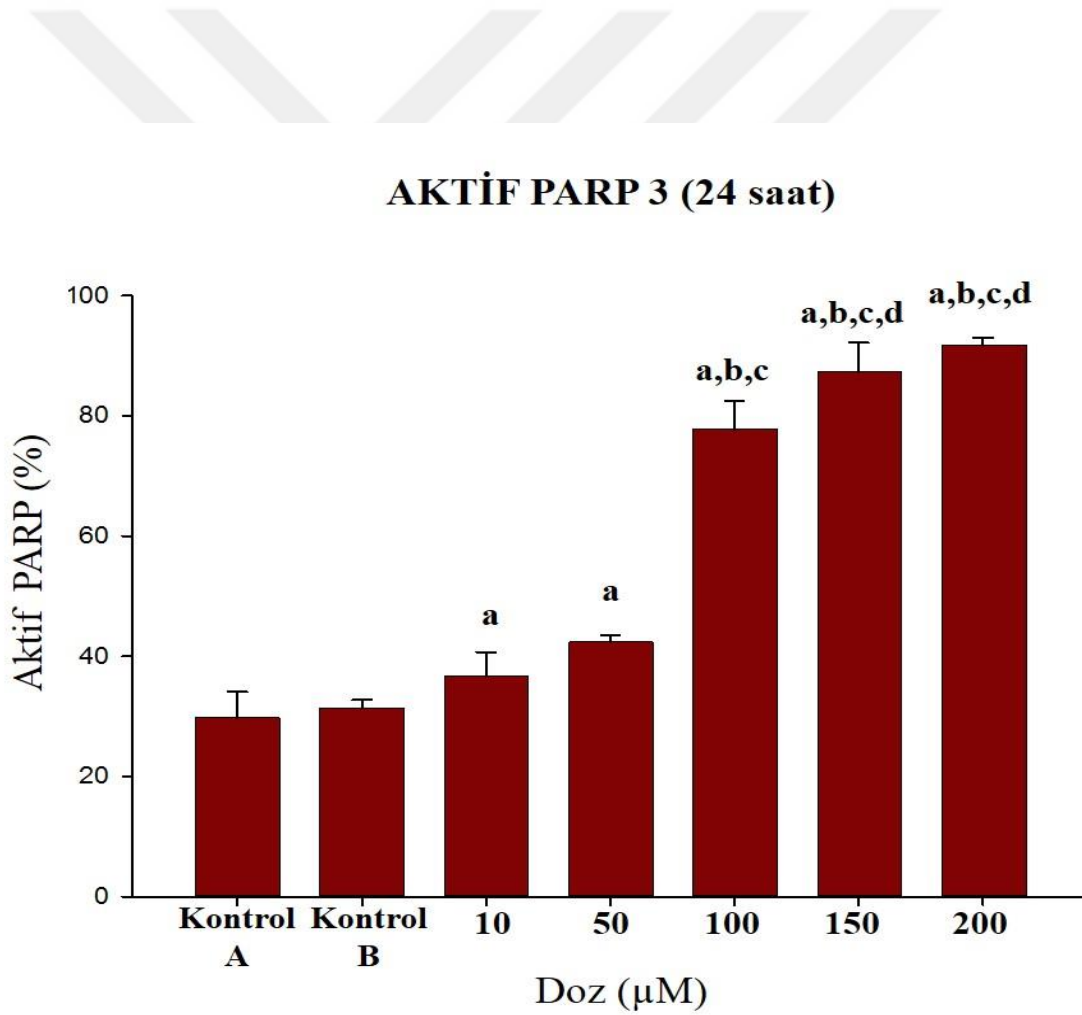
Granuloza hücrelerindeki, aktif PARP pozitif immunreaksiyon veren hücrelerin sayısı aktif caspase 3 pozitif hücrelere göre daha fazla gözlemlendi. 24 saatlik CAP kontrol grupları, 10 μM CAP (36.67 \pm 4.01) ve 50 μM CAP (42.26 \pm 1.28) doz grupları ve yüksek doz 150 μM CAP (87.24 \pm 4.94) ve 200 μM CAP (91.69 \pm 1.23) pozitif immunreaksiyon sonuçlarının yüzde değerleri arasında istatistiksel yönden farklılık gözlenmezken ($p>0.05$); diğer tüm doz grupları arasındaki farklılık istatistiksel düzeyde anlamlıydı ($p\leq 0.05$). Özellikle 100 μM CAP (77.73 \pm 4.74) doz uygulamasında aktif PARP pozitif immunreaksiyon veren hücrelerin sayısının, bir düşük uygulama dozu olan 50 μM CAP doz uygulamasında pozitif reaksiyon veren hücrelere göre 1.8 kat arttığı gözlemlendi (Tablo 12), (Şekil 30), (Şekil 32 A).

48 saatlik uygulama grubunda da benzer şekilde granuloza hücrelerinde, aktif caspase 3'e göre daha fazla aktif PARP immunreaksiyonu gözlemlendi. Kontrol grubu değerleri birbirine yakın ve aralarında istatistiksel yönden anlamlı farklılık gözlenmezken ($p>0.05$); 10 μM CAP (39.46 \pm 1.55), 50 μM CAP (48.35 \pm 1.18) ve 100 μM CAP (81.68 \pm 1.46) doz gruplarında, doza bağlı olarak aktif PARP pozitif immunreaksiyon gösteren hücre sayılarında artış belirlendi ($p\leq 0.05$). Tüm doz grupları arasında ise istatistiksel anlamda farklılık gözlenirken ($p\leq 0.05$), 150 μM CAP (93.17 \pm 1.1) ve 200 μM CAP (94.49 \pm 3.57) doz grupları arasında istatistiksel farklılık belirlenmedi ($p>0.05$) (Tablo 11), (Şekil 31), (Şekil 32 B).

24 ve 48 saatlik farklı doz CAP uygulamalarının aktif PARP immunreaksiyonu üzerine etkilerine bakıldığında kontrol grupları ile 50 μM CAP ve 150 μM CAP doz grupları arasında istatistiksel yönden farklılık gözlemlendiği ($p\leq 0.05$), diğer doz gruplarındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmadığı belirlendi ($p>0.05$).

Tablo 12. 24 ve 48 saat CAP uygulaması aktif PARP pozitif immunreaksiyon (%) değerleri.

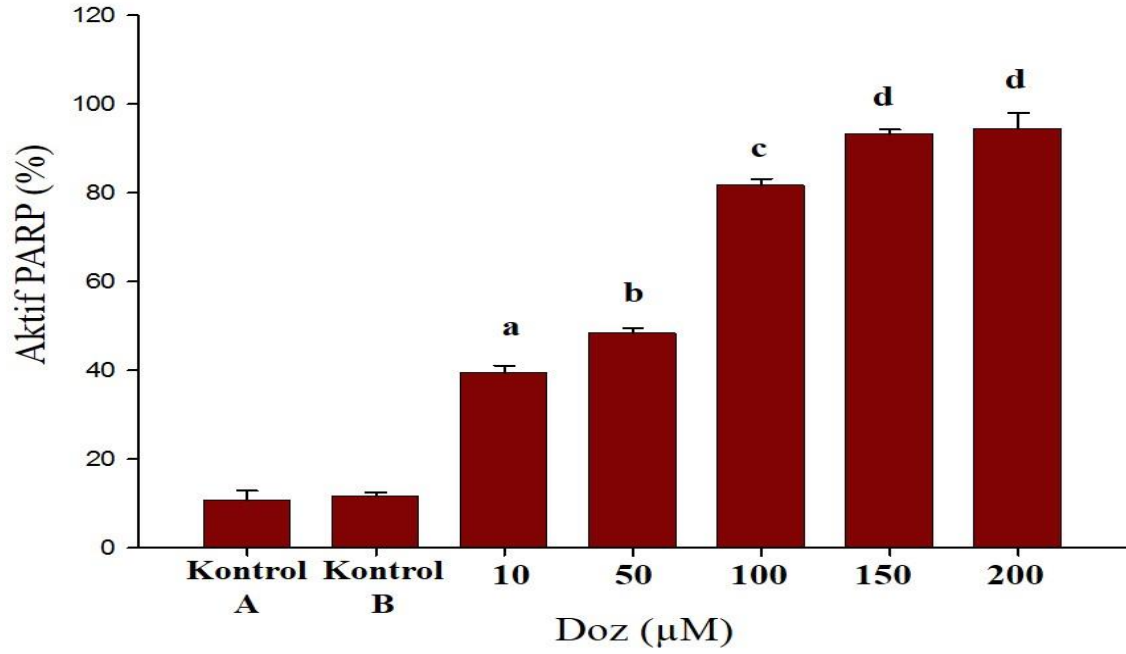
Doz (μ M)/Zaman	Kontrol A	Kontrol B	10	50	100	150	200
24 saat	29.66 \pm 4.39	31.27 \pm 1.42	36.67 \pm 4.01 ^a	42.26 \pm 1.28 ^a	77.73 \pm 4.74 ^{a,b,c}	87.24 \pm 4.94 ^{a,b,c,d}	91.69 \pm 1.23 ^{a,b,c,d}
48 saat	10.68 \pm 2.12	11.59 \pm 0.87	39.46 \pm 1.55 ^a	48.35 \pm 1.18 ^b	81.68 \pm 1.46 ^c	93.17 \pm 1.1 ^d	94.49 \pm 3.57 ^d



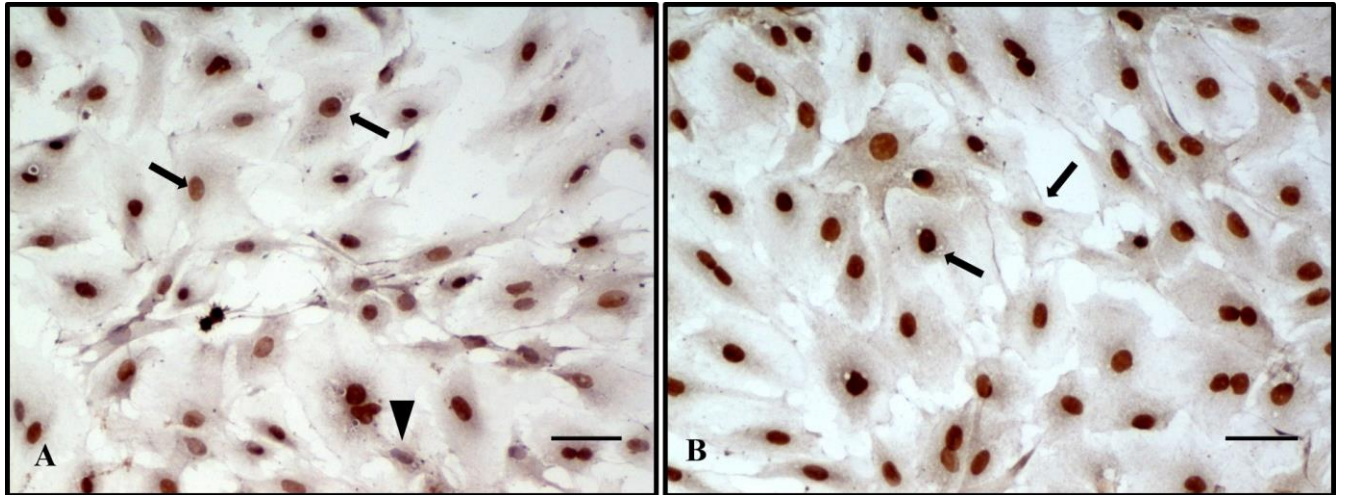
Şekil 30. 24 saat CAP uygulaması, aktif PARP immunsitokimya sonuçları.

a : Doz gruplarının, kontrol gruplarına göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). b : Doz gruplarının, 10 μ M CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). c : Doz gruplarının, 50 μ M CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$). d : Doz gruplarının, 100 μ M CAP grubuna göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$).

AKTİF PARP 3 (48 saat)



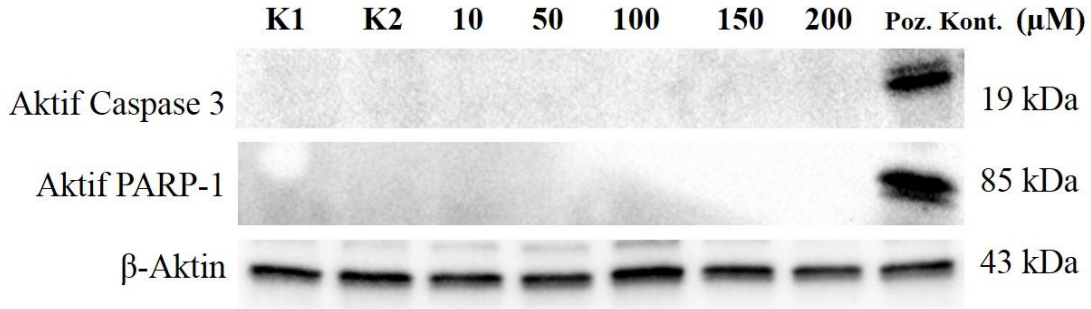
Şekil 31. 48 saat CAP uygulaması, aktif PARP immünohistokimya sonuçları. (a, b, c, d : Tüm doz gruplarının, kontrol gruplarına göre istatistiksel farkını ifade eder ($p \leq 0.05$).)



Şekil 32. Primer granuloza hücrelerinde Aktif PARP ifadesi, **A.** 24 saat, 150 µM CAP uygulaması, İSK boyama metodu, Aktif PARP ifadesi (pozitif reaksiyon,ok; negatif reaksiyon, ok başı), (Bar: 50µm), **B.** 48 saat, 150 µM CAP uygulaması, İSK boyama metodu, Aktif PARP ifadesi (pozitif reaksiyon,ok), (Bar: 100µm),

3.3. Apoptozis Western Blot Sonuçları

Apoptozisi belirlemek için uygulanan aktif-caspase 3 ve aktif-PARP immünohistokimya sonuçlarını desteklemek amacıyla hücre lizatlarına aynı antikorlar ile western blot denemeleri yapıldı. Western blot deneyi sonucunda, sırasıyla 19 ve 85 kDa seviyelerinde görülmesi beklenen Aktif -caspase 3 ve aktif-PARP protein bantları membranlarda gözlenemedi. Antikor ve deneyin kontrolü olarak, daha önce yapılan bir çalışmada kullanılan, apoptozise uğradığı kesin olarak bilinen, PFKFB3 ifadeleri azaltılmış HeLa hücreleri, pozitif kontrol olarak kullanıldı ve yöntemin doğruluğu ispat edildi (Şekil 33), (164).



Şekil 33. 48 saat CAP doz grupları ve pozitif kontrol örneği, WB metodu Aktif Caspase 3, Aktif PARP ve β-Aktin bant sonuçları.

TARTIŞMA ve SONUÇ

Capsaicin, sensorik sinirlerden, nöropeptitlerin salınımını uyararak, birçok hücrenin proliferasyon ve apoptozis mekanizmasını aktive eder. Hücrelerin kaderini belirleyen bu etkisinden dolayı son yıllarda capsaicin ile ilgili yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Sunulan tezde de, acı kırmızı biberin etken maddesi olan capsaicin, doza ve zamana bağlı olarak ovaryumda, folliküllerin ve oositin gelişiminde önemli rol oynayan granuloza hücreleri üzerindeki etkilerini inceledik.

Capsaicinin *in vitro* uygulanması, hem *in vivo* çalışmalara temel oluşturmakta, hem de sistemik etkinin bertaraf edilmesiyle, otokrin ve parakrin etkilerin, lokal olarak değerlendirilmesine imkan sağlamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, daha çok primer hücreler, hücre hatları ve kanser hücre hatları gibi farklı modeller kullanılarak capsaicin, hücreler üzerindeki proliferatif, apoptotik, kanserojenik veya anti-kanserojenik etkileri anlaşılma ve moleküler düzeydeki etkileri belirlenmeye çalışılmıştır.

Capsaicinin, ovaryum ve genital kanal üzerine etkilerini inceleyen önceki çalışmalarda, daha çok puberteye giriş süreci, ovulasyonun başlangıç zamanı ve genital kanal organlarının morfolojik gelişim aşamaları incelenmiştir (13, 15, 17, 35). Bölümümüzde yapılan bir çalışmada (15) tavukların dişi genital sistemi üzerine kırmızı acı biberin etkilerini incelemek amacıyla, rasyona düşük dozda (10 g/kg) kırmızı acı biber ilave edilmiş, tavuklar beş ay süreyle beslenmiştir. Sonuçta, kontrol grubuna göre tavukların ovaryum ağırlıklarında, follikül sayısında ve folliküllerin çapında belirgin artış olduğu, puberteye giriş zamanının kontrol grubuna göre daha erken gerçekleştiği bildirilmiştir. 0 ve 3 günlük yaştaki ratlara, 50mg/kg tez doz CAP'ın derialtı enjekte edildiği başka bir çalışmada, kontrol grubuna göre, ratlarda canlı ağırlık kazancının arttığı fakat ilk vajinal östrus zamanının geciktiği, aynı zamanda CAP uygulanan grupta gebe kalma oranının düşük olduğu, ovaryumda 100 µm'den büyük preantral ve antral folliküllerin sayısında azalma olduğu belirtilmiştir (13).

Alatrise ve arkadaşları (165) Gine domuzlarına, 30 mM dozda subkutan capsaicin uygulamasının, hayvanlarda pubertaya girişte gecikmeye sebep olduğunu ve ovaryumdaki preantral ve antral folliküllerin sayısının azaldığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak, CAP'ın

uygulanan nörotoksik dozunun, hipotalamus-hipofiz-ovaryum yolağındaki duyu sinirlerinde dejenerasyon oluşturarak steroidegenезisi olumsuz etkilediğini belirtmişlerdir.

Sunulan tez çalışmasında, hipotalamo-hipofiz-ovaryum eksenі, genital sistem organlarının birbirleri üzerindeki etkileşimleri ve ovaryumu oluşturan diğer yapıların bertaraf edilmesiyle, ovaryum granuloza hücrelerinin proliferasyon ve/veya apoptozisi üzerine, farklı konsantrasyonlarda, iki farklı zaman diliminde uygulanan CAP'ın etkileri incelenmiştir. Sunulan tezde birçok çalışmada, farklı hücreler üzerine uygulanan CAP denemelerine benzer olarak, 24 saatlik ilk zaman dilimi ayrıca ikinci zaman denemesi olan daha uzun süre, 48 saat seçilmiştir.

Çalışmamızda 24 saatlik CAP uygulamasının, PCNA immunsitokimya sonuçlarına bakıldığında, 50 µM doz uygulamasına kadar, hücre proliferasyonunda artış gözlenirken, Capsaicin dozunun artmasıyla beraber hücre proliferasyonunda azalma gözlenmiştir. Bizim çalışmamıza benzer olarak, Venier ve arkadaşları (166), prostat kanser ve stromal hücre hatlarına 50, 100 ve 200 µM CAP'ın 24 saat uygulanması sonucunda yapılan MTS hücre proliferasyon testinde ve western blot sonuçlarında, her iki hücre grubunda da doza bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalma gözlemişlerdir. Aynı zamanda düşük doz (0.5 mg/kg/gün) capsaicinın ovaryum üzerine *in vivo* etkilerini inceleyen başka bir çalışmada (17), düşük doz capsaicinın, ovaryumda folliküllerin granuloza hücrelerinde proliferasyona sebep olduğu ve atretik follikül sayısının azalttığı belirtilmiştir. Sonuç olarak düşük doz capsaicinın, follikülleri apoptozdan koruduğu ve folliküler gelişimi uyardığı bildirilmiştir.

Sunulan tez çalışmasında, CAP'ın granuloza hücrelerine 48 saatlik uygulamasında, hücre proliferasyonunun doza bağlı olarak 24 saatlik uygulamada gözlendiği gibi 50 µM doza kadar arttığı, CAP konsantrasyonu arttıkça hücre proliferasyonunda azalma meydana geldiği gözlenmiştir. Elde edilen bu bulgular western blot ve MTT canlılık testi ile desteklenmiştir. Çalışmamızda 24 ve 48 saatlik kontrol grupları arasında hücre proliferasyonu bakımından farklılık olduğu belirlenmiştir. Bu farklılığın çalışmamızda primer olarak elde edilen granuloza hücrelerinin mitotik çoğalma hızlarının ilk 24 saatte daha hızlı olduğu, 48 saatlik sürede ise yavaşladığını düşünmekteyiz.

Hücre proliferasyon bulguları değerlendirildiğinde; ovaryumda, hem oositin gelişiminde hem de follikülogenezis sürecinde büyüme faktörlerini sentezleyerek ve östrojen üretimini sağlayarak önemli rol oynayan granuloza hücreleri, düşük doz capsaicine maruz kaldıklarında

mitotik kapasitelerinde artış meydana geldiği görülmüştür. Bu sonuçtan yola çıkarak, düşük doz capsaicin uygulamalarının ovaryum gelişimi ve üreme fizyolojisi üzerinde olumlu rol oynadığını, bu etkinin 24 ve 48 saat uygulamalarında benzer olmasından dolayı, 24 saatlik düşük doz capsaicin uygulamasının, ovaryum follikül gelişiminde yeterli olduğunu düşünmekteyiz.

CAP'ın konsantrasyona bağlı olarak iki yönlü etkisinin olduğu, düşük dozlarının uyarıcı, yüksek dozlarının ise apoptozu indüklediği belirtilmektedir. Bu fonksiyonlarından dolayı CAP'ın profilaktik ve/veya tedavi edici etkilerinden yararlanılmaktadır. Özellikle farklı kanser türlerinde CAP'ın apoptotik etkilerinden yararlanılarak kemoterapötiklerle kombinasyonları kullanılmakta ve alternatif tedavi metodları geliştirilmektedir (9, 10, 144, 146, 152).

Primer pankreas asiner hücrelere 24 saat CAP'ın farklı dozları (0-250 μ M) uygulanmış ve asiner hücrelerde kontrol grubuna göre hücre proliferasyonunda 100 μ M CAP dozuna kadar artış olduğu, artan konsantrasyona bağlı olarak hücre proliferasyonunda azalma meydana geldiği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, primer asiner hücrelerde CAP konsantrasyonuna bağlı olarak kontrol grubuna göre apoptozisin arttığı bildirilmektedir (9). CAP'ın primer hücreler üzerindeki proliferasyona etkisini gösteren bu sonuçlar, bizim çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Çalışmamızda CAP'ın farklı konsantrasyonunun iki zaman uygulamasında granuloza hücreleri üzerine apoptotik etkisini belirlemek için, aktif caspase-3 ve aktif PARP primer antikolar kullanıldı. CAP konsantrasyonu ve zaman uygulaması arttıkça hem aktif caspase-3 hemde aktif PARP immunpozitif reaksiyon gösteren hücre sayısında artış gözlenmiştir. Elde edilen apoptozis verilerinin özellikle 100 μ M CAP uygulama dozundan sonra belirgin olması, hücre proliferasyonu ile ilgili PCNA deney sonuçlarını desteklemektedir. Aktif caspase3 ve aktif PARP immunsitokimya sonuçlarını desteklemek için yapılan western blot deneylerinde, belirtilen antikora ait bant gözlenmemiştir. Metodun doğruluğu HeLa hücre hatlarında apoptozis oluşturularak kontrol edilmiştir (164). CAP uygulanan hücrelerin lizatlarında bu proteinlere ait bantların gözlenmemesi, yarıklanmış protein miktarının total protein miktarı içerisinde az miktarda olduğunu akla getirmektedir. CAP'ın farklı konsantrasyonları çeşitli kanser hücre hatlarında kullanılarak CAP'ın yüksek dozlarının antikanserojenik olduğu ve apoptozisi uyardığı belirtilmektedir (9, 10, 152, 166). Bizim çalışmamızda da CAP'ın 100 μ M doz sonrasında granuloza hücrelerinde apoptozisi indüklediği gözlenmiştir.

Çalışmamızın temel başlangıç noktası olarak, primer ovaryum granuloza hücre kültürü gerçekleştirilmiş ve birçok uygulama alanı bulunan CAP'ın farklı konsantrasyonlarının granuloza hücreleri üzerine etkisi incelenmiştir.

Sonuç olarak;

- ✓ CAP'ın, granuloza hücreleri üzerinde 50 μM doza kadar proliferatif etki gösterdiği,
- ✓ 100 μM ve üzeri CAP uygulamalarında ise, granuloza hücrelerinde apoptozisin meydana geldiği anlaşılmıştır.

Bu çalışmadan yola çıkılarak, CAP'ın 50 μM 'a kadar olan dozlarının, granuloza hücrelerinin hayatta kalmasını sağlaması ve proliferatif etkisinden dolayı, reproduktif düzenin devamlılığında ve ovaryum sağlığının korunmasında kullanılabileceği söylenebilir. Ayrıca, bu çalışma, CAP'ın yüksek dozlarının apoptotik etkisinden faydalanılarak, yüksek mortalite oranına sahip ovaryum kanserleri ve özellikle ovaryum granuloza hücre kanserlerinde CAP'ın koruyucu ve/veya alternatif tedavi amacıyla geliştirilecek deneysel protokoller için temel oluşturmaktadır.

KAYNAKLAR

1. SZOLCSANYI J. Capsaicin and sensory neurones: a historical perspective. Editor: ABDEL-SALAM OME. Capsaicin as a therapeutic molecule, Springer, Sheffield, page 1-39, 2014.
2. ANAND P, BLEY K. Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *British Journal of Anaesthesia*, 107(4): 490-502, 2011.
3. UCHIDA M, YANO S, WATANABE K. The role of capsaicin-sensitive afferent nerves in protective effect of capsaicin against ethanol-induced gastric lesions in rats. *Japanese Journal of Pharmacology*, 55: 279-282, 1991.
4. AGARWAL A, DHIRAAJ S, TANDON M, SINGH PK, SINGH U, PAWAR S. Evaluation of capsaicin ointment at the Korean hand acupressure point K-D2 for prevention of postoperative nausea and vomiting. *Anaesthesia*, 60 (12): 1185-1188, 2005.
5. FRAGASSO G, PALLOSHI A, PIATTI PM, MONTI L, ROSSETTI E, SETOLA E, MONTANO C, BASSANELLI G, CALORI G, MARGONATO A. Nitric-oxide mediated effects of transdermal capsaicin patches on the ischemic threshold in patients with stable coronary disease. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 44(3): 340-347, 2004.
6. ERNST E, BARNES J. Treatments used in complementary medicine. *Side Effects of Drugs Annual*, 21: 489-95, 1998.
7. SURH YJ, LEE SS. Capsaicin in Hot Chili Pepper: Carcinogen, Co-Carcinogen or Anticarcinogen? *Food and Chemical Toxicology*, 34: 313-316, 1996.
8. MORRÉ DJ, CHEU PJ, MORRÉ DM. Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 92: 1831-1835, 1995.
9. ZHANG R, HUMPHREYS I, SAHU RP, SHI Y, SRIVASTAVA SK. *In vitro* and *in vivo* induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis*, 13(12): 1465-1478, 2008.
10. KIM MY, TRUDEL LJ, WOGAN GN. Apoptosis induced by capsaicin and resveratrol in colon carcinoma cells requires nitric oxide production and caspase activation. *Anticancer Research*, 29: 3733-3740, 2009.

11. REILLY CA, TAYLOR JL, LANZA DL, CARR BA, CROUCH DJ, YOST GS. Capsaicinoids cause inflammation and epithelial cell death through activation of vanilloid receptors. *Toxicol Sciences*, 73: 170-81, 2003.
12. RICHEUX F, CASCANTE M, ENNAMANY R, SANCHEZ D, SANNI A, SABOUREAU D, CREPPY EE. Implications of oxidative stress and inflammatory process in the cytotoxicity of capsaicin in human endothelial cells, lack of DNA strand breakage. *Toxicology*, 147: 41-49, 2000.
13. MORÁN C, MORALES L, RAZO RS, APOLONIO J, QUIRÓZ U, CHAVIRA R, DOMÍNGUEZ R. Effects of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy. *Life Sciences*, 73(16): 2113-2125, 2003.
14. NANCE DM, KING TR, NANCE PW. Neuroendocrine and behavioral effects of intrathecal capsaicin in adult female rats. *Brain Research Bulletin*, 18, 109-114, 1987.
15. ÖZER A, ERDOST H, ZIK B. Histological investigations on the effects of feeding a diet containing red hot pepper on the reproductive organs of the chicken. *Phytotherapy Research*, 19, 501-505, 2005.
16. ÖZER A, ZIK B, ERDOST H, ÖZFILİZ N. Histological investigations on the effects of feeding with a diet containing red hot pepper on the reproductive system organs of the cock. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 30: 7-15, 2006.
17. ZIK B, ÖZGÜDEN AKKOÇ CG, TÛTÛNCÛ Ş, TUNCAY I, YILMAZTEPE OA, OZENCI CÇ. Effect of low dose capsaicin (CAP) on ovarian follicle development in prepubertal rat. *Revue De Medecine Veterinaire*, 161: 288-294, 2010.
18. ZIK B, ÖZGÜDEN AKKOÇ CG, TÛTÛNCÛ Ş. Sıçan ovaryumunda düşük doz capsaicinin NF-kB ve XIAP proteininin sentezlenmesi üzerine etkisi. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 57, 223-228, 2010.
19. ZIK B, ALTUNBAS K, TUTUNCU S, OZDEN O, OZGUDEN-AKKOC GC, PEKER S, SEVIMLI A. Effects of capsaicin on nitric oxide synthase isoforms in prepubertal rat ovary. *Biotechnic & Histochemistry*, 87(3): 218-225, 2012.
20. BAHADIR A, YILDIZ H. *Veteriner Anatomi, Hareket Sistemi & İç Organlar*, Ezgi Kitapevi, Bursa, sayfa 284, 2008.
21. JOST A. General outline about reproductive physiology and its developmental background. *Mammalian Reproduction*, 4-32, 1970.
22. OJEDA SR. *Female Reproductive Function*. Editor: JEASRO G, *Textbook of Endocrine Physiology*, Fourt Edition, Oxford University Press, New York, page 215-216, 2000.

23. YOUNG B, HEATH JW. Wheater's Functional Histology. Fourth Edition, Churchill Livingstone, London, page 341-371, 2000.
24. ERDOST H. Diş Genital Sistem. Editör: ÖZER A, Veteriner Özel Histoloji, 2. baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, sayfa 219-233, 2010.
25. JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, KELLEY RO. Basic Histology, Sixth Edition, Appleton & Lange, New Jersey, 439-444, 1989.
26. EDSON MA, NAGARAJA AK, MATZUK MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine Reviews*. 30 (6): 624-712, 2009.
27. DE SOUSA LOPES SM, HAYASHI K, SURANI MA. Proximal visceral endoderm and extraembryonic ectoderm regulate the formation of primordial germ cell precursors. *BMC Developmental Biology*, 7:140, 2007.
28. LAWSON KA, DUNN NR, ROELEN BA, ZEINSTRALM, DAVIS AM, WRIGHT CV, KORVING JP, HOGAN BL. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes & Development*, 13: 424-436, 1999.
29. YING Y, LIU XM, MARBLE A, LAWSON KA, ZHAO GQ. Requirement of BMP8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Molecular Endocrinology*, 14: 1053-1063, 2000.
30. YING Y, ZHAO GQ. Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Developmental Biology*, 232: 484-492, 2001.
31. ÖZFİLİZ N. Üriner Sistem. Editör: ÖZER A, Veteriner Embriyoloji, Dördüncü Baskı, Nobel Yayın Dağıtım, Ankara, sayfa 238, 2010.
32. CHIQUOINE AD. The identification, origin and migration of the primordial germ cells in the mouse embryo. *The Anatomical Record*, 118: 135-146, 1954.
33. MACGREGOR GR, ZAMBROWICZ BP, SORIANO P. Tissue non-specific alkaline phosphatase is expressed in both embryonic and extraembryonic lineages during mouse embryogenesis but is not required for migration of primordial germ cells. *Development*, 121: 1487-1496, 1995.
34. CANNON JD, CHERIAN-SHAW M, LOVEKAMP-SWAN T, CHAFFIN CL. Granulosa cell expression of G1/S phase cyclins and cyclin dependent kinases in PMSG-induced follicle growth. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 264: 6-15, 2007.

35. PEPLING ME, SPRADLING AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles and developmental biology. 234: 339-351, 2001.
36. BRISTOL-GOULD SK, KREEGER PK, SELKIRK CG, KILEN SM, COOK RW, KIPP JL, SHEA LD, MAYO KE, WOODRUFF TK. Postnatal regulation of germ cells by activin: the establishment of the initial follicle pool. *Developmental Biology*, 298(1): 132-48, 2006.
37. PEPLING ME. Follicular assembly: mechanism of action. *Reproduction*, 143(2):139-149, 2012.
38. BAKER TG. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Biological Sciences*, 158: 417-433, 1963.
39. HIRSHFIELD AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124: 43-101, 1991.
40. SOYAL SM, AMLEH A, DEAN J. FIG α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, 127: 4645-4654, 2000.
41. LIANG L, SOYAL SM, DEAN J. FIG α , a germ cell specific transcription factor involved in the coordinate expression of the zona pellucida genes. *Development*, 124: 4939-4947, 1997.
42. RANKIN TL, O'BRIEN M, LEE E, WIGGLESWORTH K, EPPIG J, DEAN J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. *Development*, 128: 1119-1126, 2001.
43. VANORNY DA, PRASASYA RD, CHALPE AJ, KILEN SM, MAYO KE. Notch signalling regulates ovarian follicle formation and coordinates follicular growth. *Molecular Endocrinology*, 28(4): 499-511, 2014.
44. TROMBLY DJ, WOODRUFF TK, MAYO KE. Suppression of Notch signaling in the neonatal mouse ovary decreases primordial follicle formation. *Endocrinology*, 150: 1014-1024, 2009.
45. CHEN Y, JEFFERSON WN, NEWBOLD RR, PADILLA-BANKS E, PEPLING ME. Estradiol, progesterone, and genistein inhibit oocyte nest breakdown and primordial follicle assembly in the neonatal mouse ovary *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology*, 148: 3580-3590, 2007.
46. IGUCHI T, TAKASUGI N, BERN HA, MILLS KT. Frequent occurrence of polyovular follicles in ovaries of mice exposed neonatally to diethylstilbestrol. *Teratology*, 34: 29-35, 1986.

47. MCGEE EA, HSUEH AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*. 21: 200-214, 2000.
48. HORIE K, TAKAKURA K, TAI S, NARIMOTO K, NODA Y, NISHIKAWA S, NAKAYAMA H, FUJITA J, MORI T. The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. *Biology of Reproduction*, 45: 547-552, 1991.
49. YOSHIDA H, TAKAKURA N, KATAOKA H, KUNISADA T, OKAMURA H, NISHIKAWA SI. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology*, 184: 122-137, 1997.
50. CASTRILLON DH, MIAO L, KOLLIPARA R, HORNER JW, DEPINHO RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*, 301: 215-218, 2003.
51. HOSAKA T, BIGGS 3rd WH, TIEU D, BOYER AD, VARKI NM, CAVENEE WK, ARDEN KC. Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101: 2975-2980, 2004.
52. SCHMIDT D, OVITT CE, ANLAG K, FEHSENFELD S, GREDSTED L, TREIER AC, TREIER M. The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development*, 131: 933-942, 2004.
53. UDA M, OTTOLENGHI C, CRISPONI L, GARCIA JE, DEIANA M, KIMBER W, FORABOSCO A, CAO A, SCHLESSINGER D, PILIA G. Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Human Molecular Genetics*, 13: 1171-1181, 2004.
54. VISSER JA, DE JONG FH, LAVEN JS, THEMMEN AP. Anti-Mullerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction*, 131: 1-9, 2006.
55. MISHINA Y, REY R, FINEGOLD MJ, MATZUK MM, JOSSO N, CATE RL, BEHRINGER RR. Genetic analysis of the Mullerian-inhibiting substance signal transduction pathway in mammalian sexual differentiation. *Genes & Development*, 10: 2577-2587, 1996.
56. KEVENAAR ME, MEERASAHIB MF, KRAMER P, VAN DE LANG-BORN BM, DE JONG FH, GROOME NP, THEMMEN AP, VISSER JA. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology*, 147: 3228-3234, 2006.

57. DISSEN GA, HIRSHFIELD AN, MALAMED S, OJEDA SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology*, 136: 4681-4692, 1995.
58. DISSEN GA, GARCIA-RUDAZ C, OJEDA SR. Role of neurotrophic factors in early ovarian development. *Seminars of Reproductive Medicine*, 27: 24-31, 2009.
59. LEE KF, LI E, HUBER LJ, LANDIS SC, SHARPE AH, CHAO MV, JAENISCH R. Targeted mutation of the gene encoding the low affinity NGF receptor p75 leads to deficits in the peripheral sensory nervous system. *Cell*, 69: 737-749, 1992.
60. GERSHON E, PAKS V, DEKEL N. Gap junctions in the ovary: expression, localization and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 282: 18-25, 2008.
61. KIDDER GM, MHAWI AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, 123: 613-620, 2002.
62. JUNEJA SC, BARR KJ, ENDERS GC, KIDDER GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin 43. *Biology of Reproduction*, 60: 1263-1270, 1999.
63. SIMON AM, GOODENOUGH DA, LI E, PAUL DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature*, 385: 525-529, 1997.
64. ELVIN JA, YAN C, WANG P, NISHIMORI K, MATZUK MM. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. *Molecular Endocrinology*, 13: 1018-1034, 1999.
65. EPPIG JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122: 829-838, 2001.
66. HUANG CT, WEITSMAN SR, DYKES BN, MAGOFFIN DA. Stem cell factor and insulin-like growth factor-I stimulate luteinizing hormone-independent differentiation of rat ovarian theca cells. *Biology of Reproduction*, 64: 451-456, 2001.
67. MAGOFFIN DA. Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 37: 1344-1349, 2005.
68. COUSE JF, YATES MM, DEROO BJ, KORACH KS. Estrogen receptor- β is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology*, 146: 3247-3262, 2005.
69. DIAZ FJ, WIGGLESWORTH K, EPPIG JJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *Journal of Cell Science*, 120: 1330-1340, 2007.
70. WILLIAMS CJ, ERICKSON GF. Morphology and physiology of the ovary. Editors: De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, Endotext, South Dartmouth, 2012.

71. CHUN SY, EISENHAEUER KM, MINAMI S, BILLIG H, PERLAS E, HSUEH AJ. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 137: 1447-1456, 1996.
72. RICHARDS JS. Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, 15: 725-751, 1994.
73. GONZALEZ-ROBAYNA IJ, FALENDER AE, OCHSNER S, FIRESTONE GL, RICHARDS JS. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Molecular Endocrinology*, 14: 1283-1300, 2000.
74. BAKER J, HARDY MP, ZHOU J, BONDY C, LUPU F, BELLVÉ AR, EFSTRATIADIS A. Effects of an IGF1 gene null mutation on mouse reproduction. *Molecular Endocrinology*, 10: 903-918, 1996.
75. CANNON JD, CHERIAN-SHAW M, CHAFFIN CL. Proliferation of rat granulosa cells during the periovulatory interval. *Endocrinology*, 146(1): 414-22, 2005.
76. RAO MC, MIDGLEY JR AR, RICHARDS JS. Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. *Cell*, 14: 71-78, 1978.
77. ELMORE S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4): 495-516, 2007.
78. HACKER G. The morphology of apoptosis. *Cell and Tissue Research*, 301: 5-17, 2000.
79. KERR JF. History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181-182: 471-4, 2002.
80. LOCKSLEY RM, KILLEEN N, LENARDO MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, 104: 487-501, 2001.
81. ASHKENAZI A, DIXIT VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*, 281: 1305-8, 1998.
82. SULIMAN A, LAM A, DATTA R, SRIVASTAVA RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. *Oncogene*, 20: 2122-33, 2001.

83. RUBIO-MOSCARDO F, BLES A D, MESTRE C, SIEBERT R, BALASAS T, BENITO A, ROSENWALD A, CLIMENT J, MARTINEZ JI, SCHILHABEL M, KARRAN EL, GESK S, ESTELLER M, DELEEUW R, STAUDT LM, FERNANDEZ-LUNA JL, PINKEL D, DYER MJ, MARTINEZ-CLIMENT JA. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. *Blood*, 106: 3214-22, 2005.
84. BRUNNER T, WASEM C, TORGLER R, CIMA I, JAKOB S, CORAZZA N. Fas (CD95/Apo-1) ligand regulation in T cell homeostasis, cell-mediated cytotoxicity and immune pathology. *Seminars in Immunology*, 15: 167-76, 2003.
85. TRAPANI JA, SMYTH MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature Reviews. Immunology*, 2: 735-47, 2002.
86. SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S. Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature*, 391: 96-99, 1998.
87. BARRY M, BLEACKLEY RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nature Reviews. Immunology*, 2: 401-409, 2002.
88. RUSSELL JH, LEY TJ. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annual Review of Immunology*, 20: 323-370, 2002.
89. LIEBERMAN J, FAN Z. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Current Opinion in Immunology*, 15: 553-559, 2003.
90. SAELENS X, FESTJENS N, VANDE WALLE L, VAN GURP M, VAN LOO G, VANDENABEELE P. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene*, 23: 2861-2874, 2004.
91. DU C, FANG M, LI Y, LI L, WANG X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome *c*-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102: 33-42, 2000.
92. GARRIDO C, GALLUZZI L, BRUNET M, PUIG PE, DIDELOT C, KROEMER G. Mechanisms of cytochrome *c* release from mitochondria. *Cell Death and Differentiation*, 13: 1423-1433, 2006.
93. HILL MM, ADRAIN C, DURIEZ PJ, CREAGH EM, MARTIN SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *The Embo Journal*, 23: 2134-2145, 2004.
94. JOZA N, SUSIN SA, DAUGAS E, STANFORD WL, CHO SK, LI CY, SASAKI T, ELIA AJ, CHENG HY, RAVAGNAN L, FERRI KF, ZAMZAMI N, WAKEHAM A, HAKEM R, YOSHIDA H, KONG YY, MAK TW, ZUNIGA-PFLUCKER JC, KROEMER G, PENNINGER JM. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature*, 410: 549-554, 2001.

95. LILY, LUO X, WANG X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412: 95–99, 2001.
96. ENARI M, SAKAHIRA H, YOKOYAMA H, OKAWA K, IWAMATSU A, NAGATA S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391: 43-50, 1998.
97. CORY S, ADAMS JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nature Reviews. Cancer*, 2: 647-656, 2002.
98. SCHULER M, GREEN DR. Mechanisms of *p53* - dependent apoptosis. *Biochemical Society Transaction*, 29: 684-688, 2001.
99. HUSSEIN MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanism. *Human Reproduction Update*, 11(2):162-77, 2005.
100. CATALDO NA, DUMESIC DA, GOLDSMITH PC, JAFFE RB. Immunolocalization of Fas and Fas ligand in the ovaries of women with polycystic ovary syndrome: relationship to apoptosis. *Human Reproduction*, 15: 1889-1897, 2000
101. PERSANI L, ROSSETTI R, CACCIATORE C. Genes involved in human premature ovarian failure. *Journal of Molecular Endocrinology*, 45: 257-279, 2010.
102. AMSTERDAM A, SASSON R, KEREN-TAL I, AHARONI D, DANTES A, RIMON E, LAND A, COHEN T, DOR Y, HIRSH L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. *Biochemical Pharmacology*, 66(8): 1355-1362, 2003.
103. GOUGEON A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrinology Reviews*, 17: 121-155, 1996
104. HSUEH AJ, BILLIG H, TSAFRIRI A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrinology Reviews*, 15: 707-724, 1994.
105. FRIBERG PA, LARSSON DGJ, RUNG E, BILLIG H. Apoptotic effects of a progesterone receptor antagonist on rat granulosa cells are not mediated via reduced protein isoprenylation. *Molecular Reproduction and Development*, 74: 1317-1326, 2007.
106. AHARONI D, MEIRI I, ATZMON R, VLODAVSKY I, AMSTERDAM A. Differential effect of components of the extracellular matrix on differentiation and apoptosis. *Current Biology*, 7, 43-51, 1997.
107. HOSOKAWA K, AHARONI D, DANTES A, SHAULIAN E, SCHERE-LEVY C, ATZMON R, KOTSUJI F, OREN M, VLODAVSKY I, AMSTERDAM A. Modulation of Mdm2 expression and *p53*-induced apoptosis in immortalized human ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 139, 4688-4700, 1998.

108. MARKSTRÖM E, SVENSSON E, SHAO R, SVANBERG B, BILLIG H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 123: 23-30, 2002.
109. QUIRK SM, COWAN RG, HARMAN RM, HU CL, PORTER DA. Ovarian follicular growth and atresia: Te relationship between cell proliferation and survival. *Journal of Animal Science*, 82: 40-52, 2004.
110. ANTONSSON B, MARTINOUC J. The Bcl-2protein family. *Experimental Cell Research*, 256: 50-57, 2000.
111. NANDEDKAR TD, DHARMA SJ. Expression of Bcl(xs) and c-myc in atretic follicules of mouse ovary. *Reproduction Biomedical Online*, 2: 221-225, 2001.
112. GÜMÜŞ B, KILIÇ S, ZÜLFKAROĞLU E. Role of apoptosis-related factors in follicular atresia. *International Journal of Genetics and Molecular Biology*, 5(5): 54-63, 2013.
113. SUGINO N, SUZUKI T, KASHIDA S, KARUBE A, TAKIGUCHI S, KATO H. Expression of Bcl-2 and Bax in the human corpus luteum during the menstrual cycle and in early pregnancy: regulation by human chorionic gonadotropin. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 85: 4379-4386, 2000.
114. RATTS VS, FLAWS JA, KOLP R, SORENSON CM, TILLY JL. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology*, 136: 3665-3668, 1995.
115. HSU SY, LIN P, HSUEH AJBOD. (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Molecular Endocrinology*. 12: 1432-1440, 1998.
116. PEREZ GI, ROBLES R, KNUDSON CM, FLAWS JA, KORSMEYER SJ, TILLY JL. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by Bax-deficiency. *Nature Genetics*, 21: 200-203, 1999.
117. DRIANCOURT MA, REYNAUD K, CORTVRINDT R, SMITZ J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reviews of Reproduction*. 5: 143-152, 2000.
118. PORTER SB. Current status of clinical trials with anti-TNF. *Chest*. 112: 339S-341S, 1997.
119. BOONE DL, TSANG BK. Caspase-3 in the rat ovary: localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biology of Reproduction*. 58: 1533-1539, 1998.
120. LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH, DESNOYERS S, POIRIER GG, EARNSHAW WC. Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by proteinase with properties like ICE. *Nature*, 371: 346-347, 1994.

121. CHUN SY, EISENHAUER KM, MINAMI S, BILLIG H, PERLAS E, HSUEH AJ. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*, 137: 1447-1456, 1996.
122. FUJINAGA H, YAMOTO M, SHIKONE T, NAKANO R. FSH and LH upregulate epidermal growth factor receptors in rat granulosa cells. *Journal of Endocrinology*, 140: 171-177, 1994.
123. MCGEE EA, SMITH R, SPEARS N, NACHTIGAL MW, INGRAHAM H, HSUEH AJ. Mullerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 64: 293-298, 2001.
124. SHEN M, LIU Z, LI B, ZHANG J, TANG Y, SUN SC, LIU H. Involvement of FoxO1 in the effects of follicle-stimulating hormone on inhibition of apoptosis in mouse granulosa cells. *Cell Death and Disease*, 5: e1475, 2014.
125. GUAN S, GUA L, ZHANG T, ZHU B, WANG X, ZHANG C. Effects of gonadotropin on Fas and/or FasL expression and proliferation in rat ovary. *Theriogenology*, 83(1) : 21-29, 2015.
126. ROBKER RL, RICHARDS JS. Hormonal control of the cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biology of Reproduction*, 59(3): 476-482, 1998.
127. SVENSSON EC, MARKSTROM E, ANDERSSON M, BILLIG H. Progesterone receptor-mediated inhibition of apoptosis in granulosa cells isolated from rats treated with human chorionic gonadotropin. *Biology of Reproduction*, 63: 1457-1464, 2000.
128. PELUSO JJ. Progesterone as a regulator of granulosa cell viability. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 85(2-5): 167-173, 2003.
129. DATTA SR, BRUNET A, GREENBERG ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes & Development*, 13(22): 2905-2927, 1999.
130. ÇOĞULU Ö, ALPMAN A, DURMAZ B, ÖZKINAY F. Mitoz ve mayozun moleküler temelleri. *Türkiye Klinikleri*, 27: 725-737, 2007.
131. HIRSHFIELD AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124: 43-101, 1991.
132. RICHARDS JS. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews*, 60: 51-89, 1980.
133. RICHARDS JS. Estradiol receptor content in rat granulosa cells during follicular development. *Endocrinology*, 97: 1174-1184, 1975.

134. RICHARDS JS, KIRCHICK HJ. Changes in the content and phosphorylation of cytosol proteins in luteinizing ovarian follicles and corpora lutea. *Biology of Reproduction*, 30: 737-751, 1984.
135. POLYAK K, LEE M, ERDJUMENT-BROMAGE H, KOFF A, ROBERTS JM, TEMPST P, MASSAGUE J. Cloning of p27^{Kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitotic signals. *Cell*, 78: 59-66, 1994.
136. KELMAN Z. PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene*, 14: 629-640, 1997.
137. BRAVO R, MACDONALD-BRAVO H. Changes in the nuclear distribution of cyclin (PCNA) but not its synthesis depend on DNA replication. *The Embo Journal*, 4(3): 655-661, 1985.
138. KOUNDRIOUKOFF S, JONSSON ZO, HASAN S, DE JONG RN, VAN DER VLIET PC, HOTTIGER MO, HUBSCHER U. A direct interaction between proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Cdk2 targets PCNA-interacting proteins for phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 275: 22882-22887, 2000.
139. WAGA S, HANNON GJ, BEACH D, STILLMAN B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. *Nature*, 369: 574-578, 1994.
140. CHEN IT, AKAMATSU M, SMITH ML, LUNG FD, DUBA D, ROLLER PP, FORNACE AJ, JR O'CONNOR PM. Characterization of p21Cip1/Waf1 peptide domains required for cyclin E/Cdk2 and PCNA interaction. *Oncogene*, 12: 595-607, 1996.
141. LAU PJ, KOLODNER RD. Transfer of the MSH2.MSH6 complex from proliferating cell nuclear antigen to mispaired bases in DNA. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 14-17, 2003.
142. MOSKOWITZ NK, BORAO FJ, DARDASHTI O, COHEN HD, GERMINO FJ. The amino terminus of Cdk2 binds p21. *Oncology Research*, 8: 343-352, 1996.
143. MAGA G, HÜBSCHER U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science*, 116: 3051-3060, 2003.
144. YANG W, GONG X, ZHAO X, AN W, WANG X, WANG M. Capsaicin induces apoptosis in HeLa cells via Bax/Bcl-2 and Caspase-3 Pathways. *Asian Journal of Traditional Medicines*, 1 (3-4), 2006.
145. HOLZER P. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews*, 43(2): 143-201, 1991.
146. NELSON EK, DAWSON LE. The constitution of capsaicin, the pungent principle of capsicum. *Journal of the American Chemical Society*, 45 (9): 2179-2181, 1923.

147. SZALLASI A, BLUMBERG PM. Vaininoid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews*, 51(2): 159-212, 1999.
148. O'NEILL TP. Mechanism of capsaicin action: recent learnings. *Respiratory Medicine*, 85: 35-41, 1991.
149. NOLANO M, SIMONE DA, WENDELSCHAFFER-CRABB G, JOHNSON T, HAZEN E, KENNEDY WR. Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation. *Pain*, 81: 135-145, 1999.
150. AKABORI H, YAMAMOTO H, TSUCHIHASHI H, MORI T, FUJINO K, SHIMIZU T, ENDO Y, TANI T. Transient receptor potential vaininoid 1 antagonist, capsazepine, improves survival in a rat hemorrhagic shock model. *Annals of Surgery*, 245: 964-970, 2007.
151. JOSSE AR, SHEERFFS SS, HOLWERDA AM, ANDREWS R, STAPLES AW, PHILIPS SM. Effects of capsinoid digestion on energy expenditure and lipid oxidation at rest and during exercise. *Nutrition & Metabolism*, 7: 65, 2010.
152. SHARMA SK, VIJ AS, SHARMA M. Mechanisms and clinical uses of capsaicin. *European Journal of Pharmacology*, 720(1-3): 55-62, 2013.
153. ZHANG JH, LAI FJ, CHEN H, LUO J, ZHANG RY, BU HQ, WANG ZH, LIN HH, LIN SZ. Involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in apoptosis induced by capsaicin in the human pancreatic cancer cell line PANC-1. *Oncology Letters*, 5: 43-48, 2013.
154. MORI A, LEHMANN S, O'KELLY J, KUMAGAI T, DESMOND JC, PERVAN M, MCBRIDE WH, KIZAKI M, KOEFFLER HP. Capsaicin, a component of red peppers, inhibits the growth of androgen-independent, p53 mutant prostate cancer cells. *Cancer Research*, 66(6): 3222-3229, 2006.
155. DEES WL, AHMED CE, OJEDA SR. Substance P and vasoactive intestinal peptide containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology*, 119: 638-641, 1986.
156. KLEIN CM, BURDEN HW. Substance P and vasoactive intestinal polypeptide (vip) immunoreactive nerve fibers in relation to ovarian postganglionic perikarya in para and prevertebral ganglia: evidence from combined retrograde tracing and immunocytochemistry. *Cell Tissue Research*, 252: 403-410, 1988.
157. TRAUIG H, SARIA A, LEMBECK F. The effects of neonatal capsaicin treatment on growth and subsequent reproductive function in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 327(3): 254-259, 1984.

158. TRUJILLO A, MORALES L, DOMÍNGUEZ R. The effects of sensorial denervation on the ovarian function, by the local administration of capsaicin, depend on the day of the oestrous cycle when the treatment was performed. *Endocrine*, 48(1): 321-328, 2015.
159. NANCE DM, KING TR, NANCE PW. Neuroendocrine and behavioral effects of intrathecal capsaicin in adult female rats. *Brain Research Bulletin*, 18, 109-114, 1987.
160. OKTAY E, OLGUN H, Kırmızı biberin New Hampshire tavuklarında yumurta verimi, yumurta kalitesi ve kuluçka verimine etkisi, IV. Bilim Kongresi. Ankara, sayfa 1-6, 1973.
161. FURUSE M, NAKAJIMA SI, MIYAGAWA S, NAKAGAWA J, OKUMURA JI. Feeding behavior, abdominal fat and laying performance in laying hens given diets containing red pepper. *Japanese Poultry Science*, 31:45-52, 1994.
162. ERDOST H, ÇAVUŞOĞLU I, YAKIŞIK M, ÖZFİLİZ N, ZİK B. Gonadotrophs in the chicken, fed with a diet containing red hot pepper. *Indian Veterinary Journal*, 83: 419-423, 2006.
163. YABA A, BIANCHI V, BORINI A, JONSON J. A putative mitotic checkpoint dependent on mTOR function controls cell proliferation and survival in ovarian granulosa cells. *Reproductive Sciences*, 15: 128-138, 2008.
164. YALCIN A, CLEM BF, IMBERT-FERNANDEZ Y, OZCAN SC, PEKER S, O'NEAL J, KLARER AC, CLEM AL, TELANG S, CHESNEY J. 6-Phosphofructo-2-kinase (PFKFB3) promotes cell cycle progression and suppresses apoptosis via Cdk1-mediated phosphorylation of p27. *Cell Death and Disease*, 5: e1337, 2014.
165. ALATRISTE V, HERRERA-CAMACHO I, MARTINEZ MI, LIMON ID, GONZALEZ-FLORES O, LUNA F. Sensory denervation with capsaicin reduces ovarian follicular development and delays the onset of puberty in guinea pigs. *Advances in Reproductive Sciences*, 1(3): 29-37, 2013.
166. VENIER NA, COLQUHOUN AJ, FLESHNER NE, KLOTZ LH, VENKATESWARAN. Lycopene enhances the anti-proliferative and pro-apoptotic effects of capsaicin in prostate cancer in vitro. *Cancer Therapeutics & Research*, 1:1-30, 2012.

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamı, hayatımdaki en önemli iki kadına ithaf ediyorum.

Birincisi, doktora başladığım ilk günden beri yanımda olan, bildiği her şeyi paylaşan, tanıdığı herkesle tanıştıran, gittiği her yere götüren; sadece doktora tezimin tamamlanması sürecinde değil, bilimsel ve akademik kimliğimin oluşmasında çok büyük emeği olan, danışman hocam Prof. Dr. Berrin ZİK'a; ikincisi ise, var oluşumun sebebi olan, hayatım boyunca sevgisini, desteğini hiç esirgemeyen; bulunduğum noktanın en önemli mimarı, anneciğim, Güler KANTAR'a teşekkürlerimi ve minnetlerimi bir borç bilirim.

Çalışmaya destek veren Bilimsel Araştırma ve Proje Birime'ne teşekkür ederim. Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora başlama sebebim olan, hocam Prof. Dr. Nesrin ÖZFİLİZ'e, doktora sürecimde desteğini esirgemeyen hocam Prof. Dr. Hatice ERDOST'a, anabilim dalındaki tüm diğer hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Tezimde, fikirleri ve emeğiyle her zaman yanımda olan hocam Doç. Dr. Korhan ALTUNBAŞ'a ve bilimsel gelişimimde çok büyük emeği olan hocam Doç. Dr. Abdullah YALÇIN'a çok teşekkür ederim. Ayrıca, her an yanımda olan, bıkmadan usanmadan dertlerimi dinleyen, sevinçlerimi paylaşan, birlikte üzüldüğümüz, hep birlikte çok büyük kahkahalar attığımız, doktora sürecimin bu kadar keyifli geçmesinin sebepleri, isimleri sıralasam sayfalar yetmez, veteriner fakültesi ve tıp fakültesindeki çok değerli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Son olarak, hayatımdaki en değerli üç insan, her zaman manevi destekleriyle yanımda olan, sahip oldukları her şeyi hiç düşünmeden paylaşan, varlıklarına şükür ettiğim kardeşlerim, canlarım, Zeynep PEKER'e, Hilal PEKER'e ve Hüseyin Ali PEKER'e çok teşekkür ederim.

ÖZGEÇMİŞ

08 Nisan 1985 yılında, Bursa'da doğdum. İlkokulu, Orhangazi Ali Tekin İlköğretim Okulunda, 1996 yılında tamamladım. Ortaokulu, 2000 yılında, Zekai Gümüşdiş İlköğretim Okulunda tamamladım. Lise öğrenimimi ise 2003 yılında, Bursa Anadolu Lisesinde tamamladım. 2004 yılında başladığım Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesindeki eğitimimi 2010 yılında, Çiftlik Hayvanları Yetiştiriciliği intörn grubunda, yüksek lisans derecesiyle tamamladım. Lisans eğitimi sırasında stajımı, DAAD bursuyla, Justus-Liebig Üniversitesi, Doğum Jinekoloji Androloji ve Ambulans Kliniği'nde yaptım. 2010 yılında Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veteriner Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalında doktora eğitimine başladım. Bu sürede YÖK bursuyla, 2013 yılında, 3 ay boyunca Amerika Birleşik Devletleri, Kentucky, Louisville Üniversitesi Onkoloji-Hematoloji Bölümü'nde bilimsel çalışmalara katıldım. Şubat 2013'de Araştırma Görevlisi olarak atandığım, Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalında görevime halen devam etmekteyim.