



**Farede Prematüre Over Yetmezliğinde mTERT Telomeraz
Katalitik Alt Ünitesinin Rolünün Belirlenmesi**

Program Kodu: 1001

Proje No: 215S867

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. Aylin YABA UÇAR

Danışman:

Prof. Dr. Türkan Yiğitbaşı

Araştırmacı:

Prof. Dr. Necdet Demir

Bursiyer:

Ecem YILDIRIM

Tuğçe ÖNEL

Mayıs 2019

İSTANBUL



ÖNSÖZ

DMBA (7,12-Dimethylbenz[a]anthracene), polisiklik aromatik hidrokarbon olarak ovaryum da dahil olmak üzere pekçok tümörü tetikleyen ve kemirgenlerde kanser modeli olarak kullanılan bir çevresel karsinojendir ve günlük hayatta sigara içilmesi, pişerken aktif karbona maruz kalmış yiyeceklerin tüketilmesi (mangalda pişirilen besinler gibi) ve otomobillerden çıkan egzoz dumanının solunması ile DMBA'ya maruz kalınmaktadır. Karsinojenik etkisine ek olarak DMBA'nın folikülogenezin normal sürecini bozarak folikül popülasyonunun azalmasına neden olduğu ve Prematüre Over Yetmezliğine (POY) yol açtığı da belirtilmektedir.

Ovaryumdaki rezervin hızlı bir şekilde tükenerek kadınların üreme hayatlarının kısılmasına neden olan DMBA'nın bu sonuçlara hangi yolları kullanılarak ulaştığına ilişkin henüz net bir çalışma yoktur. Biz projemizde foliküler gelişimde önemli bir role sahip olan c-Abl ve mTERT'in DMBA indüklü ovotoksitenin mekanizmasının ortaya koyulmasında önemli olabileceğini düşündük. Buradan yola çıkarak bir hafta boyunca DMBA uygulaması yaptığımız farelerin ovaryum dokularında c-Abl ve mTERT ekspresyonlarını göstermeyi amaçladık. Buna ek olarak yapılan çalışmalarda, DMBA'nın folikül içerisinde nasıl bir etki göstererek oosit ve granuloza hücreleri arasındaki ilişkiyi bozduğuna dair de bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle transmisyon elektron mikroskobu ile ultrastrüktürel düzeyde oosit ile granuloza hücreleri arasındaki ilişkiyi de göstermeyi hedefledik.

Projemiz sonucunda elde edilen bulgular DMBA'nın ovotoksiteye ve POY'ne neden olarak prematüre folikül aktivasyonu sonucu primordiyal folikül rezervinin erken tükenişine yol açtığını göstermektedir. Ayrıca, DMBA'nın oosit ile granuloza hücreleri arasındaki iletişimin bozulmasına neden olarak foliküler gelişimde ve oosit maturasyonunda bozulmalara neden olduğu belirlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak DMBA uygulanan ovaryumlarda, prematüre folikül aktivasyonu ile mTERT ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. İlk defa projemiz sonucu elde edilen bulgular ile DMBA'nın c-Abl üzerinde inhibe edici bir görevinin olduğu belirlenmiştir. Projemiz sonunda elde edilen veriler ışığında mTERT ve c-Abl tirozin kinazın DMBA'nın ovotoksik etkisinin ortaya çıkmasında önemli role sahip olabileceğini düşünmekteyiz.

İÇİNDEKİLER

Önsöz	i
İçindekiler	ii
Şekil listesi	iii
Tablo listesi	v
Özet	vi
Abstract	vii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	2
3. GEREÇ VE YÖNTEM	6
3.1 Deney Gruplarının Oluşturulması ve Değerlendirilmesi	6
3.2 Doku takibi ve Hematoksilen-Eozin boyaması	7
3.3 Kanda AMH Konsantrasyonlarının ELISA ile Belirlenmesi	7
3.4 Folikül sayımı	8
3.5 TUNEL Yöntemi	9
3.6 İmmunofloresan Yöntemi	9
3.7 Western blot Yöntemi	10
3.8 Transmisyon Elektron Mikroskobu Yöntemi	11
3.9 qReal Time-PCR Yöntemi	12
4. BULGULAR	14
4.1 Deney Gruplarının Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi	14
4.2 Elisa Yöntemi Bulguları	20
4.3 Folikül sayımı Bulguları	21
4.4 TUNEL Yöntemi Bulguları	22
4.5 İmmunofloresan Yöntemi Bulguları	25
4.6 Western blot Yöntemi Sonuçları	31
4.7 Transmisyon Elektron Mikroskobu Yöntemi Bulguları	35
4.8 qRT-PCR Yöntemi Sonuçları	38
5. TARTIŞMA/SONUÇ	39
6. KAYNAKLAR	42

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. In vivo kontrol grubu ovaryum.....	14
Şekil 2. In vivo çözgen grubu ovaryum.	15
Şekil 3. In vivo DMBA grubu ovaryum.	16
Şekil 4. In vitro kontrol grubu ovaryum.....	17
Şekil 5. In vitro çözgen grubu ovaryum.	18
Şekil 6. In vitro DMBA grubu ovaryum.	19
Şekil 7. AMH için standart değerlerin eğrisi.	20
Şekil 8. Deney gruplarında AMH seviyesinin gösterilmesi.	20
Şekil 9. Deney gruplarında primordiyal, primer, sekonder-preantral, antral, graaf ve atretik foliküllerin sayılarının karşılaştırılması.	21
Şekil 10. Kontrol grubu ovaryumda TUNEL boyanması.....	22
Şekil 11. Çözgen grubu ovaryumda TUNEL boyanması.....	23
Şekil 12. DMBA grubu ovaryumda TUNEL boyanması.	24
Şekil 13. Kontrol grubu ovaryumda genel olarak c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması.....	25
Şekil 14. Kontrol grubu ovaryumda erken antral aşamadaki folikülde c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması.....	26
Şekil 15. Kontrol grubu ovaryumda antral aşamadaki folikülde c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması.....	27
Şekil 16. DMBA grubu ovaryumda genel olarak c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması.	28
Şekil 17. DMBA grubu ovaryumda sekonder aşamadaki folikülde c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması.	29
Şekil 18. DMBA grubu ovaryumda sekonder aşamadaki folikülde c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması.	30
Şekil 19. Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularında c-Abl protein ekspresyonu (A) ve analizi (B).....	31
Şekil 20. Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularında mTERT protein ekspresyonu (A) ve analizi (B).	32
Şekil 21. Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularında Caspase3 protein ekspresyonu (A) ve analizi (B).	33
Şekil 22. Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularında PCNA protein ekspresyonu (A) ve analizi (B).	34
Şekil 23. Transzonal uzantıların değerlendirilmesi.	35
Şekil 24. Mitokondri yapısının değerlendirilmesi.	36



Şekil 25. Oosit yapısının değerlendirilmesi.	37
Şekil 26. DMBA uygulamasının <i>c-Abl</i> ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	38
Şekil 27. DMBA uygulamasının <i>mTERT</i> için ekspresyonu üzerindeki etkisi.....	38



TABLO LİSTESİ

Tablo 1. In vivo deney grupları.	6
Tablo 2. In vitro deney grupları.....	7
Tablo 3. Kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları.....	11



ÖZET

Memelilerde prenatal hayatta oluşan oosit rezervi, postnatal hayatta azalarak tükenmektedir. Foliküler atrezi olarak adlandırılan bu mekanizma ile ovariyal yaşlanma meydana gelmektedir. Primordiyal folikül havuzu tekrardan yenilenemediği için bu tükeniş sonucunda infertilite ya da Prematüre Over Yetmezliği (POY) ile karşı karşıya kalınmaktadır.

Polisiklik aromatik hidrokarbon 7, 12-dimetilbenz (7,12-dimethylbenz-[a]anthracene (DMBA)), ovaryum da dahil olmak üzere pekçok tümörü tetikleyen ve günlük hayatta da sıklıkla maazur kaldığımız bir çevresel karsinojendir.

Telomeraz, hücrenin bölünmesi esnasında kromozomların kararlı yapılarının korunmasını sağlar ve fare telomeraz ters transkriptaz (mTERT), telomeraz kompleksinin gerekli bir bileşenidir. c-Abl protein tirozin kinaz, DNA çift sarmalında kırıkların oluşması ile aktive olan ve telomer kontrolü esnasında bu kırıkların tamir edilmesine katılan bir proteindir. Telomer kısalması, hücre bölünmesini zamanla durduran bir işlemdir. Bu nedenle çalışmamızda DMBA indüklü ovotoksisite sonucu oluşan POY'de c-Abl ve mTERT'in önemli bir role sahip olabileceğini düşünmekteyiz. Buradan yola çıkarak günlük yaşamda sürekli olarak maazur kalınan DMBA'nın ovaryumdaki oosit rezervi, oosit kalitesi ve granuloza hücreleri üzerindeki etkisini c-Abl (Abelson Tirozin Kinaz) ve mTERT (telomeraz katalitik altünitesi) belirteçleri ile açıklamayı hedefledik.

Çalışmamızda postnatal (PND) 28 günlük BalbC türü farelere 7 gün boyunca susam yağı içerisinde çözölen 1mg/kg DMBA uygulaması yapıldı. İzole edilen ovaryum dokularında Hematoksilin-Eozin boyama ile morfolojik değerlendirme ve folikül sayımı yapıldı. İmmünofloresan yöntemi ile c-Abl ve mTERT lokalizasyonları gösterildi. Ayrıca ELISA, western blot ve qRT-PCR yöntemleri kullanılarak fare ovaryumunda DMBA tedavisinin telomeraz aktivitesi üzerine olan etkisi gösterildi. Ayrıca, Transmisyon Elektron Mikroskopi yöntemi ile oosit-granuloza hücresi arasındaki ilişki ultrastrüktürel düzeyde incelendi.

Çalışmamızda DMBA indüklü ovotoksisite sonucu oluşan POY'de c-Abl ve mTERT, ilk defa gösterilmiştir. Bu proje ile DMBA uygulanmış fare ovaryumunda c-Abl ve mTERT ekspresyonlarındaki değişimin gösterilmesiyle, projemizin sonuçlarının POY'de erken over yaşlanması ve kadın infertilitesine ilişkin sinyal mekanizmalarına ışık tutacağını düşünmekteyiz.(TÜBİTAK-215S867).

Anahtar Kelimeler: DMBA (7,12-dimethylbenz-[a]anthracene), Prematüre Over Yetmezliği, Fare, mTERT Telomeraz Katalitik Alt Ünitesi.



ABSTRACT

In mammals, the oocyte reserve formed in prenatal life is depleted during postnatal life. Ovarial aging occurs with this mechanism called follicular atresia. Since primordial follicle pool cannot be regenerated again, this depletion results in infertility or Premature Ovarian Failure (POY).

Polycyclic aromatic hydrocarbon 7,12-dimethylbenz (7,12-dimethylbenz- [a]anthracene (DMBA)) is an environmental carcinogen that triggers many tumors, including ovaries, and frequently exposed in daily life.

Telomerase maintains stable structures of chromosomes during cell division and mouse telomerase reverse transcriptase (mTERT) is a necessary component of telomerase complex. c-Abl protein tyrosine kinase is a protein that is activated by formation of fractures in DNA double helix and participates in repair of these fractures during telomere control. Telomere shortening is a process that stops cell division over time. Therefore, we suggested that c-Abl and mTERT may have an important role in POY caused by DMBA-induced ovotoxicity. We aimed to explain the effect of continuously exposed DMBA on oocyte reserve, oocyte quality and granulosa cells in ovary with c-Abl (Abelson Tyrosine Kinase) and mTERT (telomerase catalytic subunit) markers.

Postnatal (PND) 28 days old BalbC mice were treated with 1mg/kg DMBA dissolved in sesame oil for 7 days. Hematoxylin-Eosin staining and follicle counts were performed in isolated ovarian tissues. c-Abl and mTERT localizations were demonstrated by immunofluorescence staining. In addition, effect of DMBA treatment on telomerase activity was demonstrated in mouse ovary using ELISA, western blot and qRT-PCR methods. In addition, relationship between oocyte-granulosa cells was examined at ultrastructural level.

In our study, c-Abl and mTERT were shown for the first time in POY caused by DMBA-induced ovotoxicity. We suggest that results of our project will shed light on signaling mechanisms of early ovarian aging and female infertility in POY by demonstrating changes in c-Abl and mTERT expressions in DMBA-treated mouse ovaries. (TÜBİTAK-215S867).

Keywords: DMBA (7,12-dimethylbenz-[a]anthracene), Premature Ovarian Failure, Mouse, mTERT Telomerase Catalytic Subunit.



1. GİRİŞ

Primer over yetmezliği olarak da bilinen Prematüre Over Yetmezliği, ovaryumların 40 yaşından önce normal fonksiyonlarının kaybolmasıdır. Bunun sonucu olarak ovaryumlar, normal miktarda östrojen hormonu üretemez veya düzenli olarak ovulasyonu gerçekleştiremez ve bunlara bağlı olarak POY'da infertilite yaygın bir sonuçtur. POY bazen erken menopoz olarak da adlandırılır, ancak iki koşul ile menapozdan farklıdır. POY olan kadınlar yıllarca düzensiz veya ara sıra adet görebilirler ve hatta hamile kalabilirler. Erken menopozda olan kadınların menstrüel periyodları bitmiştir ve hamile kalamazlar. POY olan kadınlarda östrojen seviyelerinin restore edilmesi ile osteoporoz gibi düşük östrojen seviyesinin bir sonucu olarak ortaya çıkan bazı komplikasyonlar önlenabilir.

POY nedenleri arasında Turner's sendromu gibi X kromozomuna bağlı kromozomal defektler, otoimmün hastalıklar, kemoterapi ve radyoterapi gibi toksinlerin yanısıra sigara içilmesi, kimyasallar, pestisitler ve virüsler gibi çevresel toksinler belirtilmektedir. Özellikle sigara içen kadınlar ile yapılan araştırmalarda, sigara içen kadınların içmeyenlere oranlara idiyopatik POY riskinin arttığı gösterilmiştir. Ancak halen POY'ne neden olan faktörler ve etki mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Biz çalışmamızda çevresel bir karsinojen olan ve özellikle sigara içerisinde ve çok pişmiş yiyeceklerde bulunan DMBA'nın ovaryumdaki oosit rezervini nasıl harab ederek tükettiğini mTERT ve c-Abl üzerinden açıklamayı hedefledik. Daha önceki projemizde mTERT ve c-Abl arasındaki ilişkiyi granuloza hücreleri ile oosit ve preimplantasyon dönemi embriyolarında ortaya koymuştuk. Oosit rezervinin hızlı tükenişinde de mTERT ve c-Abl arasındaki ilişkinin etkili olabileceğini hipotez ederek POY oluşturduğumuz fare ovaryumlarında mTERT ve c-Abl ekspresyonlarını göstermeyi amaçladık.

Günümüze kadar insan ve deney hayvanı ile yapılan çalışmalar ve elde edilen bulgular, POY olan hastalarda ovaryumların fonksiyonunun yeniden kazanılması ve doğurganlığa ulaşılması konusunda pekçok bilgi vermektedir. Son yıllarda ovarial kök hücrelerin kullanılması fikri POY tedavisinde umut vericidir. Bununla birlikte, ovarial kök hücrelerin tedavi için klinik kullanımı, karşımıza bu hücrelerin güvenliği, özellikle de *in vitro* kültür sırasındaki epigenetik değişikliklerin ve üretilen oositlerin ve ayrıca elde edilen embriyoların manipülasyonu ile ilgili çok sayıda soru işareti de oluşturmaktadır. Böyle bir başarının elde edilmesi, çok zaman harcanmasını ve büyük deneysel ve klinik çalışmaların yapılmasını gerektirecektir. O zamana kadar, POY'nin altında yatan mekanizmaların belirlenmesi, ovaryumdaki oosit rezervinin korunmasında ve yenilenmesinde kliniğe ışık tutacaktır. Tamamladığımız bu proje ile mTERT ve c-Abl'in bu noktada POY altında yatan mekanizmaların aydınlatılmasına katkı sağlayacağını düşünmekteyiz.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

Memelilerde prenatal hayatta oluşan oosit rezervi, postnatal hayat süresince sürekli azalarak tükenmektedir. Bu tükeniş sürecinde oositlerin çok az bir bölümü fonksiyonel gelişimini tamamlayarak ovule olurken, binlercesi ovulasyona girmeden ortadan kaldırılmaktadır. Foliküler atrezi olarak adlandırılan bu mekanizma ile ovariyal yaşlanma meydana gelmekte ve primordiyal folikül havuzu tükenmektedir (Borman vd. 2000; Broekmans vd. 2007; Hansen vd. 2008; Hoyer ve Sipes 1996) ve bu tükeniş sonucunda infertilite ya da Prematüre Over Yetmezliği (POY) ile karşı karşıya kalınmaktadır.

Polisiklik aromatik hidrokarbon 7,12-Dimethylbenz[a]anthracene (DMBA), ovaryum da dahil olmak üzere pekçok farklı türde tümörü tetikleyen ve kemirgenlerde kanser modeli olarak kullanılan bir çevresel karsinojendir (Hoyer vd. 2009). Peki günlük hayatta insanlar DMBA'ya nasıl maruz kalırlar? DMBA'nın kaynağı olarak sigara içilmesi, pişerken aktif karbona maruz kalmış yiyeceklerin tüketilmesi (mangalda pişirilen besinler gibi) ve otomobillerden çıkan egzoz dumanının solunması belirtilmektedir (Gelboin 1980). Karsinojenik etkisine ek olarak DMBA'nın folikülogenezin normal sürecini bozarak folikül popülasyonunun azalmasına neden olduğu ve POY'ne yol açtığı da belirtilmektedir (Mattison ve Nightingale 1980). Yapılan çalışmalar ile DMBA'nın preovulatuvar foliküllerde, proapoptotik Bax proteininin ve Caspase-3 proteininin aktivasyonuna neden olarak granuloza ve teka hücrelerinin apoptozuna yol açtığı gösterilmiştir (Tsai-Turton vd. 2007). Sigara içen kadınlar ile içmeyenler karşılaştırıldığında, sigara içenlerde erken menopozun uyarıldığı belirlenmiştir (Harlow ve Signorello 2000; Jick 1979; Mattison vd. 1983). Ayrıca sigara içen annelerin yavrularında, gebelik süresince sigara içmeseler bile, oosit sayısında azalma, anormal over fonksiyonu, fertilitenin azalması ve/ya da erken menopoz gibi sorunlar ile karşılaşıldığı ortaya koyulmuştur (Jurisicova vd. 2007).

Prematüre Over Yetmezliği, 40 yaşın altındaki kadınlarda hipergonadotropik hiperöstrojenik amenorenin meydana gelmesi yani çok genç yaşta ovaryumdaki oosit rezervinin tükenerek kadınların erken menopoza girmesi durumudur (Vujovic vd. 2012). Hastaların %74-90'ı idiyopatiktir. X kromozomu ya da otozomlardaki genetik bozukluklar POY için primer neden olarak gösterilmektedir. POY etiolojisinde %20 ailesel genetik nedenler, %10 X kromozomu anomalileri olduğu bildirilmiştir (Bennett vd. 2010). Kromozom X üzerindeki Xq13.3-q21.1 (POF2) ve Xq21.3- q27 (POF1) bölgelerinin overin işlevi açısından önemli olduğu bildirilmiştir (Dudding vd. 2010; Simpson 2008). Ancak POY etiolojisinde rol oynayan genetik ve/veya epigenetik etkenler henüz ortaya konulamamıştır. Teknolojik ilerlemelere bağlı olarak sık gözlenen hastalıkların genetik temelini ortaya

koyulma çalışmaları içerisinde POY genetiğine ilişkin çalışmalar da yoğunlaşmıştır. Bilateral ooforektomi, kemoterapi, radyoterapi ve enfeksiyonlar da POY'ne neden olabilmektedir. POY semptomları arasında sinirlilik, libido kaybı, depresyon, konsantrasyon eksikliği, kilo alma ve enfeksiyonlara daha sık yakalanma sayılabilir. Ancak en büyük ve en önemli sorun bu hastaların ovaryumlarındaki yumurta (oosit) rezervlerinin hızlı bir şekilde tükenmesi ve dejenere (atretik) folikül sayılarının artmasıdır. Bu hastaların azalan over rezervlerinin yanısıra kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz ve inme gibi hastalıklara da yatkınlıkları artmaktadır (Vujovic vd. 2012). POY sendromuna sahip hastalarda germ hücre sayısı normalden az olabilir, bu hastalarda atreziye giden folikül sayısı normalden fazla olabilir ya da çevresel faktörlerden dolayı postnatal hayatta germ hücre kaybı izlenebilir.

c-Abl (Abelson Tirozin Kinaz), reseptör olmayan tirozin kinaz ailesinin bir üyesidir. Hücre içerisinde; çekirdekte ve sitoplazmada yerleşim göstererek pekçok sinyal molekülü ile ilişkiye girmekte ve hücre içi sinyal mekanizmalarında rol almaktadır (Gu vd. 2009; Pendergast 2002; Sirvent vd. 2008; Wang ve Zhu 2004; Zhu ve Wang 2004). c-Abl (Abelson) protein tirozin kinaz, DNA çift sarmalında kırıkların oluşması ile aktive olmaktadır. Telomer kontrolü esnasında bu kırıkların tamir edilmesine katılan bir proteindir (Meltser vd. 2011). c-Abl'in aktive olması durumunda telomeraz aktivitesi baskılanmaktadır (Bakalova vd. 2003).

Bir ribonükleoprotein kompleksi olan **telomeraz**, hücrenin bölünmesi esnasında kromozomların kararlı yapılarının korunmasını sağlar. Evrimsel olarak korunmuş bir gen olan telomeraz geninin insandaki ortoloğu hTERT'dir. Telomeraz, telomerleri sentezleyen ve koruyan bir ters transkriptaz enzimidir. Yapısında taşıdığı RNA'yı taslak olarak kullanarak, her bölünme ile kısalan telomer uçlarında tamiri sağlar. Telomerik DNA dizilerini doğrusal kromozomların uçlarına ilave eder. Her DNA eşleşmesi sonrası kromozomun boyu kısalır; çünkü DNA polimeraz, ana zincirde 3' ucunda yeni bir DNA sentezini başlatamaz. Telomeraz, bu uç replikasyon problemini, telomerik tekrar dizilerini kromozomun 3' ucuna takip, kromozomun kısalmasını engelleyerek çözer. Telomeraz enzimi, somatik hücrelerde az bulunur. Bu yüzden normal bir hücrenin her bölünüşünde, telomer boyu yaklaşık 100 baz çifti kadar kısalır. *Telomer kısalması, hücre bölünmesini zamanla durduran bir işlemdir.* Fare telomeraz ters transkriptaz (**mTERT**) (**fare telomeraz katalitik altünitesi**) (**mouse Telomerase Reverse Transcriptase**) telomeraz kompleksinin gerekli bir bileşenidir. Telomeraz aktivitesi ile hTERT'i koadlayan genin ekspresyon düzeyi arasında güçlü bir korelasyon vardır (Brenner vd. 1999). Telomeraz çeşitli protein kinazlar ile kompleks oluşturarak geri dönüştürülebilir bir fosforilasyona sahiptir. Bu durum telomeraz aktivitesinin modülasyonu için ve sinyal yolları için gereklidir. Ancak telomeraz aktivitesinin nasıl



düzenlendiği halen bilinmemektedir. Günümüze kadar edinilen bilgiler telomeraz regülasyonunun, Protein kinaz C/B bağımlı aktivasyon ve c-Abl bağımlı inhibisyon olmak üzere iki farklı şekilde olduğudur.

Telomerler, tüm ökaryotik hücrelerde doğrusal kromozomal sonların gerekli bir koruyucu başlığı olarak görev yapmaktadır (Greider ve Blackburn 1996). Telomeraz bir ribonükleoprotein ters transkriptaz kompleksi içeren bir kalıp RNA alt ünitesi (TER) ve bir katalitik protein alt ünitesi (TERT)'nden oluşmaktadır. Telomerin korunmaması durumunda, hücre bölünmesinin ardından kromozomal kararsızlığa neden olan telomer kısalması ve proliferatif yaşlanma izlenmektedir (Blasco vd. 1997).

İnsan sperminde telomer uzunluğu erkeğin yaşı ile artış göstermektedir (Allsopp vd. 1992) ve ratlarda germ hücre hattının olgunlaşması esnasında telomer uzunluğu, telomeraza ters orantılı olarak çalışmaktadır (Achi vd. 2000). Kısa telomerlerin farede sperm DNA fragmentasyonu ile ilişkili olduğu ileri sürülmüştür (Rodriguez vd. 2005). İnsanda fragmente olan sperm DNA'sı anormal embriyonal gelişime neden olmaktadır (Evenson vd. 2002). Oositin hasarlı DNA'yı tamir mekanizması iyi bilinmekle birlikte (Derijck vd. 2008) bu kapasitenin döllenen sonra farklı mekanizmaların da işin içerisine girmesine rağmen preimplantasyon dönemi embriyolarında da mevcut olduğu ileri sürülmektedir (Fiorenza vd. 2001). Döllenede, oosit ve sperm telomerleri aynı hücrede birlikte yer alır ve telomer uzama-kısalma mekanizması aktif olarak gerçekleşir (Liu vd. 2002).

c-Abl (-/-) hücreler ile yapılan çalışmalarda c-Abl'in telomer uzunluğunu düzenlediği gösterilmiştir. c-Abl (-/-) hücreler, hTERT'in negatif regülasyonunda önemli bir role sahiptir (Tybulewicz vd. 1991). c-Abl(-/-) farelerde yapılan bir çalışmada spermatogenezde pakiten evresinde defektler meydana geldiği bildirilmiştir (Kharbanda vd. 1998). c-Abl proteini pakiten kromozomların sonlarında yerleşim göstermektedir. Bundan dolayı mayotik hücrelerde telomeraz ile de ilişkiye girebilmektedir (Kharbanda vd. 1998).

Sığır ovaryumunda telomeraz RNA komponenti ovaryumda büyüyen foliküllerin granuloza hücrelerinde lokalize olurken primordiyal folikülde izlenmemektedir. Sıçanlarda, büyük ve atretik foliküllerdeki telomeraz aktivitesinin küçük ve sağlıklı foliküllere nazaran azaldığı belirlenmiştir (Yamagata vd. 2002). İnsan telomeraz reverse transkriptaz (hTERT) ekspresyonu ile ilgili bulgular ve telomeraz aktivitesinin insan ovaryumundaki epitel hücreleri tarafından üretilen östrojen tarafından uyarılması, endometriyum, prostat ve ovaryum gibi östrojenin etkili olduğu hedef dokularda telomeraz aktivitesinin hormonal kontrol



altında olduğunu ileri sürmektedir (Chronowska 2012). İnsanda yapılan bir çalışmada normal ovaryumlar ile POY olan 40 yaş altı ovaryumlar telomeraz aktivitesi açısından karşılaştırılmış ve yaşa bağlı olarak telomeraz aktivitesinin azaldığı belirtilmiştir (Kinugawa (2000).

Biz bu çalışmamızda, farede DMBA maazuzyetinin ovaryumdaki foliküllerin telomeraz aktivitesinde değişime neden olduğunu hipotez ettik. DMBA indüklü ovotoksisitede c-Abl ve mTERT arasındaki ilişkiyi ortaya koyarak, foliküler gelişimde telomerlerin uzamasında-kısalmasında yer alan mekanizmaya yeni bir yaklaşımda bulunmayı amaçladık. Çalışmamızın sonunda elde edeceğimiz bulgular ile, telomer kısalmasının hücre bölünmesini zamanla durduran bir işlem olmasından dolayı, genç yaşta ovaryumdaki yumurta rezervinin tükenmesi ve oosit kalitesinin bozulması sorunlarının açıklanmasına katkıda bulunmayı hedefledik. Önerdiğimiz proje ile ilk defa, fare deney modelinde POY sendromunda ovariyal yaşlanmada rol aldığını düşündüğümüz c-Abl ve mTERT arasındaki ilişkinin gösterilmesi ile, DMBA indüklü ovotoksisite ve POY'de folikül ve oosit maturasyonu hakkında önemli bilgilere de ulaşmış olduk.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Deney Modelinin Oluşturulması

A. In vivo Bölüm: Intraperitoneal olarak DMBA Uygulanması

Çalışmamızın in vivo kısmında postnatal 28 günlük toplam 30 adet (her grup için 10 tane hayvan toplam 60 adet ovaryum) Balb/C türü dişi fareler kullanılmıştır. Deney gruplarından birinci gruba Prematüre Over Yetmezliği modeli için ovotoksisite oluşturmak amacıyla intraperitoneal (ip) olarak 7 gün boyunca susam yağı içerisinde hazırlanmış günlük 1mg/kg dozda 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) uygulanması yapılmıştır. İkinci gruba sadece susam yağı verilirken, üçüncü gruba herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Son enjeksiyondan 24 saat sonra hayvanlar eter anestezi altında servikal dislokasyon ile ötanazi edilerek ovaryum dokuları diseke edildi. Diseke edilen sağ ovaryumlar morfolojik değerlendirme, folikül sayımı ve immunofloresan boyama ve TUNEL yapılmak üzere fiksatif içerisinde alınırken sol ovaryumlar protein ve RNA izolasyonu yapılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

B. In vitro Bölüm: Ovaryum Kültürü

DMBA'nın ovaryumda meydana getirdiği ovotoksik etkisini in vitro deney modelinde göstermek amacıyla yaptığımız ovaryum kültürü için dokular diseke edilerek 6-kuyucuklu kültür kaplarına alındı. Ovaryumlar %10'luk FBS, 7,5 mg Ascorbic Acid, 1,25 ml L-Glutamin, 75 µl, 250 µl FGF, 30 µl LIF, 37,7 µl SCF, 3 ml. B27 ve Penicilin/Streptomycin içeren RPMI medyumunda içerisinde 4 gün kültüre edildi. Kültür ortamındaki ovaryumlara kontrol grubu için hiçbir uygulama yapılmazken, çözünen grubu 0.01% aseton içeren medyum ve deney grubu 50nM DMBA içeren medyum ile kültüre edildi.

Deney grupları ve yapılan uygulamalar aşağıdaki tablolarda da özetlenmiştir (Tablo 1 ve 2).

Tablo 1. In vivo deney grupları.

Grup Adı	Hayvan Adedi
DMBA Grubu: Postnatal 28 günlük hayvanlara intraperitoneal olarak (ip) 7 gün boyunca susam yağı içerisinde hazırlanmış günlük 1mg/kg dozda DMBA verilen grup	10
Çözgen Grubu: Postnatal 28 günlük hayvanlara intraperitoneal olarak (ip) 7 gün boyunca susam yağı verilen grup	10
Kontrol Grubu: Postnatal 28 günlük hayvanlara hiçbir işlem yapılmadan 7 gün	10

boyunca hayvanların inkübe edildiği kontrol grubu	
Toplam Hayvan Sayısı	30

Tablo 2. In vitro deney grupları.

Grup Adı	Hayvan Adedi
DMBA Grubu: Postnatal 28 günlük ovaryumların 4 gün boyunca doku kültürü ortamına 50nM DMBA içeren medyum verilen grup	10
Çözgen Grubu: Postnatal 28 günlük ovaryumların 4 gün boyunca doku kültürü ortamına 0.01% aseton içeren medyum verilen grup	10
Kontrol Grubu: Postnatal 28 günlük ovaryumların hiçbir işlem yapılmadan 4 gün boyunca ovaryum dokusu inkübe edilen kontrol grubu	10
Toplam Hayvan Sayısı	30

3.2 Doku Takibi ve Hematoksilen-Eozin ile Boyama

Tüm gruplardan alınan ovaryum dokuları %10'luk formaldehit içerisinde 6 saat fikse edildi. Ardından çeşme suyunda 2 saat yıkandıktan sonra sırasıyla %70, 80 ve 90'luk alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon yapıldı. 3 saat %100'lük alkolde bekletildikten sonra 3 kez 5'er dakika ksilolde bekletilerek şeffaflaştırma yapıldı. Dokular 56°C'deki sıvı parafin içerisinde 3 kez 1'er saat inkübe edildikten sonra temiz parafine gömüldü. Parafin bloklardan alınan 5µm kalınlıktaki kesitlere Hematoksilen-Eozin boyaması yapıldı ve gruplar morfolojik olarak incelenerek karşılaştırıldı.

3.3 Kanda Antimüllerien Hormon (AMH) Seviyesinin Belirlenmesi

Deney grupları oluşturulup deney tamamlandığında doku diseksiyonu yapılmadan önce hayvanlarda Anti Müllerian Hormonu seviyelerini belirlemek amacıyla deneklerden kan örneği alındı. Alınan kanlar 15 dakika 4000 rpm'de santirfüj edilerek, ELISA tekniğinde kullanılmak üzere -80°C'ye kaldırıldı.

Serum Anti-Müllerian Hormon (AMH) Konsantrasyonlarının ELISA ile Belirlenmesi

1. -80°C'den alınan serum örnekleri oda ısısına getirildi, ardından 20-30 saniye santirfüj edildi.
2. Standartlar kitte önerilen şekilde hazırlandı.
3. Kitte belirtilen 5 adet standart, pozitif kontrol ve çalışmamıza ait 12 adet serum örneği daha önceden planlanan sıraya uygun olarak AMH seviyelerini belirlemek üzere

kuyucuklara eklendi. Standartların her biri ve örnekler 2 tekrarlı olacak şekilde yüklendi.

4. Standart kuyularının üzerine 50 µL Streptavidin-HRP ve örneklerin üzerine 10 µL AMH antikoru ve 40 µl HRP enzim konjugat eklendi ve 1 saat 37°C'de inkübe edildi. Blank için 2 adet boş kuyucuk ayrıldı.
5. İnkübasyonun sonunda tüm kuyucuklardaki sıvı uzaklaştırıldı.
6. 30X konsantrasyondaki yıkama solüsyonu 30 kat sulandırılarak 1X konsantrasyona getirildi. Tüm kuyucuklar 350 µl 1X yıkama solüsyonu ile 5 kez yıkandı. Yıkamadan sonra kuyucuklarda kalan sıvı havlu kağıt aracılığıyla alındı.
7. Tüm kuyucuklara 50'şer µl kromojen A ve ardından 50'şer µl kromojen B solüsyonu eklendi, yavaşça çalkalandı ve 37°C'de 10 dakika karanlıkta inkübe edildi. Bu süre içerisinde kuyucuklarda farklı tonlarda mavi renk oluşumu gözlemlendi.
8. Ardından tüm kuyucuklara 50'şer µl stop solüsyonu eklendi. Yavaşça çalkalanarak solüsyonun kuyucuklarda homojen olarak dağılması sağlandı ve maviden sarıya renk geçişi gözlemlendi.
9. Hemen ardından 15 dk. içerisinde 450 nm'de Gen5 programı aracılığıyla örnekler ELISA okuyucuda okunarak absorbans değerleri kaydedildi.

3.4 Folikül Sayımı

Tüm gruplardan alınan ovaryum dokularına yukarıda belirtilen rutin parafin takibi yapıldıktan sonra 5 µm kalınlıkta kesitler alındı. Folikül sayımı yönteminde önemli olan kısım, bir ovaryumun tamamının hiçbir kesit atlanmadan seri olarak ve tüm kesitler aynı kalınlıkta olacak şekilde mikrotomda kesilmesidir. Alınan kesitlere hematoksilin-eozin boyaması yapıldı. Folikül sayısını doğru bir şekilde hesaplayabilmek ve aynı folikülü tekrar saymış olmamak için, boyama sonrasında kesitlerdeki foliküllerden, sadece oositinin çekirdeği görünen foliküller sayıldı. Böylece tüm gruplardaki ovaryumlarda folikül sayısı belirlendi.

3.5 TUNEL Yöntemi

Fare ovaryumunda atretik folikülleri, apoptotik oosit ve granuloza hücrelerini belirlemek amacı ile TUNEL metodu uygulandı.

1. Pozitif şarjlı lamlara alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler ksilen ile deparafinize edildi.
2. Sırası ile %100, %90, %70'lik alkol serilerinden geçirilen kesitler distile suya alınarak rehidrate edildi ve ardından PBS ile yıkandı.
3. TUNEL metodu üretici firmanın (Roche, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein) verdiği kullanım kılavuzundaki yöntemine göre yapıldı. Kesitler Proteinaz K'da (20 µg/ml) 15 dk bekletildi, ardından PBS ile 3 kez yıkandı.
4. Kit içerisindeki "Enzyme solution" ve "Label Solution" 1:9 oranında karıştırılarak kesitlerin üzerine 25'er µl damlatıldı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
5. Ardından 3 kez PBS ile yıkama yapıldıktan sonra DAPI içeren kapatma solüsyonu (Sigma, Fluroshield with DAPI, #F6057) ile kapatılarak konfokal mikroskop ile görüntüledi.

3.6 İmmünofloresan Boyama

Tüm deney gruplarından alınan ovaryum dokularında c-Abl ve mTERT proteinlerinin varlığını ve yerleşimlerini göstermek amacıyla çiftli immünofloresan yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde aynı kesit üzerinde iki farklı antijenin iki farklı sekonder antikor kullanılarak (farklı iki renkte görünür hale getirilmesi sağlandı. Protokolün detayları aşağıda verilmiştir.

1. Kesitler seçildikten sonra 1 saat 60°C'de etüvde bekletildi
2. 20 dk 2'şer kez ksilenden, ardından 10'ar dakika %100, %90, %80 ve %70 alkol serilerinden geçirildi.
3. Ardından, önce distile suda sonra PBS'te 5'er dakika yıkandı ve taze hazırlanan 250 ml EDTA (pH: 8.0) tamponunda ilk olarak 6 dakika 700 Watt'lık mikrodalga ışınımına, ardından 15 dakika 300 Watt'lık mikrodalga ışınımına maruz bırakılarak antijenik epitopların açığa çıkması sağlandı.
4. Ardından oda sıcaklığından soğuması için bir süre bekletildi ve distile su ile üç kez 5'er dakika oda ısısında yıkandı.
5. Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini doyurmak için, kesitler metanol ile hazırlanan %3'lük H₂O₂ solüsyonu içinde oda ısısında 10 dakika bekletildi.
6. Ardından 2 kez 5 dakika distile su ile sonrasında 5 dakika TBS-T ile yıkandı.
7. Kesitlerdeki özgül olmayan bağlanmaları engellemek için %5 Normal Goat Serum (TBS-T içerisinde) ile 1 saat oda sıcaklığında bloklama yapıldı.

8. mTERT (MA5-16034, Mouse mA6, Thermo) primer antikoru ile (1:100) +4°C'de gece boyu inkübe edildi.
9. Primer ile gece boyu inkübasyonun ardından ertesi sabah kesitler 3x5 dk TBS-T ile yıkandı.
10. 1.5 saat oda sıcaklığında sekonder antikor ile inkübe edildi. (Goat anti-mouse IgG, Dylight 488nm (35503, Thermo, Invitrogen 1:250)).
11. Kesitler sekonder inkübasyonun ardından 6x5 dk TBS-T ile yıkandı.
12. Tekrar %5 NGS ile 1 saat oda sıcaklığında bloklama yapıldı.
13. c-Abl (PA5, 39688, Rabbit, Thermo) primer antikoru ile (1:100) 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
14. 3x5 dk TBS-T ile yıkamanın ardından tekrar sekonder antikor inkübasyonuna konuldu. Sekonder için Goat anti-rabbit IgG Cross-Adsorbed Texas red (T-2767, Invitrogen, 1:500, 615 nm) kullanıldı, 1.5 saat oda sıcaklığında inkübe edildi.
15. 6x5 dk TBS-T ile yıkama işlemi yapıldı.
16. DAPI'li kapatma solüsyonu ile kapatılıp konfokal mikroskobu ile görüntülendi.

3.7 Western Blot Yöntemi

Doku Lizatlarının Hazırlanması:

Tüm gruplardan alınan örnekler tartıldıktan sonra üzerlerine 10 mg/ml Protease Inhibitor Cocktail (PIC) içeren 100 µl RIPA lizis solüsyonu (Santa Cruz; sc-24948) eklendi. Örnekler daha sonra sonikatör kullanılarak parçalanıp lizat haline getirildi. Lizatların içerdiği protein konsantrasyonu Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific; Q33211) kullanılarak ölçüldü.

Jel Elektroforezi:

Yürütmelerde %4-12 Bis-Tris jel kullanıldı (ThermoFisher Scientific; NP0321). Loading Buffer (LDS, 4X) 2,5 µl, Reducing Agent (10X) 1 µl, su 1 µl ve 5 µl protein lizatı (toplam 10 µl) karıştırılarak denatürasyon işlemi için 10 dakika 70°C'de inkübe edildi. 5 µl protein ladder ve 10 µl örnek jelin kuyularına yüklendikten sonra elektroforez sistemi 80 mA-200V olarak ayarlanarak 20 dakika, daha sonra 120 mA-200V olarak ayarlanarak 1 saat 30 dakika proteinler jelde yürütüldü.

PVDF Membrana Transfer:

Elektroforezden sonra jeldeki proteinler iBlot sistemi kullanılarak PVDF membrana (ThermoFisher Scientific; IB401001) transfer edildi. 9 dakika transfer işleminden sonra membranlar önce distile suda çalkalandı daha sonra % 0.1 Tween-20 içeren TBS (TBS-T) solüsyonu ile 5 dakika yıkandı.

Bloklama:

Transfer işleminden sonra membranlar TBS-T içerisinde %5 yağsız süt tozu ile oda sıcaklığında 1 saat çalkalayıcı üzerinde inkübe edilerek bloklama işlemi gerçekleştirildi.

Primer Antikor ile Inkübasyon:

Çalışmamızda kullanılan antikorlar, katalog numaraları ve dilüsyon oranları aşağıdaki tabloda verilmiştir (Tablo 3).

Tablo 3. Kullanılan antikorlar ve dilüsyon oranları.

Antikorlar	Katalog no	Dilüsyon oranı
c-Abl	Sigma#A5844	1:1000
mTERT	Santa Cruz #sc-7212	1:1000
PCNA	Cellsignalling#14220	1:1000
Caspase3	Cell Signaling #13110	1:1000
Beta-actin	Cell Signaling #8H10D10	1:5000

Projede belirtilen antikorlar TBS-T içerisinde %5 yağsız süt tozu ile tablo 1'de belirtilen dilüsyon oranlarında seyreltilerek hazırlandı. Bloklama sonrasında membranlar +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Primer antikor ile inkübasyondan sonra membranlar TBS-T ile 5'er dakika 3 kez yıkandı. Anti-Rabbit IgG HRP bağlı sekonder antikor TBS-T içerisinde % 5 yağsız süt tozu ile 1:5000 oranında hazırlandı. Yıkamadan sonra membranlar 2 saat oda sıcaklığında sekonder antikor ile inkübe edildi. Sekonder antikorla inkübasyondan sonra membranlar TBS-T ile 5'er dakika 6 kez yıkandı. Yıkamadan sonra membranlar chemiluminisans (Amersham #RPN2109) ile oda sıcaklığında karanlık ortamda 1 dakika inkübe edildikten sonra, CCD kamera ile görüntülendi.

3.8 Transmisyon Elektron Mikroskobu Yöntemi

Kontrol, DMBA uygulanan ve çözgen gruplarından izole edilen ovaryum dokularında oosit ve folikül hücrelerini ultrastrüktürel düzeyde incelemek amacıyla transmisyon elektron mikroskobu (TEM) tekniği kullanıldı. Kontrol, DMBA-tedavisi uygulanan ve çözgen grubundan alınan ovaryum dokuları trimlenerek %4'lük Gluteraldehitte (0.1 M Sörensen Fosfat

Tamponunda (SFT) hazırlanmış) 2 saat fikse edildi. Ardından Sörensen Fosfat Tamponuyla yıkanıp %1'lik SFT'nda hazırlanmış osmiyum tetraoksit (OsO₄) fiksantifi ile fikse edildi. Dokular artan alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Sonrasında %75'lik etanol ile hazırlanmış %1'lik uranil asetat solusyonunda 1 saat inkübe edildikten sonra Propilen Oksitte 10'ar dakika 2 kez, Propilen Oksit+(Araldit Ana Karışımı+%2 oranında Hızlandırıcı BDMA) (1:1) karışımında 4 saat boyunca oda ısısında inkübe edildi. Araldit içerisinde gece boyu inkübe edilen dokular ertesi gün taze araldite gömülerek 60°C'de 48 saat bekletildi. Araldit bloklardan alınan kesitler TEM mikroskobunda görüntülendi.

3.9 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Basamakları:

Örnek hazırlama ve Doku izolasyonu

Her bir doku örneği üzerine 300 µl lysis buffer eklendi. Manyetik boncuklar eklendikten sonra ependorf içerisindeki doku homojenize edildi. Homojenizasyon sonrasında üzerine 200 µl daha lysis buffer eklenerek 10 dk. 1000 g'de santrifüj edildikten sonra örnek süpernatant fazı ve boncuklar birbirinden ayrıldı. Tekrar 10 dk. 1000 g.'de santrifüj işlemi yapıldıktan sonra dipte bulunan pellet kısmına dokunmadan üstteki süpernatant kısmı başka bir ependorfa aktarıldı.

Filtrenin Aktifleştirilmesi

Filtreli ependorflar 100 µl aktivasyon buffer ile yıkanarak 30 sn. 10.000 g.'de santrifüj edildi ve altta kalan ependorf (süzülen kısım) boşaltıldı.

Filtreli Ependorfa Örneklerin Aktarılması

Örnek süpernatantının bulunduğu ependorfa 300 µl iso-propanol eklenerek ve vortekslendi. Filtreli ependorfların dibine çöken aktivasyon buffer boşaltıldıktan sonra isopropanol eklenen örnekler filtreli ependorfa aktarıldı. 30 sn. 10.000 g.'de santrifüj edildi. Filtrenin altında kalan ependorf boşaltıldı, örneklere ait RNA'lar bu aşamada filtre içerisinde kalır.

Filtrenin Yıkaması

RNA içeren filtreler 700 µl primer buffer yıkama solüsyonu ile yıkanarak 30 sn. 10.000 g.'de santrifüj edildi. Filtrenin altında bulunan ependorf boşaltıldı. Filtrenin üzerine 700 µl sekonder buffer yıkama solüsyonu eklendi ve 30 sn. 10.000 g.'de santrifüj edildi. Filtrenin altında bulunan ependorf boşaltıldı.

RNA'nın Ayrılması

Filtre kısmı otoklavlanmış yeni bir ependorfa aktarıldı. Filtre üzerine 40 µl elution buffer filtrenin merkezine gelecek şekilde filtre üzerine aktarılarak 3 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi ve ardından 2 dk. 10.000 g.'de santrifüj edildi. RNA'lar altta bulunan ependorfta toplandı. Üstte bulunan filtre atılarak örnek RNA'lar -20 °C'ye kaldırıldı.

cDNA Sentezi

Ayrılan RNA'lardan RNA ölçümü yapıldıktan sonra 9.5 µl RNA-template ve 0.5 µl Oligo-Dt karışımı hazırlandı. 70 °C'de 5-10 dk. ısıtma işlemine tabi tutuldu (denatürasyon işlemi).

Hazırlama ve DNA çoğaltılmasında kullanılan birinci aşama

Mix hazırlama;

SCRIPT RT Buffer Complete	4 µl
dNTP mix	1 µl
DTT Stock Solution	1 µl
RNAase Inhibitor	1 µl
SCRIPT Reverse Transcriptase	0.5 µl
RNAase free water	2.5 µl

Bu miktarlar bir örnek için geçerlidir. Bu işlem sonucunda elde edilen 10 µl mix solüsyonu ile 10 µl örnek RNA'sı karıştırılarak 50 °C'de 45 dk., 42 °C'de 10 dk. inkübe edildi.

PCR için son aşama

1 ependorf için;

PCR Grade water	7.8 µl
Master mix	10 µl
Forward	0.6 µl
Reverse	0.6 µl

Bu miktarlar bir örnek için geçerli. Herbir ependorfa 19 µl hazırlanan mix + 1 µl cDNA eklendi. Kullanılan primerlere uygun program girildi.

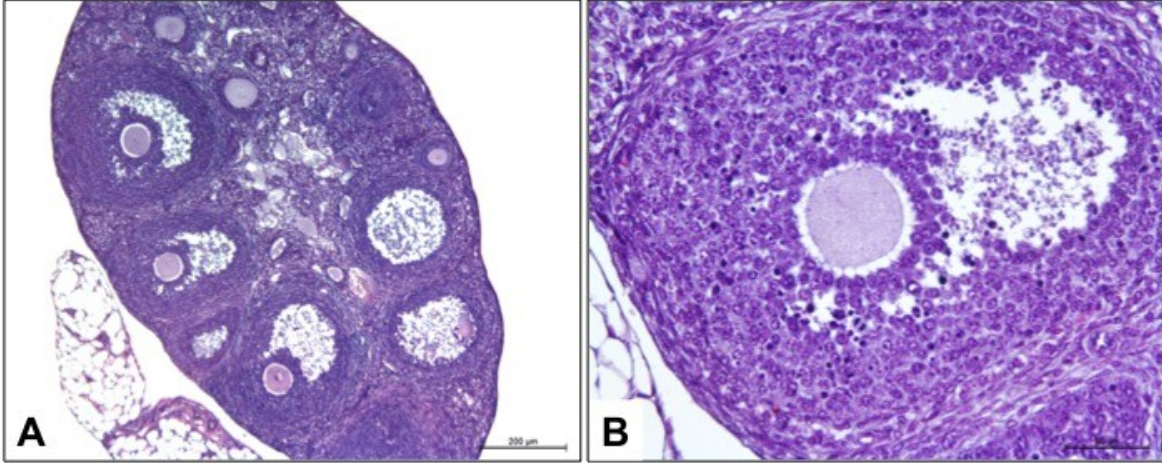
qRT-PCR yöntemi tüm örnekler için farklı zamanlarda olmak üzere toplam 3 kez tekrar edildi. Elde edilen Real Time PCR sonuçları, kullanılan kitin önerdiği şekilde hesaplandı. Değerlendirmeler yapılırken, her bir grup için 3 deney sonucunun ortalaması alındı ve gruplar arasındaki *c-Abl* ve *mTERT* gen ekspresyonu mRNA düzeyinde karşılaştırıldı. İnternal kontrol olarak *Beta aktin* kullanıldı. İstatistiksel değerlendirme GraphPad programı kullanılarak gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1 Deney Gruplarının Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

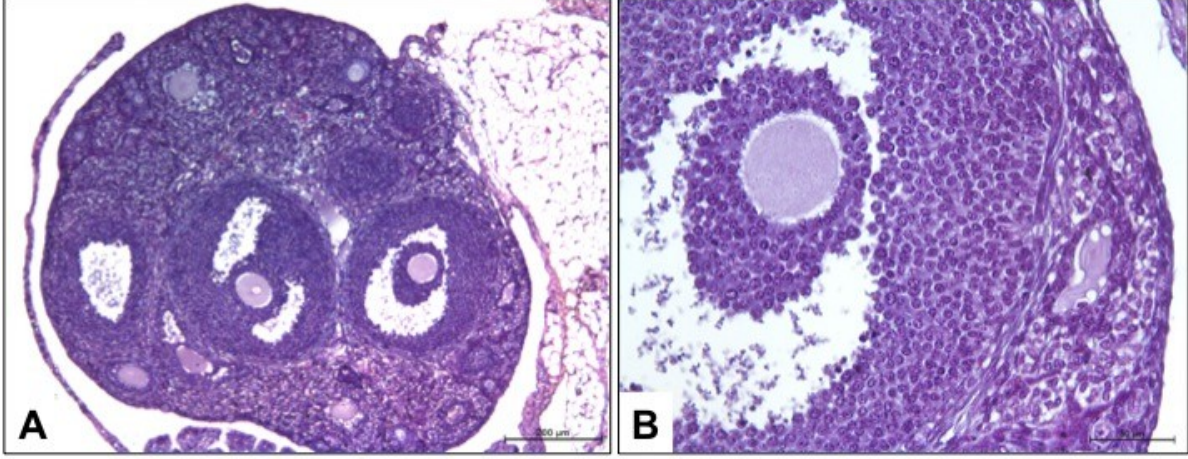
A- In Vivo Deney Gruplarının Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Çalışmamızda kontrol grubu ovaryum dokusunda, ovaryumun korteks kısmında foliküler gelişimin farklı aşamalarındaki foliküller belirlendi. Gelişen foliküllerdeki oositleri morfolojik olarak değerlendirdiğimizde sitoplazmalarının ve zona pellusidalarının normal olduğunu belirledik. Çekirdeklerini incelediğimizde oositlerin profaz 1 (P1) aşamasında olduklarını ve çekirdekçiklerinin normal görünümüne sahip olduğunu gözlemledik. Oositlerin çevresinde yer alan granuloza hücrelerinin oosit ile ilişkide olacak şekilde oosit çevresinde düzenlendiklerini belirledik. Ayrıca kontrol grubu ovaryumlarda normal bir foliküler sürecin gereği olarak gelişimini tamamlayamayan atretik folikülleri de belirledik (Şekil 1 A ve B).



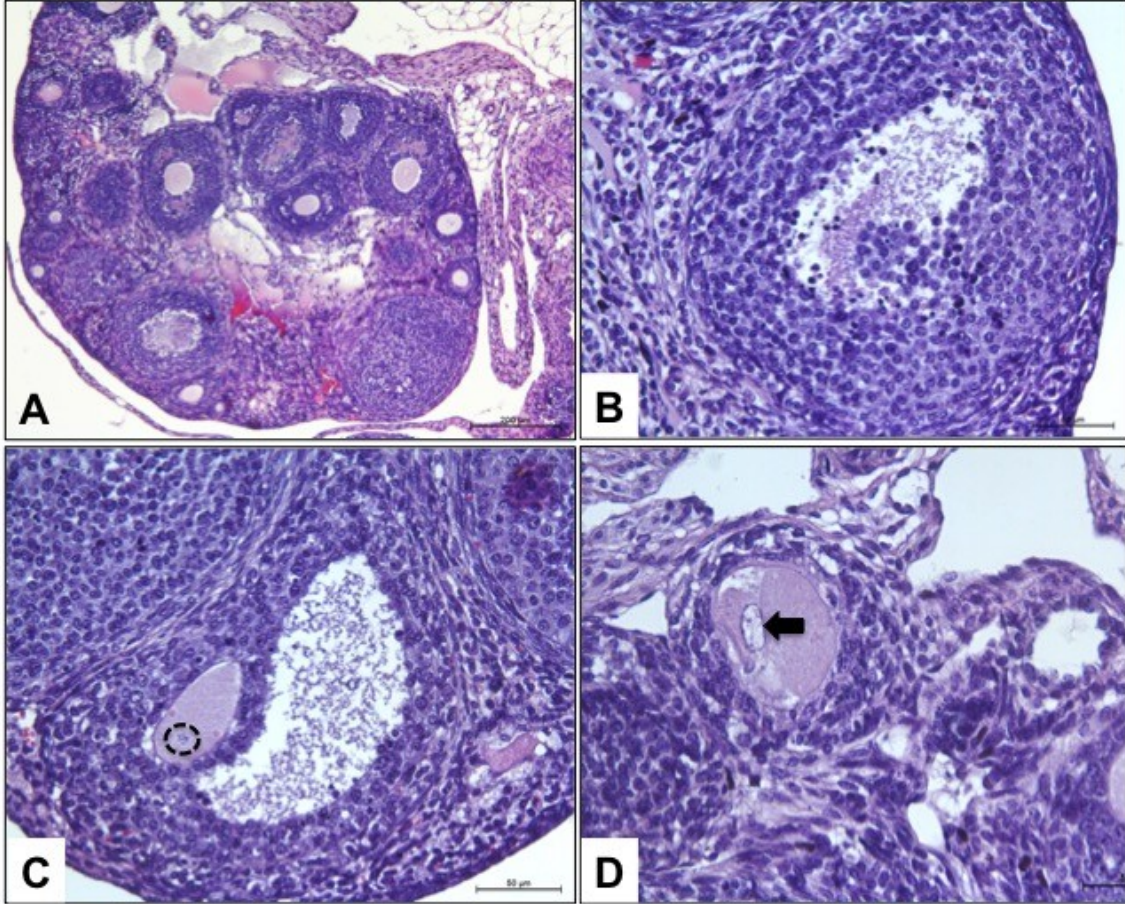
Şekil 1. In vivo kontrol grubu ovaryum. **A**, Ovaryumun genel görünümü; **B**, Sağlıklı bir antral folikül izlenmektedir (A,10X; B, 40X).

Çözgen grubundan elde ettiğimiz ovaryum dokularını değerlendirdiğimizde genel olarak kontrol grubu ile aynı morfolojik sonuçları elde ettik (Şekil 2 A ve B).



Şekil 2. In vivo çözgen grubu ovaryum. **A**, Ovaryumun genel görünümü; **B**, Solda sağlıklı bir graaf folikülü sağda ise gelişimini tamamlayamayan bir atretik folikül izlenmektedir (A,10X; B, 40X).

DMBA uygulaması yaptığımız ve ovotoksisite meydana getirerek Prematüre Over Yetmezliği fare modeli oluşturmayı hedeflediğimiz farelerin ovaryum dokularını değerlendirdiğimizde, ovaryumun korteks kısmında foliküler gelişimin farklı aşamalarındaki folikülleri belirledik. Ancak gelişen foliküllerin sayısının dormant olarak bekleyen, gelişimin erken aşamasındaki primordiyal ve primer foliküllerden daha fazla olduğunu gözlemledik. Gelişen folikülleri incelediğimizde folikül içerisinde yer alan oositlerin sitoplazma ve zona pellusidalarında kontrole kıyasla bozulmalar gözlemledik. Çekirdeklerini incelediğimizde mayotik bölünmede hataların olduğunu ve bazı oositlerin profaz 1 (P1) aşamasında olmadıklarını gözlemledik. Foliküllerde yer alan granuloza hücrelerinde gerek mitozun ve gerekse apoptozun kontrol grubu ile karşılaştırıldığında aktive olduğunu gözlemledik. Atretik foliküllerde kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda DMBA grubunda artış belirlemedik. Ancak foliküler gelişimin her aşamasında atreziye giden foliküllerin olduğunu belirledik (Şekil 3 A-D).

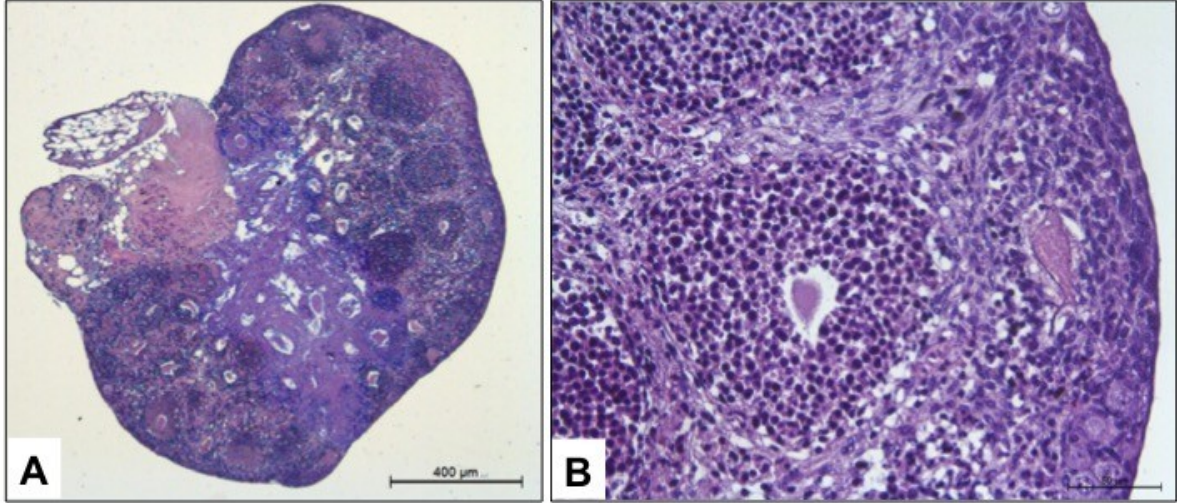


Şekil 3. In vivo DMBA grubu ovaryum. **A**, Ovaryumun genel görünümü; **B**, Antral folikül. Folikül içerisinde antruma komşu olan çok sayıdaki granuloza hücrelerinin koyu mavi çekirdekleri ile apoptoza gittiği izlenmektedir. **C**, Oosit çekirdeğinde bozulmaların meydana

geldiği (daire içerisine alınan alan) bir antral folikül. **D**, Oosit çekirdeğinde bozulmaların meydana geldiği (siyah ok) bir sekonder folikül (A,10X; B-D, 40X).

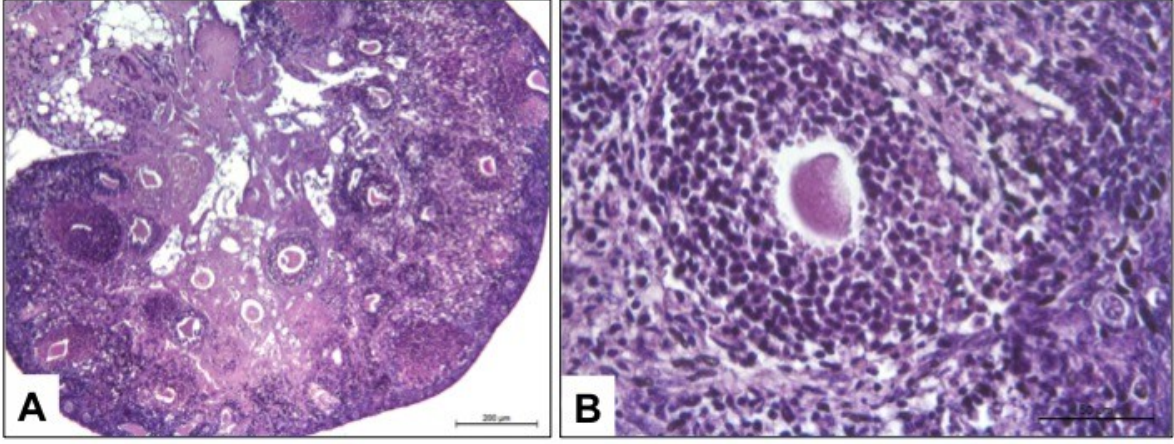
B- In Vitro Deney Gruplarının Morfolojik Olarak Değerlendirilmesi

Postnatal 28 günlük fare ovaryumlarının diseke edildikten sonra 4 gün boyunca hiçbir işlem yapılmadan kültüre edildiği kontrol grubunda, foliküler gelişimin primordiyal, primer, sekonder ve erken antral aşamasında olan foliküller belirlendi. Folikülleri incelediğimizde granuloza hücrelerinin sağlıklı bir morfolojide olduklarını, etraflarında teka hücre tabakasının geliştiğini, ovaryumun genel olarak damarlanmasının normal olduğunu belirledik. Foliküllerde bulunan oositler incelendiğinde, sitoplazmik olarak normal görünümde oldukları ve çekirdeklerinin de normal görünümde olduklarını gözlemledik (Şekil 4 A ve B).



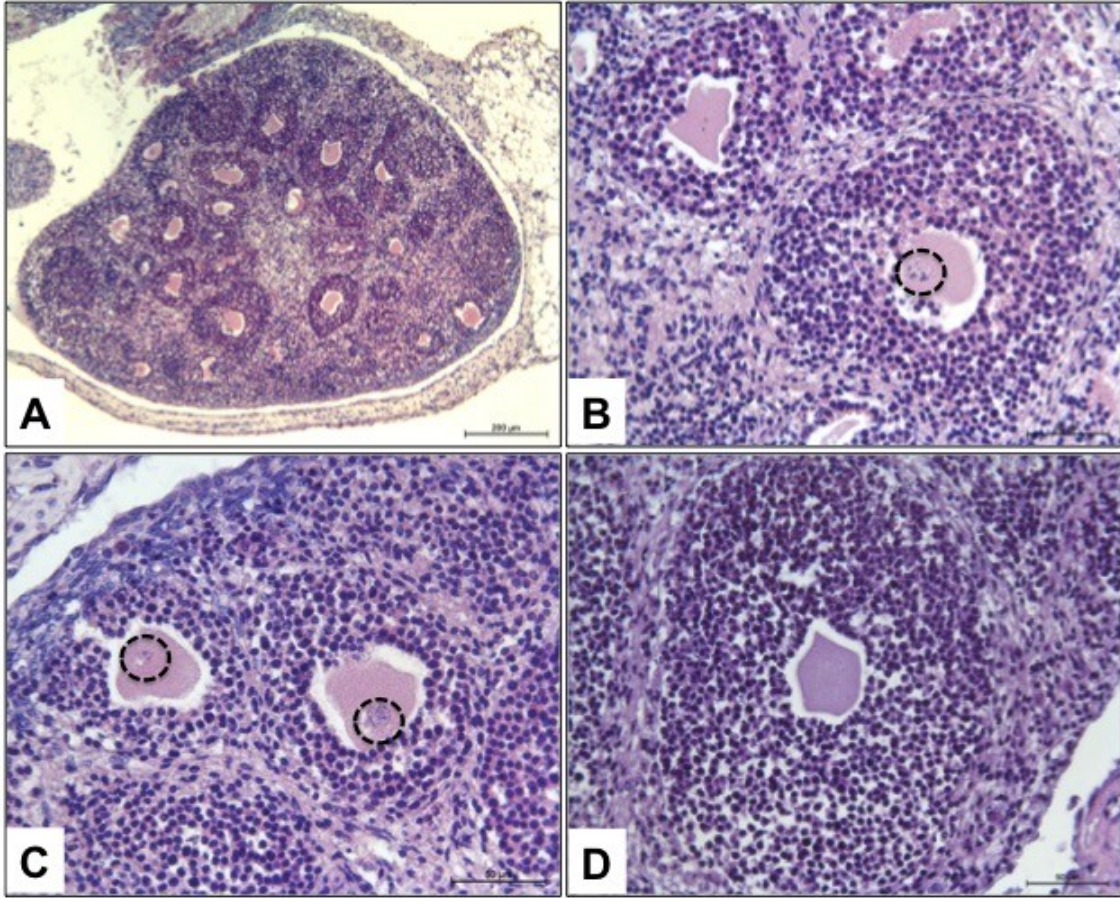
Şekil 4. In vitro kontrol grubu ovaryum. **A**, Ovaryumun genel görünümü; **B**, Solda sağlıklı bir sekonder folikül, sağda ise sağlıklı bir gelişim göstermeyen bir sekonder folikül izlenmektedir (A,10X; B, 40X)

Postnatal 28 günlük ovaryumların 4 gün boyunca doku kültürü ortamına 0.01% aseton içeren medyum ile inkübe edildiği çözgen grubunda kontrol grubu ile paralel bulgular elde edildi (Şekil 5 A ve B).



Şekil 5. In vitro çözgen grubu ovaryum. **A**, Ovaryumun genel görünümü; **B**, Sağlıklı bir sekonder folikül, sağ alt köşede ise primordiyal foliküller izlenmektedir (A,10X; B, 40X).

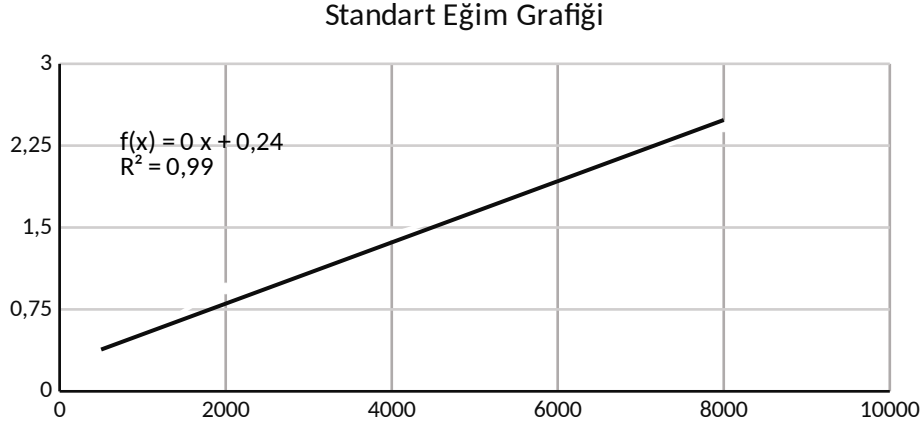
Postnatal 28 günlük farelerin izole edilen ovaryumlarının 4 gün boyunca 50nM DMBA ile inkübe edildiği grupta, foliküler gelişimin primordiyal, primer, sekonder ve erken antral aşamasında olan folikülleri belirledik. Folikülleri incelediğimizde granuloza hücrelerinin genel olarak sağlıklı bir morfolojide olduklarını, etraflarında teka hücre tabakasının geliştiğini, ovaryumun genel olarak damarlanmasının normal olduğunu belirledik. Foliküllerde bulunan oositler incelendiğinde, bazı oositlerin sitoplazmik görünümünün bozulduğunu ve çekirdeklerinin de normal görünümde olmadıklarını, mayoz bölünmede sorunlar olduğunu belirledik (Şekil 6 A ve B).



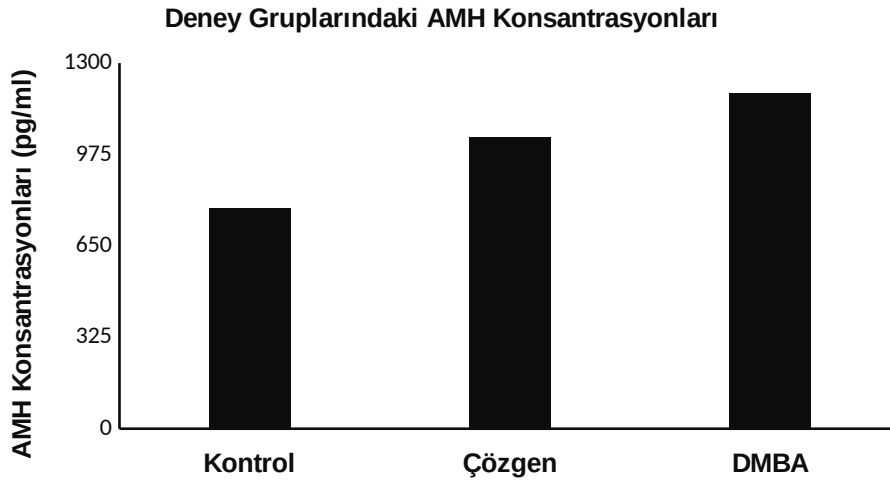
Şekil 6. In vitro DMBA grubu ovaryum. **A**, Ovaryumun genel görünümü; **B-C** Genel olarak sağlıklı bir görünüm sergileyen sekonder foliküller izlenmektedir. Oositlerin çekirdeklerinin normal görünümde olmadıkları, mayoz bölünmede sorunlar olduğunu izlenmektedir (siyah daire) (A,10X; B-D, 40X).

4.2 Elisa Yöntemi Bulguları

Standartların ölçümleri yapıldığında aşağıda verilen standart eğim grafiği (Grafik 1) elde edilmiştir. Standartlar ile deney gruplarını karşılaştırdığımızda deney gruplarındaki AMH konsantrasyonu Grafik 2'de gösterilmiştir (Grafik 2).



Şekil 7. AMH için standart değerlerin eğrisi.



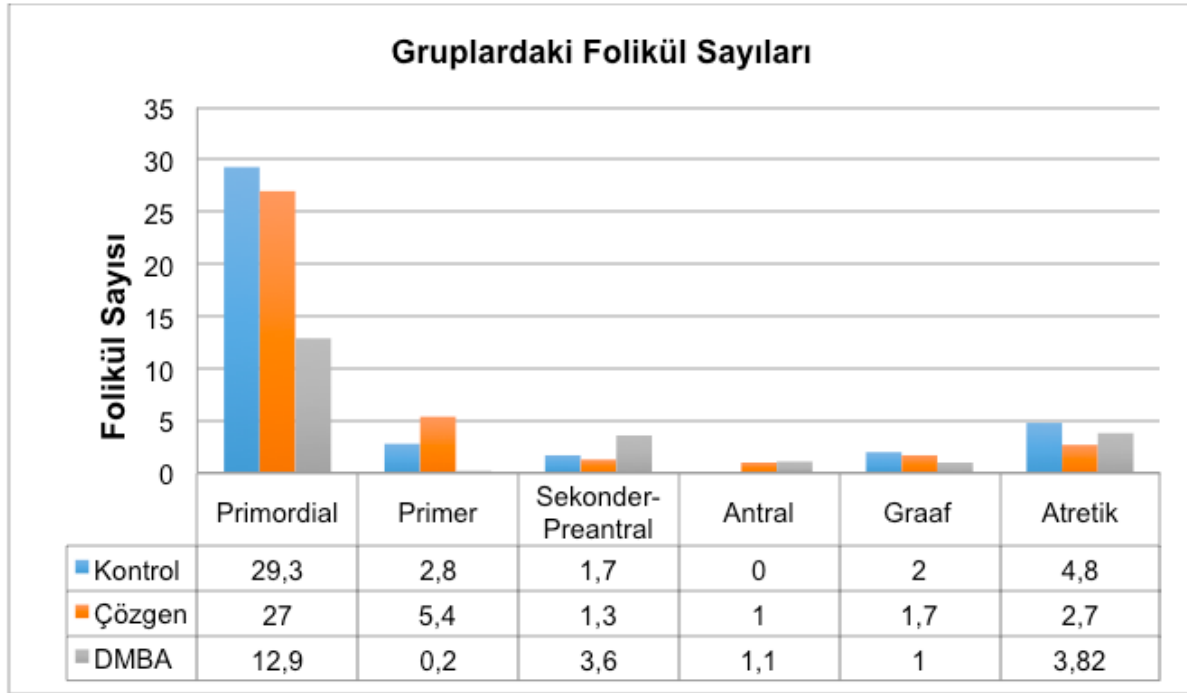
Şekil 8. Deney gruplarında AMH seviyesinin gösterilmesi.

DMBA uygulaması yapılarak ovotoksisite meydana gelen ve Prematüre Over Yetmezliği deney modelini oluşturduğumuz DMBA grubundan alınan serumlardaki AMH seviyesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, AMH seviyesinin DMBA grubunda anlamlı olarak arttığını belirledik. Bu sonuç DMBA indüklü ovotoksisite ile erken primordiyal folikül aktivasyonunun gerçekleştiğini doğrulamaktadır.

4.3 Folikül Sayımı Bulguları

Anti Müllarian Hormonu, foliküler gelişim sürecinde primer folikül ve erken antral folikül aşamasındaki foliküllerde bulunan granuloza hücreleri tarafından salgılanmaktadır ve primordiyal foliküllerin aktivasyonunda görev almaktadır. AMH hormonu seviyesinin azalması ovaryumda bulunan folikül havuzunun azalmasının bir göstergesidir.

DMBA uygulaması yapılan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında primordiyal ve primer folikül sayısının çarpıcı bir şekilde azaldığını belirledik. Buna ek olarak gelişmekte olan sekonder ve pre-antral aşamadaki foliküllerin sayısında kontrol ve çözgen grubuyla karşılaştırdığımızda artış olduğunu belirledik. Folikül sayıları Grafik 3'te verilmiştir.

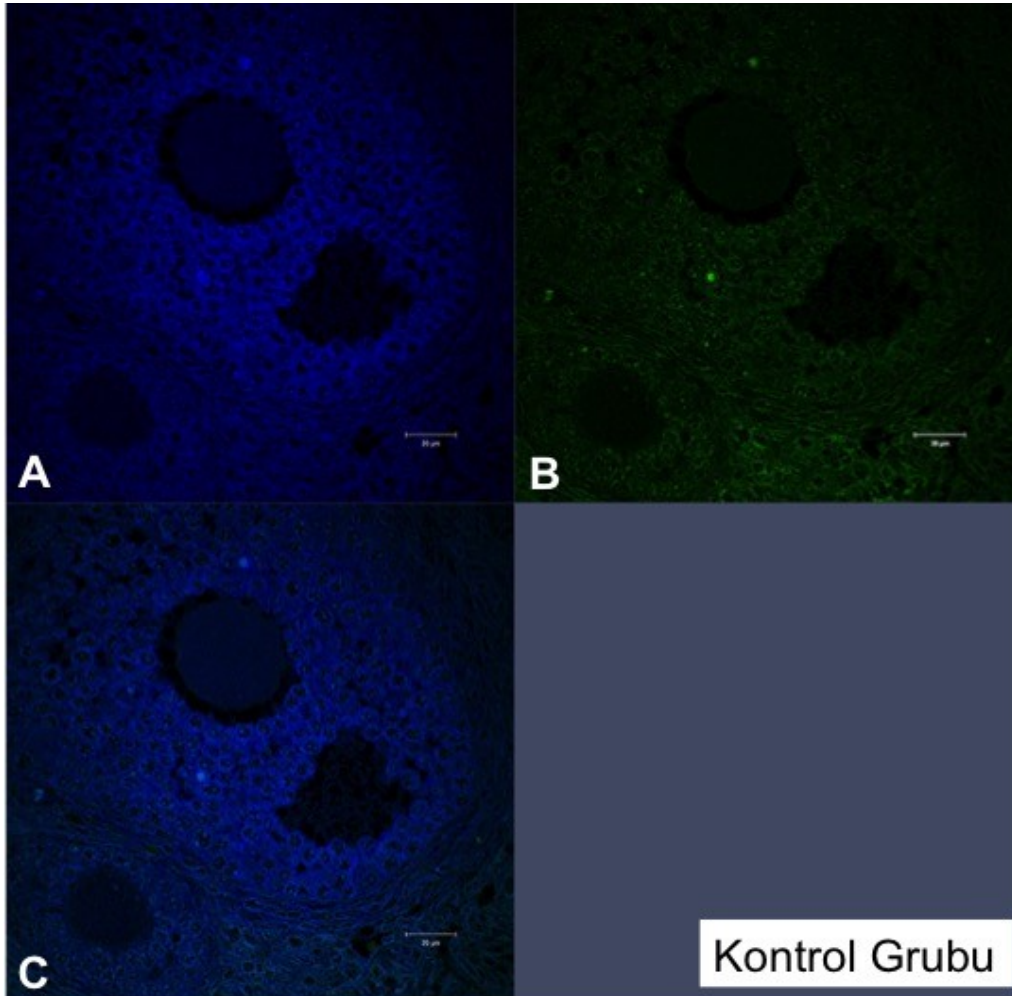


Şekil 9. Deney gruplarında primordiyal, primer, sekonder-preantral, antral, Graaf ve atretik foliküllerin sayılarının karşılaştırılması.

4.4 TUNEL Yöntemi Bulguları

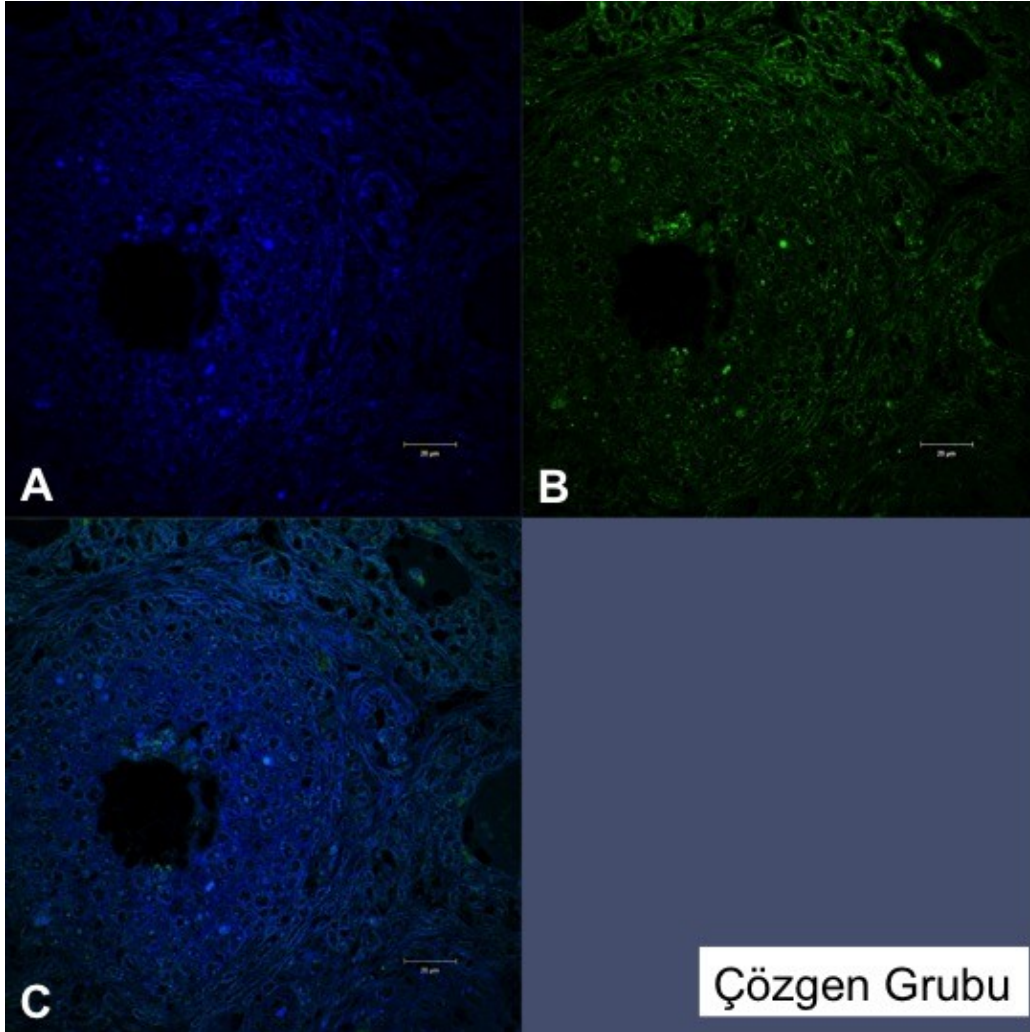
Alınan görüntüleri genel olarak değerlendirdiğimizde, DAPI boyamasından dolayı ovaryumda yer alan folikül hücrelerinin, oosit ve stromal alandaki hücrelerin çekirdekleri mavi ile boyanmış olarak izlenmektedir, TUNEL pozitif hücreler ise yeşil floresan ile parlak renkte boyanmış olarak izlenmektedir.

Kontrol grubu ovaryumda, özellikle antral foliküllerde antruma komşu olan granuloza hücrelerinin bazıları TUNEL pozitif olarak izlendi (yeşil floresan) (Şekil 7). Gelişimin daha erken aşamalarında olan primer ve sekonder foliküllerde yok denilecek kadar az TUNEL pozitif hücre izlendi.



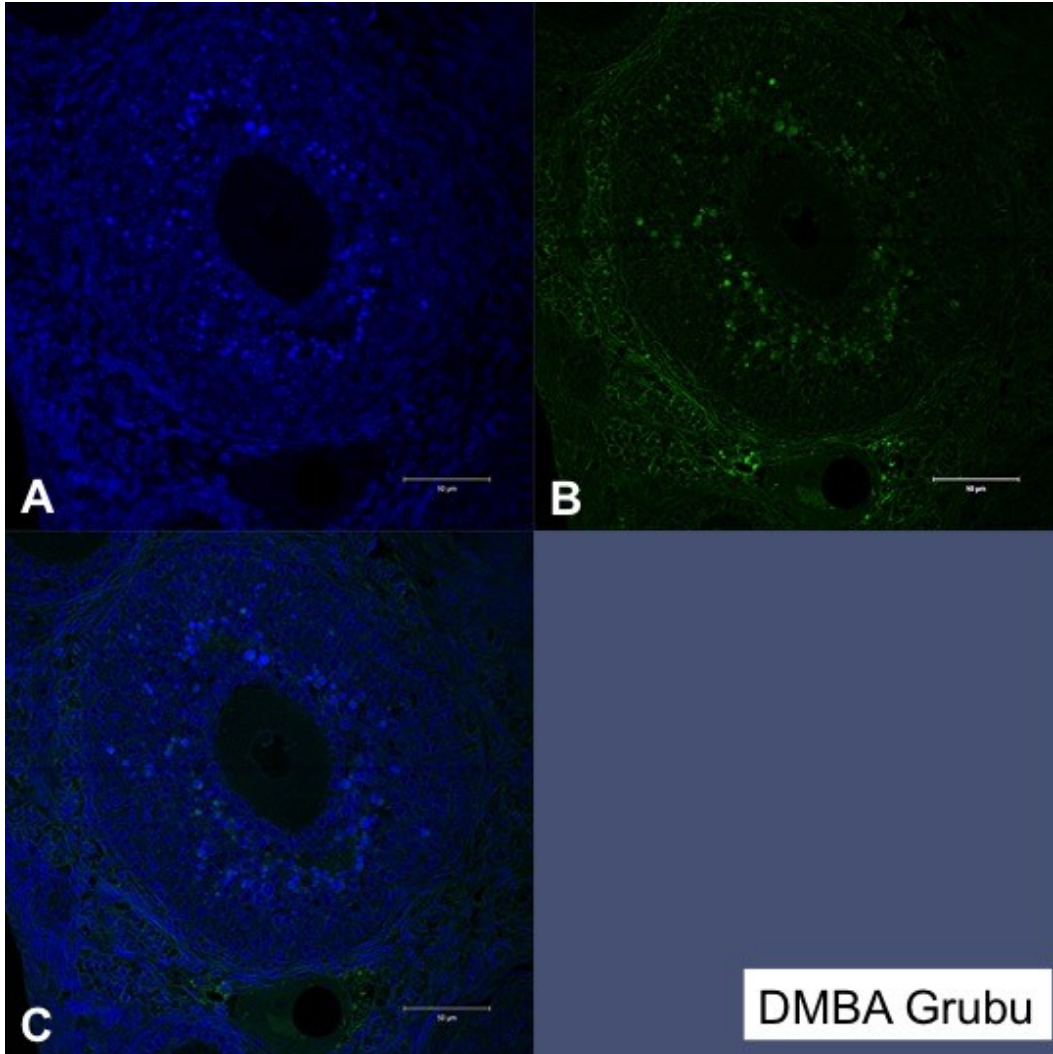
Şekil 10. Kontrol grubu ovaryumda TUNEL boyanması. **A**, DAPI; **B**, TUNEL boyanması; **C**, DAPI-TUNEL çakıştırılan görüntü izlenmektedir. Apoptoza giden hücreler parlak yeşil renkte izlenmektedir.

Çözgen grubunda elde ettiğimiz bulgular kontrol grubu ile paraleldi (Şekil 8).



Şekil 11. Çözgen grubu ovaryumda TUNEL boyanması. **A**, DAPI; **B**, TUNEL boyanması; **C**, DAPI-TUNEL çakıştırılan görüntü izlenmektedir. Apoptoza giden hücreler parlak yeşil renkte izlenmektedir.

DMBA verilen grubu değerlendirdiğimizde gelişmekte olan foliküllerde artan bir granuloza hücre apoptozu belirledik. Özellikle antral foliküllerde sadece antruma komşu olan antral granuloza hücrelerinin değil folikül duvarında bulunan mural granuloza hücrelerinin de apoptoza gittiklerini belirledik (Şekil 9).

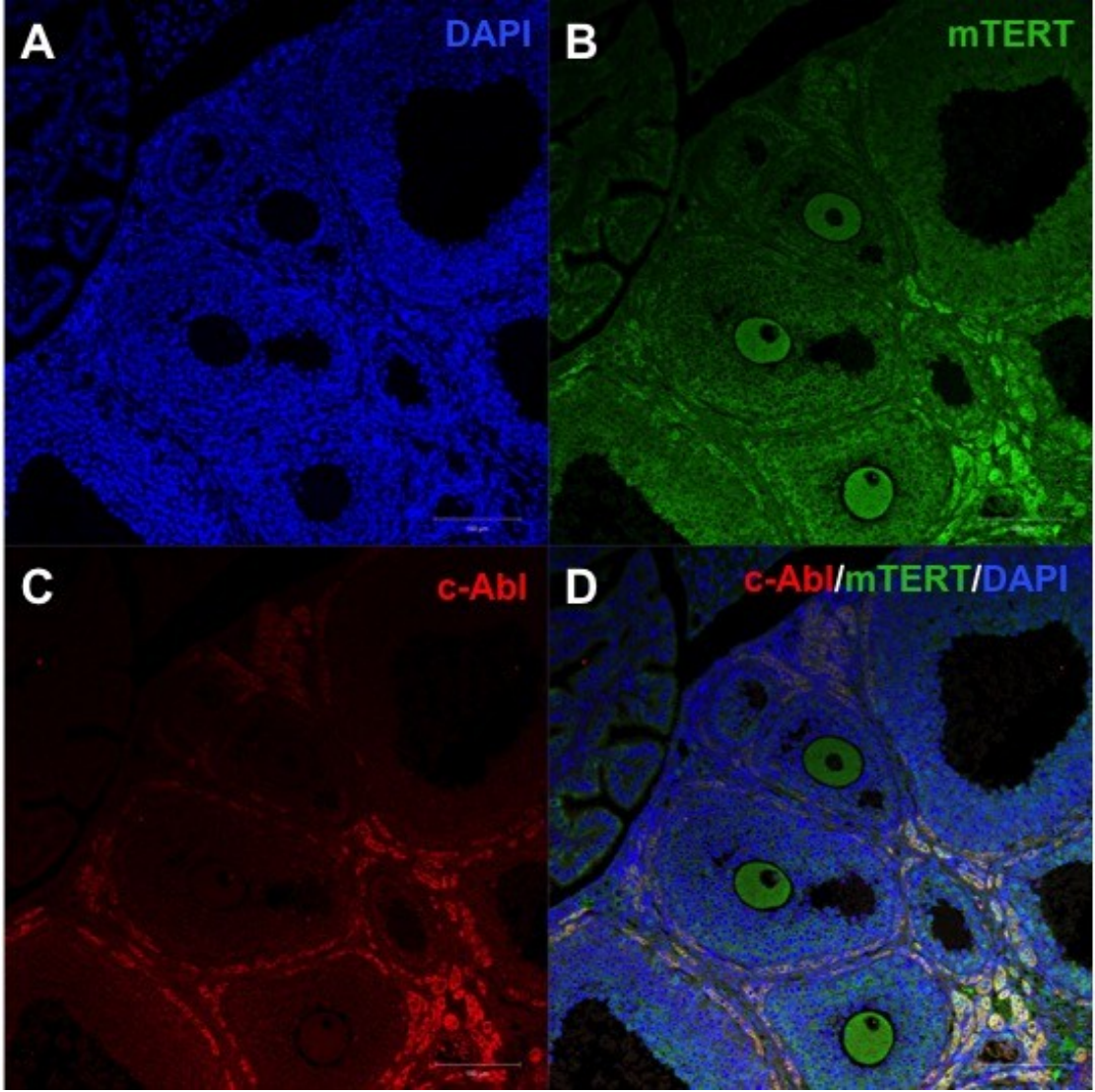


Şekil 12. DMBA grubu ovaryumda TUNEL boyanması. **A**, DAPI; **B**, TUNEL boyanması; **C**, DAPI-TUNEL çakıştırılan görüntü izlenmektedir. Apoptoza giden hücreler parlak yeşil renkte izlenmektedir. DMBA grubunda folikül içerisinde yer alan apoptotik granuloza hücrelerinin sayısının arttığı izlenmektedir.

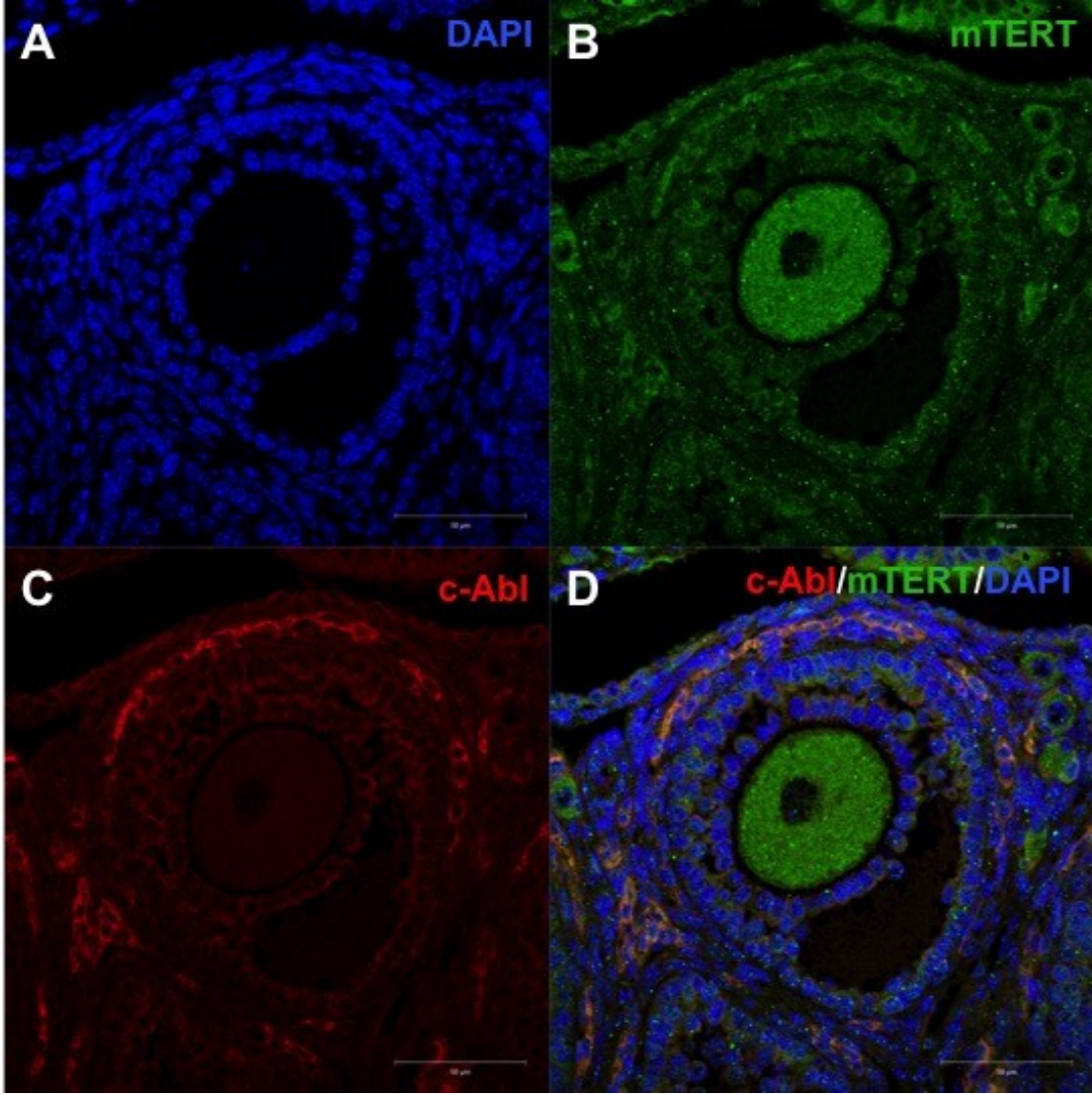
Folikül sayımında elde ettiğimiz sonuçlar, ELISA, morfolojik değerlendirme ve TUNEL bulgularımız birbirini destekler niteliktedir. Elde ettiğimiz ELISA, morfolojik değerlendirme, TUNEL ve folikül sayımı sonuçlarımızın tümünü birlikte değerlendirdiğimizde; hedeflediğimiz Prematüre Over Yetmezliği fare modelini ve ovaryumlarda oluşturmayı hedeflediğimiz ovotoksisiteyi gerek hormonal gerekse morfolojik bakımdan oluşturduğumuzu doğruladık.

4.5 İmmunofloresan Yöntemi Bulguları

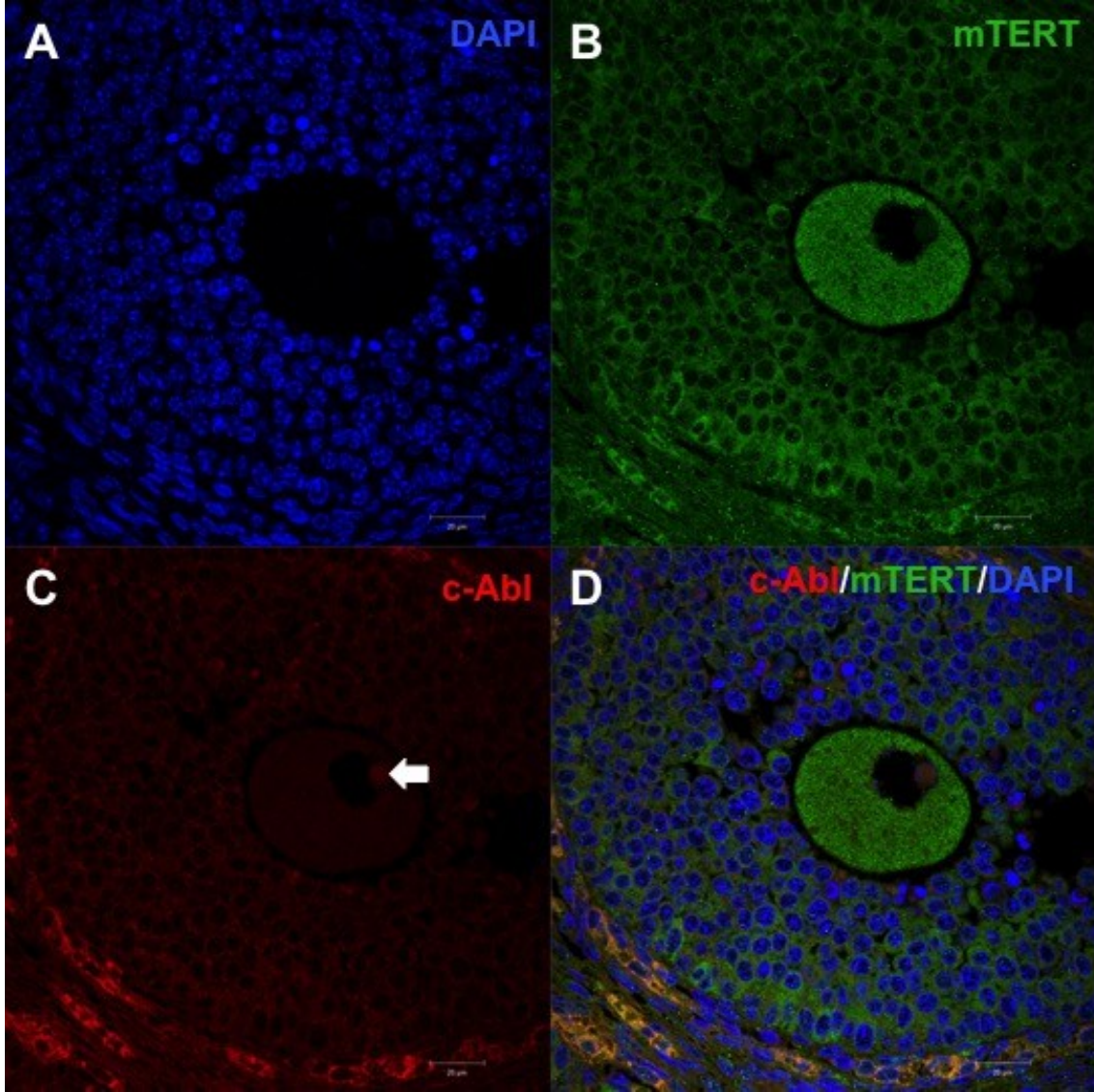
Genel olarak ovaryumda c-Abl ve mTERT immün boyanmalarını değerlendirdiğimizde, c-Abl'in oositin sitoplazmasında zayıf olarak ve çekirdekçisinde kuvvetli olarak lokalize olduğunu belirledik. c-Abl'in granuloza hücrelerinde sitoplazmik olarak lokalize olduğunu ancak bölünmekte olan ve apoptoza giden granuloza hücrelerinde çekirdekte lokalize olduğunu gözlemledik. mTERT'in oositin sitoplazmasında c-Abl'den daha yoğun olarak eksprese olduğunu, çekirdek ve çekirdekçikte herhangi bir immün boyanmanın olmadığını belirledik. Granuloza hücrelerinde ise sitoplazmik mTERT immün boyanması olduğunu izledik (Şekil 10-12).



Şekil 13. Kontrol grubu ovaryumda genel olarak c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması. **A,** DAPI; **B,** mTERT; **C,** c-Abl; **D,** c-Abl/mTERT/ DAPI çakıştırılan görüntü izlenmektedir.

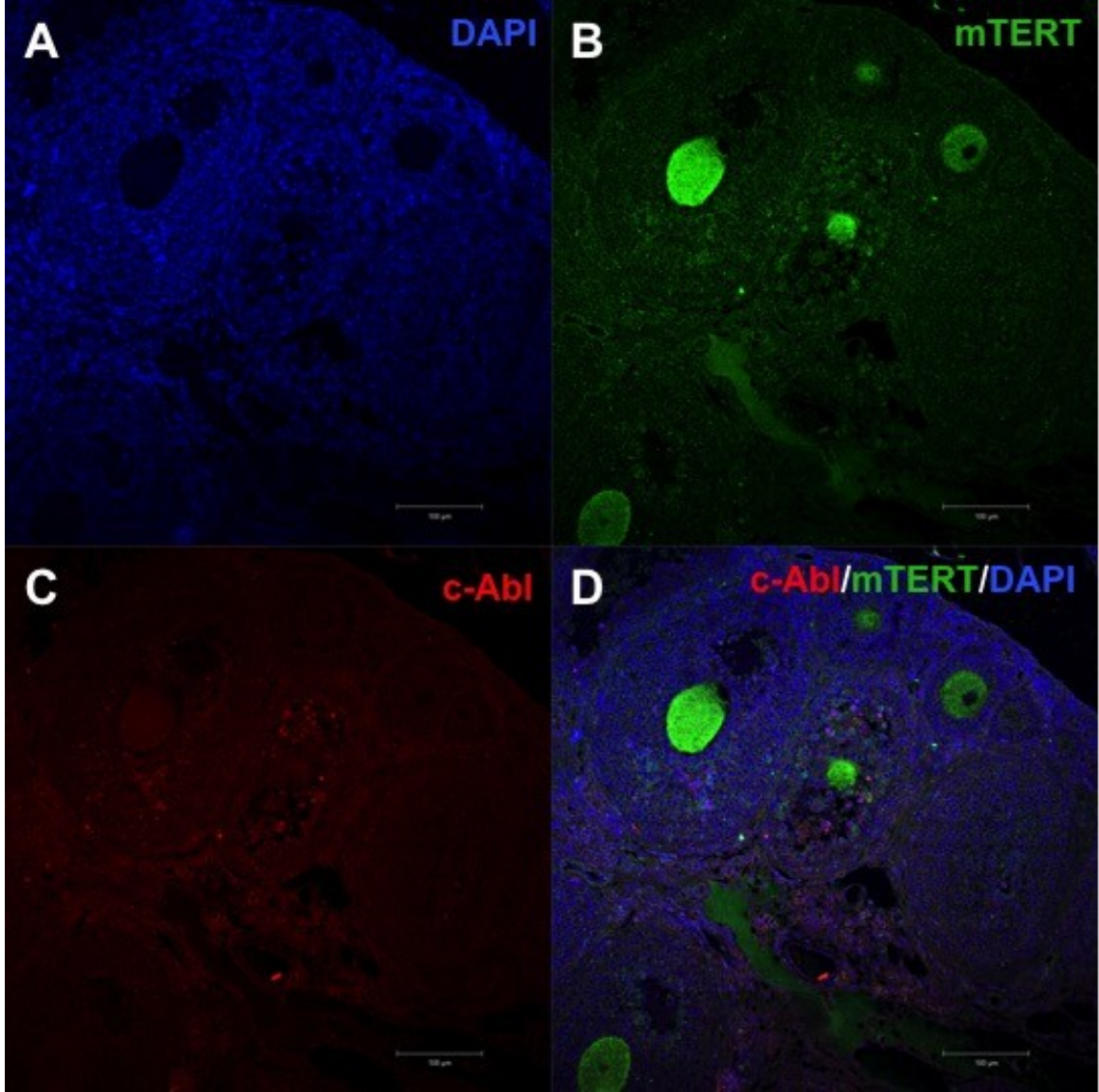


Şekil 14. Kontrol grubu ovaryumda erken antral aşamadaki folikülde c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması. **A**, DAPI; **B**, mTERT; **C**, c-Abl; **D**, c-Abl/mTERT/ DAPI çakıştırılan görüntü izlenmektedir.

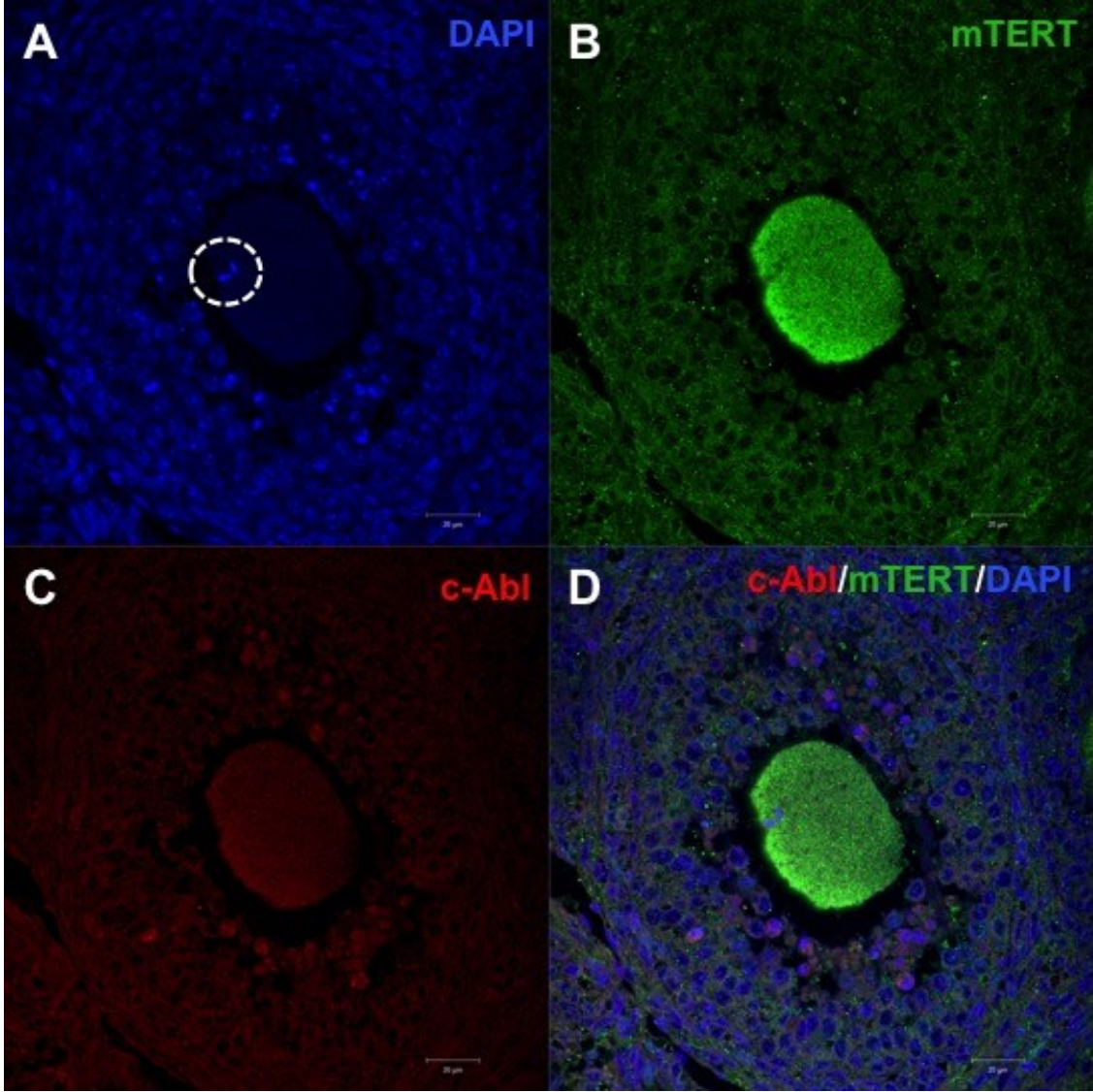


Şekil 15. Kontrol grubu ovaryumda antral aşamadaki folikülde c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması. **A**, DAPI; **B**, mTERT; **C**, c-Abl; **D**, c-Abl/mTERT/ DAPI çakıştırılan görüntü izlenmektedir. c-Abl immün boyanması apoptotik granuloza hücrelerinde ve oositin çekirdekçisinde de belirlenmiştir (beyaz ok).

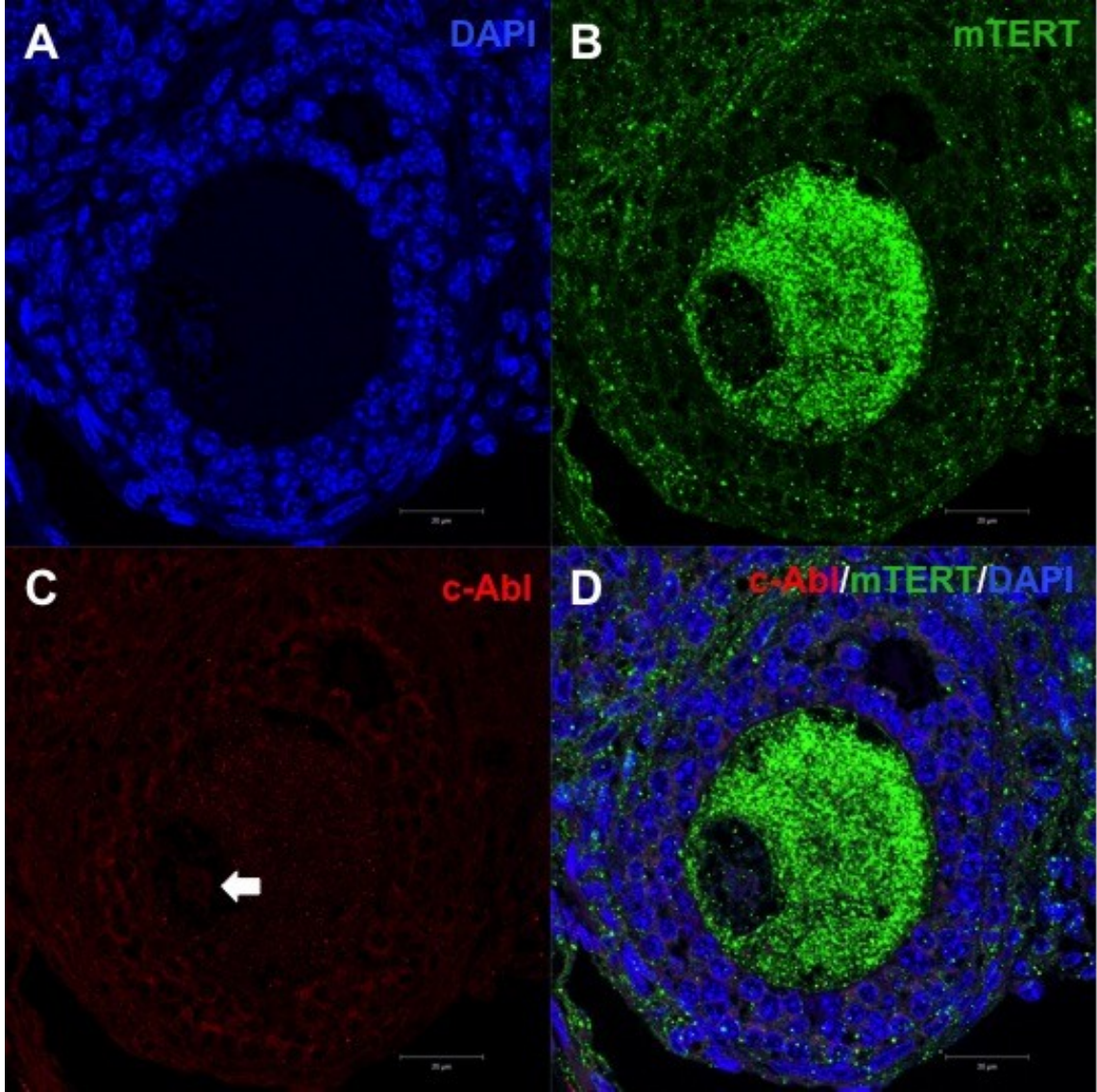
Deney gruplarını karşılaştırdığımızda DMBA uygulaması yaptığımız grupta c-Abl ve mTERT immün boyanmalarının kontrol grubu ile aynı boyanma örneğini gösterdiğini belirledik. Bunun dışında DMBA grubunda mTERT immün boyanmasının kontrol grubuna kıyasla daha yoğun olduğunu gözlemledik (Şekil 13-15).



Şekil 16. DMBA grubu ovaryumda genel olarak c-Abl-mTERT immüno Floresan boyanması. **A,** DAPI; **B,** mTERT; **C,** c-Abl; **D,** c-Abl/mTERT/ DAPI çakıştırılan görüntü izlenmektedir.



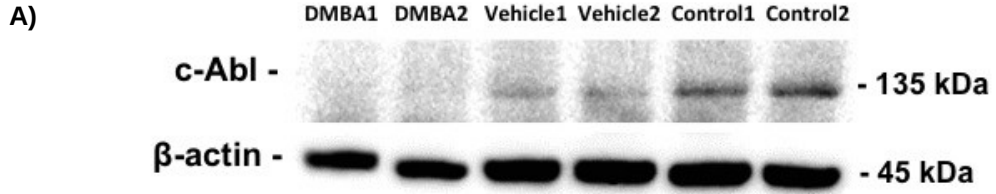
Şekil 17. DMBA grubu ovaryumda sekonder aşamadaki folikülde c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması. **A**, DAPI; **B**, mTERT; **C**, c-Abl; **D**, c-Abl/mTERT/ DAPI çakıştırılan görüntü izlenmektedir. c-Abl immün boyanması apoptotik granuloza hücrelerinde (beyaz daire) de gösterilmektedir. Oositin çekirdeğinde izlenen bozulma beyaz daire ile DAPI boyanmasında gösterilmiştir (A).



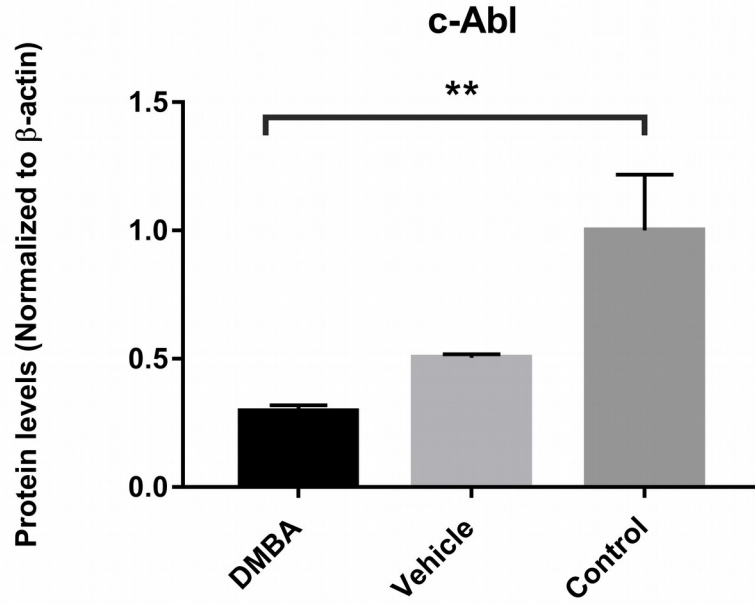
Şekil 18. DMBA grubu ovaryumda sekonder aşamadaki folikülde c-Abl-mTERT immünfloresan boyanması. **A**, DAPI; **B**, mTERT; **C**, c-Abl; **D**, c-Abl/mTERT/ DAPI çakıştırılan görüntü izlenmektedir. c-Abl immün boyanması oositin çekirdekçğinde de belirlenmiştir (beyaz ok).

4.6 Western blot Yöntemi Sonuçları

Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularıyla yaptığımız western blot deneylerimiz sonucunda, DMBA tedavisi uygulanarak prematüre over yetmezliği oluşturulan gruptan izole edilen ovaryum dokularında c-Abl ekspresyonunun azaldığını belirledik ($p < 0.05$) (Şekil 16 A ve B).



B)



Şekil 19. Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularında c-Abl protein ekspresyonu (A) ve analizi (B).

Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularıyla yaptığımız western blot

deneylemiz

sonucunda,

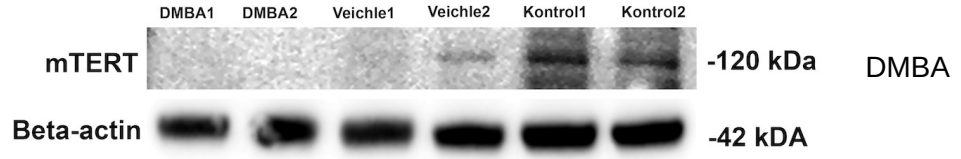
tedavisi

uygulanarak

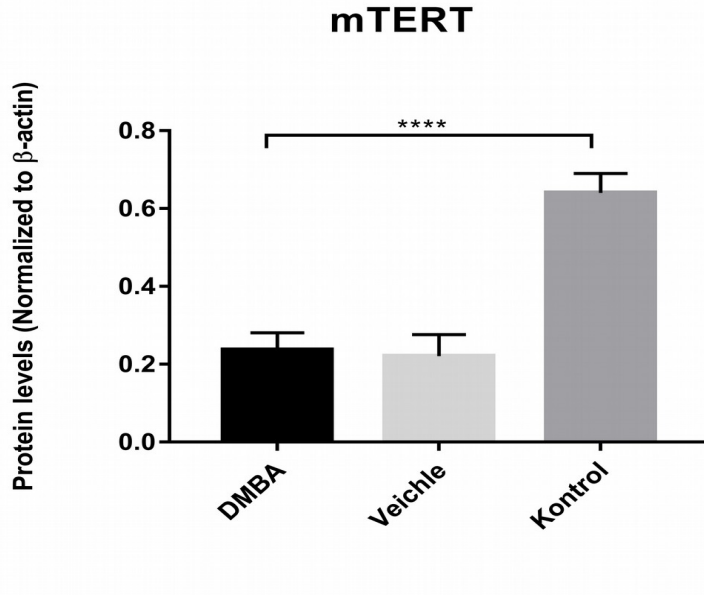
prematüre

over yetmezliği (POY) oluşturulan gruptan izole edilen ovaryum dokularında mTERT protein

ekspresyonunun azaldığını belirledik ($p < 0.05$) (Şekil 17A ve B).



A)



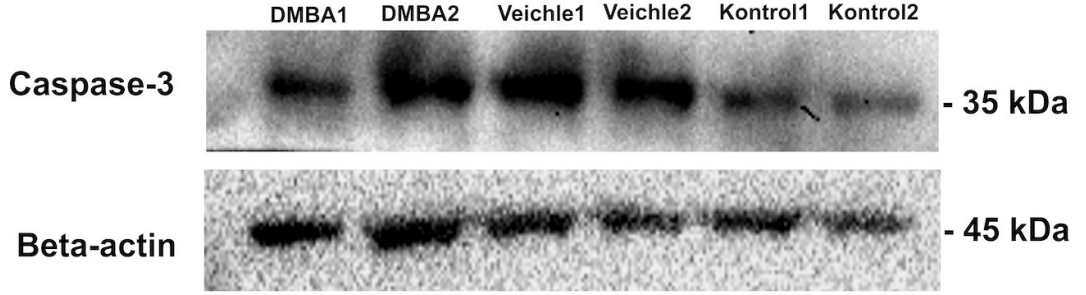
Şekil 20. Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum

dokularında mTERT protein ekspresyonu (A) ve analizi (B).

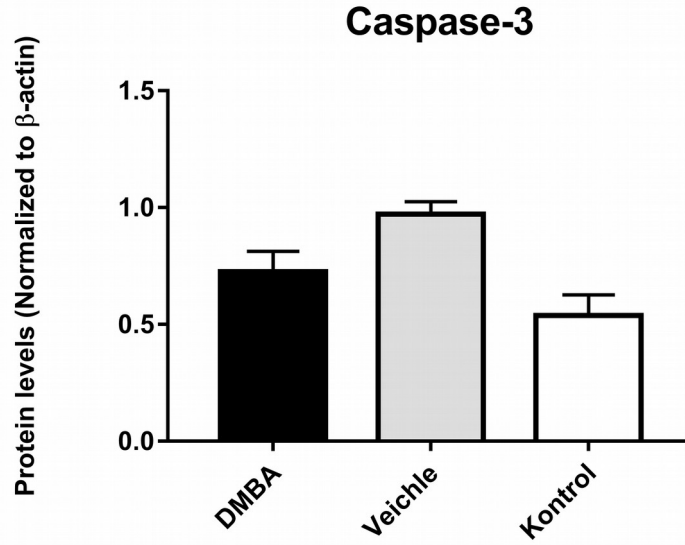
B)

Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularıyla yaptığımız western blot deneylerimiz sonucunda, DMBA tedavisi uygulanarak prematüre over yetmezliği (POY) oluşturulan gruptan izole edilen ovaryum dokularında Caspase3 protein ekspresyonunda değişim belirlenmedi (Şekil 18A ve B).

A)



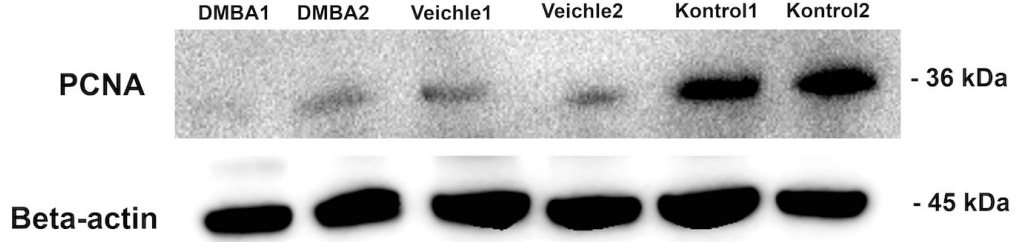
B)



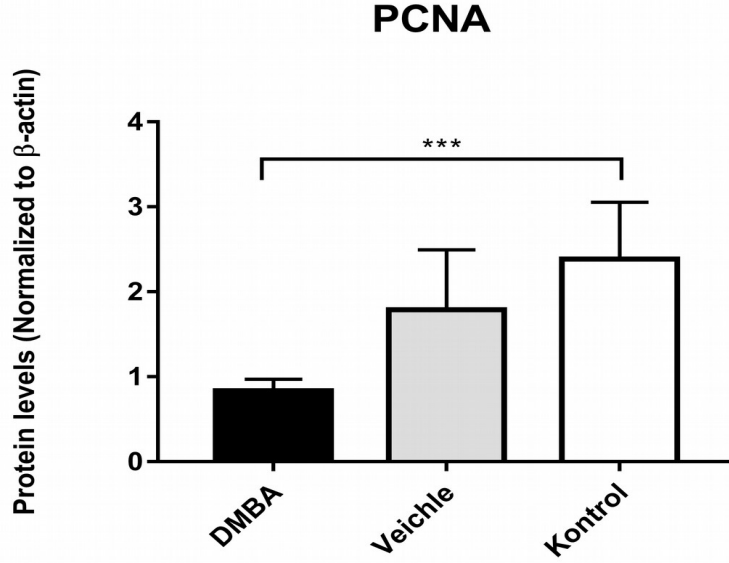
Şekil 21. Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularında Caspase3 protein ekspresyonu (A) ve analizi (B).

Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularıyla yaptığımız western blot deneylerimiz sonucunda, DMBA tedavisi uygulanarak prematüre over yetmezliği (POY) oluşturulan gruptan izole edilen ovaryum dokularında PCNA protein ekspresyonunda azalma belirlendi (Şekil 19 A ve B).

A)



B)



Şekil 22. Kontrol, çözgen ve DMBA uygulanan gruplardan izole edilen ovaryum dokularında PCNA protein ekspresyonu (A) ve analizi (B).

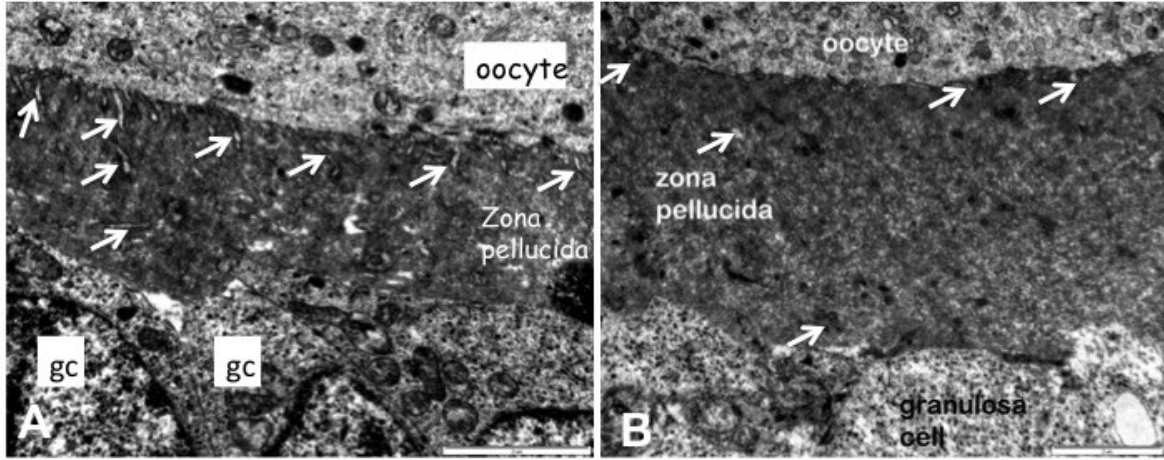
Çalışmamızda tüm gruplar için n=6 örnek kullanılmıştır ve deneyler 6 kez tekrar edilmiştir. Elde edilen western blot görüntüleri NIH ImageJ programı ve GraphPad Prism Software programı kullanılarak analiz edilmiştir. Protein analizi değerlendirmelerimiz sonucunda DMBA-indüklü ovotoksisite ile POY'de, folikül rezervinin hızlı bir şekilde azalmasında c-Abl ve mTERT'in önemli bir role sahip olabileceğini düşünmekteyiz.

4.7 Transmisyon Elektron Mikroskopi Bulguları

Kontrol, DMBA uygulanan ve çözgen gruplarından izole edilen ovaryum dokularının ultrastrüktürel olarak değerlendirilmesi amacıyla TEM yöntemi kullanılmıştır. Projemizin transmisyon elektron mikroskobik deneyleri sonucunda, kontrol grubu ile DMBA uygulanan gruptaki ovaryum dokuları aşağıda belirtilen kriterler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Çözgen grubu ile kontrol grubu arasında belirtilen kriterler açısından farklılık gözlenmemiştir.

a) Zona pellusida boyunca uzanan transzonal uzantılar

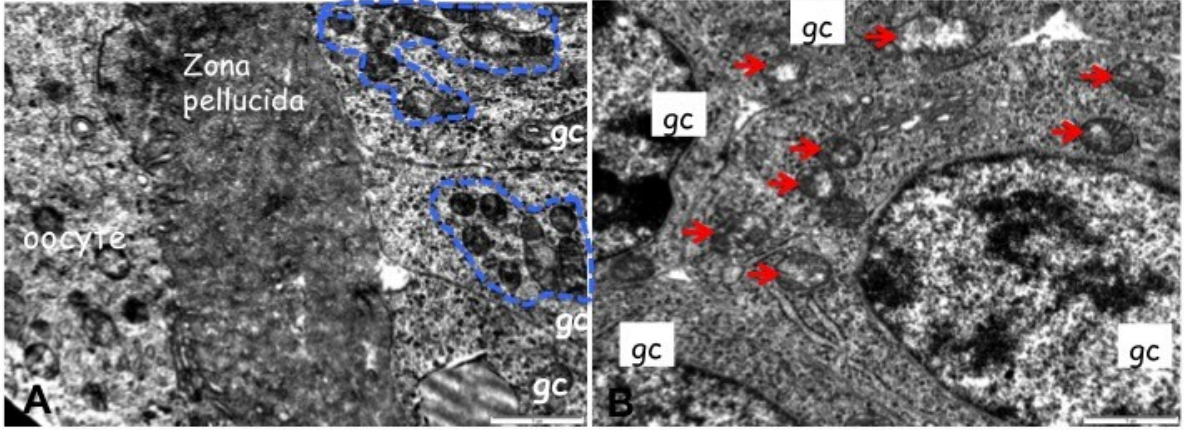
Transzonal uzantılar oosit ile granuloza hücreleri arasındaki iletişimde, oositin maturasyonunu tamamlamasında ve folikülün büyümesinde oldukça önemli bir role sahiptir. Kontrol grubunda oosit yüzeyinden kaynaklanan ve zona pellusida boyunca uzanarak granuloza hücrelerinde sonlanan çok sayıda transzonal uzantılar belirlenmiştir (Şekil 18A). Ancak DMBA uygulanan POY grubunda transzonal uzantıların sayısının azaldığını ve boylarının kısaldığını belirlenmiştir (Şekil 18B).



Şekil 23. Transzonal uzantıların değerlendirilmesi. **A**, Kontrol grubunda transzonal uzantılar (beyaz ok). **B**, DMBA tedavisi uygulanan POY grubunda sayıca azalan ve daha kısa uzunluğa sahip transzonal uzantılar izleniyor.

b) Granuloza hücrelerinin sitoplazmasında yaygın olarak bulunan mitokondriler

Kontrol grubu ovaryumda folikülleri oluşturan granuloza hücrelerinin tübüler kristallı mitokondrilere sahip olduğunu belirledik (Şekil 19A). Ancak DMBA uygulanan POY grubunda foliküllerdeki granuloza hücrelerinin mitokondrilerinde hasar olduğunu, krista yapısını çoğunlukla kaybettiklerini belirledik (Şekil 19B).

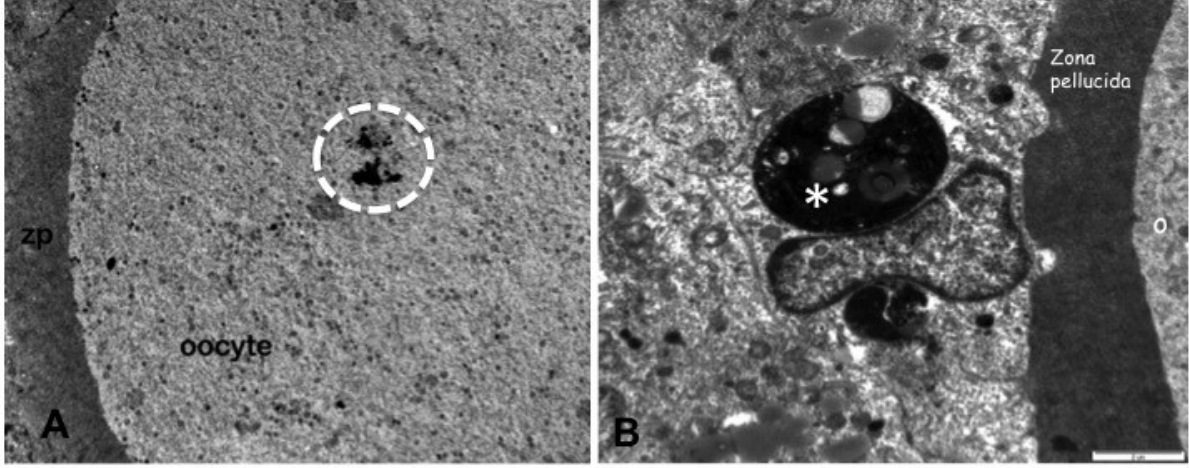


Şekil 24. Mitokondri yapısının değerlendirilmesi. **A**, Kontrol grubundan alınan ovaryum dokularında granuloza hücrelerinde tübüler kristallı normal morfolojide izlenen çok sayıda mitokondri. **B**, DMBA tedavisi uygulanan POY grubunda granuloza hücrelerinin mitokondrilerindeki hasar izleniyor. gc: Granuloza hücresi, mavi çizgi ile sınırlanmış alan: tübüler kristallı mitokondriler, kırmızı oklar: hasarlı mitokondriler.

c)

Oosit çekirdeği ve apoptotik granuloza hücreleri

DMBA uygulanan POY grubunda foliküllerdeki oositlerin bir kısmının profaz 1 (PI) aşamasında olmadığını, mayoz bölünmelerine devam ederek metafaz 1 (MI) aşamasına ulaştıklarını belirledik (Şekil 20A). Bunun yanısıra kontrol grubu ile karşılaştırdığımızda foliküllerde daha fazla apoptotik granuloza hücreleri olduğunu gözlemledik (Şekil 20B).

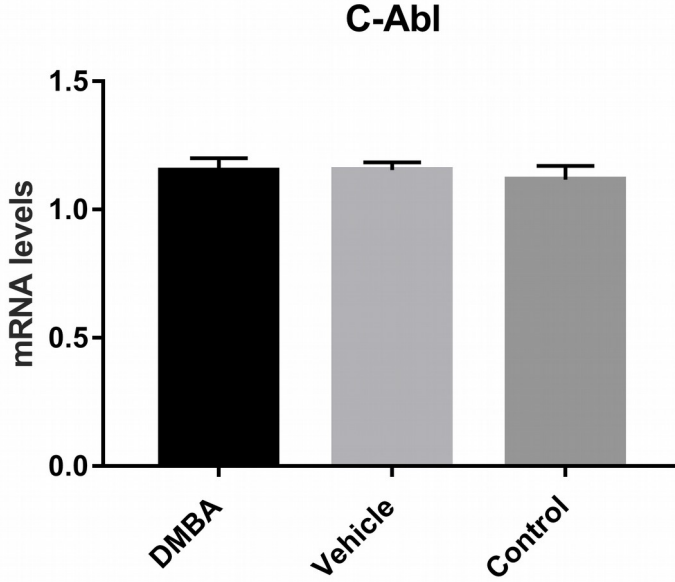


Şekil 25. Oosit yapısının değerlendirilmesi. **A**, DMBA tedavisi uygulanan POY grubunda metafaz 1 (MI) aşamasındaki bir oosit. **B**, Oositi çevrelen apoptotik bir granuloza hücresi. Beyaz kesikli çizgi: kromatinler, (*): apoptotik granuloza hücresi, o: oosit, zp: zona pellusida.

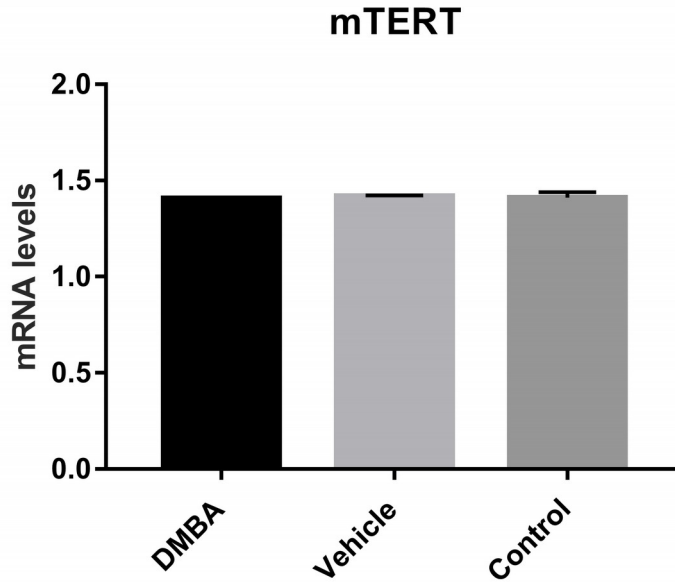
TEM ile elde edilen bulgular DMBA maruziyeti sonucu oluşan ovotoksisite ile POY'de oositin nükleer maturasyonunun bozulduğunu, buna ek olarak oosit ile granuloza hücreleri arasındaki fiziksel iletişimin bozulduğunu ve granuloza hücrelerinin mitokondriyel krista hasarına uğradığını göstermektedir.

4.8 qRT-PCR Yöntemi Sonuçları

Aşağıdaki şekillerde deney gruplarından elde edilen ovaryum dokularında *c-Abl* ve *mTERT* ekspresyonları izlenmektedir. Genel olarak DMBA uygulamasının fare ovaryumunda *c-Abl* ve *mTERT* ekspresyonları üzerindeki etkisini değerlendirdiğimizde gruplar arasında mRNA düzeyinde bir farklılık belirlenmemiştir.



Şekil 26. DMBA uygulamasının *c-Abl* ekspresyonu üzerindeki etkisi.



Şekil 27. DMBA uygulamasının *mTERT* için ekspresyonu üzerindeki etkisi.

5. TARTIŞMA/SONUÇ

Bir polisiklik aromatik hidrokarbon olan DMBA, ovaryum dokusu da dahil olmak üzere çok sayıda doku üzerinde etkili olan çevresel bir karsinojendir (Hoyer vd. 2009). Karsinojenik etkisine ek olarak günlük yaşantımızda farkında olmadan maruz kaldığımız DMBA kadınlarda özellikle ovaryumda yıkıcı bir etki göstererek normal folikülogenez sürecini bozmakta, folikül popülasyonunun azalmasına ve POY'ne neden olmaktadır (Mattison ve Nightingale 1980). Yapılan araştırmalar ile günümüzde en fazla maruziyetin sigara içen kadınlarda olduğu, düzenli sigara içen kişilerde fertilitenin azalması ve/ya da erken menopoz gibi sorunlar ile karşılaşıldığı ortaya koyulmuştur (Harlow ve Signorello 2000; Jick 1979; Mattison vd. 1983), (Jurisicova vd. 2007).

Ovaryumdaki rezervin hızlı bir şekilde tükenerek kadınların üreme hayatlarının kılmasına neden olan DMBA'nın bu sonuçlara hangi yolları kullanılarak ulaştığına ilişkin henüz net bir çalışma yoktur. Biz projemizde foliküler gelişimde önemli bir role sahip olan c-Abl ve mTERT'in DMBA indüklü ovotoksisitenin mekanizmasının ortaya koyulmasında önemli olabileceğini düşündük. Buradan yola çıkarak bir hafta boyunca DMBA uygulaması yaptığımız farelerin ovaryum dokularında c-Abl ve mTERT ekspresyonlarını göstermeyi amaçladık. Buna ek olarak yapılan çalışmalarda, DMBA'nın folikül içerisinde nasıl bir etki göstererek oosit ve granuloza hücreleri arasındaki ilişkiyi bozduğuna dair de bir bilgi bulunmamaktadır. Bu nedenle transmisyon elektron mikroskobu ile ultrastrüktürel düzeyde oosit ile granuloza hücresi arasındaki ilişkiyi de göstermeyi hedefledik.

Yapılan çalışmalar DMBA'nın primordiyal folikül aktivasyonunu ve gelişen foliküllerin atreziye gitmesini tetiklediğini ve sonuç olarak POY'a neden olduğunu göstermektedir (Sobinoff vd. 2011; Sobinoff vd. 2010). Diğer polisiklik hidrokarbonlar gibi DMBA da prematüre primordiyal folikül aktivasyonuna neden olarak oksidatif stress yoluyla oositin füzibilitesini bozabilmektedir (Sobinoff vd. 2012). Elde ettiğimiz verilerde DMBA uygulanan ovaryumlarda primordiyal folikül sayısının azaldığını, buna karşın primer ve sekonder folikül sayısının arttığını belirledik. Buna paralel olarak serum AMH seviyelerinde de artış tespit ettik. Ancak gelişen foliküllerin yapısını değerlendirdiğimizde, oositin gerek nükleer gerekse sitoplazmik maturasyonunda hatalar olduğunu gözlemledik. Bu bulgularımızı literatür ile desteklediğimizde DMBA'nın prematüre primordiyal folikül aktivasyonuna neden olarak gelişmekte olan folikül sayısının ve AMH seviyesinin DMBA tedavisi uygulanan ovaryum dokularında arttığını düşünmekteyiz.



TEM bulgularımızı değerlendirdiğimizde, DMBA uygulanan POY grubunda transzonal uzantıların sayısının azaldığını ve boylarının kısalacağını, granuloza hücrelerinin mitokondrilerinde hasar olduğunu, krista yapısını çoğunlukla kaybettiklerini belirledik. Buna ek olarak DMBA grubunda gelişen foliküllerde çok fazla miktarda apoptotik granuloza hücresi olduğunu ve oositin mayotik bölünmesinde hatalar meydana geldiğini, profaz I'den metafaz I aşamasına ilerlediğini gözlemledik. Bu bulgularımız da DMBA sonucu oluşan prematüre folikül aktivasyonunun, gerek oosit maturasyonunu gerekse granuloza hücreleri ile oosit arasındaki iletişimi olumsuz bir şekilde etkileyerek foliküler gelişimi başarısızlığa uğrattığını, foliküler atreziyi tetikleyerek primordiyal folikül rezervinin azalmasına neden olduğunu göstermektedir. Buradan yola çıkarak, DMBA'nın oositin fonksiyonunun bozulmasını indükleyerek oosit kalitesini olumsuz bir şekilde etkileyebileceğini ve fertilizasyonda başarısızlık izlenebileceğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla ileride yapılacak çalışmalarda reaktif oksijen türlerine bakılmasının oositin metabolik fonksiyonlarının nasıl değiştiğine ilişkin bilgi edinilmesinde faydalı olacağını düşünmekteyiz.

Epidermal Büyüme Faktörü, küçük çaplı foliküllerdeki granuloza hücrelerinde telomeraz aktivitesini uyarmaktadır (Tomanek vd. 2008). Bu durum bize özellikle küçük ve hızlı büyüyen foliküllerde granuloza hücrelerinin proliferasyonu için telomeraz aktivitesine ve telomerazın uzamasına ihtiyaç olduğunu göstermektedir (Liu ve Li 2010). Yapılan bir çalışmada östrojenin TERT geni promotör bölgesi üzerinde direkt etki göstererek ve MYC geni üzerinden indirekt olarak TERT geni ekspresyonunu pozitif yönde düzenlediği belirlenmiştir (Liu ve Li 2010). Buna ek olarak, östrojen reseptörü 1 ve 2'nin kanser ve sağlıklı farklılaşmış hücrelerde TERT geninin transkripsiyonunun düzenlenmesine katıldığı gösterilmiştir (Grasselli vd. 2008; Kondoh vd. 2007). Çalışmamızda DMBA indüklü ovotoksisite ve POY'de prematüre folikül aktivasyonu sonucu sekonder aşamadaki foliküllerin sayısında artma ve mTERT ekspresyonunda azalma belirledik. Yapılan çalışmalar POY olan kadınlarda, periferel kandan izole edilen lökositlerde ve granuloza hücrelerinde telomerazın kısa ve telomeraz aktivitesinin az olduğunu göstermektedir (Butts vd. 2009; Xu vd. 2017). Ayrıca genç kadınlarda granuloza hücrelerinin telomerik kısalması ve azalmış telomeraz aktivitesinin over yetmezliğine neden olduğu gösterilmiştir (Butts vd. 2009). Bu literatür bilgileri verilerimizi doğrular niteliktedir. Ancak telomeraz, germ hücre gelişimi ve neoplastik immortalizasyon gözönünde bulundurulduğunda iki ucu keskin bir bıçak gibidir. Prolifere olan granuloza hücrelerinin DMBA etkisi ile ilerleyen zamanlarda nasıl bir değişime uğrayacağını daha uzun süreli DMBA maruziyeti ile gözlemlemek faydalı olacaktır.

c-Abl mayotik ve mitotik hücrelerde DNA kırıklarının onarılmasını sağlayarak genomik integritenin korunmasında önemli bir göreve sahiptir (Kharbanda vd. 1998). Apoptotik kaskaddaki bu faktörlerin her biri ovaryum üzerindeki sitotoksik tedavilerin etkilerini bloklamak için potansiyel bir hedef sunmaktadır. Ancak DNA hasarı olan oositteki apoptozun bloklanması, DNA tamir moleküllerinin tamir kapasitesinin ardında hücrelerin hayatta kalmasına izin veren potansiyel bir endişe de oluşturmaktadır (Gonfloni 2010). Bir hafta DMBA tedavisi uygulanan ovaryum dokularında DMBA'nın c-Abl'i inhibe ederek ekspresyonunu azalttığını belirledik. DMBA'nın prematüre folikül aktivasyonuna neden olması ve bunun sonucu olarak sekonder aşamadaki foliküllerin sayısında artış belirlenmesi, bize DMBA'nın c-Abl'i baskılamasından dolayı oosit ve granuloza hücrelerinin tamir mekanizmasından kurtulduklarını ve alternatif bir yolak seçerek gelişimlerine devam edebileceklerini göstermektedir. Gruplar arasındaki Caspase3 ekspresyonunda anlamlı bir değişim izlenmemesi de bu bulgumuzu destekler niteliktedir. Yapılan bir çalışmada DMBA'nın kanserojen etkisinin c-Abl inhibitörü İmatinib uygulanarak tedavi edilebileceği gösterilmektedir (Morgan vd. 2013). Buradan yola çıkarak elde ettiğimiz bulgular ışığında DMBA'nın c-Abl'i baskılamasıyla oosit ve granuloza hücrelerinin DNA tamir kontrol mekanizmasından kaçtığını ve böylece granuloza hücrelerinin proliferasyonlarını sürdürmesiyle prematüre aktive olan foliküllerin sekonder aşamaya geliştiklerini düşünmekteyiz. Ancak 1 hafta DMBA uygulanması bu sinyal mekanizmasını ortaya koymada tam olarak yeterli olmamaktadır. Bu nedenle ileride planlanacak çalışmalar ile daha uzun süreli DMBA maruziyetinin foliküler gelişimin ve oosit maturasyonunun ilerleyen aşamalarına olan etkisini daha net olarak ortaya koymayı hedeflemekteyiz.

Projemiz sonucunda elde edilen bulgular DMBA'nın ovotoksisiteye ve POY'ne neden olarak prematüre folikül aktivasyonu sonucu primordiyal folikül rezervinin erken tükenişine neden olduğunu göstermektedir. DMBA'nın oosit ile granuloza hücreleri arasındaki iletişimin bozulmasına neden olarak foliküler gelişimde ve oosit maturasyonunda başarısızlıklara neden olduğu belirlenmiştir. Tüm bunlara ek olarak prematüre folikül aktivasyonu ile DMBA uygulanan ovaryumlarda mTERT ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. İlk defa projemiz sonucu elde edilen bulgular ile DMBA'nın c-Abl üzerinde inhibe edici bir etkisinin olduğu da belirlenmiştir. Bulgularımız 1 hafta DMBA uygulaması sonucunda elde edilen verilerdir. İleride yapılacak farklı çalışmalar ile DMBA'nın uzun süreli etkisinin ovaryumda oosit maturasyonu, foliküler gelişim, c-Abl ve mTERT ekspresyonlarını nasıl etkilediğinin ayrıntılı olarak çalışılması planlanmaktadır.



6. KAYNAKLAR

- Achi MV, Ravindranath N, Dym M. 2000. "Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity", *Biol Reprod*, 63(2), 591-598.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. 1992. "Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(21), 10114-10118.
- Bakalova R, Ohba H, Zhelev Z, Ishikawa M, Shinohara Y, Baba Y. 2003. "Cross-talk between Bcr-Abl tyrosine kinase, protein kinase C and telomerase-a potential reason for resistance to Glivec in chronic myelogenous leukaemia", *Biochem Pharmacol*, 66(10), 1879-1884.
- Bennett CE, Conway GS, Macpherson JN, Jacobs PA, Murray A. 2010. "Intermediate sized CGG repeats are not a common cause of idiopathic premature ovarian failure", *Hum Reprod*, 25(5), 1335-1338.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. 1997. "Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA", *Cell*, 91(1), 25-34.
- Borman SM, Christian PJ, Sipes IG, Hoyer PB. 2000. "Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: comparison through calculation of an ovotoxic index", *Toxicol Appl Pharmacol*, 167(3), 191-198.
- Brenner CA, Wolny YM, Adler RR, Cohen J. 1999. "Alternative splicing of the telomerase catalytic subunit in human oocytes and embryos", *Mol Hum Reprod*, 5(9), 845-850.
- Broekmans FJ, Knauff EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC. 2007. "Female reproductive ageing: current knowledge and future trends", *Trends Endocrinol Metab*, 18(2), 58-65.
- Butts S, Riethman H, Ratcliffe S, Shaunik A, Coutifaris C, Barnhart K. 2009. "Correlation of telomere length and telomerase activity with occult ovarian insufficiency", *J Clin Endocrinol Metab*, 94(12), 4835-4843.
- Chronowska E. 2012. "Regulation of telomerase activity in ovarian granulosa cells", *Indian J Exp Biol*, 50(9), 595-601.
- Derijck A, van der Heijden G, Giele M, Philippens M, de Boer P. 2008. "DNA double-strand break repair in parental chromatin of mouse zygotes, the first cell cycle as an origin of de novo mutation", *Hum Mol Genet*, 17(13), 1922-1937.
- Dudding TE, Lawrence O, Winship I, Froyen G, Vandewalle J, Scott R, Shelling AN. 2010. "Array comparative genomic hybridization for the detection of submicroscopic copy number variations of the X chromosome in women with premature ovarian failure", *Hum Reprod*, 25(12), 3159-3160; author reply 3160-3151.
- Evenson DP, Larson KL, Jost LK. 2002. "Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques", *J Androl*, 23(1), 25-43.
- Fiorenza MT, Bevilacqua A, Bevilacqua S, Mangia F. 2001. "Growing dictyate oocytes, but not early preimplantation embryos, of the mouse display high levels of DNA homologous recombination by single-strand annealing and lack DNA nonhomologous end joining", *Dev Biol*, 233(1), 214-224.
- Gelboin HV. 1980. "Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes", *Physiol Rev*, 60(4), 1107-1166.
- Gonfloni S. 2010. "DNA damage stress response in germ cells: role of c-Abl and clinical implications", *Oncogene*, 29(47), 6193-6202.
- Grasselli A, Nanni S, Colussi C, Aiello A, Benvenuti V, Ragone G, Moretti F, Sacchi A, Bacchetti S, Gaetano C, Capogrossi MC, Pontecorvi A, Farsetti A. 2008. "Estrogen receptor-alpha and endothelial nitric oxide synthase nuclear complex regulates transcription of human telomerase", *Circ Res*, 103(1), 34-42.

- Greider CW, Blackburn EH. 1996. "Telomeres, telomerase and cancer", *Sci Am*, 274(2), 92-97.
- Gu JJ, Ryu JR, Pendergast AM. 2009. "Abl tyrosine kinases in T-cell signaling", *Immunol Rev*, 228(1), 170-183.
- Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. 2008. "A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause", *Hum Reprod*, 23(3), 699-708.
- Harlow BL, Signorello LB. 2000. "Factors associated with early menopause", *Maturitas*, 35(1), 3-9.
- Hoyer PB, Davis JR, Bedrnicek JB, Marion SL, Christian PJ, Barton JK, Brewer MA. 2009. "Ovarian neoplasm development by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA) in a chemically-induced rat model of ovarian failure", *Gynecol Oncol*, 112(3), 610-615.
- Hoyer PB, Sipes IG. 1996. "Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity", *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36(307-331).
- Jick H. 1979. "Cigarette smoking and early menopause", *West J Med*, 130(3), 235.
- Juriscova A, Taniuchi A, Li H, Shang Y, Antenos M, Detmar J, Xu J, Matikainen T, Benito Hernandez A, Nunez G, Casper RF. 2007. "Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri", *J Clin Invest*, 117(12), 3971-3978.
- Kharbanda S, Yuan ZM, Weichselbaum R, Kufe D. 1998. "Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage", *Oncogene*, 17(25), 3309-3318.
- Kondoh K, Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Watanabe N. 2007. "Inhibition of estrogen receptor beta-mediated human telomerase reverse transcriptase gene transcription via the suppression of mitogen-activated protein kinase signaling plays an important role in 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2)-induced apoptosis in cancer cells", *Exp Cell Res*, 313(16), 3486-3496.
- Liu JP, Li H. 2010. "Telomerase in the ovary", *Reproduction*, 140(2), 215-222.
- Liu L, Blasco M, Trimarchi J, Keefe D. 2002. "An essential role for functional telomeres in mouse germ cells during fertilization and early development", *Dev Biol*, 249(1), 74-84.
- Mattison DR, Nightingale MR. 1980. "The biochemical and genetic characteristics of murine ovarian aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase activity and its relationship to primordial oocyte destruction by polycyclic aromatic hydrocarbons", *Toxicol Appl Pharmacol*, 56(3), 399-408.
- Mattison DR, Nightingale MS, Shiromizu K. 1983. "Effects of toxic substances on female reproduction", *Environ Health Perspect*, 48(43-52).
- Meltzer V, Ben-Yehoyada M, Shaul Y. 2011. "c-Abl tyrosine kinase in the DNA damage response: cell death and more", *Cell Death Differ*, 18(1), 2-4.
- Morgan S, Lopes F, Gourley C, Anderson RA, Spears N. 2013. "Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin", *PLoS One*, 8(7), e70117.
- Pendergast AM. 2002. "The Abl family kinases: mechanisms of regulation and signaling", *Adv Cancer Res*, 85(51-100).
- Rodriguez S, Goyanes V, Segrelles E, Blasco M, Gosalvez J, Fernandez JL. 2005. "Critically short telomeres are associated with sperm DNA fragmentation", *Fertil Steril*, 84(4), 843-845.
- Simpson JL. 2008. "Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: overview of selected candidate genes", *Ann N Y Acad Sci*, 1135(146-154).
- Sirvent A, Benistant C, Roche S. 2008. "Cytoplasmic signalling by the c-Abl tyrosine kinase in normal and cancer cells", *Biol Cell*, 100(11), 617-631.
- Sobinoff AP, Mahony M, Nixon B, Roman SD, McLaughlin EA. 2011. "Understanding the Villain: DMBA-induced preantral ovotoxicity involves selective follicular destruction and primordial follicle activation through PI3K/Akt and mTOR signaling", *Toxicol Sci*, 123(2), 563-575.



- Sobinoff AP, Pye V, Nixon B, Roman SD, McLaughlin EA. 2010. "Adding insult to injury: effects of xenobiotic-induced preantral ovotoxicity on ovarian development and oocyte fusibility", *Toxicol Sci*, 118(2), 653-666.
- Sobinoff AP, Pye V, Nixon B, Roman SD, McLaughlin EA. 2012. "Jumping the gun: smoking constituent BaP causes premature primordial follicle activation and impairs oocyte fusibility through oxidative stress", *Toxicol Appl Pharmacol*, 260(1), 70-80.
- Tomanek M, Chronowska E, Kott T, Czernekova V. 2008. "Telomerase activity in pig granulosa cells proliferating and differentiating in vitro", *Anim Reprod Sci*, 104(2-4), 284-298.
- Tsai-Turton M, Nakamura BN, Luderer U. 2007. "Induction of apoptosis by 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene in cultured preovulatory rat follicles is preceded by a rise in reactive oxygen species and is prevented by glutathione", *Biol Reprod*, 77(3), 442-451.
- Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC. 1991. "Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene", *Cell*, 65(7), 1153-1163.
- Vujovic S, Iovic M, Tancic-Gajic M, Marina L, Barac M, Arizanovic Z, Nenezic A, Ivanisevic M, Micic J, Sajic S, Micic D. 2012. "Premature ovarian failure", *Srp Arh Celok Lek*, 140(11-12), 806-811.
- Wang S, Zhu J. 2004. "The hTERT gene is embedded in a nuclease-resistant chromatin domain", *J Biol Chem*, 279(53), 55401-55410.
- Yamagata Y, Nakamura Y, Umayahara K, Harada A, Takayama H, Sugino N, Kato H. 2002. "Changes in telomerase activity in experimentally induced atretic follicles of immature rats", *Endocr J*, 49(6), 589-595.
- Zhu J, Wang JY. 2004. "Death by Abl: a matter of location", *Curr Top Dev Biol*, 59(165-192).

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. AYLİN YABA UÇAR
Proje No:	215S867
Proje Başlığı:	Farede Prematüre Over Yetmezliğinde Mtert Telomeraz Katalitik Alt Ünitesinin Rolünün Belirlenmesi
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	NECDET DEMİR
Danışmanlar:	TÜRKAN YİĞİTBAŞI
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	YEDİTEPE Ü.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	15/04/2017 - 15/04/2019
Onaylanan Bütçe:	372450.0
Harcanan Bütçe:	345849.84

TÜBİTAK

<p>Öz:</p>	<p>Memelilerde prenatal hayatta oluşan oosit rezervi, postnatal hayat boyunca sürekli azalarak tükenmektedir. Bu tükeniş sürecinde oositlerin çok az bir bölümü fonksiyonel gelişimini tamamlayarak ovule olurken, binlercesi ovulasyona girmeden ortadan kaldırılmaktadır. Foliküler atrezi olarak adlandırılan bu mekanizma ile ovarial yaşlanma meydana gelmekte ve primordiyal folikül havuzu tükenmektedir. Primordiyal folikül havuzu tekrardan yenilenemediği için bu tükeniş sonucunda infertilite ya da Prematüre Over Yetmezliği (POY) ile karşı karşıya kalınmaktadır.</p> <p>Polisiklik aromatik hidrokarbon 7, 12-dimetilbenz (7,12-dimethylbenz-[a]anthracene (DMBA)), ovaryum da dahil olmak üzere pekçok tümörü tetikleyen ve kemirgenlerde kanser modeli olarak kullanılan bir çevresel karsinogenidir. Günlük hayatta DMBA'nın kaynağı olarak sigara içilmesi, pişerken aktif karbona maruz kalmış yiyeceklerin tüketilmesi (mangalda pişirilen besinler gibi) ve otomobillerden çıkan egzoz dumanının solunması gösterilmektedir.</p> <p>Bir ribonükleoprotein kompleksi olan telomeraz, hücrenin bölünmesi esnasında kromozomların kararlı yapılarının korunmasını sağlar. Fare telomeraz ters transkriptaz (mTERT), telomeraz kompleksinin gerekli bir bileşeni olup insan ile homoloji göstermektedir (hTERT). c-Abl protein tirozin kinaz, DNA çift sarmalında kırıkların oluşması ile aktive olan ve telomer kontrolü esnasında bu kırıkların tamir edilmesine katılan bir proteindir. Telomer kısalması, hücre bölünmesini zamanla durduran bir işlemdir. Bu nedenle çalışmamızda DMBA indüklü ovotoksosite sonucu oluşan POY'de c-Abl ve mTERT'in önemli bir role sahip olabileceğini düşünmekteyiz. Buradan yola çıkarak günlük yaşamda sürekli olarak maruz kalınan DMBA'nın ovaryumdaki oosit rezervi, oosit kalitesi ve granuloza hücreleri üzerindeki etkisini c-Abl (Abelson Tirozin Kinaz) ve mTERT (telomeraz katalitik alt ünitesi) belirteçleri ile açıklamayı hedefledik.</p> <p>Çalışmamızın in vivo deneyleri için postnatal (PND) 28 günlük BalbC türü farelere 7 gün boyunca susam yağı içerisinde çözülün 1mg/kg DMBA uygulaması yapıldı. Aynı zamanda çalışmamızın in vitro deneyleri için PND 28 günlük BalbC türü farelerden alınan ovaryumlar 4 gün boyunca DMBA (50 nM) içerisinde ve kontroller 1% DMSO içerisinde kültüre edildi. Hematoksilen-Eozin boyama ile morfolojik değerlendirme ve folikül sayımı yapıldı. İmmünofloresan yöntemi ile c-Abl ve mTERT lokalizasyonları gösterildi. Ayrıca ELISA, western blot ve qRT-PCR yöntemleri kullanılarak fare ovaryumunda DMBA tedavisinin telomeraz aktivitesi üzerine olan etkisi gösterildi. Transmisyon Elektron Mikroskobu yöntemi ile DMBA verilen ovaryumlardaki foliküllerde oosit-granuloza hücresi arasındaki ilişki ultrastrüktürel düzeyde incelendi.</p> <p>Çalışmamızda DMBA indüklü ovotoksosite sonucu oluşan POY'de c-Abl ve mTERT, ilk defa gösterilmiştir. DMBA uygulanan ovaryumlarda c-Abl ve mTERT ekspresyonunda azalma belirlenmiştir. Bu proje ile DMBA uygulanmış fare ovaryumunda c-Abl ve mTERT ekspresyonlarındaki değişimin gösterilmesiyle, projemizin sonuçlarının POY'de erken over yaşlanması ve kadın infertilitesine ilişkin sinyal mekanizmalarına ışık tutacağını düşünmekteyiz.</p>
<p>Anahtar Kelimeler:</p>	<p>DMBA , Prematüre Over Yetmezliği, Fare, mTERT Telomeraz Katalitik Alt Ünitesi</p>
<p>Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:</p>	<p>Hayır</p>
<p>Projeden Yapılan Yayınlar:</p>	<p>1- Expression of c-Abl and mTERT in DMBA-Induced Premature Ovarian Insufficiency (POI) Mouse Model. (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 2- Farede DMBA ile induklenmiş ovotoksitede c-Abl ve mTERT ekspresyonlarının belirlenmesi (Bildiri - Ulusal Bildiri - Poster Sunum),</p>