

Orijinal Makale

FARE ÖSTRUS SİKLUSU'NUN FARKLI FAZLARINDA PLIN2 VE PLIN3 EKSPRESYONU

İlknur KESKİN^{1,4}, Turan DEMİRCAN^{2,4}, Nejda BEDRİ⁴, Nadiye KÖROĞLU³

ÖZET:

Giriş: Puberteye kadar birinci mayozun pro-faz evresinde bekleyen primordiyal foliküllerden birkaçı puberte ile birlikte, hormonal uyarı altında her ay tekrarlayan bir serüvene başlar. Bu süreçte ovaryumun stromal hücreleri de farklılaşarak, lipid droplet (LD) açısından zengin teka hücrelerine farklılaşırlar. Farede bu süreç çok kısadır ve ortalama 4 günde tamamlanır. Hücre içi sitoplazmik yapılar olan LD'ler, hücre içi birçok olayda enerji kaynağı olarak karşımıza çıkmaktadır. Perilipin yağ damlacıklarının yüzeyine lokalize olan fosforilasyon bağımlı bir proteindir ve LD'leri hormona duyarlı lipazın etkisinden korur.

Materyal-Metot: Seksüel olarak matür, düzenli östrus siklusuna sahip 24 adet dişi fare vajinal smear sonuçlarına göre 4 gruba ayrıldı; proöstrus, östrus, metöstrus, ve diöstrus. Sakrifiye edilen farelerin overleri alındı. Bir over Hematoksilin Eozin boyama ve PLIN2-PLIN3 çift floresan boyama için, diğer over ise Western Blot analiz için kullanıldı.

Bulgular: Western Blot analiz sonuçlarına göre PLIN2 ekspresyonu en fazla diöstrus, PLIN3 ekspresyonu ise en fazla diöstrus ve proöstrus fazında ölçüldü. Proöstrus antral folikül oositinde PLIN3 ekspresyonunun aynı

gruptaki farklı hücre gruplarına göre anlamlı olarak daha fazla olduğu saptandı ($p<0,05$). Östrus antral folikül oositinde eksprese olan PLIN3 atretik folikül PLIN3 ekspresyonuna göre anlamlı olarak daha yüksek ölçüldü ($p=0,031$). Sekonder folikül granüloza hücrelerinde diöstrus fazında PLIN3 ekspresyonu proöstrus ($p=0,000$), östrus ($p=0,001$) ve metöstrus ($p=0,023$) fazlarından anlamlı olarak daha yüksek saptandı. Sekonder folikül oositinde PLIN3 ekspresyonu diöstrus fazında metöstrus fazından anlamlı olarak daha yüksek saptandı. Preantral folikül granüloza hücrelerinde eksprese olan PLIN3'ün östrus fazında proöstrus ($p=0,005$), metöstrus ($p=0,045$) ve diöstrus ($p=0,025$) fazlarına göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı. Atretik folikül granüloza hücrelerinden eksprese olan PLIN3 miktarının östrus fazında proöstrus fazına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü ($p=0,023$).

Tartışma: Kompleks bir süreç olan oosit matürasyonu, ovulasyon ve fertilizasyon aşamalarında gelişen olaylar enerji gerektirir. Bu süreçte hücre içi lipid mobilizasyonunu düzenleyen yollar ile oositi aktive eden yolların yakından ilişkili olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur. Biz de çalışmamızda östrus siklusunu oluşturan dört fazda PLIN2 ve

1. İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Türkiye
2. İstanbul Medipol Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Türkiye
3. İstanbul Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Türkiye
4. Rejeneratif Ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMERC), Türkiye

Yayın Gönderim ve Kabul Tarihi: 18.10.2016-25.10.2016

PLIN3 ekspresyonlarının fazlar arasında ve aynı faz içinde farklı hücre gruplarında ekspresyon farklılıkları gösterdiklerini gösterdik. Bu da bize bu düzenleme ile oosit ve granuloza hücrelerinin enerji ihtiyacına göre perilipin ekspresyonunu ayarladığını ve enerji rezervini koruduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: Perilipin, Ovaryum, Östrus, Lipid Droplet, Fare

Expression of PLIN2 and PLIN3 during the different phases of estrous cycle in mouse

Abstract

Introduction: Some primordial follicles which waits at the first meiotic prophase stage till puberty begins a recurring adventure with puberty every month under hormonal stimulation. During this process stromal cells differentiate into theca cells which are rich in terms of lipid droplets (LD). This process is very short, and completed an average of 4 days in mice. LDs, which are intracellular cytoplasmic structures, emerges as an energy source in many intracellular processes. Perilipin, a phosphorylation dependent protein, is localized to the surface of the oil droplets and protects LDs from the effect of the hormone-sensitive lipase.

Materials and Methods: 24 female mice that are sexually mature and having regular estrous cycle, were divided into 4 groups according to the vaginal smear results; proestrus, estrus, metestrus, and diestrus. Ovaries of the sacrificed mice were isolated. A single ovary was used for hematoxylin eosin sand PLIN2-PLIN3 double fluorescent staining. The other ovary was used for Western Blot analysis.

Results: According to the western blot results, PLIN2 expression was detected at most in diestrus stage, and these phases for PLIN3 are diestrus and proestrus. PLIN3 expression was found to be significantly high in comparison to the different cells in

the same group in proestrus antral follicle oocytes ($p < 0.05$). PLIN3 expression in estrus antral follicles is significantly higher than expressed PLIN3 amount in atretic follicles ($p = 0.031$). PLIN3 expression in diestrus phase for secondary follicular granulosa cells is significantly higher than proestrus ($p = 0.000$), estrus ($p = 0.001$) and metestrus ($p = 0.023$). PLIN3 expression in secondary follicles oocytes were significantly higher in diestrus phase than the the metestrus phase. PLIN3 expression in estrus phase for pre-antral follicle granulosa cells is significantly higher than proestrus ($p=0,005$), metestrus ($p=0.045$) and diestrus ($p=0,025$). PLIN3 expression level in atretic follicular granulosa cells was significantly higher in estrus phase than the proestrus phase ($p = 0.023$).

Discussion: Ongoing events during the complex process of oocyte maturation, ovulation and fertilization stages require energy. By many studies, cross talking of pathways related to activation of oocytes and regulation of lipid mobilization has been demonstrated. Here, in this study, we exhibit the expression alterations of PLIN2 and PLIN3 in different phases or in diverse cells of the same phase during the estrous cycle. According to this data, we can conclude that, energy requirements of the oocyte and granulosa cells regulates the perilipin expression and maintenance of energy reserves.

Key Words: Perilipin, Ovary, Estrus, Lipid Droplet, Mouse

Giriş

İnsanda primordiyal folikül aşamasından başlayıp sonuçta fertilize olacak ve embriyo geliştirecek olan oositin gelişim sürecini ifade eden folikül matürasyonu, oldukça kompleks ve dinamik bir süreçtir. Bu süreç ekstra ve intra-ovaryen faktörler tarafından düzenlenmektedir. Puberte ile birlikte, birinci

mayozun profaz evresinde beklemekte olan primordiyal foliküllerden her ay küçük bir grup, hormonal regülasyon ile büyüme sürecine başlar. Foliküler büyümeyle eş zamanlı olarak ovaryumun stromal hücreleri de farklılaşarak androstenedion sentezleyen teka hücrelerine farklılaşırlar. Bu hücreler steroid sentezi yapan tipik hücre karakterine sahiptirler ve LD açısından oldukça zengindirler (Junqueira et al. 1998, Junquera et al.2006). İnsanda gözlenen ortalama 28 günlük östrus siklusunun aksine farelerde östrus siklusu 4-5 günde tamamlanmaktadır ve 4 faza ayrılmaktadır; proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M) ve diöstrus (D) (Nelson, J. F., et al. 1982, Safranski., T., et al. 1993). Proöstrus fazı 12 saat, östrus fazı 12-24 saat, metöstrus fazı 6-8 saat ve diöstrus fazı 52-60 saat sürmektedir (Petioianu, A., et al. 2005). Proöstrus fazında ve östrus fazının başlarında ovaryumda folikül gelişimi izlenirken, östrus fazının ortalarında ovulasyon gerçekleşir, metöstrus fazında korpus luteum oluşur, diöstrus fazı ise dinlenme fazıdır (Hubscher, Brooks et al. 2005).

Östrus siklusu boyunca cinsiyet hormonlarında meydana gelen siklik değişiklikler vaginal epitelde de histolojik değişikliklere neden olmaktadır. Vaginal smeara üç tip hücre görülmektedir; nükleuslu epitel hücreleri, kornifiye epitel hücreleri ve lökositler. Bu üç hücrenin smearadaki yoğunluğu östrus siklusu fazlarının belirlenmesini sağlar. Proöstrus fazında bol miktarda nükleuslu epitel hücresi görülürken, östrus fazında kornifiye epitel hücreleri ağırlıktadır. Metöstrus fazında kornifiye epitel hücrelerinin yanı sıra lökositler de bulunur. Diöstrus fazında ise nükleuslu epitel hücreleri ve lökositler izlenir. Bu döngü içerisinde hayvanlar morfolojik, fizyolojik ve davranışsal farklılıklar sergilemekte ve enerji dengeleri değişmektedir (Hubscher, C. H., et al. 2005).

Hücre içi sitoplazmik yapılar olan LD'ler, nötral yağları ve serbest yağ asitlerini depo-

lamaktadırlar (Wang, H., et al. 2011). Metabolik enerji, membran bileşeni, taşıma, lipid metabolizması ve biyosentezi, translasyon sonrası protein modifikasyonu ve sinyal molekülü gibi birçok hücre içi olayda LD'lerin fonksiyonel olduğu bilinmektedir (Murphy, D. J. 2001, Thiele, C. ve J. Spandl 2008), LD fonksiyonunda membranında bulunan fosfolipid tabaka etkilidir. Fosfolipid tabaka birçok protein içermektedir. PAT (perilipin, adipophilin, and TIP47) protein ailesi üyeleri bunlardan birkaçıdır. Memelilerde Perilipin (PLIN1), Adipophilin (ADRP- PLIN2), PLIN3 (TIP47), PLIN4 (S3-12) ve PLIN5 (OXPAT) olmak üzere 5 farklı PAT protein ailesi üyesi tespit edilmiştir. Doku ve hücreye göre ekspresyonları değişmekle birlikte PLIN1; beyaz yağ dokusunda, PLIN2; makrofaj, mikroglia, granüloza hücreleri ve oositlerde, PLIN3; oositler dahil birçok hücrede, PLIN4; kahverengi yağ dokusunda, PLIN5; kalp, karaciğer ve iskelet kası gibi çeşitli oksidatif dokularda eksprese olmaktadır (Khor, V. K., et al. 2013). Perilipin yağ damlacıklarının yüzeyine lokalize olan fosforilasyon bağımlı bir proteindir. Enerji rezervini oluşturan triaçilgliserol (TAG)'u serbest yağ asitleri ve gliserol oluşumuna (hidrolizine) neden olan hormona duyarlı lipazın etkisinden korur ve depolanmasını kontrol eder. Eğer Protein Kinaz A tarafından fosforilasyonu gerçekleştirilirse, Perilipin'in yapısı değişir ve artık yağ damlacığını örtmez. Bunun üzerine lipaz, yağ damlacığının yüzeyine bağlanıp TAG'ı hidrolizlemeye başlar, yani parçalar ve enerji açığa çıkar. Daha önceki çalışmalar perilipinin lipid yıkımını engelleyip, lipid birikimini teşvik ettiğini göstermiştir (Tansey, J.T. et al. 2003, Marcinkiewicz, A.et al 2006).

Materyal ve metod

Bu çalışmada yer alan deneyler İstanbul Medipol Üniversitesi Rejeneratif ve Restoratif Tıp Araştırmaları Merkezi (REMER) tarafından desteklenerek gerçekleştirildi. Deneyde

kullanılan hayvanlar İstanbul Medipol Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (38828770-604.01.01-E.1816) tarafından belirlenmiş olan deney hayvanları bakım, kullanım ve ötenazi protokolüne uygun olarak kullanıldı.

Deney Gruplarının Oluşturulması

PLIN2 ve PLIN3'ün, ovaryumda in vivo ekspresyonlarının değerlendirilmesi amacı ile seksüel olarak matür, düzenli östrus siklusuna sahip 24 adet 3 aylık Balb/c dişi fare kullanıldı. Günlük vaginal smear takibi yapılarak sikluslar tespit edildi. Vajinal smear, steril pipet yardımı ile vajinal duvarı izotonik solüsyon ile yıkayarak yapıldı. Yıkama sonucu elde edilen maternal lam üzerine yayılarak Giemsa ile boyandı. Görüntüleme ışık mikroskobu (Zeiss, Axio-Zoom V16) ile yapıldı ve fotoğrafları çekildi. Östrus siklusu fazları vajinal smearda bulunan hücre tiplerinin yoğunluğuna göre belirlendi (McLean, A. C., et al. 2012). Siklus aşamaları dört kategoride sınıflandı: proöstrus (P; n=6), östrus (E; n=6), metöstrus (M; n=6), ve diöstrus (D; n=6). Ketamin ve ksilazin (5 mg/kg-50 mg/kg) anestezisi altında sakrifiye edilen hayvanlardan alınan ovaryum dokuları, % 10'luk neutral buffer formaline (NBF) içerisinde fikse edildi. Ovaryumlar kademeli olarak konsantrasyonu artan etil alkol serilerinde dehidre edilerek xylene ile şeffaflaştırılıp parafine gömüldü.

Hematoksilen Eozin Boyaması

Mikrotom (HM 340E, Thermo Scientific) ile 5 µm kalınlığında alınan parafin kesitler, etüvde deparafinize edildikten sonra kademeli olarak konsantrasyonu azalan etil alkol serilerinden geçirildi. Hematoksilen (Bio-Optica) ve Eozin (Bio-Optica) ile boyanan dokular, artan etil alkol serilerinden geçirilerek xylene ile şeffaflaştırıldı. Mounting mediumu ile kapatılan dokular ışık mikroskobu (Zeiss, AxioZoom V16) ile görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

Western Blot Analizi

Tüm gruplara ait ovaryumlardan alınan dokularda, total protein, T-PER doku protein ekstraksiyon kiti (Thermo scientific) ve proteaz inhibitörü (1 mM phenylmethyl sulphonyl fluoride, Roche) kullanılarak yapıldı. Homojenize edilen dokularda protein konsantrasyonu belirlendi (Qubit 2.0 Fluoremeter, Lifetechnologies). Hazır jellerin (AnyKD Mini-Protean TGX Precast Protein Gels, Bio-Rad) her kuyucuğuna 20 µg protein yüklenerek SDS-PAGE elektroforez ile proteinler ağırlığına göre ayrıldı. Jeldeki proteinler aktiveleştirilen PVDF membran (Trans-Blot Turbo Mini-size PVDF Membran, Bio-Rad) üzerine aktarıldı. Non spesifik bağlanmaları engellemek için membran % 5 yağsız süt tozu içeren TBS-T (% 0,1 Tween 20 içeren TBS) ile bloklandı. TBS-T ile yıkanan membranlar rabbit poliklonal anti-mouse (PLIN2, dilüsyon 1:2000, Novusbio) ve guinea pig polyclonal anti-mouse (PLIN3, dilüsyon 1:2000, Progen) primer antikoları ile bir gece +4 °C'de inkübe edildi. Üç defa TBS-T ile yıkanan membranlar HRP konjuge goat anti rabbit IgG (dilüsyon 1:10000, Santa Cruz) ve Goat anti Guinea pig IgG (dilüsyon 1:10000, Santa Cruz) sekonder antikoları ile bir saat inkübe edildi. HRP substratı (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad) damlatılan membranlardaki protein bantlarının görüntüsü alındı (Bio-Rad Chemi DOC MP Imaging System) yapıldı. Gruplara ait over dokularından yapılan Western blot bantlarının ölçümleri Image Lab software 5.0 BIO-Rad ile yapıldı.

PLIN2 ve PLIN3 Çift İmmunfloresan Boyama

Alınan 5 µm kalınlığındaki kesitler, xylene ile deparafinize edilerek azalan etil alkol serilerinden geçirildi. PBS ile yıkanan kesitler 7 dakika sitrat buffer tampon solüsyonu ile kaynatıldı. % 10'luk keçi serumu (NGS, Abcam) ile 1 saat bloklamanın ardından rabbit poliklonal anti-mouse (PLIN2, dilüsyon 1:100, Novusbio) ve guinea pig polyclonal

anti-mouse (PLIN3, dilüsyon 1:100, Progen) primer antikoları ile bir gece +4 °C'de inkübe edildi. Primer antikolar uzaklaştırılıp 3 kez PBS ile yıkanan kesitler 1 saat goat anti-rabbit polyclonal (dilüsyon 1:100, Alexa Flour 488, Abcam) ve goat anti-guinea pig polyclonal (dilüsyon 1:100, Alexa Flour 594, Abcam) sekonder antikoları ile inkübe edildi. Sekonder antikor uzaklaştırılıp 3 defa PBS ile yıkanan kesitler kapatma mediumu (prolong gold antifade reagent with DAPI, Lifetechnologies) ile kapatıldı ve Zeiss LSM 780 NLO konfokal mikroskop (Carl Zeiss) ile görüntüledi. Gruplara ait over kesitlerinde immunfloresan ışımının intensity ölçümleri Zen 2011 Blue Software (Zeiss) programında yapıldı.

İstatistiksel analiz

İstatistiksel analizler için SPSS 18.0 istatistik paket programı kullanıldı. Verilere kendi alanlarının ortalaması esas alınarak standardizasyon işlemi uygulandı. Çalışma grupları tek yönlü varyans analizi (One- way ANOVA) ile

test edildi (ikili karşılaştırmalar Tukey's HSD testi ile yapıldı). $p < 0.05$ olasılık değeri anlamlı kabul edildi.

Bulgular

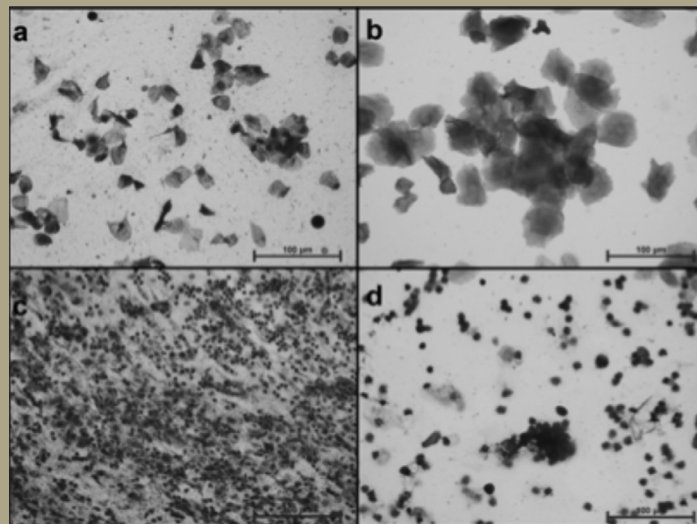
Vajinal Smear

Proöstrus grubuna ait smear örneklerinde kümeler oluşturmuş nükleuslu epitel hücreleri, östrus fazı örneklerinde ise kümeler halinde nükleussuz kornifiye epitel hücreleri görüldü (Şekil 1a, 1b). Metöstrus fazındaki örneklerde erken dönemde kornifiye hücrelerin yanında nötrofiller gözlenirken, ilerleyen dönemlerde nükleuslu epitel hücreleri ve nötrofiller görüldü (Şekil 1c). Diöstrus fazı örnek smearlarında artmış olan nötrofillerin yanında nükleuslu epitel hücreleri gözlendi (Şekil 1d).

Hematoksilen Eozin Boyaması

Fare östrus siklusunun kısa olması sebebiyle, siklus fazlarına ait kesit görüntülerinde, farklı gelişim aşamalarına ait foliküller gözlendi. Primordiyal, primer ve preantral foliküller kor-

Şekil 1: Proöstrus (a), Östrus (b), Metöstrus (c) ve Diöstrus (d) gruplarına ait vajinal smear görüntüsü (Giemsa, 40x, Bar=100 µm)



tikal bölgede, antral foliküller ise daha çok medullar bölgede izlendi. Ovaryumda siklusun farklı fazlarında farklı jenerasyonlarda korpus luteumlar ve farklı atretik dejenerasyon seviyelerinde foliküller tespit edildi. Proöstrus fazında sitoplazmik vakuoller ve dejenere olmuş korpus luteum ile etrafında fibröz doku proliferasyonu görüldü. Östrus fazında dejenere olmuş, hücre sitoplazması bazofilik boyanmış, merkezde sıvı dolu boşluğu olan ve fibröz doku içermeyen korpus luteum gözlemlendi (Şekil 2).

Western blot analizi

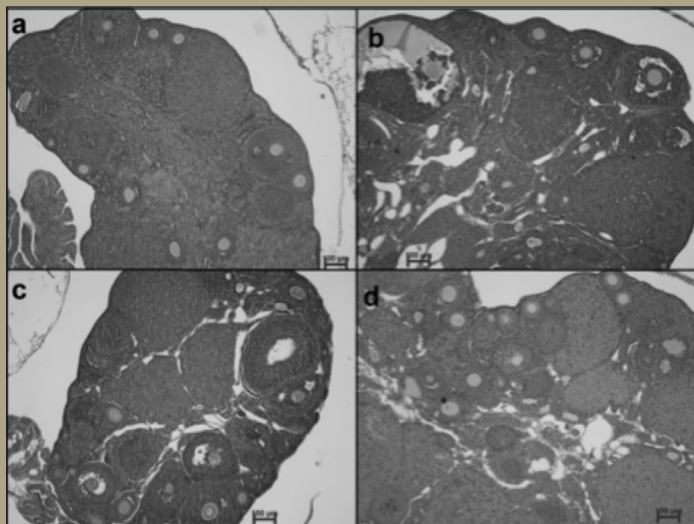
Western blot analizi için, test edilen PLIN2 ve PLIN3 dışında kontrol olarak (housekeeping gene) beta aktin kullanılmıştır (Şekil 3). Kuyucuklardaki miktarın ölçümü sonrası, PLIN2 ve PLIN3 miktarları her siklus için beta aktin ile normalize edilmiştir. Bu normalizasyon sonucunda, PLIN2 ve PLIN3 ekspresyon değerleri karşılaştırılıp, PLIN2 ekspresyonunun en fazla diöstrus fazında olduğu görüldü (Şekil 4). PLIN3 ekspresyonunun ise diöst-

rus ve proöstrus fazında diğer fazlara kıyasla daha fazla olduğu saptandı (Şekil 4).

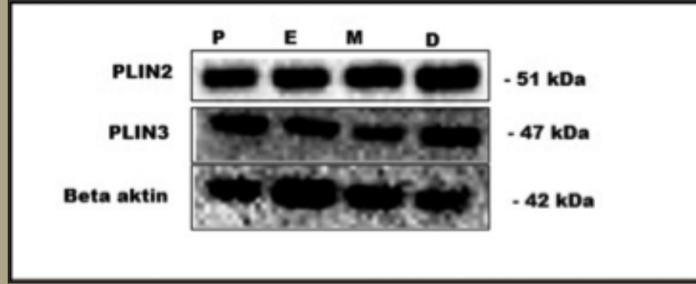
PLIN2 ve PLIN3 Çift İmmunfloresan Boyama Gruplarına kendi içinde bakıldığında, proöstrus grubunda antral folikül oositinde eksprese olan PLIN3 miktarının antral folikül granüloza hücreleri ($p=0,031$), atretik folikül ($p=0,024$), preantral folikül granüloza hücreleri ($p=0,005$) ve primer folikül granüloza hücreleri ($p=0,016$) ile kıyaslandığında anlamlı olarak daha fazla olduğu saptandı. Farklı siklus fazlarındaki toplam PLIN2 ve PLIN3 ekspresyonları ölçüldüğünde PLIN2 ekspresyonunun PLIN3 ekspresyonuna kıyasla overlerde daha baskın olduğu izlendi (Tablo1) (Şekil 5). Gruplar arasında bu farka bakıldığında ise farklı evrelerdeki foliküllerde farklılık göstermekle birlikte toplamda PLIN2'nin diöstrus ve metöstrusta, PLIN3'ün ise diöstrusta anlamlı olarak daha fazla eksprese edildiği saptandı ($p<0,05$).

Farklı fazlarda primer ve sekonder foliküllere ait oosit ve granüloza hücrelerinden eksprese olan PLIN2 ve PLIN3 miktarları karşı-

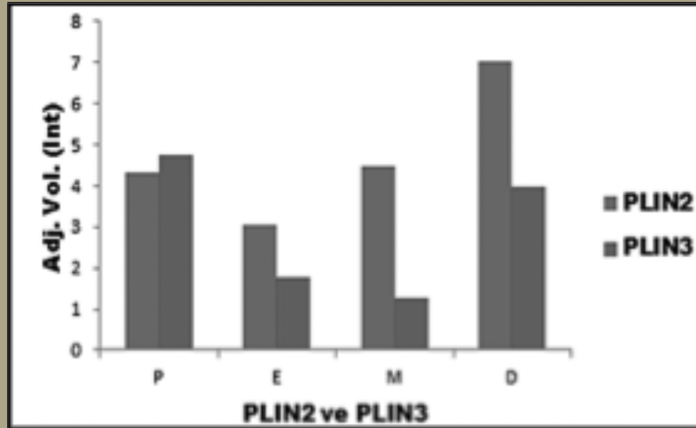
Şekil 2: Proöstrus (a), Östrus (b), Metöstrus (c) ve Diöstrus (d) gruplarına ait over kesitleri (Hematoksilen Eozin, 10x, Bar=100 µm)



Şekil 3: Western Blot PLIN2 ve PLIN3 analiz sonuçları



Şekil 4: Western Blot PLIN2 ve PLIN3 analiz değerleri



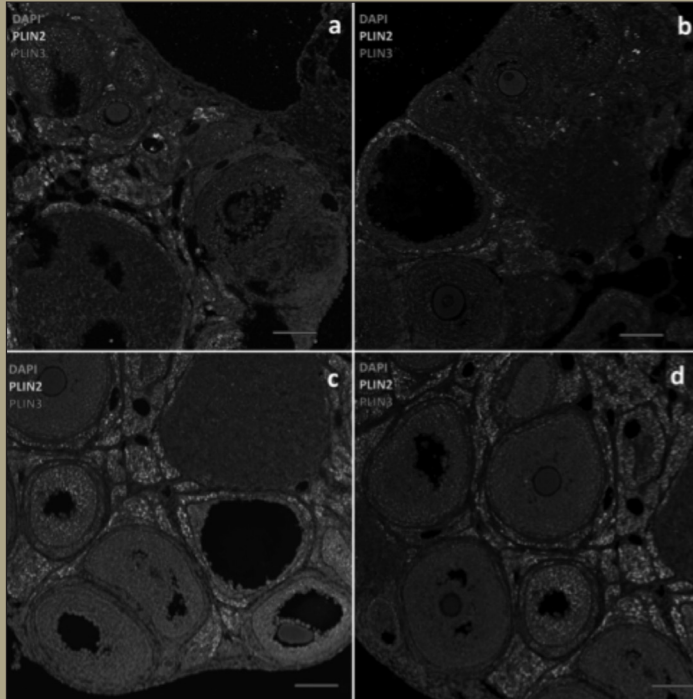
laştırıldığında primer folikül granüloza hücreleri ve oositlerinde eksprese olan PLIN2 ve PLIN3 değerlerinin fazlar arasında anlamlı farklılık göstermediği gözlemlendi. Sekonder folikül granüloza hücrelerinde ise PLIN2 ekspresyonunun diöstrus fazında diğer fazlara göre daha yüksek olmakla birlikte anlamlı bir farklılık göstermeksizin devamlı yüksek seyrettiği gözlemlendi. Sekonder folikül granüloza hücrelerinde PLIN3 ekspresyonuna bakıldığında diöstrus fazında PLIN3 ekspresyonu

proöstrus ($p=0,000$), östrus ($p=0,001$) ve metöstrus ($p=0,023$) fazlarından anlamlı olarak daha yüksek saptandı (Tablo2) (Şekil 6a). Sekonder folikül oositinde de PLIN2 ekspresyonunun diöstrus fazında diğer fazlara göre daha yüksek olmakla birlikte anlamlı bir farklılık göstermeksizin devamlı yüksek seyrettiği gözlemlendi. Sekonder folikül oositinde PLIN3 ekspresyonuna bakıldığında ise diöstrus fazında PLIN3 ekspresyonunun metöstrus ($p=0,037$) fazından anlamlı olarak

Tablo 1: Oositlerde toplam ortalama PLIN2 ve PLIN3 ekspresyon değerleri (* p<0,05)

Gruplar	PLIN2	PLIN3
Preöstrus	2.131	182
Östrus	1.803	206
Metöstrus	4.965*	547
Diöstrus	6.503*	955*

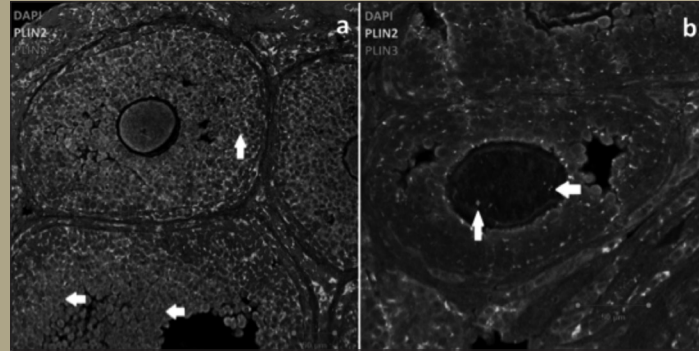
Şekil 5: Proöstrus (a), Östrus (b), Metöstrus (c) ve Diöstrus (d) PLIN2 ve PLIN3 ekspresyonu



Tablo 2: Granüloza hücrelerinde (gh) ortalama PLIN2 ve PLIN3 ekspresyon değerleri (* p<0,05)

Gruplar	PLIN2	PLIN3
Preöstrus sekonder fol (gh)	30,5297	1,8726*
Östrus sekonder fol (gh)	24,7888	2,0332*
Metöstrus sekonder fol (gh)	32,5012	2,9435*
Diöstrus sekonder fol (gh)	55,5838	6,1925

Şekil 6: Sekonder folikül granüloza hücrelerinde (a) ve sekonder folikül oositinde (b) PLIN3 ekspresyonu



daha yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo3) (Şekil 6b).

Preantral folikül granüloza hücrelerinden eksprese olan PLIN3 değerlerine bakıldığında östrus fazında saptanan değer proöstrus (p=0,005), metöstrus (p=0.045) ve diöstrus (p=0,025) fazlarına göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptandı (Şekil 7a). Preantral folikül oosit PLIN3 ekspresyonu ise tüm gruplarda benzer şekilde gözlenmiştir.

Atretik folikül granüloza hücrelerinden eksprese olan PLIN3 miktarının östrus fazında

proöstrus fazına göre anlamlı olarak daha yüksek olduğu görüldü (p=0.023) (Şekil 7b).

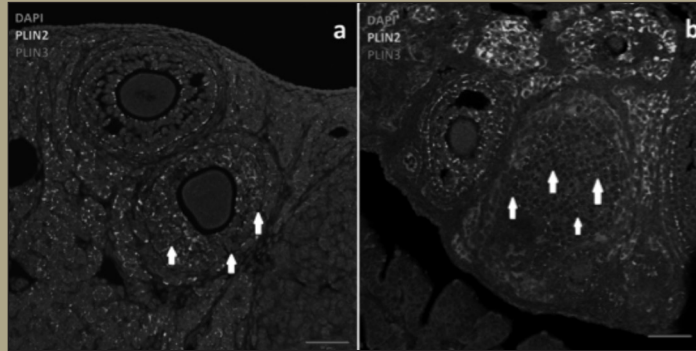
Tartışma

Oosit matürasyonu, oosit nükleus ve sitoplazmasında kompleks bir dizi olayların meydana geldiği ve profaz evresinde bekleyen mayozun tamamlandığı bir süreçtir (Wu B,1996, Krischer RL,2004, Kimura N. Et al. ,2007). Matürasyon esnasında ve öncesinde, oosit hacimce büyümekte ve gelişerek fertilize olabilme yeteneği kazanmaktadır (Xia, Kikuchi et

Tablo 3: Oositlerde ortalama PLIN2 ve PLIN3 ekspresyon değerleri (* p<0,05)

Gruplar	PLIN2	PLIN3
Preöstrus sekonder fol (oosit)	29,3950	3,2236
Östrus sekonder fol (oosit)	19,8084	2,7979
Metöstrus sekonder fol (oosit)	16,2500	2,2373
Diöstrus sekonder fol (oosit)	48,9112	6,8113*

Şekil 7: Preantral folikül granüloza hücrelerinde (a) ve atretik folikül granüloza hücrelerinde PLIN3 ekspresyonu



al. 2000). Büyüme aşamasındaki folikülde aynı zamanda folikül hücre proliferasyonunun da hızlanması ile birlikte enerji ihtiyacı da artmaktadır. Aynı süreçte büyüyen folikülün ooplazmasında glikojen granülleri ve yağ asitleri içeren LD'ler birikmektedir (Sturmey and Leese 2006, Griffin, Emery et al. 2006). Olgunlaşan oositteki hücre içi lipid mobilizasyonunu düzenleyen yollar ile oositi aktive eden yolların yakından ilişkili olduğu bilinmektedir (Downs, Hudson et al. 2002, Holm 2003).

PLIN'in adipositlerdeki varlığı ve lipid homeostazındaki rolleri detaylı olarak bilirse de, over-

lerdeki varlıkları ve rolleri ile ilgili çalışmalar çok sınırlıdır. Hayvan modelleri ile yapılan çalışmalar, PLIN2 ve PLIN3'ün oosit matürasyonunda ve erken embriyo gelişiminde önemli rol oynadığını göstermektedir (Yang, Dunning et al. 2010, Sastre, Costa et al. 2014, Zhang, Fu et al. 2014). Domuz oositlerinde PLIN1 mRNA ekspresyonu saptanmazken, Germinal Vezikül (GV) ve Metafaz II (MII) aşamasındaki oositlerde PLIN2 mRNA ekspresyonunun olduğu gözlenmektedir (Zhang, Fu et al. 2014). Başka bir çalışmada, MII aşamasındaki oositte PLIN2 ekspresyonunun

GV aşamasındaki oosite göre anlamlı derecede düşük olduğu gözlenmiştir. Bu da oosit matürasyonu esnasında PLIN2'nin TG depolanmasını düzenleyen başlıca LD proteini olduğunu düşündürmüştür (Zhang, Fu et al. 2014).

PLIN'in oositlerdeki bu ekspresyon farklılıkları, in vitro matürasyon (IVM) esnasında önemli rollerinin olduğunu düşündüren güçlü bir kanıttır. Yapılan IVM çalışmalarında PLIN2 ekspresyonu sabit kalırken, PLIN3 ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir (Yang, Dunning et al. 2010, Sastre, Costa et al. 2014, Zhang, Fu et al. 2014). PLIN2 ekspresyonu IVM esnasında PLIN3 ekspresyonuna göre daha yüksek oranda görülmüştür. Ayrıca PLIN2'nin granüloza hücrelerindeki mRNA ve protein düzeylerinin periovuluar dönemde yükseldiği ve LH yükselmesinden 36 saat sonra pik yaptığı gösterilmiştir (Seachord et al 2005). PLIN2 prostaglandin (PG) sentezi için gerekli olan araşidonik asit (AA) de dahil olmak üzere uzun zincirli yağ asitlerinin hücre içinde birikiminden sorumludur. PLIN2 bu etkileriyle granüloza hücrelerinin AA'i kullanmasını ve dolayısıyla başarılı bir ovulasyon için gerekli olan prostoglandinlerin sentezlenmesini sağlamaktadır. Oosit matürasyonunda PLIN2 ekspresyonunun artması, matürasyon esnasında enerji ihtiyacının arttığı dönemde lipid depolarının aniden tüketilmesini önlemek için oositin metabolik yanıtını yansıtmaktadır (Bickel, Tansey et al. 2009).

Embriyo gelişim sürecinde de PLIN2 ekspresyonunun morula aşamasında ve PLIN3 ekspresyonunun blastokist aşamasında belirgin olarak arttığı görülmüştür (Lee B,2009). Blastokist aşamasında PLIN3'ün PLIN2'ye göre 15 kat daha fazla eksprese olduğu saptanmıştır (Sastre, et al. 2014). PLIN3'ün sığırlarda embriyo gelişim sürecinde ana PAT proteini olduğu göstermiş ve bunun da artan protein ihtiyacı ve yüksek enerji gereksinimine bağlı olduğunu öne sürmüşlerdir (Sastre, et al. 2014).

Çalışmamızda gruplara ait smear örneklerinde fazları belirlememizi sağlayan hücresel değişiklikler izlendi. Siklus fazlarına ait preparat görüntülerinde, fare östrus siklusunun kısa olması sebebiyle, çeşitli gelişim aşamalarındaki foliküller bir arada gözlemlendi. Ovaryen yapı normal histolojik özelliklerde idi. Western blot analizi ile

PLIN2 ekspresyonunun en fazla diöstrus fazında olduğu görüldü. Bu da bu evrede enerji ihtiyacının azaldığı ve LD'lerin korunduğunu gösterdi. PLIN2 ve PLIN3 ekspresyonunun daha çok nerelerde olduğunu saptamak için yaptığımız IF görüntülemeye overlerde toplamda baskın olanın literatürle uyumlu olarak PLIN2 ekspresyonu olduğu görüldü. Bununla birlikte PLIN2'nin diöstrus ve metöstrusta, PLIN3'ün ise diöstrusta anlamlı olarak daha fazla eksprese edildiği saptandı. Yüksek aktivasyon göstermeyen primer folikül granüloza hücreleri ve oositlerinde eksprese olan PLIN2 ve PLIN3 değerlerinin ise fazlar arasında anlamlı farklılık göstermediği gözlemlendi. Gruplara kendi içinde bakıldığında, proöstrus grubunda antral folikül oositinde eksprese olan PLIN3 miktarının dokudaki diğer hücrelere göre anlamlı olarak daha fazla olduğu saptandı. Oositin enerji kapasitesini ovulasyon sonrası için korumak amaçlı PLIN ekspresyonunu artırması ile korele olduğu düşünüldü. Sekonder folikül granüloza hücrelerinde PLIN3 ekspresyonunun bu evrede granüloza hücrelerinde proliferasyonun azalması ile bağlantılı olarak enerji ihtiyacının azalması ile birlikte diğer hücre gruplarına kıyasla anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptandı. Sekonder folikül oositinde PLIN3 ekspresyonuna bakıldığında da kendini ovulasyon ve ardından fertilizasyona hazırlayan oositin enerji kaynaklarını korumak için PLIN ekspresyonunu artırdığı düşünüldü.

Fare östrus siklusunun kısa olması ve sürekli devamlılık göstermesi siklus evrelerinin keskin sınırlarla ayrılmasını zorlaştırmaktadır. Özellikle metöstrus fazında over yakalamak oldukça güç olmaktadır. Bununla birlikte overde mevcut tüh hücre gruplarında perilipin ekspresyonunun farklı oranlarda yapıyor olması özellikle western sonuçlarında total perilipin miktarını saptamamıza ve hücre düzeyinde bir değer vermemize engel teşkil etmektedir. Bilindiği üzere perilipin ancak fosforile olduğu durumda aktive olmakta ve bu aşamada LD'ler parçalanıp enerji açığa çıkmaktadır. Bu sebeple farklı siklus evrelerinde fosforile olan ve fosforile olmayan perilipin ekspresyonlarının birlikte gösterilmesi daha açıklayıcı sonuçlar verebilir.

Sonuç: Oosit matürasyonunu tetikleyen ve de-

vam ettiren mekanizmalardan birisi oosit sitoplazmasındaki LD'de gözlenen PLIN ekspresyonlarıdır. LD'de PLIN ekspresyonu değişiklikleri, oosit matürasyonunu olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle, LD'de gözlenen PLIN ekspresyonlarının araştırılması ile oosit matürasyonuna yön veren fizyolojik ve patofizyolojik süreçlerin daha iyi anlaşılabilmesine ve oosit dondurma süreçlerinde de yardımcı olabileceğine inanmaktayız.

Kaynaklar

1. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. (1998). *Dişi Üreme Sistemi. Temel Histoloji*. Ed:Y. Aytekin, S. Solakoğlu, B. Ahiskalı. İstanbul, Bariş Kitabevi.
2. Junqueira LC, Carneiro J. (2006). *Dişi Üreme Sistemi. Temel Histoloji*. Ed:Y. Aytekin, S. Solakoğlu. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi.
3. Nelson, J. F., et al. (1982). A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod* 27(2): 327-39.
4. Safranski TJ, Lamberson WR, Keisler DH. (1993). Correlations among three measures of puberty in mice and relationships with estradiol concentration and ovulation. *Biol Reprod*;48(3):669-73.
5. Petroianu, A., et al. (2005). The influence of venous drainage on autologous ovarian transplantation. *J Surg Res* 124(2): 175-9.
6. Hubscher, C. H., et al. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem* 80(2): 79-87.
7. Wang, H., et al. (2011). Unique regulation of adipose triglyceride lipase (ATGL) by perilipin 5, a lipid droplet-associated protein. *J Biol Chem* 286(18): 15707-15.
8. Murphy, D. J. (2001). The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40(5): 325-438.
9. Thiele, C. and J. Spandl (2008). Cell biology of lipid droplets. *Curr Opin Cell Biol* 20(4): 378-85.
10. Khor, V. K., et al. (2013). Lipid droplet metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16(6): 632-7.
11. Tansey, J.T. et al. (2003). Functional studies on native and mutated forms of perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols. *J Biol Chem* 278, 8401-6.
12. Marcinkiewicz, A., Gauthier, D., Garcia, A. & Brasaemle, D.L. (2006). The phosphorylation of serine 492 of perilipin directs lipid droplet fragmentation and dispersion. *J Biol Chem* 281, 11901-9.
13. McLean, A. C., et al. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*(67): e4389.
14. Wu B, Igotz GG, Currie WB, Yang X. (1996). Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*. 45(4):560-5.
15. Krisher RL. (2004). The effect of oocyte quality on development. *J Anim Sci*;82 E-Suppl:E14-23.
16. Kimura N, Hoshino Y, Totsukawa K, Sato E. (2007). Cellular and molecular events during oocyte maturation in mammals: molecules of cumulus-oocyte complex matrix and signalling pathways regulating meiotic progression. *Soc. Reprod. Fert. Suppl.* 63:327-42.
17. Xia GL, Kikuchi K, Noguchi J, Izaikae Y. (2000). Short time priming of pig cumulus-oocyte complexes with FSH and forskolin in the presence of hypoxanthine stimulates cumulus cells to secrete a meiosis-activating substance. *Theriogenology*. 53(9):1807-15.
18. Sturmey, R. G., et al. (2006). Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte. *Reproduction* 132(6): 829-37.
19. Griffin, J., et al. (2006). Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). *J Exp Clin Assist Reprod* 3: 2.
20. Downs, S. M., et al. (2002). A potential role for AMP-activated protein kinase in meiotic induction in mouse oocytes. *Dev Biol* 245(1): 200-12.
21. Holm, C. (2003). Molecular mechanisms regulating hormone-sensitive lipase and lipolysis. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 6): 1120-4.
22. Yang, X., et al. (2010). Identification of Perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reproduction, Fertility and Development* 22(8): 1262-71.
23. Sastre, D., et al. (2014). Expression of PLIN2 and PLIN3 during oocyte maturation and early embryo development in cattle. *Theriogenology* 81(2): 326-31.
24. Zhang, R. N., et al. (2014). Expression of Perilipin 2 (PLIN2) in Porcine Oocytes During Maturation. *Reproduction in Domestic Animals* 49(5): 875-80.
25. Bickel, P. E., et al. (2009). PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* 1791(6): 419-40.
26. Seachord, C. L., et al. (2005). Adipose differentiation-related protein: a gonadotropin- and prostaglandin-regulated protein in primate periovulatory follicles. *Biol Reprod* 72(6): 1305-14.
27. Lee B, Zhu J, Wolins NE, Cheng JX, Buhman KK. (2009). Differential association of adipophilin and TIP47 proteins with cytoplasmic lipid droplets in Mouse enterocytes during dietary fat absorption. *Biochim Biophys Acta*. 1791(12):1173-80.