



TC.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

VHE-2019-0002

**ÖSTRUS SIKLUSU SÜRESİNCE RAT OVARYUMUNDA OKSİDATİF
STRESİN ARAŞTIRILMASI**

Hediye İpek PORTAKAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ülker EREN

AYDIN 2019

2019

YUKSEK LISANS

HISTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ

HEDİYE İPEK PORTAKAL

T.C.
AYDIN ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ (VETERİNER)
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

ÖSTRUS SIKLUSU SÜRESİNCE RAT OVARYUMUNDA
OKSİDATİF STRESİN ARAŞTIRILMASI

Hediye İpek PORTAKAL
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ülker EREN

Sunulan tez çalışması Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-16017 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN 2019

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Hediye İpek PORTAKAL tarafından hazırlanan “Östrus Siklusu Süresince Rat Ovaryumunda Oksidatif Stresin Araştırılması ” başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:/...../.....

Ünvanı, Adı Soyadı

Üniversite:

İmza:

Üye (Tez Danışmanı) :Prof. Dr. Ülker EREN Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Emrah SUR Konya Selçuk Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Şadiye KUM Aydın Adnan Menderes Üniversitesi

ONAY:

Bu tez Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

(Ünvanı, Adı Soyadı)
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın her aşamasında her türlü bilgi birikimiyle bana yol gösteren, ilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen sayın danışmanım Prof. Dr. Ülker EREN'e, sayın Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı hocalarıma, MDA ve SOD ölçümü için yardımlarından dolayı sayın hocam Doç. Dr. Murat BOYACIOĞLU'na, laboratuvar çalışmalarında yardımcı olan arkadaşlarım Gülsüm YILMAZ ve Musa TATAR'a ve eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI.....	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ovaryum	3
2.1.1. Ovaryumun Gelişimi	3
2.1.2. Oosit Oluşumu	4
2.1.2.1. Primordial germ hücreleri	5
2.1.2.2. Ovariye kordonların oluşumu ve oosit I'ın mayoz bölünmeye girmesi	6
2.1.2.2.1. Mayozun durdurulması	6
2.1.3. Folikül Gelişimi	7
2.1.3.1. Primordiyal folikül oluşumu	7
2.1.3.2. Primordiyal folikülden primer foliküle geçiş.....	8
2.1.3.2.1. Oosit ve granuloza hücreleri arasında karşılıklı etkileşim	8
2.1.3.3. Preantral/ sekonder folikül oluşumu.....	9
2.1.3.4. Antral folikül oluşumu	9
2.1.3.5. Preovulatoör folikül (Graaf folikülü) oluşumu	10
2.1.4. Mayotik Olgunlaşma	11
2.1.5. Sitoplazmik Olgunlaşma	11
2.1.6. Preantral Foliküllerde Atrezi.....	12
2.1.7. Ovulasyon.....	12

2.1.7.1. Korpus luteum.....	13
2.2. Ratlarda Östrüs Siklusu	14
2.2.1. Ratlarda Vaginal Smear.....	16
2.3. Oksidatif Stres	17
2.3.1. Dişı Reprodüktif Sistemde ROS	17
2.3.2. Oksidatif Stres ve Korpus Luteum	20
2.3.3. Oksidatif Stres ve <i>İn vitro</i> Fertilizasyon.....	21
2.3.4. Oksidatif Stres ve 8-OHdG	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereç.....	23
3.2. Yöntem	23
3.2.1. Vaginal Smear Yapımı	23
3.2.2. Doku Örneklerinin Toplanması	24
3.2.3. Üçlü Boyama Metodu.....	24
3.2.3.1. Histolojik değişimlerin belirlenmesi	25
3.2.4. Strept ABC Boyama Yöntemi.....	25
3.2.5. Serum Örneklerinde Total Oksidan /Antioksidan ve Total Protein Seviyelerinin Belirlenmesi	26
3.2.5.1. Malondialdehit (malondialdehyde/ MDA) ölçümü	26
3.2.5.2. Süperoksitdismutaz (süperoxide dismutase/ SOD) ölçümü	27
3.3. İstatistiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR	28
4.1. Histolojik Bulgular	30
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular.....	37
4.3. Enzim histokimyasal (TUNEL metodu) Bulgular	39
4.4. Serumda MDA ve SOD Değerleri	41
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ.....	47
7. KAYNAKLAR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

8-OHDG	: 8-hidroksi -2' - deoksi guanozin
AC	: adenilat siklaz/ <i>adenilate cyclase</i>
AMH	: antimüllerian hormon / <i>antimüllerian hormone</i>
bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü / <i>basic fibroblast growth factor</i>
Blimp1/ Prdm1	: B lenfosit kaynaklı olgunlaşma proteini / pozitif düzenleyici alan 1/ <i>B-lymphocyte-induced maturation protein / positive regulatory domain</i>
BMP	: kemik şekillendirici protein / <i>bone morphogenetic protein</i>
cAMP	: siklik adenosin monofosfat / <i>cyclic adenosine monophosphate</i>
CC	: kumulus hücreleri / <i>cumulus cells</i>
CDK-1	: siklin bağımlı kinaz 1 / <i>cyckline dependent kinase-1</i>
CL	: korpus luteum/ <i>corpus luteum</i>
COC	: kumulus-oosit kompleksi / <i>cumulus oocyt complex</i>
CuZn-SOD	: Bakır çinko süperoksit dismutaz
DAB	: diamino benziolin / <i>diamino benzyoline</i>
dpc	: çiftleşmeden sonraki gün / <i>day of post coitum</i>
E2	: östrojen / <i>estradiol</i>
EGF	: epidermal büyüme faktörü / <i>epidermal growth factor</i>
FSH	: folikül uyarıcı hormon / <i>follicle stimulating hormone</i>
Foxl2	: Forkhead box L2
GDF	: büyüme farklılaşma faktörü / <i>growth differentiation factor</i>
GnRh	: gonadotropin salgılatıcı hormon/ <i>gonadotropin releasing hormone</i>
GRELs	: gonat kabartısı epitel benzeri hücreleri / <i>gonadal ridge epithelial like cells</i>
GSH-Px	: glutatyon peroksidaz / <i>glutathione peroxidase</i>
GV	: germinal vesikül
GVDB	: germinal vesicle kırılımı / <i>germinal vesicle breakdown</i>
H₂ O₂	: hidrojen peroksit
HDL	: yüksek yoğunluklu lipoprotein / <i>high density lipoprotein</i>
IGF-1	: insülin benzeri büyüme faktörü 1/ <i>insulin-like growth factor-1</i>
KitL	: kit ligand
LDL	: düşük yoğunluklu lipoprotein / <i>low density lipoprotein</i>
LH	: lüteinleştirici hormon / <i>luteinizing hormone</i>

LHR	: LH reseptörleri / <i>luteinizing hormone receptor</i>
LIF	: Leukemia inhibitory factor
MDA	: Malondialdehit / <i>malondialdehyde</i>
MGC	: Mural granuloza hücreleri / <i>mural granulosa cell</i>
MMPs	: Matriks metalloproteinazlar / <i>matrix metalloproteinase</i>
Mn- SOD	: mangan- süperoksit dismutaz / <i>manganese-superoxide dismutase</i>
MPF	: Olgunlaşmayı uyaran faktör / <i>maturation promoting factor</i>
mTOR	: <i>Mammalian target of rapamycin</i>
NO	: Nitrik oksit/ <i>nitric oxide</i>
O₂-	: Süperoksit anyonu/ <i>superoxide anion</i>
OH	: Hidroksil radikali/ <i>hydroxyl radical</i>
PBS	: fosfat buffer solüsyonu / <i>phosphate buffer solution</i>
PDE	: fosfodiesteraz / <i>phosphodiesterase</i>
PGC	: primordiyal germ hücreleri / <i>primordial germ cells</i>
PGF₂α	: <i>Prostaglandin F₂α</i>
PI3K	: <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PKA	: Protein kinaz A / <i>protein kinase A</i>
PTEN	: <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
ROO	: Peroksil radikali/ <i>Peroxyl radical</i>
ROS	: Reaktif oksijen türleri/ <i>reactive oxygen species</i>
Sycp3	: sinaptonemal kompleks protein 3 / <i>synaptonemal complex protein 3</i>
SOD	: Süperoksit dismutaz / <i>superoxide dismutase</i>
sABC	: strept avidin- biyotin kompleks / <i>strept avidin biotin complex</i>
SrY	: Y kromozomunun cinsiyeti belirleyen bölgesi / <i>Sex-determining region of the Y chromosome</i>
StAR	: steroidojenik akut düzenleyici / <i>steroidogenic acute regulatory</i>
TBA	: tiobarbiturik asit / <i>thiobarbituric acid</i>
TCA	: triklorasetik asit / <i>trichloroacetic acid</i>
TGF-β	: transforme edici büyüme faktörü β / <i>transforming growth factor- β</i>
TNFα	: tümör nekrozis alfa/ <i>tumor necrosis alpha</i>
Tsc1	: Tüberkular Skleroz Kompleksi-1/ <i>tuberous sclerosis complex 1</i>
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü / <i>vascular endothelial growth factor</i>

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Östrüs siklusundaki evrelerde hormonların salınımları.....	16
Şekil 2a: Proöstrüs evresinin smeardaki hücre tipleri	17
Şekil 2b: Östrüs evresinin smeardaki hücre tipi	17
Şekil 2c: Metaöstrüs evresinin smeardaki hücre tipleri.....	17
Şekil 2d: Diöstrüs evresinin smeardaki hücre tipleri.....	17
Şekil 3. Proöstrüs evresinde vaginal smear görüntüsü. Giemsa boyama yöntemi. Çekirdekli hücreler (siyah oklar), lökositler (ok başları), kornifiye hücreler (beyaz ok).....	28
Şekil 4. Östrüs evresinde vaginal smear görüntüsü. Giemsa boyama yöntemi. Çekirdeksiz kornifiye hücreler (oklar).	29
Şekil 5. Metöstrüs evresinde vaginal smear görüntüsü. Giemsa boyama yöntemi. Çekirdeksiz kornifiye hücreler (beyaz ok), çekirdekli hücreler (siyah ok), nötrofil lökosit (ok başı).	29
Şekil 6. Diöstrüs evresinde vaginal smear görüntüsü. Giemsa boyama yöntemi. Nötrofil lökosit (oklar), çekirdekli hücre (ok başı).....	30
Şekil 7. Ovaryumun mikroskopik görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi. Primer foliküller (ok başları), antral foliküller (a).....	31
Şekil 8. Sekonder folikülün mikroskopik görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi. Zona pellusida (z), granuloza hücreleri (g), teka interna (ok başı), teka eksterna (ok).....	32
Şekil 9. Antral folikülün mikroskopik görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi. Antrum (a), granuloza hücreleri (gc), teka hücreleri (tc).	32
Şekil 10. Graaf folikülünün mikroskopik görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi. Antrum (a), granuloza hücreleri (gc), teka hücreleri (tc).	33
Şekil 11. Yeni korpus luteumun mikroskopik görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi. Korpus luteum (Cl).....	34
Şekil 12. Korpus luteumun mikroskopik görüntüsü (A,B). Üçlü boyama yöntemi. Olgun korpus luteum (Cl).	34
Şekil 13. Korpus luteumun mikroskopik görüntüsü (A,B). Üçlü boyama yöntemi. Gerilemiş korpus luteum (Cl).	35

Şekil 14. Antral folikülün mikroskopik görüntüsü. sABC boyama metodu. Antrumu çevreleyen hücrelerin çekirdeklerinde 8-OHdG pozitivitesi (ok başları), antral boşluk (a).	37
Şekil 15. Graaf folikülünün mikroskopik görüntüsü. sABC boyama metodu. Graaf folikülü (gf), antrumu çevreleyen hücrelerdeki çekirdeklerdeki 8-OHdG pozitivitesi (ok başları).	38
Şekil 16. Korpus luteumun mikroskopik görüntüsü. sABC boyama metodu. Gerilemekte olan korpus luteum (Cl), hücrelerin çekirdeklerinde 8-OHdG pozitivitesi (siyah oklar).....	38
Şekil 17. Antral folikülün mikroskopik görüntüsü. TUNEL yöntemi. Antrum (a), antrumun çevresinde gözlenen apoptotik hücreler (siyah oklar).	39
Şekil 18. Olgun korpus luteumun mikroskopik görüntüsü. TUNEL yöntemi. Korpus luteum (Cl), luteal hücrelerde apoptozis (siyah oklar).....	40
Şekil 19. Gerilemiş korpus luteumun mikroskopik görüntüsü. TUNEL yöntemi. Korpus luteum (Cl), luteal hücrelerde apoptozis (siyah oklar).....	40

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: Ratlarda östrüs siklusu dönemlerinde folikül ve korpus luteum sayıları	36
Tablo 2: Ratlarda östrüs siklusu evrelerinde MDA (oksidan) ve SOD (antioksidan) değerleri	42

ÖZET

ÖSTRUS SIKLUSU SÜRESİNCE RAT OVARYUMUNDA OKSİDATİF STRESİN ARAŞTIRILMASI

Portakal İ. Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Yüksek Lisans Programı (Veteriner) Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2019.

Sunulan çalışmada; ratlarda östrus siklusunun farklı dönemlerinde, ovaryumdaki oksidatif stres düzeyi ile ovaryumu etkileyen sonuçlarının belirlenmesi ve siklus dönemleri arasındaki farklılıkların ortaya konması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda vaginal smear ile ratların östrus siklusunun dönemleri belirlendi. Her dönem için sekiz adet olmak üzere toplamda 32 adet erişkin rat, materyal olarak kullanıldı. Ovaryumlar histolojik, immunohistokimyasal ve enzim histokimyasal metotlarla incelendi, kanda MDA (malondialdehit) ve SOD (Süperoksitdismutaz) değerleri belirlendi. Herbir ovaryumda hem folikülogenezisin farklı aşamaları hem de korpus luteumun farklı dönemlerinin bulunduğu görüldü. Yeni korpus luteumun östrus döneminde metaöstrüs döneminden daha fazla olduğu gözlemlendi. Olgun korpus luteum sayısının metaöstrüs ve diöstrüs dönemleri arasında farklı olmadığı tespit edildi. Mikroskopik inceleme sonucunda oksidatif stres belirteci olan 8-OHdG (8-hidroksi-2' deoksi guanozin)'nin hem çekirdekte hem de sitoplazmada pozitifite verdiği dikkati çekti. Antral foliküllerde ve Graaf folikülünde, özellikle antrumu çevreleyen hücrelerin çekirdeklerinde, 8-OHdG pozitifitesi gözlemlendi. Gerilemekte olan ve gerilemiş korpus luteumların özellikle orta kısımlarında, bağ doku ile dolmaya başlayan kısımlarında 8-OHdG pozitifitesi tespit edildi. Kanda MDA seviyesi östrüs döneminde, SOD seviyesi metöstrüs ve proöstrüs döneminde yüksek bulundu. Apoptotik hücreler de immunohistokimyasal ve biyokimyasal verilere uygun olarak antral foliküller ve korpus luteumda gözlemlendi.

Anahtar kelimeler: Apoptozis, 8-OHdG, oksidatif stres, ovaryum, östrüs siklusu, rat.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE OXIDATIVE STRESS DURING THE ESTROUS SCYCLE IN THE RAT OVARY

Portakal İ. Aydın Adnan Menderes University Institute of Health Sciences Histology-Embryology Master of Science Program (Veterinary) Master Thesis, Aydın, 2019.

The aim of this study was to determine the effects of ovarian oxidative stress on ovaries and to determine the differences between the cycle periods. For this purpose, the periods of oestrus cycle of rats with vaginal smear were determined. A total of 32 adult rats, eight for each period, were used as material. The ovaries were examined by histological, immunohistochemical and enzyme histochemical methods and MDA (malondialdehyde) and SOD (süperoxide dismutase) values were determined in blood. The different stages of both folliculogenesis and life time of corpus luteum were seen in each ovary. It was observed that the new corpus luteum was higher in the oestrus phase than in the metoestrus. The number of mature corpus luteum was not different between metoestrus and dioestrus phases. As a result of microscopic examination, 8-OHdG (8-hydroxy-2' -deoxyguanosine), which is a marker of oxidative stress, showed both positivity in both nucleus and cytoplasm. The 8-OHdG positivity was observed in the antral follicles and the Graaf follicle, especially in the nuclei of the cells surrounding the antrum. At the same time, 8-OHdG positivity was observed in the resting and regressed corpus luteum, especially in the middle parts which were filled with connective tissue of the corpus luteum. MDA levels in blood were found to be high during the oestrus phase and SOD levels were found to be high in the metoestrus and proestrus phases. Apoptotic cells were also observed in antral follicles and Cl in accordance with immunohistochemical and biochemical data.

Key words: Apoptosis, 8-OHdG, oxidative stress, ovary, estrus cycle, rat.

1. GİRİŞ

Oksidatif stres; oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulmasıdır. Bu bozulma sonucu serbest radikaller (oksidan molekülü, reaktif oksijen) olarak adlandırılan, hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan oksijen bileşikleri meydana gelir. Buna engel olan antioksidan savunma sisteminin yeterli olmadığı durumlarda vücutta serbest radikallerin artmasıyla oksidatif stres oluşur (Atalay ve Laksonen, 2002; Sork, 2004).

Serbest radikallerin oksijen kaynaklı olanları reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species/ ROS) olarak isimlendirilirler (Sugino, 2006). ROS, oksijen (O₂) tüketimi sırasında üretilir (Fujii ve ark, 2005). Biyolojik sistemler bol miktarda O₂ içerir. Bir diradikal olarak O₂, kolayca diğer radikallerle reaksiyona girer. Serbest radikaller sıklıkla O₂'nin kendisinden üretilir ve kısmen indirgenmiş türler vücuttaki normal metabolik süreçlerden kaynaklanır. ROS, yaygın olarak oksidatif streste yer alan önemli ve potansiyel olarak toksik ara ürünlerdir (Kehrer, 2000). ROS seviyelerinde ılımlı bir artış hücre büyümesini ve proliferasyonunu uyabilir ve normal fizyolojik fonksiyonlara izin verir. Tersine, aşırı ROS hücre hasara neden olarak DNA, lipid membranlara ve proteinlere zarar verir (Agarwal ve ark, 2012).

ROS'un organizmada fizyolojik fonksiyonları da vardır. Dişi genital sistemde gerçekleşen hücre mekanizmaları ROS'un organizmadaki fizyolojik fonksiyonları için güzel bir örnek oluşturmaktadır. ROS'un dişi reproduktif sistemde oosit olgunlaşması, ovulasyon, korpus luteum şekillenmesi, steroid sentezi, luteolizis, embriyo gelişimi ve gebeliğe kadar dölleme ve üreme ile ilgili fizyolojik işlemlerde etkili olduğu bildirilmiştir (Gonzalez-Fernandez ve ark, 2005; Sugino, 2006; Rizzo ve ark, 2012; Ciani ve ark, 2015).

Ovaryumda gerçekleşen fizyolojik mekanizmaların ilerleyebilmesi için apoptozisin gerekli olduğu tahmin edilebilir. Folliküler antrumun oluşması, ovulasyon ve korpus luteumun gerilemesi apoptozisin gerçekleşmesi beklenen fizyolojik olaylardır. Oksidatif stres apoptozisi tetikleyen bir mekanizmadır. Sunulan araştırma, ovaryumlarda oksidatif stresin, ovaryum fonksiyonlarının gerçekleştirilmesinde fizyolojik bir faktör olarak kullanıldığı hipotezine dayanarak hazırlanmıştır. Dolayısıyla sunulan çalışmada, ovaryumda oksidatif stres düzeyi ile ovaryumu etkileyen sonuçlarının belirlenmesi ve siklus dönemleri arasındaki farklılıkların ortaya konması amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda öncelikle farklı östrüs siklusu evrelerindeki ovaryumların histolojik olarak incelenmesi, daha sonra oksidatif stres

belirteci olan 8-OHdG'nin ovaryum dokusunda gösterilmesi, kanda oksidan ve antioksidan belirteçlerin düzeyinin ölçülmesi ve dokuda apoptozis noktalarının belirlenmesi planlanmıştır.

Sunulan çalışma; histolojik, immunohistokimyasal, enzim histokimyasal ve biyokimyasal verileriyle, ovaryumda oksidatif stres ve fizyolojik mekanizmalar arasındaki bağlantı konusunda bilgi birikimine katkı oluşturacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Dişi genital sistem; ovaryumlar, sistemin kanalı (ovidukt, uterus, vagina) ve dış genital organ vulvayı içerir (Leeson ve ark, 1985; Tanyolaç, 1999). Sistemin sinirsel ve hormonal mekanizmalarla kontrol edilen ana fonksiyonları; dişi cinsiyet hücrelerinin üretilmesi, spermatozoonun kabul edilmesi, fertilizasyon, fötüsün gelişimi için uygun ortam hazırlanması ve gelişmiş fötüsün dış ortama çıkarılmasıdır (Leeson ve ark, 1985; Eroschenko ve Demir, 2001).

2.1. Ovaryum

Ovaryumlar olgun dişi eşey hücrelerini oluşturan, salgıladığı hormonlarla dişi genital sisteminin diğer organları üzerinde de etki gösteren ve östrus siklusunu düzenleyen organlardır (Tanyolaç, 1999). Ekzokrin (sitogenik) ve endokrin salgı yapan bir çift bez olarak da sınıflandırılırlar (Leeson ve ark, 1985).

Ovaryumun hilus kısmı, mezovaryum adı verilen peritoneal kıvrım ile geniş ligamentin posteriyor yüzeyine tutunur. Mezovaryumun vasküler bağ dokusu, hilumdan itibaren ovaryumun stromasını oluştururken, mezovaryumu kaplayan periton da (mezotel) germinatif epitel olarak devam eder (Leeson ve ark, 1985). Germinatif epitel bazal membrana oturur, epitelin altında sıkı bağdokudan oluşan tunika albugina vardır. Ovaryumda korteks ve medulla kısımları ayırtdedir. Korteks kısmında yoğun hücresel bağ doku ve bu bağdoku içine gömülmüş foliküller bulunur. Medulla ise kan damarları ve sinirleri içeren gevşek bağdoku kısmıdır (Leeson ve ark, 1985; Ross ve Pawlina, 2006; Richards, 2007).

2.1.1. Ovaryumun Gelişimi

Memelilerde ovaryumun gelişimi iki faza ayrılabilir. Birincisi, ovaryumun büyümesi ve primordial folikül havuzunun oluşumu, ikincisi ise foliküllerin olgunlaşması ve pubertede döllenabilir yumurtanın bırakılmasıdır (Wear ve ark, 2016). Ovariye gelişimin büyük kısmı farelerde erken embriyonik gelişimin beşinci gününde başlar ve doğumdan sonraki ikinci günde sonlanır (Edson ve ark, 2009; Sarraj ve Drummond, 2012).

İntermedier mezodermden köken alan gonad ve mezonefroz, sölomik boşluğun dorsal yönünde longitudinal olarak yer alırlar (Yao, 2005). Farklılaşmamış gonadlar her iki cinsiyette de mezonefrozun ventro-lateral yüzeyinde sölomik epitelin kalınlaşması ile oluşurlar (Guigon ve Magre, 2006). Fare embriyolarında bu kabartılar, çiftleşme sonrası (day of post coitum/dpc) 10. günde gerçekleşir.

Cinsiyetin belirlenmesinden önce, dişi ve erkek embriyolarda “uniseks” gonad gelişimi görülür. Gonadlar bu dönemde, genetik yapısına bağlı olarak, testis veya ovaryum yönünde gelişme kabiliyetine sahip olduklarından, “bipotansiyel” olarak da tanımlanırlar (Yao, 2005). Gonadların gelişmelerinde başlangıç süreci, çeşitli transkripsiyon faktörleri (Emx2, Wt1, Lhx9 ve steroidojenik faktör1 gibi) ile düzenlenir. Bu faktörler bipotansiyel olan gonadlarda somatik hücrelere etki ederler (Yao, 2005; Edson ve ark, 2009; Hu ve ark, 2013).

Somatik hücrelerin ve genital kabartıya göç eden germ hücrelerinin mitozla çoğalması sonucunda gonad taslaklarının hızlı bir şekilde büyümesi gerçekleşir (McKearin ve Ohlstein, 1995; Liu ve ark, 2010). Söz konusu somatik hücreler sölom epiteli ve mezenşimi ile mezonefrozdan köken alırlar (Motta ve ark, 1997).

Memelilerde cinsiyet sperm hücresinin kromozom kompozisyonuna göre fertilizasyon sırasında belirlenir. Y kromozomunun varlığı veya yokluğu (XX veya XY olması) gonadların cinsiyetini belirler. Erkeklerde (XY) Sry geni (Sex-determining region of the Y chromosome), farklılaşmamış gonadlardaki somatik hücrelerde bulunur ve hücre hatlarını testisi oluşturacak şekilde indükler. Sry geninin olmadığı durumda gonadlar otomatik olarak ovaryum olarak farklılaşacaktır (Smith ve ark, 2014). Erken ovaryum gelişimi için XX genetik özelliğe sahip somatik hücreler, cinsiyetin belirlendiği zamanda, wnt4 ve follistatin eksprese etmektedirler (Vaino ve ark, 1999; Menke ve Page, 2002).

2.1.2. Oosit Oluşumu

Oosit oluşumu yedi basamakta gerçekleşir. Bunlar; primordiyal germ hücrelerinin (primordial germ cells /PGCs) oluşumu, PGC'nin gonad taslaklarına göçü, PGC'nin gonadlarda kolonize olmaları, PGC'nin oogonyumlara farklılaşmaları, oogonyumların

çoğalması, mayozun başlaması ve mayozun profaz I'in diploteninde durdurulması olarak sıralanabilir (Van Den Hurka ve Zhaob, 2005).

2.1.2.1. Primordial germ hücreleri

Spermatozoon ve oositlerin öncüleri, diploid primordial germ hücreleridir. PGC'ler unipotent hücrelerdir ve organizmanın cinsiyetine bağlı olarak spermatozoon veya oosite dönüşürler. Oositin sperm tarafından döllenmesi sonucu da totipotent olan zigot oluşur. Primitif germ hücrelerinin spesifikasyonunda kemik şekillendirici protein (bone morphogenetic protein/ BMP) ve WNT sinyalizasyonu rol oynar (Güneşdoğan ve ark, 2014).

Farelerde primordial germ hücrelerinin öncülleri, gastrulasyon öncesi ve primitif çizgi oluşumunun başlangıcındaki embriyolarda ekstraembriyonik ektoderme yakın olarak proksimal epiblastta bulunmuştur (Lawson ve Hage, 1994; Anderson ve ark, 2000). Bu hücreler ilk önce altı hücre olarak ortaya çıkarlar. Mitoz bölünmeyle çoğalan farklılaşmamış hücreler embriyonun yedinci gününde primitive çizgide 40 hücre olurlar (Wear ve ark, 2016). Ekstraembriyonik ektodermden bırakılan BMP4'ün etkisi ile allantoisin proksimaline ulaşırlar (Lawson ve ark, 1999).

Visseral endoderm ve ekstraembriyonik ektoderm primordial germ hücrelerinin öncülerinin oluşumunu birlikte indüklerler. Visseral endoderm, uygun sayıda PGC öncülünün oluşumunu düzenlerken öncü hücrelerden sonraki PGC'lerin spesifikasyonu için etkisi yoktur. Ekstraembriyonik ektodermin görevi, PGC öncüllerinin embriyonun arka kısmına lokalizasyonu kısıtlamaktır (de Sousa Lopes ve ark, 2007).

Primitif cinsiyet hücreleri yüksek alkalın fosfataz aktivitesi gösterirler ve Blimp1/Prdm1 (B-lymphocyte-induced maturation protein /positive regulatory domain I) (Ohinata ve ark, 2005) ve Prdm14 eksprese ederler (Yamaji ve ark, 2008). Daha sonra kemotatik faktörler yardımıyla (c-kit, Kit ligand) 10.5 dpc güne kadar gonadlara göç ederler ve orada hızla çoğalırlar. Burada yeniden programlanarak oogenezis veya spermatogenezise hazır hale gelirler (Ohinata ve ark, 2005; Yamaji ve ark, 2008).

2.1.2.2. Ovariye kordonların oluşumu ve oosit I'in mayoz bölünmeye girmesi

Oositler, mezotelden köken alan (mezenkimal hücreler) ve bazal membran üzerine oturan gonadal somatik pre-granülosa hücreleri ile biraraya gelerek ovariyel kordonları oluştururlar (Odor ve Blandau, 1969; McKearin ve Ohlstein, 1995; Guigon ve Magre, 2006). Farklı olarak Hummitzsch ve ark (2013), ovariyel kordonların stromal hücrelerinin ovaryumun germinatif epitelinden köken almadıklarını, hatta hem germinatif epitelin hem de granuloza hücrelerinin gonad kabartısı epitel benzeri hücrelerinden (gonadal ridge epithelial like cells/ GRELs) köken aldığını ileri sürmektedirler.

Ovarize kordonlar içinde oogoniumlar ilk mayotik bölünmenin profazına girerler (McKearin ve Ohlstein, 1995; Ohinata ve ark, 2005; Guigon ve Magre, 2006; Yamaji ve ark, 2008). Gelişimin 13.5 dpc gününde oogonia mitoz bölünmeyi keser ve oosit oluşturmak için mayoz bölünme aşamasına geçer. Mayoza başlarken, mayoza spesifik bir protein olan sinaptonemal kompleks protein 3 (synaptonemal complex protein 3/ Sycp 3) geninin ekspresyonuyla sentezlenir. Bu protein DNA'nın sinapsını ve mayotik rekombinasyonunu kolaylaştırır (Bullejos ve Koopman, 2004).

Daha sonra ovariyel kordonlar, diploten aşamasında olan her bir oositi kaplayacak şekilde foliküler ünitler halinde kırılırlar (Guigon ve Magre, 2006; Liu ve ark, 2010) ve kistik yapıları oluştururlar (Byskov, 1986).

2.1.2.2.1. Mayozun durdurulması

Mayoz, primer oositler mayoz I'in profazına girdikten sonra, fetal gelişim boyunca ve puberteye kadar, profaz I'in diploten aşamasında durdurulur (McKearin ve Ohlstein, 1995; Sanchez ve Smith, 2012). Mayotik blokaj, hem oosit hem de kumulus hücreleri tarafından yapılan ve gap junction aracılığı ile oosite aktarılan, ikincil haberci olan siklik adenosin monofosfatın (cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate / cAMP) yüksek konsantrasyonu ve cAMP bağımlı protein kinaz A'nın (protein kinase A/ PKA) aktivasyonu ile sağlanır (Conti ve ark, 2002; Adhikari ve Lui, 2014; Wang ve ark, 2015). PKA düzenleyici ve katalitik alt üniteleri ile bilinmeyen proteinlerin fosforilasyonları ve ayrıştırılmalarına neden olur (Webb ve ark, 2002). cAMP'nin konsantrasyonunun azalması ise mayozun kaldığı yerden tekrar devam etmesine neden olur (Conti ve ark, 2002). cAMP'nin oosit konsantrasyonunu düzenleyen iki tip enzim salgılanır. Bunlar; cAMP sentezinden sorumlu olan adenilat siklaz

(adenilate cyclase/ AC) ve parçalanmasından sorumlu fosfodiesterazlar (phosphodiesterase/ PDE) dir. (Conti ve ark, 1998; Wang ve ark, 2015).

Profazda durdurulmuş oosit büyük bir nükleus bulundurur ve bu nükleusa germinal vezikül (germinal vesicle/ GV) adı verilir (Jaffe ve Egbert, 2017).

Fare ovaryumlarında, hücre ölümünün ilk dalgası oogonyumların ilk mayoza girdiği (13.5-15.5 dpc) zamandır. İkinci dalga ise 17.5 dpc ile doğum aşaması arasında, hatta rodentlerde doğumdan sonraki iki güne kadar oluşur. Bu son aşama kistlerin parçalanmasını ve primordiyal follikül yerleşmesinin başlangıcını gösterir (Coucouvanis ve ark, 1993; Ratts ve ark, 1995). Kistik yapıların oluşumu sırasında toplam oosit miktarının ancak üçte biri primordiyal follikül oluşumuna katılmakta, diğerleri ise apoptozise sürüklenmektedirler (Borum, 1967; Pepling ve Spradling, 2001; Pepling, 2012).

2.1.3. Folikül Gelişimi

2.1.3.1. Primordiyal folikül oluşumu

Mayozun profaz I. aşamasında beklemekte olan primer oosit ve onu çevreleyen tek katlı yassı folliküler hücreler primordiyal follikülü oluşturur (Reynaud ve Driancourt, 2000; Pepling ve ark, 2010). Germ hücre yuvaları, primordiyal foliküller halinde, ovaryumun dış kısmında (korteks) yerleşirler (Liu ve ark, 2010). Dinlenmekte olan foliküller sistemik veya lokal olan inhibitör faktörlerin etkisi altındadırlar. İnhibitör maddelerin azalması ve stimülatör faktörlerin artması folikül büyümesine izin verir. Örneğin granuloza hücrelerinden salgılanan antimüllerian hormon (AMH) ve Foxl2 (Forkhead box L2) ile oosit kaynaklı PTEN (phosphatase and tensin homolog), Tsc1(tuberous sclerosis complex 1), Tsc2, Foxo3a, p27 primordiyal folikülün primer foliküle dönüşümünü engeller (La Marca ve ark, 2009; Reddy ve ark, 2010). Ayrıca, PI3K (phosphoinositide 3-kinase) ve mTOR (mammalian target of rapamycin) gibi primordiyal follikülün hayatta kalmasını sağlayan faktörler de vardır (Reddy ve ark, 2010).

2.1.3.2. Primordial folikülden primer foliküle geçiş

Primordial folikülden preantral folikül aşamasına kadar olan folikül gelişiminin erken aşamaları gonadotropin salgılayıcı hormondan (*gonadotropin releasing hormone / GnRh*) bağımsızdır (Edson ve ark, 2009). Primordial folliküllerden folikül büyümesinin ilk dalgasına girmek için seçilen folliküller aktive olur ve primordiyalden primere geçiş başlar (Hutt ve ark, 2006). Folikül gelişimini başlatan çeşitli faktörler arasında transforme edici büyüme faktörü β (transforming growth factor- β / TGF- β) ailesi üyeleri, BMP-4, BMP-7, büyüme farklılaşma faktörü 9 (growth differentiation factor-9/ GDF-9), kit-ligand, LIF (leukemia inhibitory factor) ve bFGF (basic fibroblast growth factor) sayılabilir (Braw-Tal, 2002; Skinner, 2005; Li ve Chian, 2017).

Primordial folikülden primer aşamaya geçiş uzun bir süre alabilir (Fortune, 1994). Primer folikülün oluşumu sırasında yassı granuloza hücreleri kübik hücrelere dönüşürler ve oositin çapı artar. Oogonyum büyür ve primer oosit olur. Devamındaki primer follikülün büyüme aşamasında hem granuloza hücrelerinin sayısının artması hem de oositin büyümesi gerçekleşir (Moore ve ark, 2011; Li ve Chian, 2017). Granuloza hücresi kaynaklı Kit Ligand (KitL) oosit büyümesi için fonksiyonel öneme sahiptir (Thomas ve Vanderhyden, 2006).

2.1.3.2.1. Oosit ve granuloza hücreleri arasında karşılıklı etkileşim

Oosit ile onu çevreleyen somatik hücreler sıkı ilişki içerisindedirler. Primer oosit ve granuloza hücreleri arasında zona pellüsida şekillenir (Rankin ve Dean, 1996; Sadler, 2005). Tavşan ovaryumunda zona pellusidaya ait proteinler ilk olarak, yassı follikül epitelleri ile çevrelenmiş olan oositin sitoplazmasında görülmüşlerdir (Wolgemuth ve ark, 1984).

Oositin salgılanan faktörler granuloza hücrelerinin büyüme ve farklılaşmaları ile ilişkili olarak follikül gelişimini düzenlerler (Gilchirst ve ark, 2004). Oositin salgılanan TGF- β süper ailesi üyelerinden olan, özellikle GDF-9 ile BMP-15 ve daha az olmak üzere BMP-6 ile aktivinler, granuloza hücrelerinin büyümesi ile farklılaşmalarına etki ederler (Dong ve ark, 1996; Gilchirst ve ark, 2004).

Granuloza hücreleri anatomik ve fonksiyonel olarak iki hat şeklinde farklılaşırlar. Mural granuloza hücreleri (mural granuloza cell /MGC) folikülün duvarını kaplar ve steroidojenik role sahiptir. Kumulus hücreleri (Cumulus cells /CC) ise oosit ile biraradadırlar. Bu hücreler sitolazmik uzantılarla zona pellusidaya penetre olurlar. Gap junctionları ile

beraber kumulus-oosit kompleksi (cumulus oocyt complex/ COC) adı verilen yapıyı oluştururlar (Albertini ve ark, 2001; Gilchirst ve ark, 2008; Kuyucu ve Tap, 2009). Granuloza ve teka hücreleri arasında bazal lamina vardır (Sadler, 2005).

2.1.3.3. Preantral/ Sekonder folikül oluşumu

Primer folikülde tek katlı olan granuloza hücreleri sekonder folikülde çok katlı hale gelir. Granuloza hücreleri dışında bazal lamina vardır. Bazal laminanın dış tabakasındaki somatik hücreler teka interna ve teka eksternayı oluşturarak folikülün büyümesine neden olurlar. İki teka katmanı arasında kan damarlarının oluşması sonucu kandan foliküle dolaşım başlar. Tekal anjiogenesisin gerçekleşmesi folikül gelişimi için oldukça önemlidir (Tamanini ve Ambrogi, 2004). Ratlarda primer folikülün etrafında da teka hücreleri gösterilmiştir (Skinner, 2005). Normal foliküler gelişim, oosit ve granuloza hücreleri arasında ve ayrıca granuloza ile teka hücreleri arasında hücre-hücre iletişimini gerektirir (Eppig, 2001; Skinner, 2005).

Preantral aşamadan Graaf folikülü aşamasına kadar olan dönemdeki foliküller, eksprese ettikleri folikül uyarıcı hormon (follicle stimulating hormone/ FSH) ve lüteinleştirici hormon (luteinizing hormone/ LH) reseptörlerinin aracılığıyla gonadotropinlere cevap verirler (Edson ve ark, 2009). Itoh ve ark (2002) insülin, FSH ve LH'nin *-in vitro-* inek büyük preantral folliküllerinin oluşumunda ve büyümesinde önemli rol oynadığını ileri sürmüşlerdir. Folikül gelişimiyle beraber granuloza hücreleri farklılaşır ve östrojen sentezi artar. FSH, cAMP aracılığıyla foliküler gelişimi uyarır (Hunzicker-Dunn ve Maizels, 2006).

2.1.3.4. Antral folikül oluşumu

Foliküler büyümenin başlangıç aşaması oldukça yavaş olsa da antrum şekillenmesi çok daha hızlıdır (Fortune, 1994). Foliküler antrum şekillenmesi ve antrumun genişlemesi FSH'ya bağlı bir durumdur (Chun ve ark, 1996; Hsu ve Hsueh, 1997; Combelles ve ark, 2004). FSH, granuloza hücrelerindeki reseptörüne bağlandığında östrojen (estradiol/ E2) üretimini artırırken (Lee ve ark, 2001), E2 antrum şekillenmesini başlatmaktadır (Tasaki ve ark, 2013).

Gelişmekte olan foliküllerde önceden teka hücreleri arasında oluşan vasküler ağ, özellikle granuloza hücreleri tarafından üretilen vasküler endotelial büyüme faktörü (vascular endothelial growth factor /VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörünün (basic fibroblast growth factor /bFGF) uyarımıyla belirgin şekilde gelişir ve damarların geçirgenlikleri artar (Tamanini ve Ambrogi, 2004). FSH ile birlikte epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor /EGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü 1 (insulin-like growth factor 1 /IGF-1)'in de *in vitro* folikül büyümesini ve antrum şekillenmesini artırdığı tespit edilmiştir (Gutierrez ve ark, 2000). Antrum şekillenmesinde folikülün içine su girişi önemli olmaktadır. McConnel ve ark (2002) su geçirgenliğinin oluşumunda akuaporin 7, 8 ve 9'un aracılık ettiğini tespit etmişlerdir. Granuloza hücrelerinin oluşturduğu hiyaluronan ve kontroitin sülfatın ozmoza meyil oluşturduğu düşünülmektedir (Rodgers ve Irving Rodgers, 2010).

Folikül büyürken granuloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar şekillenir. Bu şekilde olan foliküller antral folikül olarak adlandırılır (Sadler, 2005; Sugiura ve ark, 2011).

2.1.3.5. Preovulatör folikül (Graaf folikülü) oluşumu

Teka hücreleri LH kontrolünde kolesterolden androjen ve progestin üretimini gerçekleştirirler (Erickson ve ark, 1985; Hedin ve ark, 1987). LH preantral folikülden erken-antral folikül aşamasına geçiş döneminde androjenlerin sentezini ve büyümeyi uyaran etkisini artırır (Orisaka ve ark, 2013). Teka hücrelerinden salınan BMP4, granuloza hücrelerindeki reseptörüne bağlandığında FSH etkisiyle östrojen üretimini artırırken, BMP7 progesteron üretimini uyarmaktadır. BMP7 aynı zamanda primordial folikülden primere geçişi ve devamında antral folikül oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Lee ve ark, 2001).

Foliküler gelişim ovulasyon öncesi aşamaya ulaştığı zaman granuloza hücreleri, LH kontrolü altında progestinleri sentezleme ve salgılama kapasitesini artırır (Uilenbroek ve Richards, 1979; Camp ve ark, 1991). Preovulator foliküllerde granuloza hücreleri teka hücrelerinin salgıladığı androjeni, aromatazın etkisiyle E₂'ye çevirmektedirler (Evans ve ark, 1981; Palermo, 2007; Tasaki ve ark, 2013). Dominant folikülde E₂ oluşumunda, LH reseptörlerinin (Luteining Hormone Receptor /LHR) artması, IGF gibi intrafoliküler faktörlerin spesifik değişimleri ile inhibin, aktivin ve follistatin sistemleri de önemli rol oynar (Fortune ve ark, 2003; Hayashi ve ark, 2010) . İmmatur antral folikül, granuloza hücrelerinin duyarlılığını, FSH'ya yanıtı artırmak ve LH etkisiyle tekal androjen sentezini baskılamak üzere aktivinleri üretir. Preovulatör folikülde ise FSH etkisiyle üretilen inhibin,

maturasyonu sonlandırmak için tekrar LH ve androjen sentezini uyarır (Atwood ve Meethal, 2016).

Granuloza hücreleri arasında oluşan boşluklar birleşerek tek bir boşluk (antrum) meydana getirir. Oluşan folikül Graaf follikülü adını alır (Kuyucu ve Tap, 2009). Antrumun şekillenmesi granuloza hücrelerini, oositin çevresinde kumulus granuloza hücreleri ve foliküler duvarı sınırlayan mural granuloza hücreleri olmak üzere, yerleşim ve fonksiyonel olarak ikiye ayırır (Sugiura ve ark, 2011). Antrumun bir kenarında, ortada primer oosit, primer oositi çevreleyen zona pellüsida ve etrafındaki kumulus granuloza hücreleri tarafından oluşturulmuş korona radiyata hücreleri bulunur.

2.1.4. Mayotik Olgunlaşma

Memelilerde mayotik olgunlaşma LH salınımıyla tetiklenir (Anwar ve Moussa , 2002). LH sitozoldeki olgunlaşmayı uyaran faktörü (maturation promoting factor/ MPF) aktive eder. MPF, katalitik siklin bağımlı kinaz 1'in (cyckline dependent kinase-1 /CDK-1) bir heterodimeridir ve düzenleyici komponenti siklin b'dir. Aktif MPF mayozun metafaz I'den metafaz II'ye ilerlemesini, histon-1 kinaz aktivasyonu, kromozom yoğunlaşması, iğ ipliği oluşumu, çekirdek zarının erimesi (germinal vesicle breakdown /GVDB) yoluyla sağlar ve ilk polar cisimcik bırakılır (Shibuya ve ark, 1989; Das ve Arur, 2017). Birçok faktör, kümülüs hücresindeki GVBD'nin kontrolüne aracılık eder. Gap junctionlar; steroidler, Ca⁺², inositol 1,4,5-trisfosfat, cAMP ve pürinler gibi düzenleyici moleküllerin oosit ve kümülüs hücreleri arasında serbestçe geçmesine izin verir (Chian ve ark, 2003). İkinci mayoz bölünme başlar ancak metafazda duraklar. Oosit sperm tarafından fertilize olana dek bu aşamada kalır (Orisaka ve ark, 2009).

2.1.5. Sitoplazmik olgunlaşma

Sitoplazmik olgunlaşma, oositte GV evresinden metafaz II sonuna kadar olan yapısal ve moleküler değişiklikler içerir (Cran ve Moor, 1990). Sitoplazmik olgunlaşma, döllenme ve embriyonik gelişim için oosit sitoplazmasının hazırlanmasına atıf yapan bir terimdir (Cao ve ark, 2009; Chian ve ark, 1999). RNA molekülleri, proteinler ve baskılayıcı genler, büyüme

evresi boyunca oosit sitoplazmasında birikir ve embriyo DNA transkripsiyonu başlamadan önce embriyonik gelişimin erken evresini sürdürmek için kullanılır (Gougeon, 1998; Picton ve ark, 1998).

2.1.6. Preantral Foliküllerde Atrezi

Ovaryumda foliküler atrezi, ovulasyon öncesi antral foliküllerde gözlenen dejeneratif değişiklikler olarak tanımlanmaktadır. Dejeneratif değişikliklerde apoptozis önemli yer tutmaktadır (Husueh ve ark, 1994; Matsuda-Minehata ve ark, 2006) Yaşam faktörlerinin (FSH, ILGF-I, EGF) yetersizliğinde folikülde endojen apoptozis yolu aktive olmakta ve foliküler atrezi gerçekleşmektedir (Quirk ve ark, 2004). Folliküler atreside; ölüm ligand ve reseptörleri, Bcl-2 ailesine ait proteinler, nodal, kaspaslar, büyüme faktörleri, gonadotropinler ve kalsiyum gibi faktörlere bağlı apoptozis gerçekleşebilmektedir (Gümüş ve ark, 2013). Mikroçevredeki östrojen yetersizliği de ovulasyonun gecikmesi sebebiyle, atresi nedeni olabilmektedir (Tabarowski ve ark, 2005).

Dejeneratif değişiklikler önce granuloza hücrelerinde başlamakta sonra teka hücrelerinde de görülmektedir (Tabarowski ve ark, 2005; He ve ark, 2016; Worku ve ark, 2017).

2.1.7. Ovulasyon

İnsanlarda her bir siklusta yirminin üzerinde primordial folikül olgunlaşma işlemi için aktive olur ancak genellikle bir tanesi tam olgunluğa ulaşır ovule olurken, diğerleri geriler (Tomac ve ark, 2011). Ovulasyon, oositin ovaryumdan bırakılmasıdır, ovulasyon öncesi LH salınımı ile indüklenir (Crespo ve ark, 2015). Ovulasyon; hormonlar, immun ve metabolik sinyaller, ayrıca teka ve granuloza hücrelerinden salınan intrafolliküler parakrin faktörler ve oositin de içinde olduğu birçok etken tarafından kontrol edilir (Russell ve Robker, 2007).

LH, folikülün rüptürünü folikül duvarında proteoliz ve apoptozu uyararak tetikler. LH, matriks metalloproteinaz ailesinden (matrix metalloproteinase/ MMPs), kollagenolitik aktiviteye sahip olan MMP2 eksprese edilmesine neden olur. Prostaglandin ve proinflamator sitokin olan tümör nekrozis alfa (TNF α) da ovulasyon işlemleri düzenleyici moleküllerdendir (Crespo ve ark, 2015). LH preovulasyon folikülde, teka interna hücrelerinde, caspas 3 ve 7

aktivitesini ve apoptozisi artırmaktadır (Yacobi ve ark, 2004). Olgunlaşmış olan folikül artan LH'ya cevap olarak yırtılır ve folikülden döllenabilir oosit bırakılır (Robker ve ark, 2000).

Ovulasyon sırasında folikül hücrelerinde (granuloza ve teka hücreleri), stromal hücreler (fibroblast ve endotel hücreleri) ve yüzey epitel hücrelerinde fonksiyonel değişimler meydana gelir. Ayrıca ovulasyon sırasında nötrofil ve makrofajların invazyonu gerçekleşir ve sitokinler de inflamatuvar hücreler ve ovaryumdaki hücreler üzerine etkili olabilir (Robker ve ark, 2000).

2.1.7.1. Korpus luteum

Korpus luteum (corpus luteum/ CL) blastosist implantasyonu ve gebeliğin devamı için gerekli olan progesteronu salgılayan geçici endokrin bir organdır. Ek olarak progesteron, negatif geri bildirim mekanizması ile hipotalamusa baskı yaparak, bir sonraki foliküler gelişimi baskılar. CL ovulasyondan sonra granuloza ve teka hücreleri tarafından oluşturulur (Tomac ve ark, 2011.). Korpus luteumda teka-lutein hücreleri veya granuloza-lutein hücreleri bulunur (Alila ve ark, 1989).

LH ovulasyona uğramış folikülün CL'a dönüşmesini sağlar (Russel ve Robker, 2007; O'shea ve ark, 1978). Teka hücreleri, fibroblastlar ve endotel hücreleri yeni oluşan korpus luteuma dahil olur (Palotie ve ark, 1984). LH salınımıyla tekal hücrelerin mikroçevresinde değişimler başlar ve korpus luteumda yeni damarlar gelişir (Carpini ve ark, 2010). LH artışı, luteinleşecek olan granuloza hücrelerinde bazı genleri aktive eder. Steroidogeneziste yer alan genler arasında, LH salınımından sonra aromataz enzimi baskılanırken steroidojenik akut düzenleyici (steroidogenic acute regulatory /StAR) proteini ürettiren gen hızlı bir biçimde indüklenir (Maekawa ve ark, 2016). Düşük yoğunluklu lipoprotein (low density lipoprotein/ LDL ve yüksek yoğunluklu lipoprotein (high density lipoprotein/ HDL)'den sağlanan kolesterolden pregnenolon oluşur. Serbest kolesterol mitokondriye taşınır. Sitokrom p450 ve steroid proteinler ile taşıma işlemi gerçekleşir. Pregnenolon progesterona dönüştürülür (Hanukoğlu, 1992).

Korpus luteumlar içindeki hücrelerin karakterlerine, fibröz doku bulundurmalarına, sentral boşluk içermelerine ve bağ doku içeriğine göre ayrılıp sınıflandırılabilir (Westwood, 2008). Ratlarda korpus luteum yeni, olgun ve gerilemiş olarak üç tipte tanımlanır. Yeni oluşan korpus luteum, östrus siklusunda ovulasyondan sonra görülür. Daha önce oluşan korpus

luteum aynı zamanda eski olarak tanımlanan korpus luteum, tamamen yok olmadan birkaç östrus siklusu döngüsü süresince kalır (Yoshida ve ark, 2009).

Luteoliz, fonksiyon kaybı ve ardından luteal yapının involüsyonu olarak tanımlanır. Progesteron sentezinin azalması, apoptotik hücrelerin sayısının artması ve luteal yapının bozulması korpus luteumun gerilediğini gösterir (Devoto ve ark, 2009; Bruce ve ark, 2002). Lüteoliz sırasında kan damarlarının hacmi azalır. Lüteolizisi en önemli faktörü prostaglandin F₂ alfa (PGF₂α)'dır (Davis ve Rueda, 2002).

2.2. Ratlarda Östrüs Siklusu

Ratlar, geçmişte ve günümüzde üzerlerinde birçok deneysel çalışmanın yapıldığı hayvanlardır. Bu hayvanlar, bakım ve beslemelerinin kolay olması ve araştırmalar sırasında elde edilen verilerin diğer canlılar için de temel oluşturması açısından tercih edilmektedirler. Bu nedenle seksüel sikluslarının takip edilmesi ve bu siklus üzerine etki eden faktörlerin ortaya konması gerekir. Dişi ratların yetişkin ağırlığı 250-350 gr arasındadır. Gıda alımı 5-10g/100 g, su alımı 10 ml/100 g'dir. Yaklaşık 3-4 yıl yaşarlar. Erişkinliğe geçiş dönemi 50-60 gün arasındadır. Siklusları 65-110 gün arasında gerçekleşir. Dişi ratlarda ergenlik dönemi doğumdan sonraki dördüncü haftada LH salınımının ardından ovaryum olgunlaşmasıyla başlar (Andrews ve ark, 1981). LH salınımı proöstrüsten sekiz gün önce gözlenir. Bu evreye anöstrüs denir (Urbanski ve Ojeda, 1985). Gebelik süresi 20-23 gün arasındadır. (Richardson ve Backues, 2003).

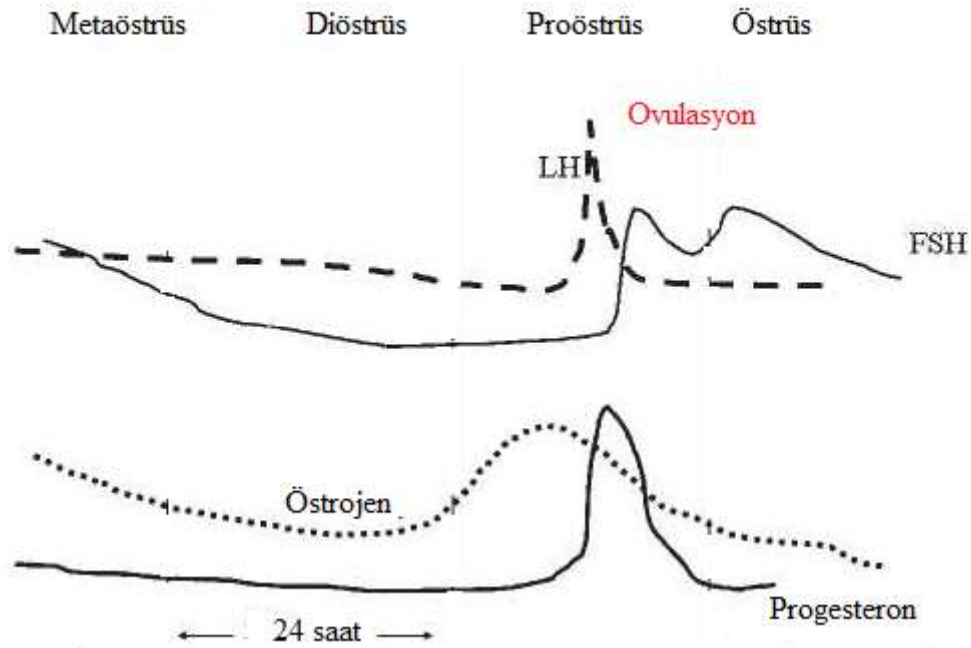
Dişi ratlar yıl boyu poliöstrik hayvanlar olup 4-5 günde bir düzenli kızgınlık gösterirler. Östrüs siklusu proöstrüs, östrüs, meteöstrüs ve diöstrüs olmak üzere dört evre içerir. Proöstrüs 12 saat, östrüs 9-15 saat, metaöstrüs 21 saat ve diöstrüs 57 saat sürmektedir (Lohmiller ve Swing, 2006). Ovulasyon proöstrüs öğleden sonrasında başlar ve östrüs öğleden önce biter. Ovulasyon gerçekleştikten sonra yerinde korpus luteum şekillenir. Korpus luteum en fazla erken diöstrüs döneminde büyür ve en yüksek progesteron değerlerine de östrüs siklusunun ikinci gününde ulaşılır (Gallo, 1981; Dluzen ve Ramirez, 1986).

Ovaryumda hormonal salınımlar, ön hipofizden salınan, ovaryumda değişimlere neden olan gonadotropinler tarafından düzenlenir (Şekil 1). FSH folikül gelişimini stimüle ederken LH folikülden ovulasyonu uyarır ve korpus luteum şekillenir (Hamid ve Zakaria, 2013). FSH; proöstrüs evresinin öğleninden östrüs evresinin öğlenine kadar artış gösterir. LH, prolaktin ve progesteron proöstrüs evresinin öğleninden gece yarısına kadar artış gösterir (Monroe ve

ark,1969; Piacsek ve ark, 1971; Smith ve ark, 1975; Spornitz ve ark, 1999). Proöstrus evresinin sabahında ise östradiol pik seviyeye ulaşır. Öğleden itibaren LH artış göstererek pik seviyeye ulaşır. LH'nın etkisiyle artış gösteren progesteron, proöstrus öğleninden ovulasyon gerçekleşene kadar yüksek seviyelerde görülür (Mendoza-Rodriguez, 2003). Diöstrusun başlarında östradiol salınımının az olduğu, sonlarına doğru arttığı bildirilmiştir. FSH artışı ile folikül gelişimine yardım eden östradiolün salınımının adenohipofizden ovulasyon öncesi LH salınımı için başlama uyarısı olduğu ileri sürülmüştür (Levine ve ark, 1985).

LH atımlı (pulsatile) olarak salınır ve en yüksek frekansa proöstrüste en düşüğe de östrusta ulaşır. LH atımı (pulse) GnRH salınımının artışına bağlıdır (Dluzen ve Ramirez, 1986; Levine ve Duffy, 1988; Levine ve Levine, 1989; Levine ve ark, 1991). Proöstrus sırasında salınan LH dalgaları preovulatuvar follüküllerde (preovulatör follükül 0,9-1,0 mm çapında) ovulasyonun meydana gelmesine ve korpus luteumun şekillenmesine neden olur. İki adet preovulatuvar FSH dalgası küçük follüküllerin gelişimini stimule eder (Peluso, 1992; Fortune, 1994). İlk dalga LH dalgası ile alakalı ve ikinci dalga ovulasyon sonrası inhibindeki azalma ile ilişkilidir (Ackland ve ark, 1990; Haisenleder ve ark, 1990).

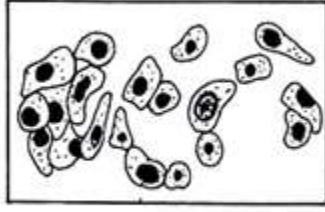
Rat follüküllerinde yapılan çalışmalar 17- α -Hidroksilaz ve aromataz mRNA düzeyinin preovulatör LH dalgasından önce artış gösterdiğini ortaya koymuştur (Richards ve ark, 1987; Findlay, 1993). Metaöstrus boyunca, korpus luteumdan progesteron salınır. Progesteron seviyesi diöstrusta azalır ve artan östradiol-17 β 'ya bağlı olarak foliküler gelişim tekrar başlar. Siklus proöstrusta meydana gelen östrojen piklerinin ovulasyona neden olan gonadotropin salınımını indüklemesi ile tamamlanır (Freeman, 1988). Ratlarda 5 gün devam eden östrus siklusu, 4 günlük siklusa benzer fakat LH ve östrojen sekresyonu, luteolozis ve uterus değişiklikleri 24 saat gecikmeli olarak meydana gelir (Astwood, 1939).



Şekil 1: Östrüs siklusundaki evrelerde hormonların salınımları (Web_1)

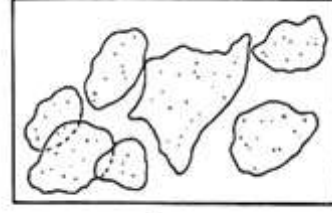
2.2.1. Ratlarda Vaginal Smear

Ratlarda 4-5 günlük siklusu belirlemek için vaginal smear yöntemiyle hücre tipleri belirlenerek evreler tanımlanır (Long ve Evans, 1922; Freeman, 1988). Östrüs siklusunun evreleri vaginal smear örneklerinde görülen üç tip hücrenin oranına göre karakterize edilir. Bu hücre tipleri epitel hücreleri, kornifiye hücreler ve lökositlerdir (Marcondes ve ark, 2001). Proöstrus evresinde çok sayıda çekirdekli epitelyum hücreleri ve bunun yanında nötrofil lökositler ve çekirdeksiz hücreler görülür (Şekil 2a). Östrus evresinde sadece çekirdeksiz üst üste gelmiş yassı hücreler görülür (Şekil 2b). Metaöstrus evresinde üç hücre tipi de görülür fakat yoğun olarak çekirdeksiz hücreler ve nötrofil lökositler görülmektedir (Şekil 2c). Diöstrus evresinde ise nötrofil lökositler yoğun bir şekilde görülürken az sayıda da çekirdekli hücreler görülmektedir (Şekil 2d) (Marcondes ve ark, 2001; Westwood, 2008; Paccola ve ark, 2013).



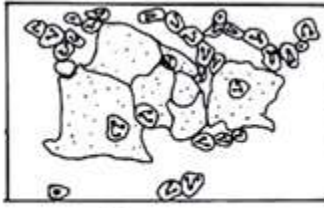
Proöstrus

Şekil 2a: Proöstrüs evresinin smeardaki hücre tipleri (Web_2)



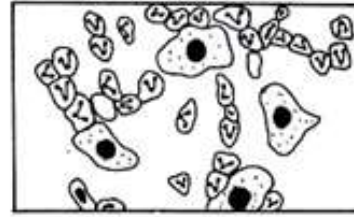
Östrus

Şekil 2b: Östrüs evresinin smeardaki hücre tipi (Web_2)



Metaöstrus

Şekil 2c: Metaöstrüs evresinin smeardaki hücre tipleri (Web_2)



Diöstrus

Şekil 2d: Diöstrüs evresinin smeardaki hücre tipleri (Web_2)

2.3. Oksidatif Stres

Oksidatif stres; oksidan oluşumu ve antioksidan savunma arasındaki dengenin oksidanlar yönünde bozulmasıdır. Bu bozulma sonucu serbest radikaller (oksidan molekülü, reaktif oksijen) olarak adlandırılan, hücre yapı ve fonksiyonlarını bozan oksijen bileşikleri meydana gelir. Buna engel olan antioksidan savunma sisteminin yeterli olmadığı durumlarda vücutta serbest radikallerin artmasıyla oksidatif stres oluşur (Atalay ve Laaksonen, 2002; Sork, 2004). Serbest radikaller pozitif, negatif ya da nötr yüklü olabilirler (Halliwell, 1989). Bu radikaller öncelikle süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH), peroksil radikali (ROO), nitrik oksit (NO) ve hidrojen peroksit (H_2O_2)'dir (Babior, 2000).

Bir serbest radikal üç yolla ortaya çıkabilir.

1. Kovalent bağ taşıyan normal bir molekülün homolitik yıkımı sonucu oluşurlar.
2. Normal bir molekülden tek bir elektron kaybı ya da bir molekülün heterolitik olarak bölünmesi ile oluşurlar.

3. Normal bir moleküle tek bir elektron eklenmesi ile oluşurlar (Cheeseman ve Staler, 1993).

Serbest radikallerin oksijen kaynaklı olanları ROS olarak isimlendirilirler (Sugino 2006). Oksidan moleküllerin sitotoksik etkileri sonucu, hücrelerin membran fosfolipit yapılarının bozulduğu, membran geçirgenliğinin arttığı, enzim aktiviteleri ve DNA yapılarının hasara uğradığı ve hücre ölümlerine neden olduğu gözlenmektedir (Anne ve Jacquez, 2002; Malgorzata ve ark, 2003; Eleanora ve ark, 2004).

ROS'un organizmada fizyolojik fonksiyonları da vardır. Dişi genital sistem bunun için güzel bir örnek oluşturmaktadır. ROS'un dişi reproduktif sistemde oosit olgunlaşması, ovulasyon, korpus luteum şekillenmesi, steroid sentezi, luteolizis, embriyo gelişimi ve gebeliğe kadar döllenme ve üreme ile ilgili fizyolojik işlemlerde etkili olduğu bildirilmiştir (Gonzalez-Fernandez ve ark, 2005; Sugino, 2006; Rizzo ve ark, 2012; Ciani ve ark, 2015).

2.3.1. Dişi Reprodüktif Sistemde ROS

Ovaryumda foliküller ve korpus luteumda bulunan nötrofil ve makrofajlar ROS kaynağıdır (Brännström ve ark, 1993; Suzuki ve ark, 1998; Nakamura ve ark, 1999). Süperoksit radikalleri normal metabolizma ve steroidogenezis sırasında sitozol ve mitokondride üretilmektedir (Sugino, 2005). Orta konsantrasyonlarda ROS'un büyüme ve apoptozdan korunma ile ilgili sinyal transdüksiyon süreçlerinde de rol oynadığı öne sürülmüştür (Ciani ve ark, 2015).

Foliküler sıvı mikroçevresi, foliküllerin olgunlaşması ve granuloza hücrelerinin fonksiyonları için önemlidir (Paszowski ve ark, 1995). Foliküler sıvı; granuloza hücreleri, endotel hücreleri ve lökositler tarafından üretilen diğer faktörlerin yanı sıra steroid hormonları, büyüme faktörleri, sitokinler, ROS ve antioksidanlar içeren metabolik olarak aktif bir mikroçevredir (Attaran ve ark, 2000; Pasqualotto ve ark, 2004). Fertilize oositlerin foliküler sıvısında glutatyon peroksidaz (Glutathione peroxidase/ GSH-Px) aktivitesi daha yüksek bulunmuştur (Paszowski ve ark, 1995). Yapılan çalışmalar sonucu fertilize olan oositlerin total antioksidan kapasitesinin yüksek olduğu belirlenmiştir ve yüksek total antioksidan kapasitesinin fertilizasyon potansiyelini tahmin etmede kullanılabileceği öne sürülmüştür (Oyawoye ve ark, 2003).

Foliküler duvarın zayıflaması ovariyal duvarın yırtılmasına neden olur. İneklerde kistik ovaryum hastalıklarında foliküler sıvıdaki ROS konsantrasyonun sağlıklı ineklerden düşük olduğu gösterilmiştir (Rizzo ve ark, 2009a). Köpeklerde östrus siklusunun östrus döneminde preovulatör periyotta ROS en yüksek seviyede bulunmuştur. Burada ROS miktarındaki artış, yüksek seviyedeki östrojen ile immun ve metabolik aktivitelerindeki artış ile ovulasyon sırasındaki akut inflamasyonla ilişkilidir (Rizzo ve ark, 2009b). Foliküler ROS apoptozu arttırırken, GSH-Px ve FSH büyüyen folliküldeki bu hareketi dengeler. Östrojen, FSH'ye yanıt olarak artar, folikülde katalaz oluşumunu tetikler ve böylece apoptozu engeller (Sugino, 2006).

Oosit gelişmesinin metafaz II aşamasında CuZn-superoksidge dismutase (CuZn-SOD), GSH-Px ve Mn-SOD enzimleri antioksidan savunma mekanizmaları önemli rol oynamaktadır (Ruder ve ark, 2008). GSH olgun oositlerde canlılık için iyi bir biyokimyasal belirteçtir ve oositlerin olgunlaşmasında in vitro GSH-Px uygulamasının olumlu etkileri olduğu bildirilmiştir (Zuelke ve ark, 2003; Curnov ve ark, 2010).

Oosit GSH sentezi düşük moleküler ağırlıklı tiol bileşikleri (sistein, sisteamin, β merkaptotanol) ile stimule edilir. İn vitro maturasyon süresinde koyun oositlerine sisteamin desteğinin morula ve blastokist gelişimini arttırdığı, β merkaptotanol ve sisteamin desteğinin GSH sentezini arttırdığı, peroksidaz içeriğini azalttığı bulunmuştur (De Matos ve ark, 2002). Hayvanlarda yapılan çalışmalarda β -karotenin sitoplazmik maturasyonu arttırdığı görülmüştür (Ikeda ve ark, 2005).

Ovulasyonun olması için preovulatuar folikülde üretilen ROS önemlidir (Ruder ve ark, 2009). Ovulasyon için gerekli olan luteinizasyon hormonu pikinden sonra oluşan inflamatuvar prekürsörler ROS'ların oluşumuna neden olur. Diğer deyişle inflamatuvar prekürsörlerin azlığı ovulasyonu olumsuz yönde etkiler (Shkolnik ve ark, 2011).

Ovulasyon akut inflamasyonla benzer mekanizmalara sahiptir (Espey, 1994). Örneğin ovulasyon sırasında sitokin ve prostaglandin üretimi, matriks metalloproteinaz gibi protolitik enzim aktivasyonu ve damar geçirgenliği artar. Folikül yırtılmasında ROS'un neden olduğu inflamator reaksiyon açığa çıkar. Özellikle ROS folikül çevresinde oksidatif stresi indükler, granuloza hücrelerinde apoptozise neden olur ve ovulasyon gerçekleşir (Kodaman ve Behrman, 2001).

ROS, ovaryumda makrofajlar, paranzimdeki steroid sentezleyen hücreler ve endotel hücreleri tarafından oluşturulur (Halliwell ve Gutteridge, 1988). Teka hücreleri, granuloza hücreleri ve hilus hücreleri güçlü oksidatif enzim aktivitesine sahiptir (Scully ve Cohen, 1964).

Serbest radikaller ve yaş faktörü fertilitede olumsuz etki göstermektedir. Foliküler sıvıda yaş ilerledikçe serbest radikal miktarının arttığı bulunmuştur (Wiener ve ark, 2004). Yaş arttıkça artan ROS miktarı mitokondrial DNA'ya zarar vererek oosit kalitesinin düşmesine neden olur (Agarwal ve ark, 2012). DNA hasarının biomarkeri olan 8-hidroksi deoksi guanozin (8-hydroxy-2' -deoxyguanosine/ 8-OHdG) yaşlı oositlerde daha yüksek düzeyde bulunmuştur (Salmon ve ark, 2010). Yine yaşla beraber granuloza ve kumulus hücrelerinde apoptozis artar (Sadraie ve ark, 2000). Takahashi ve ark (2003) ROS'lara maruz kalan oositin kalsiyum homeostasisinin bozulduğunu ve gelişmesinde gerilemeye neden olduğunu bulmuşlardır. Koruyucu enzim olan GSH'nın konsantrasyonundaki azalma gametlerin dölleme kabiliyetini etkileyebilir (Paszowski ve ark, 1995). Carbone ve ark (2003) yaşlı kadınlarda katalaz aktivitesinin düşük, SOD aktivitesinin yüksek olduğunu, gençlerde ise GSH transferaz aktivitesinin yüksek olduğunu tespit etmişlerdir.

2.3.2. Oksidatif Stres ve Korpus Luteum

Korpus luteumda ROS üretimi olur. Midluteal (folikül fazı) fazda korpus luteumda progesteron ve CuZn-SOD düzeyleri artarken, regresyon fazında azalma izlenir. Regresyon fazında ROS düzeyleri ve MnSOD düzeyleri artar. Regresyon fazında CuZn-SOD düzeylerinin azalması bu fazda yükselen lipid peroksit düzeylerini açıklayabilir. CuZn-SOD düzeyinin düşüklüğü ovaryum kan akımında azalma ya da PGF₂ α düzeyi ile makrofaj düzeylerinde artma ile açıklanabilir (Behrman ve ark, 2001). Korpus luteumdaki üretilen progesteronu inhibe eden PGF₂ α , aynı zamanda ROS'un artmasına da aracılık eder (Hayashi, 2003).

Graaf folikülünde artan peroksidasyon, oositin normal gelişimini olumsuz etkileyebilir (Jozwik ve ark, 2005). Sıçanda prostaglandinF₂ α 'nın lüteolitik etkisinin H₂O₂ ve lipid peroksit oluşumuyla ilişkili olduğu düşünülmektedir (Shimamura ve ark, 1995).

ROS, PGF₂ α sentezi için önemli enzimler olan korpus luteumda fosfolipaz A₂ aktivitesini ve siklooksijenaz-2'yi aktive edebilir (Wu ve Carlson, 1990). Böylece, PGF₂ α ile ROS arasında yakın bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Nakamura ve Sakamoto, 2011).

Regresyon fazında Mn-SOD konsantrasyonlarının artmasının, ROS' ları yok etmek için kullanıldığı düşünülmektedir. Korpus luteumun komplement yıkımı ile Mn-SOD düzeyleri düşer ve hücre hızla apoptozise gider. Bir başka deyişle Mn-SOD luteal hücreleri

oksidatif stresten korur. Korpus luteumda yüksek düzeyde β -karoten, vitamin C ve vitamin E tespit edilmiştir (Rodgers ve ark, 1995).

2.3.3. Oksidatif Stres ve *In vitro* Fertilizasyon

Oksidan moleküllerin sitotoksik etkileri sonucu hücrelerin membran fosfolipit yapıları bozulmakta, membran geçirgenliği artmakta, enzim aktiviteleri ve DNA yapıları hasara uğramakta ve hücre ölümleri gözlenmektedir. Oksidan moleküllerin reproduktif fonksiyon üzerindeki etkileri ise sperm ve oosit füzyonunun engellenmesi, fertilize oositin erken dönem gelişiminin bloke edilmesi, embriyonik ölüm ve endometritis olarak sıralanabilir (Anne ve Jacquez, 2002; Malgorzata ve ark, 2003).

Oksidatif stres *in vitro* fertilizasyon başarısında önemli bir faktördür. Oosit ve granuloza hücreleri metabolik bir birliktelik oluşturur. Granuloza hücreleri oositin gelişim ve maturasyonu ve fertilizasyonu için faydalıdır ve antioksidanları üreterek oositi oksidatif stresin indüklediği apoptozisten korurlar (Tanghe ve ark, 2002). Foliküler sıvıda antioksidanların yokluğu ROS seviyelerinde artışa neden olur (Oyawoye ve ark, 2003). Foliküler sıvı ve granuloza hücreleri oositle yakın ilişkide olduklarından bunların incelenmesi ile elde edilen sonuçlar *in vitro* fertilizasyonun başarısını tespit etmede kullanılabilir (Seino ve ark, 2002).

Yardımcı üreme tekniklerinde elde edilen başarı oranları gamet ve embriyo kalitesi tarafından etkilenir. Foliküler sıvıda ROS'ların fizyolojik miktarları sağlıklı oosit gelişimi için göstergedir (Attaran ve ark, 2000). Foliküler sıvıda saniyede 107 fotondan az ROS seviyeleri negatif *in vitro* fertilizasyon parametreleri ile ilişkili bulunmuştur. Fakat oksidatif stres durumu oosit kalitesini dolayısıyla fertilizasyonu bozar. Yapılan çalışmalarda fragmente embriyolar ile nonfragmente embriyolar karşılaştırıldığında fragmente embriyolarda hidrojen peroksit ve oksidan düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur (Yang ve ark, 1998). Oosit içindeki lipidlerdeki oksidatif hasar oosit kalitesini düşürür. Fötal ovaryum içindeki germ hücrelerinin gelişiminde toksik maddelere ve iyonize radyasyona karşı oksidatif stres indükleyicidir (Ciani ve ark, 2015).

2.3.4. Oksidatif Stres ve 8-OHdG

Reaktif oksijen türleri, aerobik organizmaların hücrelerinde fizyolojik, metabolik ve biyokimyasal reaksiyonların bir parçası olarak şekillenir. Endojen olarak üretilen ROS ve serbest oksijen radikalleri önemli fizyolojik fonksiyonlara sahiptirler fakat reaktif yapılarından dolayı hücre mebranlarının lipidlerinde, proteinlerde ve DNA'da hasara neden olabilirler (Kehrer, 1993; Shi ve ark, 2016). Protein, membran lipidi ve DNA gibi bazik biyomoleküllere zarar veren en önemli serbest oksijen radikali hidroksildir (OH). Hidroksil DNA iplikçğine saldırdığı zaman, DNA bazlarına yeni radikallerin eklenmesine ve yeni çeşitli oksidasyon ürünlerinin oluşumuna neden olur (Valko ve ark, 2004). OH'in guanin gibi DNA iplikçğinin nükleobazları ile etkileşimi C8-hidroksiguaninin veya onun nükleosid formu deoksiguanosinin (8-hidroksi-2P-deoksiguanosin) oluşumuna yol açar. İlk olarak OH ilavesi radikal addüksiyonların oluşmasına yol açar daha sonra bir elektron soyutlanması ile 8-OH-2dG oluşur (Kasai, 1997). Sekiz-hidroksi-2'-deoksiguanozin (8-OHdG), oksidatif stresin sonucu olarak DNA hasarının hassas bir göstergesidir (Shi ve ark, 2016).

İmmunohistokimyasal olarak 8-OHdG, sigara dumanına maruz bırakılan ratların akciğer dokusunda parafin kesitlerde gösterilmiştir (Aoshiba ve ark, 2003). Won ve ark (1999) da iskemi uygulanan gerbillerin hipotalamusundaki hücrelerde 8-OHdG'yi immunohistokimyasal olarak göstermişlerdir. Tip II diyabetik hastaların pankreasında endokrin hücrelerde 8-OHdG demonstre edilmiştir (Sakuraba ve ark, 2002). Ovaryumda ise kanserli vakalarda Karihtala ve ark (2005) 8-OHdG'yi immunohistokimyasal olarak göstermişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

Bu çalışmada, Aydın Adnan Menderes Üniversitesi Deney Hayvanları Ünitesi'nden sağlanan 200-300 g arasında, 90 günlük, 32 adet yetişkin ve daha önce çiftleşmemiş Spraque Dawley rat materyal olarak kullanıldı. Konvansiyonel koşullarda, *ad libitum* su ve yem (rat yemi, Optima) ile beslenen ratlar, 24±1°C ortam sıcaklığında, 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık olan ortamda tutuldular. Stres ve gürültüden izole bir ortamda çalışmaya alındılar.

Östrüs siklusunun dört dönemine ait sekizer hayvan belirlemek amacıyla ratlardan beş gün arayla vaginal smear örnekleri alındı ve Giemsa metodu ile boyandı (Long ve Evans, 1922, Freeman, 1988; Marcondes ve ark, 2001; Cora ve ark, 2015). Vaginal smear sonuçlarına göre her dönem için sekiz adet rat belirlendi.

3.2. Yöntem

3.2.1. Vaginal smear yapımı

Ucu pamukla sarılmış kürdanlar, serum fizyolojik ile ıslatılarak, ratların vaginasına sürüldü. Daha sonra vaginal dokudan alınan hücrelerin lam üzerine aktarılması amacıyla, sürüntü lam üzerinde farklı bölgelere denk gelecek şekilde dokundurularak smear hazırlandı. Preparat havada kurutulduktan sonra metanol ile tespit edildi. Takiben %10'luk giemsa ile 10 dk boyandı. Pipet yardımıyla distile su ile boya yıkandıktan sonra %96 ve %100 alkolden hızlıca geçirildi. Lamlar daha sonra üçer dakika olmak üzere iki kez ksilolde bekletildi ve süre sonunda entellan ile kapatıldılar.

3.2.2. Doku Örneklerinin Toplanması

Vaginal smearların incelenmesi ile östrüs siklusunun hangi döneminde olduğu belirlenen ratların vücut ağırlıkları kaydedildi. Ratlarda ketamin/xylasin (20 mg/kg- 80 mg/kg, IP) anestezisi ile genel anestezi uygulandıktan sonra total oksidan/antioksidan ve total protein parametrelerini ölçmek amacıyla, kardiyak punksiyonla kan örnekleri alındı ve daha sonra servikal dislokasyon ile hayvanlar sakrifiye edildiler. Kan örnekleri serum tüplerine alınarak 3500 rpm'de 15 dakika santrifüje edildi. Elde edilen serumlar ependorf tüplere alındı ve ölçüm aşamasına kadar -80 °C de olan dondurucuya kaldırıldı (Song ve ark, 2011).

Ratların her iki ovaryumu da çıkarılarak % 10'luk nötral buffer formalin solüsyonunda 18-24 saat tespit edildi. Tespit işleminden sonra dokular rutin parafin doku takibi yöntemi ile takip edildi. Takip sonunda dokular ışık mikroskopik inceleme için kesit alınmak üzere parafine gömüldü. Parafin bloklardan 100 µm arayla 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere genel görünümü incelemek amacıyla üçlü boyama (Culling ve ark, 1985), dokuda gerçekleşen apoptozisi gözlemek amacıyla TUNEL (Zhao ve ark, 2010) ve dokuda oksidatif stresi gösteren 8-OHdG'yi belirlemek amacıyla strept ABC metodu uygulandı (Takagi ve ark, 2004).

3.2.3. Üçlü Boyama Metodu

Bu amaçla aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Parafin kesitler deparafinizasyon için iki defa 5' ksilolde tutuldu. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serisinde (% 100 alkol-I.'de 3', % 100 alkol-II.'de 3', % 96'lık alkolde 3', % 80'lik alkolde 3', % 70'lik alkolde 3') bekletildi.
2. Distile suda iki kez çalkalandıktan sonra 5' süreyle akan çeşme suyunda yıkandı.
3. Kesitler çekirdek boyaması için 8' olmak üzere Weigert'in hematoksilen solüsyonunda bekletildi. Daha sonra 5' süreyle akan çeşme suyunda yıkandı.
4. Metil karbonatta 1' çalkalamadan sonra 5' akan çeşme suyunda, 3' da distile su içerisinde bekletildi.
5. Kesitler bu kez sitoplazma boyaması için asit fuksin boya solüsyonuna iki kez batırılıp çıkarıldı. Daha sonra dört kez distile suda çalkalandı.
6. Bağ doku beyazlaşmaya kadar yaklaşık 14' fosfotungustik asitte bekletildi. Sonrasında iki kez 5' distile suda yıkandı.

7. Kesitler bağ doku boyaması için 30 sn anilin blue boya solüsyonunda bekletildi. Daha sonra dört kez distile suda çalkalandı.

8. Kesitler % 2'lik asetik asitte 3' bekletildikten sonra, sırasıyla hızlıca distile sudan ve % 96 alkolden geçirildi.

9. Kesitler bu kez derecesi yükselen alkol serisinden (% 96'lık alkolde 3', % 100 alkol-I.'de 3', % 100 alkol-II.'de 3') geçirildi.

10. İki defa 5' ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.2.3.1. Histolojik değişimlerin belirlenmesi

Her bir döneme ait doku kesitlerinde antral ve Graaf folikülleri ile korpus luteum tipleri sayıldı. İstatistiksel değerlendirme yapılarak dönemler arası farklılıklar ortaya kondu.

3.2.4. Strept ABC Boyama Yöntemi

Her hayvandan organosilan ile kaplanmış lamlara alınan üç kesite 8-OHdG'in belirlenmesi için strept avidin-biotin kompleks (strept avidin biotin complex, sABC) boyama metodu uygulandı. Bu amaçla Anti-8 OHdG primer antikoru (Mouse monoclonal [15A3] to hydroxyguanosine antibody, Abcam ab62623) kullanıldı (Takagi ve ark, 2004).

Aşağıda belirtilen işlem sırası izlendi.

1. Organosilane ile kaplı lamlara alınan parafin kesitler bir gece boyunca 37°C'deki etüvde tutuldu.
2. Ertesi gün deparafinizasyon için parafin kesitler iki defa 5' ksilolde tutuldu. Daha sonra derecesi giderek azalan alkol serisinden (% 100 alkol-I'de 5', % 100 alkol-II'de 5') geçirildi. Kesitler sitrat bufferda mikrodalgada 15' kaynatıldı ve 30' oda sıcaklığında soğutuldu ve fosfat buffer solüsyonunda (PBS) iki kez 5' yıkandı.
3. Endojen peroksidazı yok etmek için metanol peroksid ile ön muamele yapıldı. Oda sıcaklığında 30' inkübe edildi.
4. Kesitler 0,1 M'lık PBS'te üç kez beşer dakika yıkandı.
5. Protein bloking solüsyonunda bir saat inkübe edildi.

6. Daha sonra oda ısısında primer antikorda (1/100 dilüsyon) 4 saat inkübe edildi. Dilüsyon sıvısı PBS olup, % 0,3'lük Triton x-100, % 0,08 sodyum azot ve % 2 N keçi serumu içerecek şekilde hazırlandı.
7. Kesitler, PBS'te 3 kez 10 ar dakika yıkandı.
8. Sekonder antikorda 3 saat inkübe edildi.
9. Kesitler, PBSte üç kez beşer dakika yıkandı.
10. Diaminobenziolin (DAB) solüsyonunda 1,5' tutuldu.
11. Kesitler, PBS'te üç kez beşer dakika yıkandı.
12. Devamında üçer dakika artan alkol seviyelerinden geçirilerek, ksilol serilerinde beşer dakika bekletildikten sonra faramount ile kesitlerin üzeri kapatıldı.

3.2.5. Serum Örneklerinde Total Oksidan /Antioksidan ve Total Protein Seviyelerinin Belirlenmesi

Serum örnekleri buldukları -80 °C ortamından bir gün önce -20 °C ye alındı. Sabah +4 °C'ye alınan serumların çözünmesi beklendi. Daha sonra sırasıyla aşağıdaki işlemler uygulandı. Analizler için spektrofotometre (Shimadzu UV-1601, Kyoto, Japan) kullanıldı. Okuma işlemi; spektrofotometre 560 nm dalga boyuna ayarlandıktan sonra, plastik küvetlere distile su konuldu ve spektrofotometre sıfırlandı. Spektrofotometrenin uzak olan bölümündeki distile suya karşı örnek numuneler okutuldu. Körlerin absorbansı alındı. Daha sonra numuneler okundu.

3.2.5.1. Malondialdehit (malondialdehyde/ MDA) ölçümü

1. Grupların yazılı olduğu cam tüplere 500 µl tiyobarbiturik asit (TBA), 1250 µl trikloroasetik asit (TCA) ve 250 µl numuneden eklendi ve vortekslenerek karışması sağlandı. Kapak ve folyo ile iyice kapatılarak hava giriş çıkışı önlendi.
2. Daha sonra 95 °C de 30' kaynatıldı ve buz dolu kaptı soğutuldu.
3. Üzerine 1 ml n-butanol eklendi ve vortekslenerek karışması sağlandı.
4. Takiben 3000 rpm de 10' santrifüj edildi.
5. Üstte kalan şeffaf kısım havaya karşı 535 nMde okutuldu.

3.2.5.2. Süperoksitdismutaz (süperoxide dismutase/ SOD) ölçümü

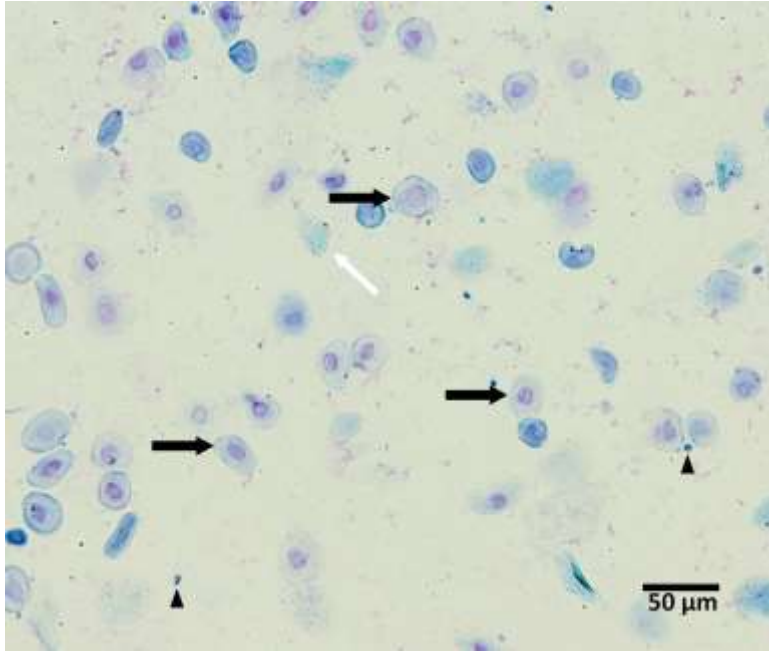
1. Numune sayısı kadar ependorfa 0,5 ml serum konuldu. Daha sonra 250 µl etanol (% 99,9), 150 µl kloroform eklenerek vortekslendi.
2. Karışım ependorf rotarında 12000 rpmde 10 dakika +4 °C de santrifüj edildi.
3. Numune sayısı kadar 5 ml'lik cam tüpe 1225 µl reaktif karışımı ve bunun üzerine 250 µl numune eklendi.
4. Ayrıca kör deneyi içinde 3 ayrı 5 ml'lik cam tüpe 1225 µl reaktif karışımı ve bunun üzerine 250 µl distile su ilave edildi.
5. Takiben 25 µl ksantin oksidaz ilave edildi. Yirmi dakika süreyle 25 °C su banyosunda bekletildi.
6. Daha sonra 0,5 ml CuCl₂ ilave edildi.
7. Sonuç 560 nm'de 1,5 ml'lik dar plastik küvetlerde okutuldu.

3.3. İstatistiksel Analiz

Ratların ovaryum görüntülerinde, dönemler arasındaki farklılıkları ortaya koyabilmek için her bir hayvanda 15 adet kesitte antral ve graaf foliküller ile korpus luteum tipleri sayıldı. Veriler üçlü ve dördü Kruskal ve Mann Whitney U testi yöntemiyle değerlendirildi. Bu amaçla SPSS-22 paket program kullanıldı (Tekin, 2003).

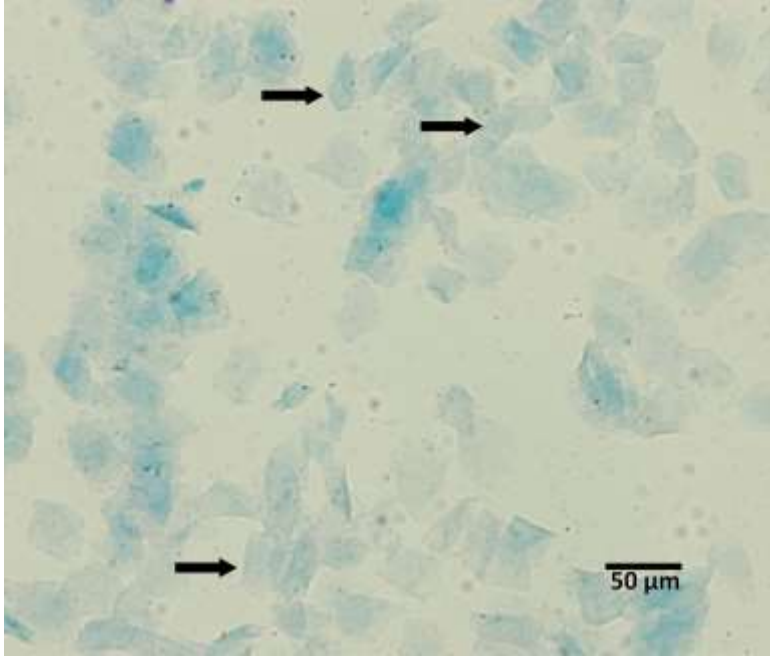
4. BULGULAR

Denemede kullanılan ratların ortalama ağırlıklarının ortalama $246 \pm 23,51$ gram olduğu görüldü. Östrüs siklusunun evreleri vaginal smear görüntülerine bakılarak belirlendi. Mikroskopik inceleme sonucunda çoğunlukta çekirdekli epitelyal hücreler olmak üzere nötrofil lökosit ve az miktarda kornifiye hücre görüldüğünde dönem proöstrus olarak belirlendi (Şekil 3).



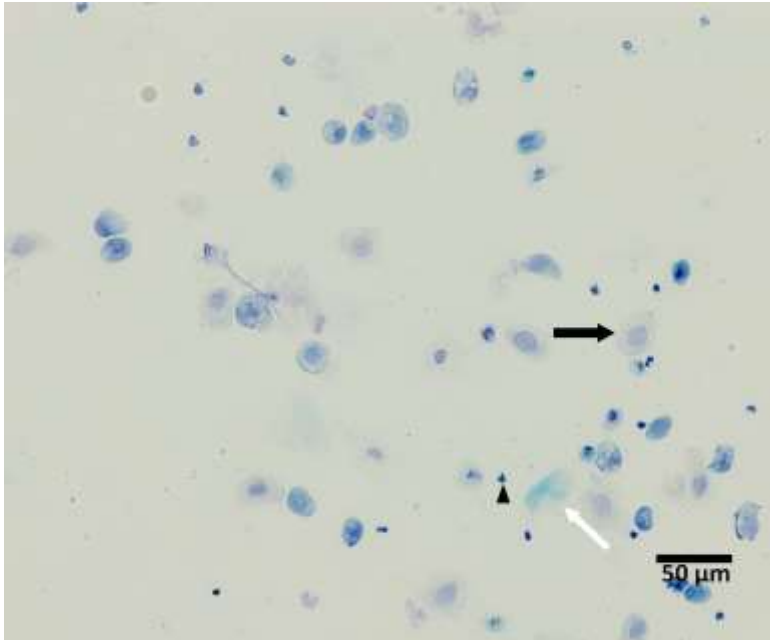
Şekil 3. Proöstrüs evresinde vaginal smear görüntüsü. Giemsa boyama yöntemi. Çekirdekli hücreler (siyah oklar), lökositler (ok başları), kornifiye hücreler (beyaz ok).

Preparatlarda sadece çekirdeksiz kornifiye hücreler olduğunda ise dönem östrus olarak kaydedildi (Şekil 4).



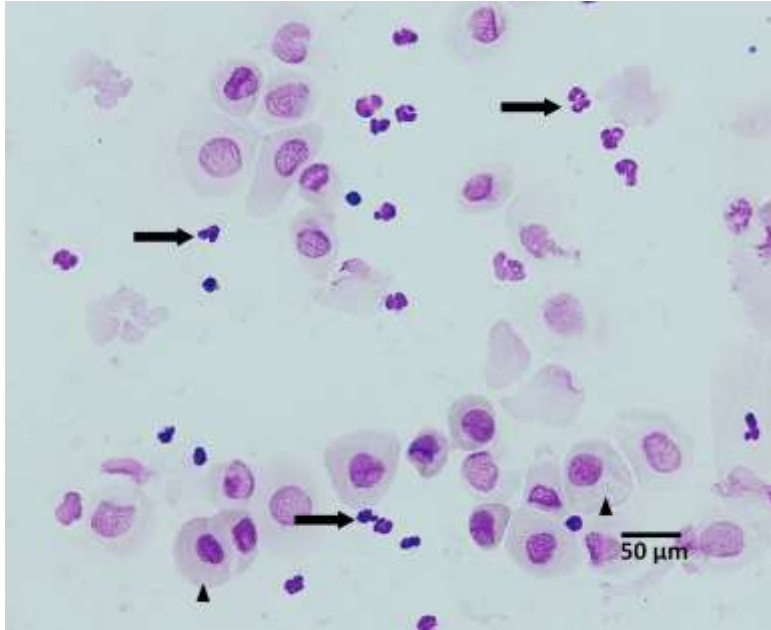
Şekil 4. Östrüs evresinde vaginal smear görüntüsü. Giemsa boyama yöntemi. Çekirdeksiz kornifiye hücreler (oklar).

Görüntüde üç tip hücrenin yaklaşık eşit olarak bulunduğu dönem metaöstrus olarak belirlendi (Şekil 5).



Şekil 5. Metöstrüs evresinde vaginal smear görüntüsü. Giemsa boyama yöntemi. Çekirdeksiz kornifiye hücreler (beyaz ok), çekirdekli hücreler (siyah ok), nötrofil lökosit (ok başı).

Nötrofil lökositlerin çoğunlukta olduğu ve az sayıda çekirdekli hücre içeren smearlarda ise dönem diöstrus olarak kaydedildi (Şekil 6).

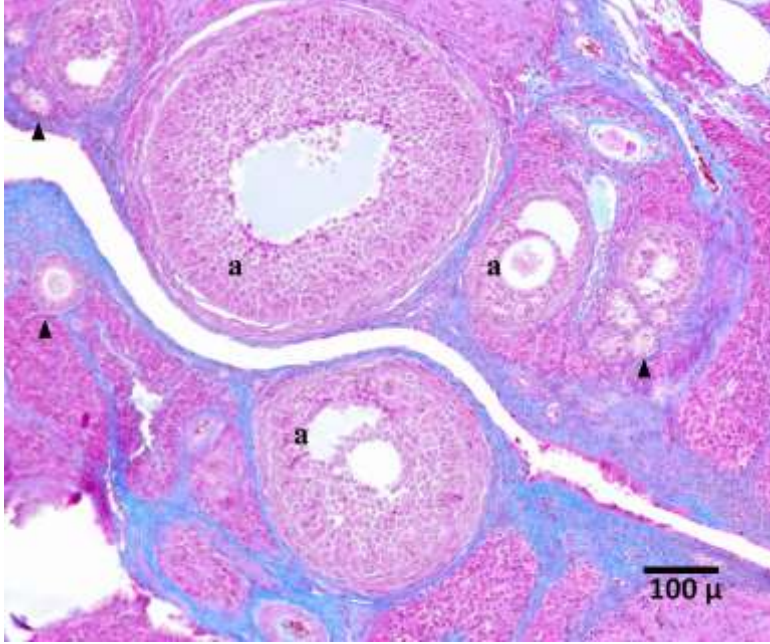


Şekil 6. Diöstrüs evresinde vaginal smear görüntüsü. Giemsa boyama yöntemi. Nötrofil lökosit (oklar), çekirdekli hücre (ok başı).

4.1. Histolojik Bulgular

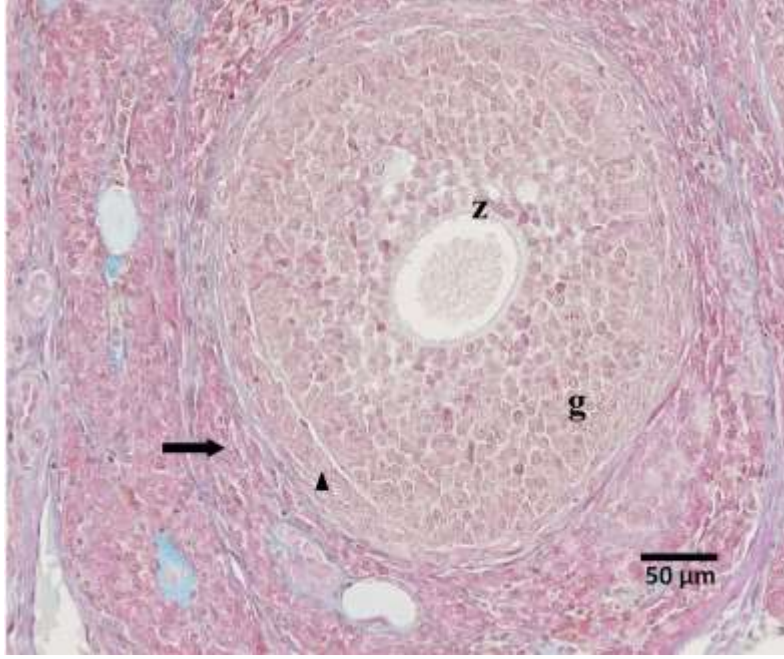
Ovaryumlar mikroskopik olarak incelendiğinde, herbir ovaryumda hem folikülogenezisin farklı aşamaları hem de korpus luteumun farklı görüntülerinin bulunduğu gözlemlendi. Görüntülerde oosit etrafında tek katlı yassı epitel hücreleri ve bunlara ilaveten tek tük kübik hücre bulunduran foliküller, primordial folikül olarak belirlendi.

Primer foliküllerde oosit etrafında tek sıra kübik epitel hücreleri görüldü (Şekil 7).



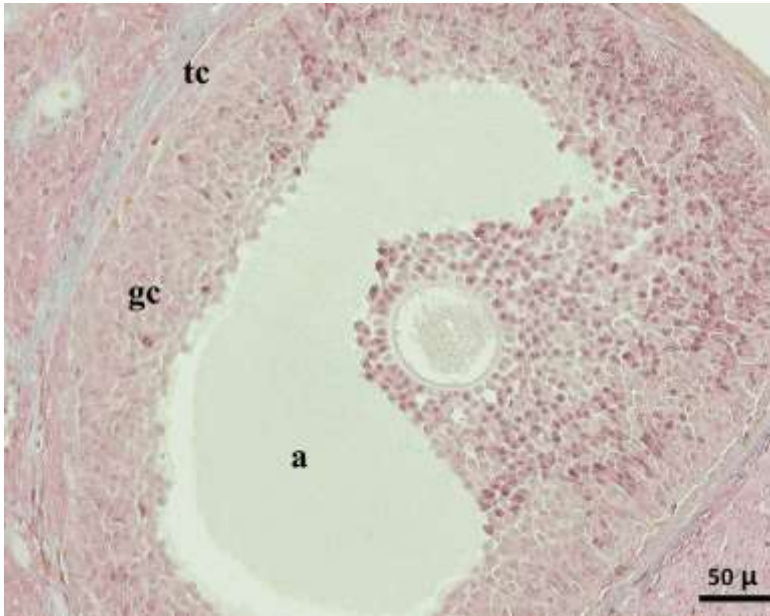
Şekil 7. Ovaryumun mikroskopik görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi. Primer foliküller (ok başları), antral foliküller (a).

Oosit etrafında iki sıralı kübik epitel bulunduran ve antrum içermeyen foliküller, sekonder folikül olarak kaydedildi (Şekil 8). Teka folikülü sekonder folikülden itibaren izlenmeye başlandı.



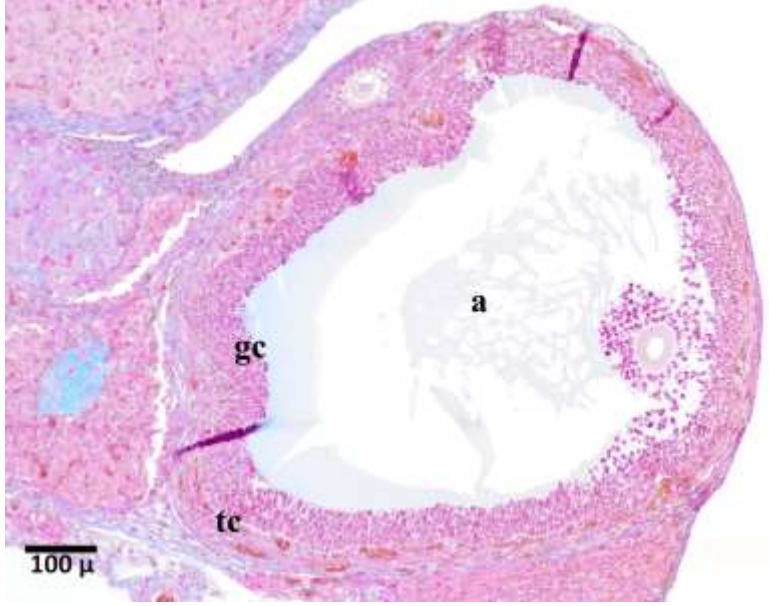
Şekil 8. Sekonder folikülün mikroskopik görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi. Zona pellusida (z) granuloza hücreleri (g), teka interna (ok başı), teka eksterna (ok).

Epitel hücreleri arasında boşlukların görüldüğü foliküller, antral folikül olarak belirlendi (Şekil 9).



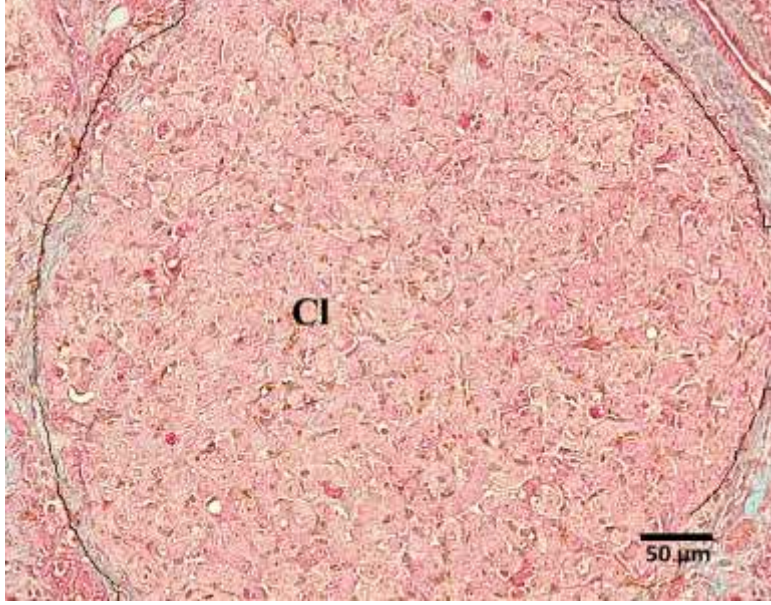
Şekil 9. Antral folikülün mikroskopik görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi. Antrum (a), granuloza hücreleri (gc), teka hücreleri (tc).

Tek bir büyük boşluk içeren ve oositin kenara itildiği foliküller, Graaf folikülü olarak değerlendirildi (Şekil 10).



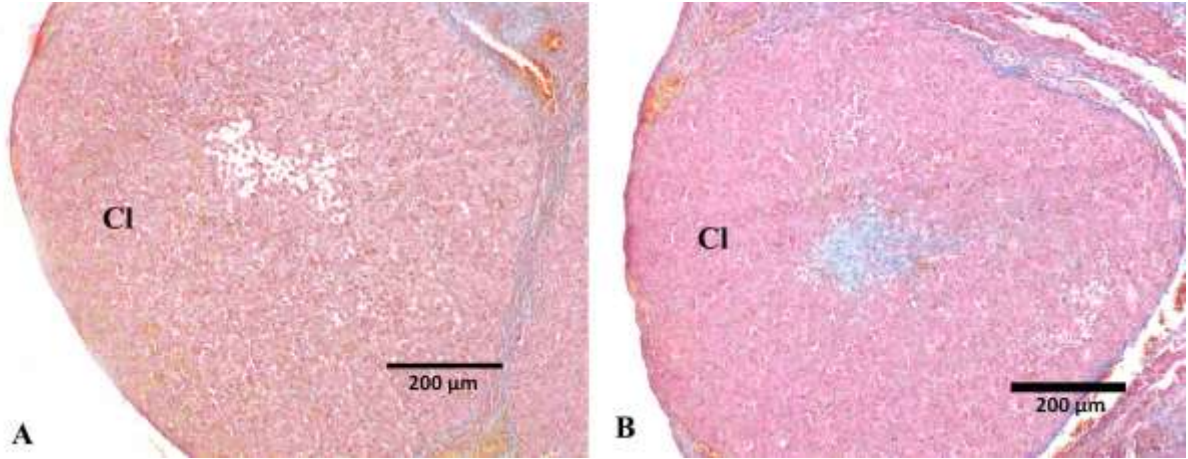
Şekil 10. Graaf folikülünün mikroskopik görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi. Antrum (a), granulosa hücreleri (gc), teka hücreleri (tc).

Ovaryum kesitlerinde korpus luteum görüntüleri yeni, olgun ve gerilemiş korpus luteum olarak sınıflandırıldı. Yeni şekillenen korpus luteumda (Şekil 11) yuvarlak şekilli hücreler, aralarda kapilar damar görüntüleri ve küçük bir boşluk izlendi.



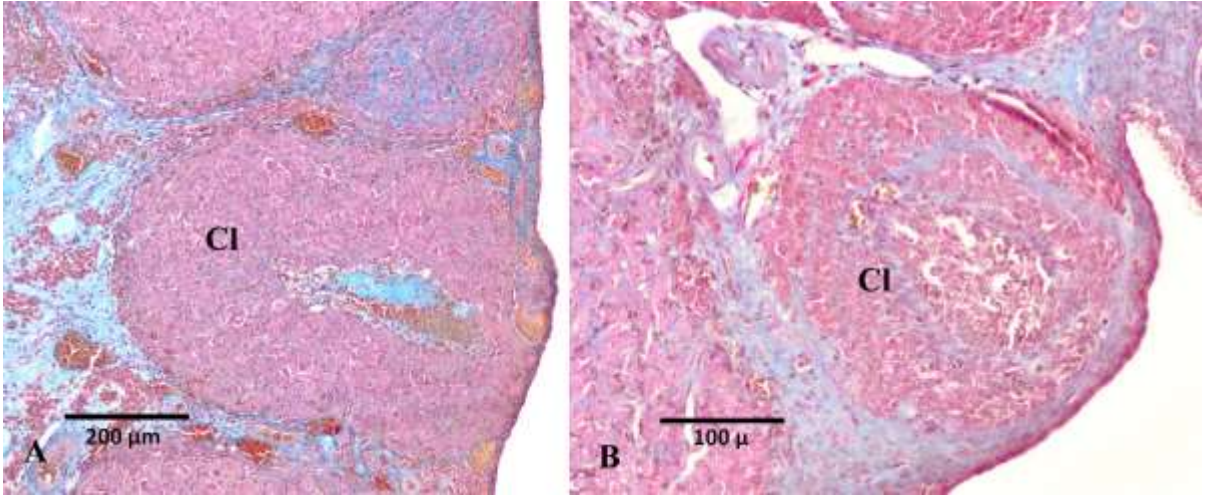
Şekil 11. Yeni korpus luteumun mikroskopik görüntüsü. Üçlü boyama yöntemi. Korpus luteum (CI).

Olgun korpus luteumda yuvarlak hücrelerin aralarında bağ dokuya ait görüntülere rastlandı. Ayrıca boşluk içerisinde sıvı görüntüsü izlendi (Şekil 12).



Şekil 12. Korpus luteumun mikroskopik görüntüsü (A, B). Üçlü boyama yöntemi. Olgun korpus luteum (CI).

Gerilemiş korpus luteumda lüteal hücrelerin involüsyonu, bağ doku miktarında artış ve merkezi boşluğun artışı gözlemlendi (Şekil 13).



Şekil 13. Korpus luteumun mikroskopik görüntüsü (A, B). Üçlü boyama yöntemi. Gerilemiş korpus luteum (Cl).

Ratlarda dönemler arasındaki farklılıkları ortaya koyabilmek için her bir hayvanda 15 adet kesitte antral ve Graaf folikülleri ile korpus luteum tipleri sayıldı. Veriler istatistiksel olarak değerlendirildi (Tablo 1). İnceleme sonucunda dönemler arasında antral folikül açısından fark gözlenmedi. Graaf folikülünün proöstrüs döneminde daha fazla olduğu belirlendi (Tablo 1). Yeni korpus luteum östrüs döneminde daha fazla olmak üzere ($P < 0,001$) östrüs ve metaöstrüs döneminde gözlemlendi. Olgun korpus luteum sayısı metaöstrüs ve diöstrüs döneminde farklı değildi. Proöstrüs döneminde olgun korpus luteuma rastlanmadı. Gerilemiş korpus luteuma ise bütün dönemlerde rastlanmakla birlikte en az sayıda proöstrüs döneminde rastlandı (Tablo 1).

Tablo 1: Ratlarda östrus siklusu dönemlerinde folikül ve korpus luteum sayıları

Foliküller	Dönemler				P değeri
	Proöstrus	Östrus	Metaöstrus	Diöstrus	
Antral	3,70±0,14	3,73±0,16	3,95±0,18	3,52±0,15	-
Graaf	0,68±0,05 ^a	0,54±0,06 ^b	0,26±0,05 ^c	0,54±0,07 ^{bc}	***
Yeni CL	0,00±0,00	3,95±0,11	3,02±0,11	0,00±0,00	*** (U testi)
Olgun Cl	3,33±1,11 ^b	0,00±0,00	3,99±0,10 ^a	3,96±0,10 ^a	*** (3'lü Kruskal Wailles)
Gerilemiş Cl	3,64±0,11 ^c	4,99±0,11 ^a	4,22±0,10 ^b	5,20±10,12 ^a	***

-: önemli değil ***:P<0,001

a,b,c: Her bir satırda gruplar arası fark önemlidir (P<0,05)

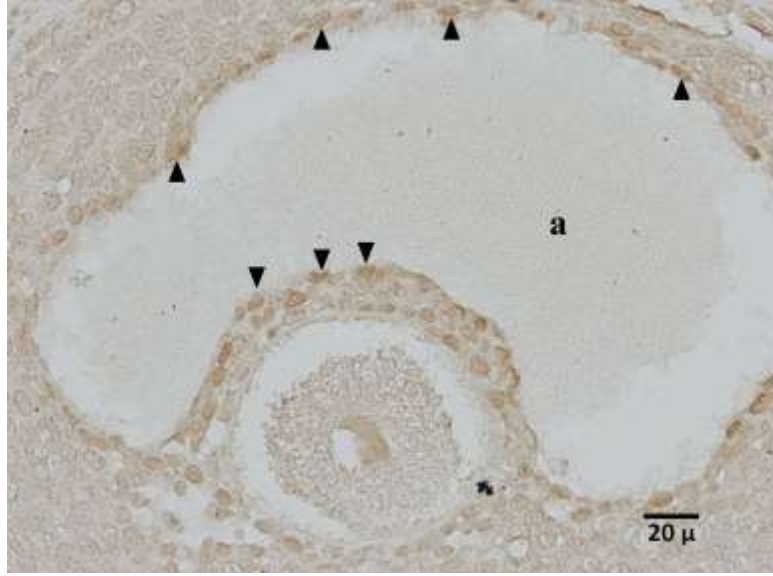
Olgun CL; Proöstrus, Metaöstrus ve Diöstrus grupları arasında karşılaştırıldı.

Yeni CL; Östrus ve Metaöstrus arasında karşılaştırıldı.

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

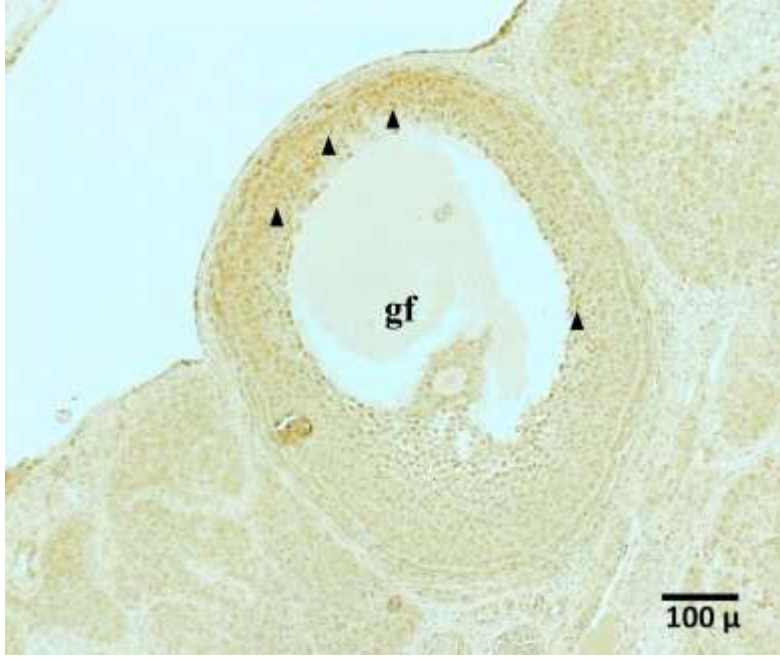
Doku kesitlerinde oksidatif stresin sonucu olarak DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG, strept ABC metodu ile belirlendi. Yapılan mikroskopik inceleme sonucunda 8-OHdG'nin hem çekirdekte hem de sitoplazmada pozitivite verdiği gözlemlendi.

Antral foliküllerde, özellikle antrumu çevreleyen hücrelerin çekirdeklerinde 8-OHdG pozitivitesi gözlemlendi (Şekil 14).



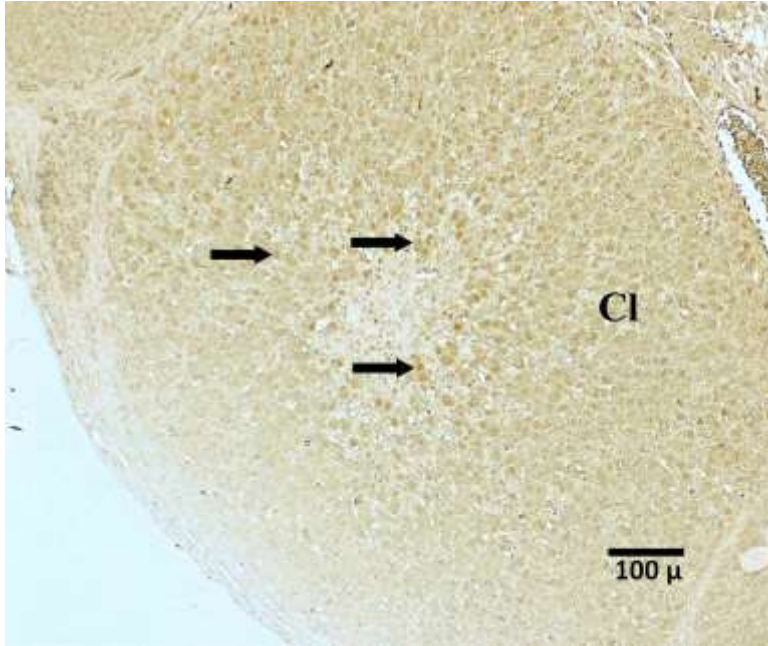
Şekil 14. Antral folikülün mikroskopik görüntüsü. sABC boyama metodu. Antrumu çevreleyen hücrelerin çekirdeklerinde 8-OHdG pozitivitesi (ok başları), antral boşluk (a).

Graaf foliküllerinde de antrumu çevreleyen hücrelerde 8-OHdG pozitivitesi görüldü (Şekil 15).



Şekil 15. Graaf folikülünün mikroskobik görüntüsü.sABC boyama metodu. Graaf folikülü (gf), antrumu çevreleyen hücrelerdeki çekirdekler 8-OHdG pozitifitesi (ok başları).

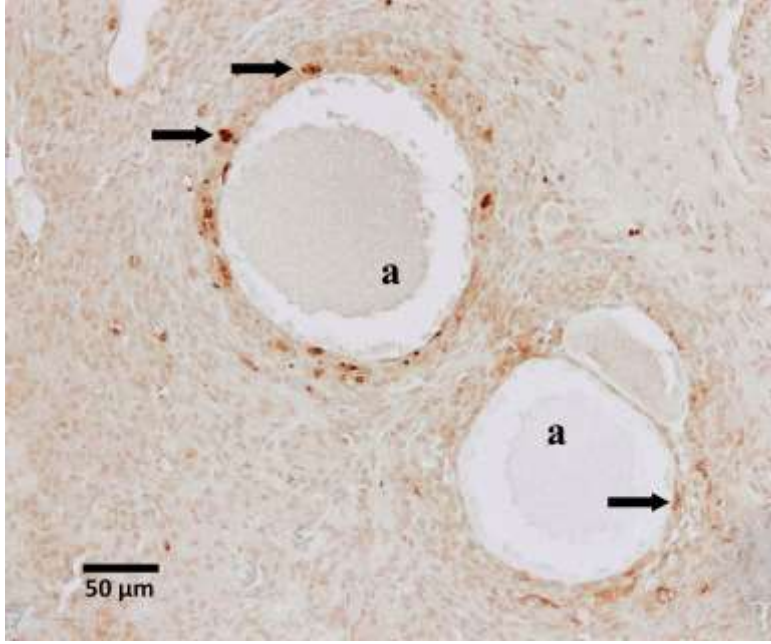
Gerilemekte olan ve gerilemiş korpus luteumların özellikle orta kısımlarında, bağ doku ile dolmaya başlayan kısımlarında 8-OHdG pozitifitesi dikkati çekti (Şekil 16).



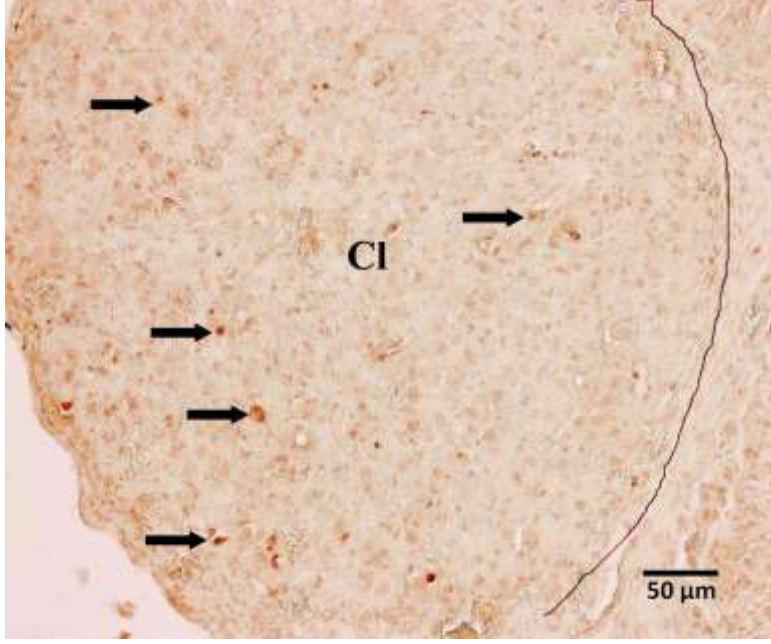
Şekil 16. Korpus luteumun mikroskobik görüntüsü. sABC boyama metodu. Gerilemekte olan korpus luteum (Cl), hücrelerin çekirdeklerinde 8-OHdG pozitifitesi (siyah oklar).

4.3. Enzim histokimyasal (TUNEL metodu) bulgular

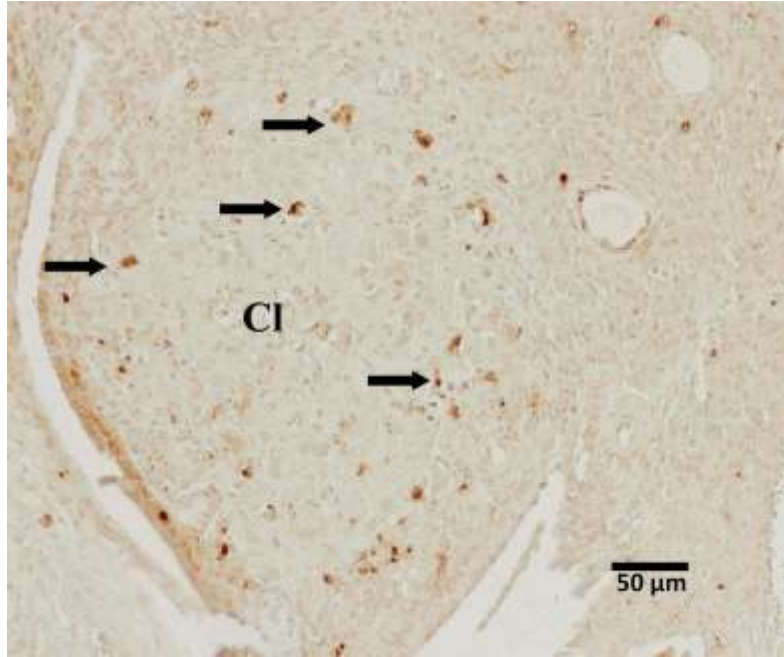
Ovaryum kesitlerinde yapılan inceleme sonucunda apoptotik hücelere antral foliküller (Şekil 17), Graaf folikülü, olgun korpus luteum (Şekil 18) ve gerilemiş korpus luteumda (Şekil 19) rastlandı.



Şekil 17. Antral folikülün mikroskopik görüntüsü. TUNEL yöntemi. Antrum (a), antrumun çevresinde gözlenen apoptotik hücelere (siyah oklar).



Şekil 18. Olgun korpus luteumun mikroskopik görüntüsü. TUNEL yöntemi. Korpus luteum (CI), luteal hücrelerde apoptozis (siyah oklar).



Şekil 19. Gerilemiş korpus luteumun mikroskopik görüntüsü. TUNEL yöntemi. Korpus luteum (CI), luteal hücrelerde apoptozis (siyah oklar).

4.4. Serumda MDA ve SOD Değerleri

Östrüs siklusunun farklı dönemlerinde olan ratlara ait serumlarda belirlenen MDA ve SOD değerleri Tablo 2’de verildi.

MDA değerinin östrüs döneminde en fazla olduğu ($P<0.01$) tespit edildi. Proöstrüs, metöstrüs ve diöstrüs dönemleri arasında istatistiksel olarak farklılık görülmedi.

SOD değerinin metaöstrüs döneminde daha fazla olduğu ($P<0.05$) görüldü. Proöstrüs dönemi SOD değerinin diöstrüsten fazla olduğu ($P<0.05$) tespit edildi.

Tablo 2: Ratlarda östrüs siklusu evrelerinde MDA (oksidan) ve SOD (antioksidan) değerleri

ROS	Dönemler				P değeri
	Proöstrus	Östrus	Metaöstrus	Diöstrus	
MDA	0,40±0,08 ^a	0,54±0,06 ^{bc}	0,45±0,09 ^a	0,39±0,04 ^a	**
SOD	64,8±14,8 ^{ac}	58,3±7,4 ^{bc}	70,5±9,7 ^{ad}	49,1±13,8 ^b	*

*:P<0,05 **:P<0,01

a,b,c,d: Her bir satırda gruplar arası fark önemlidir (P<0,05)

5. TARTIŞMA

ROS'un dişi reproduktif sistemde oosit olgunlaşması, ovulasyon, korpus luteum şekillenmesi, steroid sentezi, luteolizis, embriyo gelişimi ve gebeliğe kadar döllenme ve üreme ile ilgili fizyolojik işlemlerde etkili olduğu bildirilmiştir (Gonzalez-Fernandez ve ark, 2005; Sugino, 2006; Rizzo ve ark, 2012; Ciani ve ark, 2015).

Sunulan çalışmada; ratlarda östrus siklusunun farklı dönemlerinde, ovaryumdaki oksidatif stres düzeyi ile ovaryumu etkileyen sonuçlarının belirlenmesi ve siklus dönemleri arasındaki farklılıkların ortaya konması amacıyla histolojik ve biyokimyasal veriler toplanmıştır.

Daha önce yapılan çalışmalarda (Freeman, 1988; Marcondes ve ark, 2001) rat östrus siklusunun 4-5 gün sürdüğü bildirilmiş ve vaginal smearların hücre kompozisyonuna göre siklusun evreleri tanımlanmıştır. Sunulan çalışmada da ratların östrus siklusunun hangi evresinde olduğuna vaginal smear örnekleri incelenerek karar verilmiştir. Mikroskopik inceleme sonucunda araştırmacıların (Long ve Evans, 1922; Freeman, 1988; Marcondes ve ark, 2001; Cora ve ark, 2015) bildirdiği şekilde çoğunlukla çekirdekli epitelyal hücreler olmak üzere lökosit ve az miktarda kornifiye hücrenin görüldüğü örnekler proöstrus evresi olarak belirlenmiştir. Sadece kornifiye hücrelerin görüldüğü örnekler östrus evresi olarak kaydedilmiştir. Görüntüde üç tip hücrenin yaklaşık eşit olarak bulunduğu dönem metaöstrus olarak belirlenmiştir. Nötrofil lökositlerin çoğunlukta olduğu ve az sayıda çekirdekli hücre içeren smearlar ise diöstrus dönemi olarak not edilmiştir.

Ovaryumlar mikroskopik olarak incelendiğinde, her bir ovaryumda hem folikülogenezisin farklı aşamaları hem de korpus luteumun farklı görüntülerinin bulunduğu dikkati çekmiştir. Araştırmacıların bildirdiği gibi (Reynaud ve Driancourt, 2000; Pepling ve ark, 2010) oosit etrafında tek katlı yassı epitel hücreleri ve bunlara ilaveten tek tük kübik hücre bulunduran foliküller, primordial folikül olarak belirlenmiştir. Oosit etrafında tek sıra kübik epitel hücreleri görüldüğünde folikül primer folikül olarak adlandırılmıştır (Moore ve ark, 2011; Li ve Chian, 2017).

Sekonder folikül, antral folikül ve Graaf folikülleri araştırmacıların (Sadler, 2005; Skinner, 2005; Sugiura ve ark, 2011) verilerine göre belirlenmiştir. Oosit etrafında iki sıralı kübik epitel bulunduran ve antrum içermeyen foliküller, sekonder folikül olarak kaydedilmiştir. Teka folikülü sekonder folikülden itibaren izlenmeye başlanmıştır. Epitel

hücreleri arasında boşlukların görüldüğü foliküller, antral folikül olarak belirlenmiştir. Tek bir büyük boşluk içeren ve oositin kenara itildiği foliküller, Graaf folikülü olarak değerlendirilmiştir.

Ovaryum kesitlerinde korpus luteum görüntüleri yeni, olgun ve gerilemiş korpus luteum olarak sınıflandırılmıştır (Marusak ve ark, 2007; Westwood, 2008). Yeni şekillenen korpus luteumda yuvarlak şekilli hücreler, aralarda kapılar damar görüntüleri ve küçük bir boşluk izlenmiştir. Olgun korpus luteumda yuvarlak hücrelerin aralarında bağ dokuya ait görüntülere rastlanmıştır. Ayrıca boşluk içerisinde sıvı görüntüsü izlenmiştir (Stocco ve ark, 2007; Westwood, 2008). Gerilemiş korpus luteumlarda bağ dokunun oldukça arttığı ve luteal hücrelerin azaldığı tespit edilmiştir.

Araştırmacılar (Westwood, 2008; Sato ve ark, 2016) foliküler gelişimi ve korpus luteum tiplerini inceleyerek östrüs siklusundaki proöstrüs, östrüs, metaöstrüs ve diöstrüs evrelerini tespit etmişlerdir. Sunulan çalışmada da rat ovaryumunda dönemler arasındaki histolojik farklılıkları ortaya koyabilmek için doku kesitlerinde antral ve graaf foliküller ile korpus luteum tipleri sayılmıştır. Veriler istatikselsel olarak değerlendirildiğinde dönemler arasında antral folikül açısından fark gözlenmemiştir. Graaf folikülünün proöstrüs döneminde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Yeni korpus luteumun östrüs döneminde metaöstrüs döneminden daha fazla olduğu gözlenmiştir. Ratlarda ovulasyonun proöstrüs başlangıcından östrüs evresinin sonuna kadar gerçekleşme olasılığı olduğundan (Young ve ark, 1941; Schwartz, 1964) elde edilen bulgu literatür bilgisiyle uyumludur. Proöstrüs ve diöstrüs dönemindeki ovaryumlarda yeni korpus luteum bulunmamaktadır. Olgun korpus luteum sayısının metaöstrüs ve diöstrüs dönemleri arasında farklı olmadığı görülmüştür. Proöstrüs döneminde olgun korpus luteuma metaöstrüs ve diöstrüs dönemlerinden daha az olarak rastlanmıştır. Östrüs döneminde olgun korpus luteum bulunmamaktadır. Gerilemiş korpus luteuma ise bütün dönemlerde rastlanmakla birlikte en az sayıda proöstrüs döneminde rastlanmıştır. Sunulan çalışmada ovaryumda östrüs siklusunun evrelerine göre kaydedilen histolojik bulgular, araştırmacıların (Hirsfield ve ark, 1978; Marusak ve ark, 2007; Westwood, 2008; Sato ve ark, 2016; Wear ve ark, 2016) bildirdikleri ile uyumludur.

Yapılan araştırmada ovaryum kesitlerinde oksidatif stresin sonucu olarak DNA hasarının bir göstergesi olan 8-OHdG, strept ABC metodu ile belirlenmiştir. Mikroskopik inceleme sonucunda 8-OHdG'nin hem çekirdekte hem de sitoplazmada pozitivite verdiği dikkati çekmiştir. Sitoplazmadaki pozitivitenin mitokondriyal DNA'dan kaynaklandığı ileri sürülebilir. İnceleme sonucunda antral foliküllerde ve Graaf folikülünde, özellikle antrumu çevreleyen hücrelerin çekirdeklerinde, 8-OHdG pozitivitesi gözlenmiştir. Gerilemekte olan

ve gerilemiş korpus luteumların özellikle orta kısımlarında, bağ doku ile dolmaya başlayan kısımlarında 8-OHdG pozitifitesi tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular ovaryumda gerçekleşen histolojik değişimlerle uyumludur. Hücre yıkımının olması gereken yerlerde oksidatif stres belirteci olan ve DNA kırıklarını gösteren 8-OHdG pozitifitesi gözlenmiştir. Rizzo ve ark (2012) da ROS'un foliküler gelişimde ve korpus luteumda etkili olduğunu bildirmişlerdir. Büyüyen foliküldeki steroid üretimindeki artışın, P450'nin artmasına ve buna bağlı olarak ROS üretimine neden olduğu ve pre-ovulatuvar folliküller tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin ovulasyon için önemli uyarıcılar olduğu bildirilmiştir (Ruder ve ark, 2009).

Shi ve ark (2016) ratlarda inhalasyon yöntemi ile ozon verdikten sonra ovaryumda 8-OHdG pozitifitesini incelemişler ve antral foliküller ve gerilemiş korpus luteumda oksidatif stresi tespit etmişlerdir. Yu ve ark (2018) ratlara sodyum arsenitin intra peritonel enjeksiyonunun sekonder folikül ve antral foliküllerde artırdığını tespit etmişlerdir.

Sunulan çalışmada apoptotik hücreler enzim histokimya yöntemi olan TUNEL metodu ile belirlenmiştir. Ovaryum kesitlerinde yapılan inceleme sonucunda apoptotik hücrelere antral foliküller, graaf folikülü, olgun korpus luteum ve gerilemiş korpus luteumda rastlanmıştır. Antrum oluşmasında, ovulasyonun gerçekleşmesinde ve korpus luteumun gerilemesinde hücrelerin apoptoza uğraması olağan bir durum olarak nitelendirildi. Nitekim araştırmacılar (Tilly ve ark, 1991; Behrman ve ark, 2001; Seki ve ark, 2002; Mendoza-Rodriguez ve ark, 2003; Wu ve ark, 2004; Hussein, 2005; Sato ve ark, 2014) apoptozisin, granuloza hücrelerinde, atretik foliküllerde, luteal hücrelerde ve gerilemiş korpus luteumda görüldüğünü bildirmişlerdir. Carlson ve ark (1995) da oksidatif stres ve apoptozisin steroidojenik hücrelerin ölmeleri ve korpus luteumun gerilemesinde anahtar rol oynadığını bildirmişlerdir.

Yapılan araştırmada oksidan belirteci olan MDA değerinin östrüs döneminde en fazla olduğu ($P<0.01$) tespit edildi. Büyüyen foliküllerdeki steroid üretimindeki artış, P450'nin artmasına ve buna bağlı olarak ROS üretimine neden olur (Hanukoğlu, 2006). Pre-ovulatuvar folliküller tarafından üretilen reaktif oksijen türlerinin ovulasyon için önemli indüktörler olduğu bildirilmiştir (Ruder ve ark, 2009). Yapılan araştırmada yeni Cl sayısı da östrüs dönemi ratlarda daha fazla bulunmuştur. Progesteron sentezi sırasında da ROS üretimi olmaktadır (Sugino, 2005). Östrüs dönemindeki MDA miktarının fazla olmasının foliküler gelişim ve arkasından Cl şekillenmesinden kaynaklandığı ileri sürülebilir. Ovulasyon için

gerekli olan luteinizasyon hormonu pikinden sonra oluşan inflamatuvar prekürsörlerin de ROS' ların oluşumuna neden olduğu bildirilmiştir (Shkolnik ve ark, 2011).

Sunulan çalışmada antioksidan olan SOD değerinin metaöstrüs döneminde daha fazla olduğu ($P<0.05$) görüldü. Metöstrüs dönemindeki SOD değerinin fazla olması muhtemelen ROS'un neden olduğu oksidatif stresi dengelemeye yöneliktir. Wang ve ark (2017) da ovulasyondan sonraki SOD aktivitesinin Cl'un progesteron sentezi sırasında açığa çıkan ROS'un oluşturacağı oksidatif stresten korumaya yönelik olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca proöstrüs döneminde de SOD değerinin diöstrüs döneminde fazla olduğu gözlemlendi. Buradaki antioksidan artışının da foliküler gelişim ile artan steroid sentezi sonucu açığa çıkan ROS'un etkilerini dengelemeye yönelik olduğu düşünüldü.

6. SONUÇ

Sunulan çalışmada ratların östrüs siklusunun evreleri vaginal smear yöntemi belirlenmiş ve ovaryumlardaki histolojik değişiklikler evrelere göre tanımlanmıştır. Östrüs siklusunun farklı evrelerindeki ovaryumlar histolojik, immunohistokimyasal ve enzim histokimyasal metotlarla incelenmiş ve ovaryumda oksidatif stresin gerçekleştiği noktalar araştırılmıştır. Oksidatif stres belirteci olan 8-OHdG, antral foliküller ve Cl'da immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir. Histolojik bulgularla uyumlu olarak, kanda MDA seviyesi östrüs döneminde, SOD seviyesi metöstrüs ve proöstrüs döneminde yüksek bulunmuştur. Apoptotik hücreler de immunohistokimyasal ve biyokimyasal verilere uygun olarak antral foliküller ve Cl'da gözlenmiştir.

7. KAYNAKLAR

- Ackland JF, D'agostino J, Ringstrom SJ, Hostetler JP, Mann BG, Schwartz NB.** Circulating radioimmunoassayable inhibin during periods of transient follicle-stimulating hormone rise: secondary surge and unilateral ovariectomy. *Biology of Reproduction* 1990, 43(2), 347-352.
- Adhikari D, Liu K.** The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2014, 382(1), 480-487.
- Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S.** The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2012, 10(1), 49.
- Albertini DF, Combelles CM, Benecchi E, Carabatsos MJ.** Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction* 2001, 121(5), 647-653.
- Alila HW, Corradino RA, Hansel W.** Differential effects of luteinizing hormone on intracellular free Ca⁺² in small and large bovine luteal cells. *Endocrinology* 1989, 124(5), 2314-2320.
- Anderson R, Copeland TK, Schöler H, Heasman J, Wylie C.** The onset of germ cell migration in the mouse embryo. *Mechanisms of Development* 2000, 91(1-2), 61-68.
- Andrews WW, Mizejewski GJ, Ojeda SR.** Development of estradiol-positive feedback on luteinizing hormone release in the female rat: a quantitative study. *Endocrinology* 1981, 109(5), 1404-1413.
- Anne VL, Jacquez D.** Oksidative Stress and Peritoneal Endometriosis. *Fertil Steril* 2002, 77(5), 861- 870.
- Anwar A, Moussa MD.** In vitro maturation of oocytes. *A Review article Anatomy Journal* 2002, 25, 1-70.
- Aoshiba K, Koinuma M, Yokohori N, Nagai A.** Immunohistochemical evaluation of oxidative stress in murine lungs after cigarette smoke exposure. *Inhalation Toxicology* 2003, 15(10) 1029-1038.
- Astwood EB.** Changes in the weight and water content of the uterus of the normal adult rat. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1939, 126(1), 162-170.

Atalay M, Laaksonen DE. Diabetes, oxidative stress and physical exercise. *Journal of Sports Science & Medicine* 2002, 1(1), 1.

Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A, Sharma RK. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the outcome of in vitro fertilization. *International Journal Of Fertility And Women's Medicine* 2000, 45(5), 314-320.

Atwood CS, Meethal SV. The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis, early embryogenesis and blastocyst implantation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2016, 430, 33-48.

Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *The American Journal of Medicine* 2000, 109(1), 33-44.

Behrman HR, Kodaman PH, Preston SL, Gao S. Oxidative stress and the ovary. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation* 2001, 8(1), 40-42.

Borum K. Oogenesis in the Mouse. *Experimental Cell Research* 1967, 45(1), 39-47.

Brännström M, Mayrhofer G, Robertson SA. Localization of leukocyte subsets in the rat ovary during the periovulatory period. *Biology of Reproduction* 1993, 48(2), 277-286.

Braw-Tal R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells?. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002, 187(1-2), 11-18.

Bruce NW, Hisheh S, Dharmarajan AM. (2001) Patterns of apoptosis in the corpora lutea of the rat during the oestrous cycle, pregnancy and in vitro culture. *Reproduction, Fertility and Development* 2002, 13(3), 105-109.

Bullejos M, Koopman P. Germ cells enter meiosis in a rostro-caudal wave during development of the mouse ovary. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 2004, 68(4), 422-428.

Byskov AG. Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiological reviews* 1986, 66(1), 71-117.

Camp TA, Rahal JO, Mayo KE. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Molecular Endocrinology* 1991, 5(10), 1405-1417.

Cao Y, Xing Q, Zhang ZG, Wei ZL, Zhou P, Cong L. Cryopreservation of immature and in-vitro matured human oocytes by vitrification. *Reproductive Biomedicine Online* 2009, 19(3), 369-373.

Carbone MC, Tatone C, Monache SD, Marci R, Caserta D, Colonna R, Amicarelli F. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and

age-dependent changes. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 2003, 9(11), 639-643.

Carlson JC, Sawada M, Boone DL, Stauffer JM. Stimulation of progesterone secretion in dispersed cells of rat corpora lutea by antioxidants. *Steroids* 1995, 60(3), 272-276.

Carpini JD, Karam AK, Montgomery L. Vascular endothelial growth factor and its relationship to the prognosis and treatment of breast, ovarian, and cervical cancer. *Angiogenesis* 2010, 13(1), 43-58.

Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British Medical Bulletin* 1993, 49(3), 481-493.

Chian RC, Buckett WM, Too LL, Tan SL. Pregnancies resulting from in vitro matured oocytes retrieved from patients with polycystic ovary syndrome after priming with human chorionic gonadotropin. *Fertil and Steril* 1999, 72(4), 639-642.

Chian RC, Buckett WM, Tan SL. In-vitro maturation of human oocytes. Vol 8 No 2 148-166 *Reproductive BioMedicine Online*; www.rbmonline.com/Article/1037 2003. [https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483\(10\)60511-1/pdf](https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(10)60511-1/pdf) (22.12.2018).

Chun SY, Eisenhauer KM, Minami S, Billig H, Perlas E, Hsueh AJ. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology* 1996, 137(4) 1447-1456.

Ciani F, Cocchia N, d'Angelo D, Tafuri S. Influence of ROS on ovarian functions. In *New Discoveries in Embryology InTech* 2015.

Combelles CM, Carabatsos MJ, Kumar TR, Matzuk MM, Albertini DF. Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle, development. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 2004, 69(3), 347-355.

Conti M, Andersen CB, Richard FJ, Shitsukawa K, Tsafiriri A. Role of cyclic nucleotide phosphodiesterases in resumption of meiosis1. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998, 145(1-2) 9-14.

Conti M, Andersen CB, Richard F, Mehats C, Chun SY, Horner K, Tsafiriri A Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002, 187(1-2), 153-159.

Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic Pathology* 2015, 43(6) 776-793.

Coucovanis EC, Sherwood SW, Carswell-Crumpton C, Spack EG, Jones PP. Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Experimental Cell Research* 1993, 209(2), 238-247.

Cran DG, Moor RM. Programming the oocyte for fertilization. *Fertilization in Mammals* 1990, 35-47.

Crespo D, Goetz FW, Planas JV. Luteinizing hormone induces ovulation via tumor necrosis factor α -dependent increases in prostaglandin F 2α in a nonmammalian vertebrate. *Scientific Reports* 2015, 5 14210.

Culling CFA, Allison RT, Barr WT. Cellular pathology technique. Butterworths and Co Ltd, London, 1985.

Curnow EC, Ryan JP, Saunders DM, Hayes ES. In vitro developmental potential of macaque oocytes, derived from unstimulated ovaries, following maturation in the presence of glutathione ethyl ester. *Human Reproduction* 2010, 25(10), 2465-2474.

Das D, Arur S. Conserved insulin signaling in the regulation of oocyte growth, development, and maturation. *Molecular Reproduction and Development* 2017, 84(6), 444-459.

Davis JS, Rueda BR. The corpus luteum: an ovarian structure with maternal instincts and suicidal tendencies. *Front Biosci* 2002, 7, 1949-1978.

De Matos DG, Gasparrini B, Pasqualini SR, Thompson JG. Effect of glutathione synthesis stimulation during in vitro maturation of ovine oocytes on embryo development and intracellular peroxide content. *Theriogenology* 2002, 57(5), 1443-1451.

De Sousa Lopes SMC, Hayashi K, Surani MA. Proximal visceral endoderm and extraembryonic ectoderm regulate the formation of primordial germ cell precursors. *BMC Developmental Biology* 2007, 7(1), 140.

Devoto L, Fuentes A, Kohen P, Céspedes P, Palomino A, Pommer R, Strauss III JF. The human corpus luteum: life cycle and function in natural cycles. *Fertility and sterility* 2009, 92(3), 1067-1079.

Dluzen DE, Ramirez VD. In vivo LH-RH output of ovariectomized rats following estrogen treatment. *Neuroendocrinology* 1986, 43(4), 459-465.

Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature* 1996, 383(6600), 531.

Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews* 2009, 30(6), 624-712.

- Eleanora BP, Sharma RK, Joshi AC.** Effect of oxidative stress follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedure. *Fertility and Sterility* 2004, 81(4), 973-979.
- Eppig JJ.** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction* 2001, 122(6), 829-838.
- Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C.** The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocrine reviews* 1985, 6(3) 371-399
- Eroschenko VP, Demir R.** The Endocrine System. *Di Fiore Histoloji Atlası: Fonksiyonel İlişkileriyle 9th ed Ankara: Palme Publishing* 2001, 273-276.
- Espey LL.** Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction* 1994, 50(2), 233-238.
- Evans G, Dobias M, King GJ, Armstrong DT.** Estrogen, androgen, and progesterone biosynthesis by theca and granulosa of preovulatory follicles in the pig. *Biology of Reproduction* 1981, 25(4), 673-682.
- Findlay JK.** An update on the roles of inhibin, activin, and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biology of Reproduction* 1993, 48(1), 15-23.
- Fujii J, Iuchi Y, Okada F.** Fundamental roles of reactive oxygen species and protective the female reproductive system. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005, 3(1), 43.
- Fortune JE.** Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of reproduction* 1994, 50(2) 225-232.
- Fortune JE.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science* 2003, 78(3-4), 135-163.
- Freeman ME** The ovarian cycle of the rat. by *E Knobil, J Neill, LL Ewing, GS Greenwald, CL Markert and D W Pfaff* 1988, 1893-1928.
- Gallo RV.** Pulsatile LH release during periods of low level LH secretion in the rat estrous cycle. *Biology of Reproduction* 1981, 24(4), 771-777.
- Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG.** Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update* 2008, 14(2) 159-177.
- Gilchrist RB Ritter LJ, Armstrong DT.** Oocyte–somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science* 2004, 82, 431-446.
- González-Fernández R, Gaytán F, Martínez-Galisteo E, Porrás P, Padilla CA, Criado JS, Bárcena, JA.** Expression of glutaredoxin (thioltransferase) in the rat ovary during the oestrous cycle and postnatal development. *Journal of Molecular Endocrinology* 2005, 34(3), 625-635.

- Gougeon A.** Ovarian follicular growth in humans: ovarian ageing and population of growing follicles. *Maturitas* 1998, 30(2), 137-142.
- Guigon CJ, Magre S.** Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: insights from models of germ cell depletion. *Biology of Reproduction* 2006, 74(3), 450-458.
- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R.** Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biology of Reproduction* 2000, 62(5) 1322-1328.
- Gümüş B, Kilic S, Zulfikaroglu E.** Role of apoptosis-related factors in follicular atresia. *International Journal of Genetics and Molecular Biology* 2013, 5(5), 54-63.
- Güneşdoğan U, Magnúsdóttir E, Surani MA.** Primordial germ cell specification: a context-dependent cellular differentiation event. *Phil Trans R Soc B* 2014, 369(1657) 20130543.
- Haisenleder DJ, Ortolano GA, Dalkin AC, Ellis TR, Paul SJ, Marshall JC.** Differential regulation of gonadotropin subunit gene expression by gonadotropin-releasing hormone pulse amplitude in female rats. *Endocrinology* 1990, 127(6), 2869-2875.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease 1988.
- Halliwell B.** Tell me about free radicals, doctor: a review. *Journal of the Royal Society of Medicine* 1989, 82(12), 747-752.
- Hamid HY, Zakaria MZAB.** Reproductive characteristics of the female laboratory rat. *African journal of Biotechnology* 2013, 12(19), 2510-2514.
- Hanukoglu I.** Steroidogenic enzymes: structure, function, and role in regulation of steroid hormone biosynthesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1992, 43.8: 779-804.
- Hanukoglu, I.** Antioxidant protective mechanisms against reactive oxygen species (ROS) generated by mitochondrial P450 systems in steroidogenic cells. *Drug Metabolism reviews* 2006, 38(1-2), 171-196.
- Hayashi K, Miyamoto A, Konari A, Ohtani M, Fukui Y.** Effect of local interaction of reactive oxygen species with prostaglandin F2 α on the release of progesterone in ovine corpora lutea in vivo. *Theriogenology* 2003, 59(5-6), 1335-1344
- Hayashi KG, Ushizawa K, Hosoe M, Takahashi T.** Differential genome-wide gene expression profiling of bovine largest and second-largest follicles: identification of genes

associated with growth of dominant follicle. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2010, 8(1), 11.

He Y, Deng H, Jiang Z, Li Q, Shi M, Chen H, Han Z. Effects of melatonin on follicular atresia and granulosa cell apoptosis in the porcine. *Molecular Reproduction and Development* 2016, 83(8), 692-700.

Hedin L, Rodgers RJ, Simpson ER, Richards JS. Changes in content of cytochrome P450 17 α cytochrome P450scc and 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl CoA reductase in developing rat ovarian follicles and corpora lutea: Correlation with theca cell steroidogenesis. *Biology of Reproduction*, 1987, 37(1) 211-223.

Hirshfield AN, Rees Midgley JrA. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology of Reproduction* 1978, 19(3) 597-605.

Hsu SY, Hsueh AJ. Hormonal regulation of apoptosis an ovarian, perspective. *Trends in Endocrinology, Metabolism* 1997, 8(5), 207-213.

Hsueh AJ, Billig H, Tsafiri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine reviews* 1994, 15(6) 707-724.

Hu YC, Okumura LM, Page DC. Gata4 is required for formation of the genital ridge in mice. *PLoS Genetics* 2013, 9(7) e1003629.

Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier L, Reinhardt DP, Rodgers RJ. A new model of development of the mammalian ovary and follicles. *PloS one* 2013, 8(2), e55578.

Hunzicker-Dunn M, Maizels ET. FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cellular signalling* 2006, 18(9) 1351-1359.

Hussein MR. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update* 2005, 11(2) 162-178.

Hutt KJ, McLaughlin EA, Holland MK. Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Molecular Human Reproduction* 2006, 12(2), 61-69.

Ikeda S, Kitagawa M, Imai H, Yamada M. The roles of vitamin A for cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 2005, 51(1), 23-35.

Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H. Growth antrum formation and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biology of Reproduction* 2002, 67(4) 1099-1105.

- Jaffe LA, Egbert JR.** Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle. *Annual review of Physiology* 2017, 79, 237-260.
- Jozwik M, Wolczynski S, Jozwik M, Szamatowicz M.** Oxidative stress markers in preovulatory follicular fluid in humans. *Molecular Human Reproduction* 2005, 5(5), 409-413.
- Karihtala P, Mäenpää J, Turpeenniemi-Hujanen, T, Puistola U.** Front-line bevacizumab in serous epithelial ovarian cancer: biomarker analysis of the Finavast trial. *Anticancer Research* 2005, 30(3), 1001-1006.
- Kasai H.** Analysis of a form of oxidative DNA damage 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 1997, 387(3) 147-163.
- Kehrer JP.** Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Critical reviews in Toxicology* 1993, 23(1), 21-48.
- Kehrer JP.** The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000, 149(1), 43-50.
- Kodaman PH, Behrman HR.** Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. *Endocrinology* 2001, 142(2), 687-693.
- Kuyucu Y, Tap Ö.** Oosit olgunlaşma süreci ve düzenleyici faktörler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2009, 18(4).
- Lawson KA, Hage WJ.** Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the Mouse. *Germline Development* 1994, 165, 68-84.
- Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Hogan BL.** Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Development* 1999, 13(4), 424-436.
- Lee WS, Otsuka F, Moore RK, Shimasaki S.** Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. *Biology of Reproduction* 2001, 65(4) 994-999.
- Leeson CR, Leeson TS, Paparo AA.** *Textbook of Histology* 1985, WB Saunders Company.
- Levine JE, Duffy MT.** Simultaneous measurement of luteinizing hormone (LH)-releasing hormone, LH, and follicle-stimulating hormone release in intact and short-term castrate rats. *Endocrinology* 1988, 122(5), 2211-2221.

- Levine JE, Bauer-Dantoin AC, Besecke LM, Conaghan LA, Legan SJ, Meredith JM, Wolfe AM.** Neuroendocrine regulation of the luteinizing hormone-releasing hormone pulse generator in the rat. In *Proceedings of the 1990 Laurentian Hormone Conference* 1991, 97-153.
- Levine JE, Norman RL, Gliessman PM, Oyama TT, Bangsberg DR, Spies HG.** In vivo gonadotropin-releasing hormone release and serum luteinizing hormone measurements in ovariectomized, estrogen-treated rhesus macaques. *Endocrinology* 1985, 117(2), 711-721.
- Levine R, Levine S.** Role of the pituitary-adrenal hormones in the acquisition of schedule-induced polydipsia. *Behavioral Neuroscience* 1989, 103(3), 621.
- Li H, Chian RC.** Follicular Development and Oocyte Growth. In: Chian RC, Nargund G, Huang J. (eds) *Development of In Vitro Maturation for Human Oocytes*. Springer, Cham, 2017: 37-57.
- Liu CF, Liu C, Yao HHC.** Building pathways for ovary organogenesis in the mouse embryo. In *Current Topics In Developmental Biology* 2010,90, 263-290, Academic Press.
- Lohmiller JJ, Swing SP.** Reproduction and breeding. In *The Laboratory Rat (Second Edition)* 2006, 147-164.
- Long JA, Evans HM.** The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California* 1922, 6, 1-148.
- Maekawa R, Lee L, Okada M, Asada H, Shinagawa M, Tamura I, Sugino N.** Changes in gene expression of histone modification enzymes in rat granulosa cells undergoing, luteinization during ovulation. *Journal of Ovarian Research* 2016, 9(1) 15.
- Malgorzata S, Jacek K, Jana S, Mateus M.** Oksidative stress may be a piece in the endometriosis puzzle. *Fertility and Sterility* 2003, 79 (6), 1287-1293.
- La Marca A, Broekmans FJ, Volpe A, Fauser BC, Macklon NS.** Anti-Müllerian hormone (AMH): what do we still need to know?. *Human Reproduction* 2009, 24(9), 2264-2275.
- Marcondes FK, Miguel KJ, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC.** Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. *Physiology, Behavior* 2001, 74(4-5), 435-440.
- Marusak RA, Radi ZA, Obert L.** Expression of Ki-67 in the uterus during various stages of the estrous cycle in rats. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2007, 59(3-4), 151-155.

Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y, Manabe N. The regulation of ovarian granulosa cell death by pro-and anti-apoptotic molecules. *Journal of Reproduction and Development* 2006, 52(6), 695-705.

McConnell NA, Yunus RS, Gross SA, Bost KL, Clemens MG, Hughes Jr FM. Water permeability of an ovarian antral follicle is predominantly transcellular and mediated by aquaporins. *Endocrinology* 2002, 143(8) 2905-2912.

McKearin D, Ohlstein B. A role for the Drosophila bag-of-marbles protein in the differentiation of cystoblasts from germline stem cells. *Development* 1995, 121(9), 2937-2947.

Mendoza-Rodríguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez ML, Moreno-Mendoza N, Cruz ME, Arteaga-López P, Cerbón M. C-fos and estrogen receptor gene expression pattern in the rat uterine epithelium during the estrous cycle. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 2003, 64(4), 379-388.

Menke DB, Page DC. Sexually dimorphic gene expression in the developing mouse gonad. *Gene Expression Patterns* 2002, 2(3), 359-367.

Monroe SE, Rebar RW, Gay VL, Midgley Jr AR. Radioimmunoassay determination of luteinizing hormone during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 1969, 85(4), 720-724.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. *The Developing Human E-Book*, Elsevier Health Sciences, 2011.

Motta PM, Makabe S, Nottola SA. The ultrastructure of human reproduction 1 The natural history of the female germ cell: origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Human Reproduction Update* 1997, 3(3), 281-297.

Nakamura T, Sakamoto K. Reactive oxygen species up-regulates cyclooxygenase-2, p53, and Bax mRNA expression in bovine luteal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2011, 284(1), 203-210.

Nakamura Y, Tamura H, Takiguchi S, Kashida S, Yamagata Y, Sugino N, Kato H. Changes in interleukin-1 β mRNA expression in the rat ovary during the estrous cycle in response to lipopolysaccharide. *Endocrine Journal* 1999, 46(2), 293-300.

Odor DL, Blandau RJ. Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries I Histogenesis and organogenesis. *American Journal of Anatomy* 1969, 124(2), 163-186

Ohinata Y, Payer B, O'carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Saitou M. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 2005, 436(7048), 207.

Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *Journal of Ovarian Research* 2009, 2(1), 9.

Orisaka M, Hattori K, Fukuda S, Mizutani T, Miyamoto K, Sato T, Yoshida Y. Dysregulation of ovarian follicular development in female rat: LH decreases FSH sensitivity during preantral-early antral transition. *Endocrinology* 2013, 154(8), 2870-2880.

O'shea JD, Hay MF, Cran DG. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *Journal Of Reproduction and Fertility* 1978, 54(1), 183-187.

Oyawoye O, Abdel Gadir A, Garner A, Constantinovici N, Perrett C, Hardiman P. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. *Human Reproduction* 2003, 18(11), 2270-2274.

Paccola CC, Resende CG, Stumpp T, Miraglia SM, Cipriano I. The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Animal Reproduction* 2013, 10(4), 677-683.

Palermo R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. *Reproductive Biomedicine Online* 2007, 15(3), 326-337.

Palotie A, Peltonen L, Foidart JM, Rajaniemi H. Immunohistochemical localization of basement membrane components and interstitial collagen types in preovulatory rat ovarian follicles. *Collagen and Related Research* 1984, 4(4), 279-287.

Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, Rose BI. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility* 2004, 81(4) 973-976.

Paszkowski T, Traub AI, Robinson SY, McMaster D. Selenium dependent glutathione peroxidase activity in human follicular fluid. *Clinica Chimica Acta* 1995, 236(2), 173-180.

Peluso JJ. Morphologic and physiologic features of the ovary. *Pathobiology of The Aging Rat* 1992, 1, 337-349.

Pepling ME. Follicular assembly: mechanisms of action. *Reproduction* 2012, 143(2), 139-149.

Pepling ME, Spradling AC. Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Developmental Biology* 2001, 234(2), 339-351.

Pepling ME, Sundman EA, Patterson NL, Gephardt GW, Medico L, Wilson KI. Differences in oocyte development and estradiol sensitivity among mouse strains. *Reproduction* 2010, 139(2), 349-357

- Piacsek BE, Schneider TC, Gay VL.** Sequential study of luteinizing hormone (LH) and “progestin” secretion on the afternoon of proestrus in the rat. *Endocrinology* 1971, 89(1), 39-45.
- Picton H, Briggs D, Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1998, 145(1-2), 27-37.
- Quirk SM, Cowan RG, Harman RM, Hu CL, Porter DA.** Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *Journal of Animal Science* 2004, 82, 40-52.
- Rankin T, Dean J.** Preimplantation embryology: The molecular genetics of the zona pellucida: mouse mutations and infertility. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 1996, 2(11), 889-894.
- Ratts VS, Flaws JA, Kolp R, Sorenson CM, Tilly JL.** Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. *Endocrinology* 1995, 136(8), 3665-3668.
- Reddy P, Zheng W, Liu K.** Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends in Endocrinology Metabolism* 2010, 21(2), 96-103.
- Reynaud K, Driancourt MA.** Oocyte attrition. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2000, 163(1-2), 101-108.
- Richards JAS.** Genetics of ovulation. In *Seminars in Reproductive Medicine* 2007, 25(4), 235-242, by Thieme Medical Publishers, Inc, 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001.
- Richards JS, Hickey GJ, Chen S, Shively JE, Hall PF, Gaddy-Kurten D, Kurten R.** Hormonal regulation of estradiol biosynthesis, aromatase activity, and aromatase mRNA in rat ovarian follicles and corpora lutea. *Steroids* 1987, 50(4-6), 393-409.
- Richardson VC, Backues K.** Diseases of small domestic rodents. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 2003, 34(4), 421-421.
- Rizzo A, Minoia G, Trisolini C, Mutinati M, Spedicato M, Jirillo F, Sciorsci RL.** Reactive oxygen species (ROS): Involvement in bovine follicular cysts etiopathogenesis. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2009a, 31(4), 631-635.
- Rizzo A, Roscino MT, Minoia G, Trisolini C, Spedicato M, Mutinati M, Sciorsci RL.** Serum levels of reactive oxygen species (ROS) in the bitch. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2009b, 31(2), 310-313.

Rizzo A, Roscino MT, Binetti F, Sciorsci RL. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 2012, 47(2), 344-352.

Robker RL, Russell DL, Yoshioka S, Sharma SC, Lydon JP, O'Malley BW, Richards JS. Ovulation: a multi-gene multi-step process. *Steroids* 2000, 65(10-11) 559-570.

Rodgers RJ, Lavranos TC, Rodgers HF, Young FM, Vella CA. The physiology of the ovary: maturation of ovarian granulosa cells and a novel role for antioxidants in the corpus luteum. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 1995, 53(1-6), 241-246.

Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction* 2010, 82(6), 1021-1029.

Ross MH, Pawlina W. Histology (5th edition). Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins 2006.

Russell DL, Robker RL. Molecular mechanisms of ovulation: co-ordination through the cumulus complex. *Human Reproduction Update* 2007, 13(3), 289-312.

Ruder EH, Hartman TJ, Blumberg J, Goldman MB. Oxidative stress and antioxidants: exposure and impact on female fertility. *Human Reproduction Update* 2008, 14(4), 345-357.

Ruder EH, Hartman TJ, Goldman MB. Impact of oxidative stress on female fertility. *Current Opinion in Obstetrics, Gynecology* 2009, 21(3), 219.

Sadler TW. Langman Medikal Embriyoloji (9. Baskı), (Çev: Başaklar, AC), Palme Yayıncılık, Ankara, 2005.

Sadraie SH, Saito H, Kaneko T, Saito T, Hiroi M. Effects of aging on ovarian fecundity in terms of the incidence of apoptotic granulosa cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2000, 17(3), 168-173.

Sakuraba H, Mizukami H, Yagihashi N, Wada R, Hanyu C, Yagihashi S. Reduced beta-cell mass and expression of oxidative stress-related DNA damage in the islet of Japanese Type II diabetic patients. *Diabetologia* 2002, 45(1) 85-96.

Salmon AB, Richardson A, Pérez VI. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging?, *Free Radical Biology and Medicine* 2010, 48(5), 642-655.

Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 2012, 1822(12), 1896-1912.

Sarraaj MA, Drummond AE. Mammalian foetal ovarian development: consequences for health and disease. *Reproduction* 2012, 143(2), 151-163.

Sato J, Hashimoto S, Doi T, Yamada N, Tsuchitani M. Histological characteristics of the regression of corpora lutea in wistar hannover rats: the comparisons with sprague-dawley rats. *Journal of Toxicologic Pathology* 2014, 27(2), 107-113.

Sato J, Nasu M, Tsuchitani M. Comparative histopathology of the estrous or menstrual cycle in laboratory animals, *Journal of Toxicologic Pathology* 2016, 29(3), 155-162.

Schwartz NB. Acute effects of ovariectomy on pituitary LH, uterine weight, and vaginal cornification. *American Journal of Physiology-Legacy Content* 1964, 207(6), 1251-1259.

Scully RE, Cohen RB. Oxidative-enzyme activity in normal and pathologic human ovaries. *Obstetrics , Gynecology* 1964, 24(5), 667-681.

Seino T, Saito H, Kaneko T, Takahashi T, Kawachiya S, Kurachi H. Eight-hydroxy-2'-deoxyguanosine in granulosa cells is correlated with the quality of oocytes and embryos in an in vitro fertilization-embryo transfer program. *Fertility and Sterility* 2002, 77(6), 1184-1190.

Seki S, Kitada T, Yamada T, Sakaguchi H, Nakatani K, Onoda N, Satake K. Immunohistochemical detection of 8- hydroxydeoxyguanosine, a marker of oxidative DNA damage, in human chronic cholecystitis. *Histopathology* 2002, 40(6), 531-535.

Shi L, Zhang J, Lai Z, Tian Y, Fang L, Wu M, Wang S. Long-term moderate oxidative stress decreased ovarian reproductive function by reducing follicle quality and progesterone production. *PloS one* 2016, 11(9) e0162194.

Shibuya EK, Masui, Yoshio, Molecular characteristics of cytostatic factors in amphibian egg cytosols. *Development* 1989, 106(4), 799-808.

Shimamura K, Sugino N, Yoshida Y, Nakamura Y, Ogino K, Kato H. Changes in lipid peroxide and antioxidant enzyme activities in corpora lutea during pseudopregnancy in rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 1995 105(2), 253-257.

Shkolnik K, Tadmor A, Ben-Dor S, Nevo N, Galiani D, Dekel N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2011, 108(4), 1462-1467.

Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update* 2005, 11(5), 461-471.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 1975, 96(1), 219-226.

- Smith P, Wilhelm D, Rodgers RJ.** Development of mammalian ovary. *Journal of Endocrinology* 2014, 221(3), R145-R161.
- Song T, Pranovich A, Holmbom B.** Effects of pH control with phthalate buffers on hot-water extraction of hemicelluloses from spruce wood. *Bioresource Technology* 2011, 102(22), 10518-10523.
- Sork O.** Oksidative stress: a theoretical model or a biological reality. *CR Biologies* 2004, 327, 649-662.
- Spornitz UM, Socin CD, Dravid AA.** Estrous stage determination in rats by means of scanning electron microscopic images of uterine surface epithelium. *The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 1999, 254(1), 116-126.
- Stocco C, Telleria C, Gibori G.** The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine reviews* 2007, 28(1), 117-149.
- Sugino, N.** Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reproductive Medicine and Biology* 2005, 4(1), 31-44.
- Sugino, N.** Roles of reactive oxygen species in the corpus luteum. *Animal Science Journal* 2006, 77(6), 556-565.
- Sugiura K, Konuma R, Kano K, Naito K.** Role of oocyte-derived factors in ovarian follicular development and ovulation. *Journal of Mammalian Ova Research* 2011, 28(1), 8-17.
- Suzuki T, Sasano H, Takaya R, Fukaya T, Yajima A, Date F, Nagura H.** Leukocytes in normal-cycling human ovaries: immunohistochemical distribution and characterization. *Human Reproduction* (Oxford, England), 1998, 13(8), 2186-2191.
- Tabarowski Z, Szoltys M, Bik M, Słomczyn M.** Atresia of large ovarian follicles of the rat. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 2005, 43(1), 43-50.
- Takagi Y, Nikaido T, Toki T, Kita N, Kanai M, Ashida T, Konishi I.** Levels of oxidative stress and redox-related molecules in the placenta in preeclampsia and fetal growth restriction. *Virchows Archiv* 2004, 444(1), 49-55.
- Takahashi T, Takahashi E, Igarashi H, Tezuka N, Kurachi H.** Impact of oxidative stress in aged mouse oocytes on calcium oscillations at fertilization. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 2003, 66(2), 143-152.
- Tamanini C, De Ambrogi M.** Angiogenesis in developing follicle and corpus luteum. *Reproduction in Domestic Animals* 2004, 39(4), 206-216.

- Tanghe S, Van Soom A, Nauwynck H, Coryn M, de Kruif A.** Minireview: functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 2002, 61(3), 414-424.
- Tanyolaç A.** Özel Histoloji (3. Baskı), Yorum Basım Yayın, Ankara 1999, 132-143.
- Tasaki H, Iwata H, Sato D, Monji Y, Kuwayama T.** Estradiol has a major role in antrum formation of porcine preantral follicles cultured in vitro. *Theriogenology* 2013, 79(5), 809-814.
- Tekin ME.** Örneklerle Bilgisayarda İstatistik Konya, Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi 2003, pp: 65-80.
- Thomas FH, Vanderhyden BC.** Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006, 4(1), 19.
- Tilly JL, Kowalski KI, Johnson AL, Hsueh AJ.** Involvement of apoptosis in ovarian follicular atresia and postovulatory regression. *Endocrinology* 1991, 129(5), 2799-2801.
- Tomac J, Cekinović Đ, Arapović J.** Biology of the corpus luteum, *Periodicum Biologorum* 2011, 113(1), 43-49.
- Uilenbroek JTT, Richards JS.** Ovarian follicular development during the rat estrous cycle: gonadotropin receptors and follicular responsiveness. *Biology of Reproduction* 1979, 20(5), 1159-1165.
- Urbanski HF, Ojeda SR.** The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology* 1985, 117(2), 644-649.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J.** Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Molecular and Cellular Biochemistry* 2004, 266(1-2), 37-56.
- Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP.** Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature* 1999, 397(6718), 405.
- Van Den Hurk R, Zhao J.** Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005, 63(6), 1717-1751.
- Wang Y, Teng Z, Li G, Mu X, Wang Z, Feng L, Zhang H.** Cyclic AMP in oocytes controls meiotic prophase I and primordial folliculogenesis in the perinatal mouse ovary. *Development* 2015, 142(2), 343-351.

- Wang S, He G, Chen M, Zuo T, Xu W, Liu X.** The role of antioxidant enzymes in the ovaries. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2017.
- Wear HM, McPike MJ, Watanabe KH.** From primordial germ cells to primordial follicles: a review and visual representation of early ovarian development in mice. *Journal of Ovarian Research* 2016, 9(1), 36.
- WEB_1. (2019). <https://aibolita.com/endocrine-system/54270-ontogenetic-development-of-reproductive-ability.html> (03.01.2019).
- WEB_2. (2019). <http://www.biologydiscussion.com/zoology/practicals/oestrus-cycle-in-female-vertebrate-zoology/45818> (03.01.2019).
- Webb RJ, Marshall F, Swann K, Carroll J.** Follicle-stimulating hormone induces a gap junction-dependent dynamic change in [cAMP] and protein kinase a in mammalian oocytes. *Developmental Biology* 2002, 246(2), 441-454.
- Westwood FR.** The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology* 2008, 36(3), 375-384.
- Wiener-Megnazi Z, Vardi L, Lissak A, Shnizer S, Reznick AZ, Ishai D, Dirnfeld M.** Oxidative stress indices in follicular fluid as measured by the thermochemiluminescence assay correlate with outcome parameters in in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* 2004, 82, 1171-1176.
- Wolgemuth DJ, Celenza J, Bundman DS, Dunbar BS.** Formation of the rabbit zona pellucida and its relationship to ovarian follicular development. *Developmental Biology* 1984, 106(1), 1-14.
- Won MH, Kang TC, Jeon GS, Lee JC, Kim DY, Choi EM, Cho SS.** Immunohistochemical detection of oxidative DNA damage induced by ischemia-reperfusion insults in gerbil hippocampus in vivo. *Brain Research* 1999, 836(1-2) 70-78.
- Worku T, Rehman ZU, Talpur HS, Bhattarai D, Ullah F, Malobi N, Yang L.** MicroRNAs: New insight in modulating follicular atresia: A review, *International Journal of Molecular Sciences* 2017, 18(2), 333.
- Wu LL, Chiou CC, Chang PY, Wu JT.** Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta* 2004, 339(1-2), 1-9.
- Wu XM, Carlson JC.** Alterations in phospholipase A2 activity during luteal regression in pseudopregnant and pregnant rats. *Endocrinology* 1990, 127(5), 2464-2468.

- Yacobi K, Wojtowicz A, Tsafiriri A, Gross A.** Gonadotropins enhance caspase-3 and-7 activity and apoptosis in the theca-interstitial cells of rat preovulatory follicles in culture. *Endocrinology* 2004, 145(4), 1943-1951.
- Yamaji M, Seki Y, Kurimoto K, Yabuta Y, Yuasa M, Shigeta M, Saitou M.** Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. *Nature Genetics* 2008, 40(8), 1016.
- Yang HW, Hwang KJ, Kwon HC, Kim HS, Choi KW, Oh KS.** Detection of reactive oxygen species (ROS) and apoptosis in human fragmented embryos. *Human Reproduction (Oxford, England)* 1998, 13(4), 998-1002.
- Yao HHC.** The pathway to femaleness: current knowledge on embryonic development of the ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005, 230(1-2) 87-93.
- Yoshida M, Sanbuissyo A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y, Nishikawa A.** Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *The Journal of Toxicological Sciences* 2009, 34(Special), SP189-SP197.
- Young WC, Boling JL, Blandau RJ.** The vaginal smear picture, sexual receptivity and time of ovulation in the albino rat. *The Anatomical Record* 1941, 80(1), 37-45.
- Yu H, Kuang M, Wang Y, Rodeni S, Wei Q, Wang W, Mao D.** Sodium arsenite injection induces ovarian oxidative stress and affects steroidogenesis in rats. *Biological Trace Element Research* 2018, 1-8.
- Zhao XJ, Huang YH, Yu YC, Xin XY.** GnRH antagonist cetrorelix inhibits mitochondria-dependent apoptosis triggered by chemotherapy in granulosa cells of rats. *Gynecologic Oncology* 2010, 118(1), 69-75.
- Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD.** Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research* 2003, 64(1), 106-112.

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Portakal, Hediye İpek

Uyruk : T.C.

Doğum yeri ve tarihi : Nazilli- 30.03.1992

Telefon : 0543-731-19-50

E-mail : hedipek.92@gmail.com

Yabancı Dil :-

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet tarihi
Y.Lisans	Aydın Adnan Menderes Üniversitesi	2015-2019
Lisans	Ahi Evran Üniversitesi	10.07.2014

BURSLAR ve ÖDÜLLER:

XXXX

İŞ DENEYİMİ

Yıl	Yer/Kurum	Ünvan
2017-2018	Açı Özel Öğretim Kursu	Biyoloji Öğretmeni

AKADEMİK YAYINLAR

1. MAKALELER

XXX

2. PROJELER

XXX

3. BİLDİRİLER

A) Uluslararası Kongrelerde Yapılan Bildiriler

XXX

B) Ulusal Kongrelerde Yapılan Bildiriler

XXX