

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**METOXYCHLOR'UN SIÇAN OVARYUMUNDA
IGF-I SİNYAL YOLAĞI ÜZERİNE ETKİSİ**

Özlem ÖZDEN AKKAYA

**VETERİNER HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Korhan ALTUNBAŞ**

**İKİNCİ DANIŞMAN
Doç. Dr. Artay YAĞCI**

**Bu Tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinasyon Birimi tarafından 10-VF-21 proje numarası ile
desteklenmiştir**

Tez No: 2014-002


2014 - AFYONKARAHİSAR


KABUL VE ONAY


Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

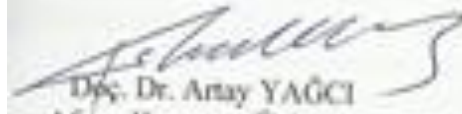
Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir


Tez Savunma Tarihi: 31/01/2014



Prof. Dr. N. G. ZEFİLİZ
Uludağ Üniversitesi
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Berrin ZİK
Uludağ Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Kothan ALTUNBAŞ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Artay YAĞCI
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Raportör


Doç. Dr. Alper SEVİMLİ
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Murat TOSUN
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye


Doç. Dr. Vural ÖZDEMİR
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Üye

Veteriner Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Özlem ÖZDEN AKKAYA'nın "Metoxychlor'un Sığır Ovaryumunda IGF-I Sinyal Yolu Üzerine Etkisi" başlıklı tezi *et.al.tosun* günü saat. *11.00*... 'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.


Prof. Dr. K. ÜÇÖK
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Günümüzde evsel ve tarımsal amaçlarla oldukça yaygın olarak kullanılan endokrin bozucular, insan ve hayvan sağlığı yönünden ciddi bir risk oluşturmaktadır. Bu endokrin bozuculardan birisi de DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis[4-chlorophenyl]ethane)'nin yerine geliştirilen methoxychlor (MXC)'dur. Organik klorlu bir pestisid olan MXC tarım ve hayvancılıkta haşerelerle mücadele için sıklıkla kullanılmaktadır. Östrojenik aktiviteler gösteren MXC, erken ovaryum gelişimini, folikülogenezisi ve yetişkin ovaryum fonksiyonunu etkilemektedir.

Ovaryum gelişiminde ve folikülogenezis sürecinde pek çok büyüme faktörünün rol aldığı bilinmektedir. Bu büyüme faktörlerinden bir tanesi de insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I)'dir. IGF-I ve reseptörü (IGF-IR), ovaryumun gelişimi boyunca farklı düzeylerde eksprese olarak foliküler gelişimi düzenlerler.

Endokrin bozucuların meydana getirdiği ovaryum fonksiyon bozuklukları, infertilite gibi olumsuzlukların, büyüme faktörleri ve onların reseptörlerinde oluşturdukları etkiler sonucunda ortaya çıkması muhtemeldir. Ancak MXC'nin büyüme faktörleri üzerine etkisine dair çalışmalar oldukça sınırlıdır. **Bu araştırmada, MXC'nin ovaryumda büyüme faktörlerinden IGF-I ile IGF-I Reseptörü (IGF-IR) üzerine olası etkilerinin belirlenmesi, dişi infertilitesinin moleküler mekanizmasının açığa çıkarılması ve yeni tedavi yaklaşımlarının ortaya konması yönünden önemlidir.**

Tezimin hazırlanması süresince danışmanlığımı yapan, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteğini yanımda hissettiğim değerli hocalarım Doç. Dr. Korhan ALTUNBAŞ ve Doç. Dr. Artay YAĞCI'ya; önerileriyle beni yönlendiren tez komite üyeleri Doç. Dr. Alper SEVİMLİ, Doç. Dr. Murat TOSUN ve Doç. Dr. Aziz BÜLBÜL'e; laboratuvarının kapısını bana sonuna kadar açan, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Ahmet AKKOÇ'a; tezimin istatistiksel analiz çalışmaları sırasında yardımları ile destek veren Doç. Dr. İbrahim KILIÇ ve Arş. Grv. İlkay DOĞAN'na; birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaşlarım Arş. Grv. Elmas ULUTAŞ, Arş. Grv. Damla ARSLAN ve Yağmur Nil Demirel'e, sevgili öğrencilerim Büşra YAZAYDIN ve Mehmet KOÇAK'a; her konuda yanımda olan ve destekleyen hayat arkadaşım Himmet AKKAYA'ya, varlığıyla beni mutlu eden biricik oğlum İ.Utku'ya, desteklerinden dolayı kayınvalideme ve bu günlere ulaşmamda her zaman maddi ve manevi desteklerini hissettiğim sevgili babama, anneme ve kardeşlerime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Özlem ÖZDEN AKKAYA

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
Kabul ve onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	vii
Şekiller	xi
Grafikler	xiii
Tablolar	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Ovaryum	1
1.1.1. Ovaryum Anatomisi	1
1.1.2. Ovaryum Histolojisi	1
1.1.3. Ovaryum Gelişimi ve Folikülogenezis.....	2
1.1.3.1. Hücre Bölünmesi ve Ovosit Yuvalarının (Kistlerinin) Oluşumu.....	2
1.1.3.2. Ovosit Yuvalarının Yıkımı ve Primordial Folikül Oluşumu	3
1.1.3.3. Primordial Folikülden Primer Foliküle Geçiş.....	9
1.1.3.4. Sekonder ve Preantral Follikül Gelişimi ve Farklılaşması	12
1.1.3.5. Folikül Seçimi, Antral Follikül Gelişimi	14
1.1.3.6. Ovulasyon	15
1.2. Methoxychlor (Metoksiklor- MXC)	16
1.2.1. Methoxychlor'un Genel Özellikleri	16
1.2.2. Methoxychlor'un Ovaryum Üzerine Etkileri	17
1.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Sistemi (İnsülin-Like Growth Factor System). 21	
1.3.1. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I (IGF-I)	21
1.3.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü -I Reseptörü (IGF-IR).....	23
1.3.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I (IGF-I) ve Reseptörü (IGF-IR)'nın Ovaryumdaki Fonksiyonları.....	24
1.4. Endokrin Bozucuların IGF-I Sinyal Yolağı Üzerine Etkileri	25
2. GEREÇ VE YÖNTEM	28
2.1. Hayvan Materyali	28
2.2. Deneysel Prosedür	28
2.3. Dokuların Alınması	29
2.4. Tespit, Doku Takibi ve Kesit Alma	30
2.4.1. Tespit, Doku Takibi ve Kesit Almada Kullanılan Malzemeler.....	30
2.4.2. Tespit.....	31
2.4.3. Doku Takibi	31
2.4.4. Kesit Alma	32
2.4.4.1. Polilizinli Lamların Hazırlanması	32
2.4.4.2. Kesitlerin Alınması	33

2.5. Folikül Sayımı.....	33
2.5.1. Crossman'nın Modifiye Üçlü Boyama Yöntemi	33
2.5.1.1. Crossman'nın Modifiye Üçlü Boyama Yönteminde Kullanılan Malzemeler.....	33
2.5.1.2. Yöntem.....	35
2.5.2. Foliküllerin Sayılması	36
2.5.2.1. Foliküllerin Sayılmasında Kullanılan Malzemeler	36
2.5.2.2. Kesitlerin Mikroskopta İncelenmesi	36
2.5.3. Değerlendirme.....	37
2.6. İmmunohistokimya	38
2.6.1. İmmunohistokimyasal Yöntemde Kullanılan Kimyasallar	38
2.6.2. Yöntem.....	41
2.6.3. Değerlendirme.....	43
2.7. Western Blotting	44
2.7.1. Western Blotting Yönteminde Kullanılan Kimyasallar	44
2.7. Protein İzolasyonu.....	46
2.7.1. Yöntem.....	46
2.7.3. Protein Miktarının Belirlenmesi.....	47
2.7.3.1. Yöntem.....	47
2.7.4. Poliakrilamid Jel Elektroforez	49
2.7.4.1. Jel Hazırlama.....	49
2.7.4.2. Jel Elektroforez	50
2.7.5. Transfer	52
2.7.5.1. Yöntem.....	52
2.7.6. Yıkama	53
2.7.7. Western Blotting İşaretleme.....	53
2.7.8. Görüntüleme.....	54
2.8. İstatistiksel Analiz.....	54
3. BULGULAR	55
3.1. Folikül Kompozisyonu.....	55
3.2. MXC'nin Folikül Kompozisyonu Üzerine Etkisi	56
3.3. MXC'nin IGF-I Sistemi Üzerine Etkisi	57
3.3.1. İmmunohistokimyasal Bulgular	57
3.3.2. Folikül Sayıları ile İmmunohistokimyasal Veriler Arasında Korelasyon Analizi	67
3.3.3. Western Blotting Bulguları	70
4. TARTIŞMA	83
4.1. MXC Uygulaması	83
4.2. Ovaryum Folikül Kompozisyonu.....	84
4.3. İmmunohistokimyasal	86
4.2. Western Blotting	92
5. SONUÇ.....	93
ÖZET.....	95

SUMMARY	96
KAYNAKLAR	97

SİMGE ve KISALTMALAR

A	Antral folikül
ACK-2	Anti c kit
Af-I	Aktivasyon fonksiyon-I
AMH	Anti müllarian hormon
ArKO	Androjen reseptör nakavt
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry/Toksik Maddeler ve Hastalıklar Kayıt Ajansı
Bax	Bcl-2-ilişkili X protein
Bcl-2	B- lymphoma 2/B-hücre lenfoma 2
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor /Beyin kaynaklı nörotrofik faktör
bFGF	Basic fibroblast growth factor /Temel fibroblast büyüme faktörü
BMP4	Bone morphogenic protein 4/ Kemik morfojenik protein 4
BMP7	Bone morphogenic protein 7/Kemik morfojenik protein 7
BMP15	Bone morphogenic protein 15/Kemik morfojenik protein 15
BSA	Bovine serum albumin
cAMP	Adenozin 3', 5'-siklik monofosfat
c-kit	Kit reseptörü
CXCR4	C-X-C kemokin reseptör tip 4
CYP19	P450 aromataz
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DDT	Dikloro difenil trikloroethan
DDE	1,1-dichloro-2,2bis(p-chlorophenyl)
DMSO	Dimetil sülfoksit
E	Embriyonal gün
E ₂	Ösrojen, östrodiol
E-Box	Enhancer Box

EDTA	Ethylenediaminetetraasetik
ER	Östrojen reseptör
ER α	Östrojen reseptör α
ER β	Östrojen reseptör β
ERK1/2	Ekstraselüler sinyal regüle edici kinaz
EU	European Union/Avrupa Birliği
FBE	Foxl2 bağlayıcı element
FDA	USA Food and Drug Administration/Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi
FGF2	Fibroblast büyüme faktörü 2
FGF7	Fibroblast büyüme faktörü 7
fig α (figla)	Faktör in the germline alfa
FSH	Folikül stimulan hormon
FSH-KO	FSH nakavt
FSHR	Folikül stimulan hormon reseptörü
Foxl2	Forkhead box L2
FOXO3	Forkhead box O3
G	Granuloza hücresi
g	Gram
GDF9	Growth differentiation faktör
GH	Büyüme Hormonu
H	Hematoksilen
HPG	Hiptalamo hipofizer gonad
HPTE	2,2,-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane
IGFBP	IGF bağlayıcı proteinler
IGFBP-1	IGF bağlayıcı proteinler 1
IGFBP-3	IGF bağlayıcı proteinler 3
IGFBP-6	IGF bağlayıcı proteinler 6
IGF	İnsülin benzeri büyüme faktörü
IGF-I	İnsülin benzeri büyüme faktörü I
IGF-II	İnsülin benzeri büyüme faktörü II
IGFIIR	İnsülin benzeri büyüme faktörü II reseptörü

IGF-IR	İnsülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü
IGF-IR α	İnsülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü alfa
IGF-IR β	İnsülin benzeri büyüme faktörü I reseptörü beta
IHK	İmmunohistokimya
IRS-1	İnsülin-reseptör substrat-1
KL (KITL)	Kit ligand
LH	Luteinizan hormon
LHR	Luteinizan hormon reseptörü
LIF	Lökemi inhibitör faktör
μm	Mikrometre
MAPK	Mitojen aktive edici protein kinaz
MAPKK	Mitojen aktive edici protein kinaz kinaz
ml	Mililitre
MOF	Multi-ovosit folikül
mono-OH MXC	Mono hidroksil
Mos	v-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog
mRNA	Messenger ribo nucleic acide/ Haberci ribonükleik asit
MXC	Methoxychlor/Metoksiklor
NBE	Night blindness e/Gece körlüğü E
NGF	Sinir büyüme faktörü
Nobox	Newborn ovary homeobox/Yenidoğan ovaryum homeobox protein
NT3	Nörotropin 3
NT4	Nörotropin 4
NT5	Nörotropin 5
O	Ovosit
Oct4	Oktamer-bağlayıcı transkripsiyon faktör 4
Ö	Örnek numune
P	Primer folikül
P4	Progesteron
P450 _{scc} /CYP11A	Cytochrome P450 side-chain cleavage/ Sitokrom P450 yan zincir bölünme

PA	Preantral folikül
PAS	Periodik asit schiff
PDGF	Trombosit kaynaklı büyüme faktör
PI-3K	Posfatidilinositol-3 kinaz
PK	Post koitum/Çiftleşme sonrası
PN	Postnatal gün
PO	Primordial folikül
PrR	Progesteron reseptör
PTEN	Fosfataz ve tensin homolog
QPCR	Quantitative polymerase chain reaction/Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
Raf	Ras ilişkili faktör
S	Sekonder folikül
SCP1	Sinaptonemal kompleks protein-1
SDF1	Stromal hücre kaynaklı faktör 1
Shc	Src homoloji 2 alanı içeren
SRY	Seks belirleyici bölge Y
StAR	Steroidojenik akut düzenleyici protein
TGF- β	Transforme edici büyüme faktörü β
TNF- α	Tümör nekrozis faktör alfa
U.S.	United States/Amerika Birleşik Devletleri
VEGF	Vaskular endotelial büyüme faktörü
WT1	Wilms' tümör geni
Wnt-4	Wingless (kanatsız)-tip MMTV entegrasyon site ailesi, üye 4
ZAR1	Zigot tutuklama 1
3 β -HSD	3 β hidroksisteroid dehidrojenaz tip 1

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1. Erken dönem fare gem hücre gelişimi	3
Şekil.1.2. Sıçan ovaryumunda foliküler gelişim dönemlerinin şematik görünümü.....	4
Şekil 1.3. Primordial folikül üzerine moleküler düzenleyicilerin etkisi	8
Şekil 1.4. Primordial ve Primer folikül oluşumunda rol alan önemli genler	12
Şekil 1.5. MXC ve metabolitleri	17
Şekil 1.6. IGF-I'in şematik gösterimi	22
Şekil 1.7. IGF-I ve östrojen arasındaki etkileşim için kabul edilen mekanizma.....	27
Şekil 2.1. Deney prosedürü	29
Şekil 2.2. Standart ve numunelerin tüp dizaynı	48
Şekil 2.3. 96 well plate standart ve numunelerin konulması	48
Şekil 3.1. Foliküllerin sınıflandırılması	55
Şekil 3.2. Kontrol ve deney gruplarına ait Western blotting bantları	70
Şekil 3.3. Pozitif kontrol, ovaryum tubulin ekspresyonu.....	70
Şekil 3.4. Kontrol grubunda primordial ve primer folikülün ovosit ve granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu.....	71
Şekil 3.5. Kontrol grubunda primordial ve primer folikülün ovosit ve granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu	71
Şekil 3.6. Deney grubunda primordial ve primer folikülün ovosit ve granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu.....	72
Şekil 3.7. Deney grubunda primordial ve primer folikülün ovosit ve granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu	72
Şekil 3.8. Kontrol grubunda primordial, primer ve sekonder folikülün ovosit ve granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu	73
Şekil 3.9. Kontrol grubunda primordial, primer ve sekonder folikülün ovosit ve granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu	73
Şekil 3.10. Deney grubunda primordial, primer ve sekonder folikülün ovosit ve granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu	74

Şekil 3.11. Deney grubunda primordial, primer ve sekonder folikülün ovosit ve granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu	74
Şekil 3.12. Kontrol grubunda primordial, primer ve preantral folikülün ovosit ve granuloza hücreleri ile teka interna ve eksternalarında IGF-I ekspresyonu.....	75
Şekil 3.13. Kontrol grubunda primordial, primer ve preantral folikülün ovosit ve granuloza hücreleri ile teka interna ve eksternalarında IGF-IR ekspresyonu	75
Şekil 3.14. Deney grubunda primordial, primer ve preantral folikülün ovosit ve granuloza hücreleri ile teka interna ve eksternalarında IGF-I ekspresyonu.....	76
Şekil 3.15. Deney grubunda primordial, primer ve preantral folikülün ovosit ve granuloza hücreleri ile teka interna ve eksternalarında IGF-IR ekspresyonu	76
Şekil 3.16. Kontrol grubunda preantral ve antral folikülün ovosit granuloza hücreleri ile teka interna ve eksternalarında IGF-I ekspresyonu.....	77
Şekil 3.17. Kontrol grubunda preantral ve antral folikülün ovosit granuloza hücreleri ile teka interna ve eksternalarında IGF-IR ekspresyonu	77
Şekil 3.18. Deney grubunda preantral ve antral folikülün ovosit granuloza hücreleri ile teka interna ve eksternalarında IGF-I ekspresyonu.....	78
Şekil 3.19. Deney grubunda preantral ve antral folikülün ovosit granuloza hücreleri ile teka interna ve eksternalarında IGF-IR ekspresyonu	78
Şekil 3.20. Kontrol grubunda korpus luteum ve interstisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonu.....	79
Şekil 3.21. Kontrol grubunda korpus luteum ve interstisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu.....	79
Şekil 3.22. Deney grubunda korpus luteum ve interstisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonu.....	80
Şekil 3.23. Deney grubunda korpus luteum ve İnterstisyel hücrelerde IGF-IR ekspresyonu.....	80
Şekil 3.24. Kontrol grubunda damar düz kas hücresinde IGF-I ekspresyonu	81
Şekil 3.25. Kontrol grubunda damar düz kas hücresinde IGF-IR ekspresyonu.....	81
Şekil 3.26. Deney grubunda damar düz kas hücresinde IGF-I ekspresyonu	82
Şekil 3.27. Dontrol grubunda damar düz kas hücresinde IGF-IR ekspresyonu.....	82

GRAFİKLER

	<u>Sayfa</u>
Grafik 3.1. Deney ve kontrol gruplarındaki folikül sayıları.....	57
Grafik 3.2. Kontrol (K) ve deney (D) grubunda, ovaryum foliküllerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri.....	60
Grafik 3.3. Deney ve kontrol gruplarında gelişim sürecindeki foliküllerin ovosit IGF-I ekspresyon düzeyleri.....	61
Grafik 3.4. Deney ve kontrol gruplarında gelişim sürecindeki foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyon eğrisi.....	61
Grafik 3.5. Kontrol (K) ve deney (D) grubunda, ovaryum foliküllerinde IGF-IR ekspresyon düzeyleri.....	65
Grafik 3.6. Deney ve kontrol gruplarında gelişim sürecindeki foliküllerin ovosit IGF-IR ekspresyon düzeyleri.....	66
Grafik 3.7. Deney ve kontrol gruplarında gelişim sürecindeki foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyon eğrisi.....	66
Grafik 3.8. Deney ve kontrol grupları arasında korpus luteum, interstisyel hücre ve damar duvarında IGF-I ve IGF-IR ekspresyonu.....	69

TABLOLAR

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1 Foliküllerin sınıflandırılması	37
Tablo 3.1. Deney ve kontrol gruplarında foliküler kompozisyon.....	56
Tablo 3.2. Deney ve kontrol gruplarının ovositlerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri .	59
Tablo 3.3. Deney ve kontrol gruplarının granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri.....	59
Tablo 3.4. Deney ve kontrol gruplarının teka interna hücrelerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri.....	60
Tablo 3.5. Deney ve kontrol gruplarının teka eksterna hücrelerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri.....	60
Tablo 3.6. Deney ve kontrol gruplarının ovositlerinde IGF-IR ekspresyon düzeyleri	63
Tablo 3.7. Deney ve kontrol gruplarının granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyon düzeyleri.....	64
Tablo 3.8. Deney ve kontrol gruplarının teka interna hücrelerinde IGF-IR ekspresyon düzeyleri.....	64
Tablo 3.9. Deney ve kontrol gruplarının teka eksterna hücrelerinde IGF-IR ekspresyon düzeyleri.....	65
Tablo 3.10. Deney ve kontrol gruplarında granuloza hücrelerindeki IGF-I ve IGF-IR ekspresyonları ile folikül sayıları arasındaki korelasyon analizi	68
Tablo 3.11. Deney ve kontrol gruplarının interstisyel hücrelerinde, damar duvarındaki düz kas hücrelerinde ve korpus luteumlarda IGF-I ve IGF-IR ekspresyon düzeyleri.....	69
Tablo 3.12. Kontrol ve deney gruplarının ovaryumlarında IGF-IR ekspresyonu (WB).....	70

1. GİRİŞ

1.1. Ovaryum

1.1.1. Ovaryum Anatomisi

Ratlarda böbreğin gerisinde lokalize olan ovaryumlar bursa ovarika ile sarılmıştır ve uterus kornuları ile bağlantılıdır (Krinke, 2000). Organa damar ve sinirlerin girip çıktığı bölge olan hilus, mezovaryum olarak adlandırılan bir bağ dokusu ile uterusun yan kenarlarında uzanan ligamentum latuma asılıdır. Yüzeyi ovulasyon başlamadan önce düzdür, ovulasyon başladıktan sonra bu düzgünlük kaybolur (Özer ve ark., 2010).

1.1.2. Ovaryum Histolojisi

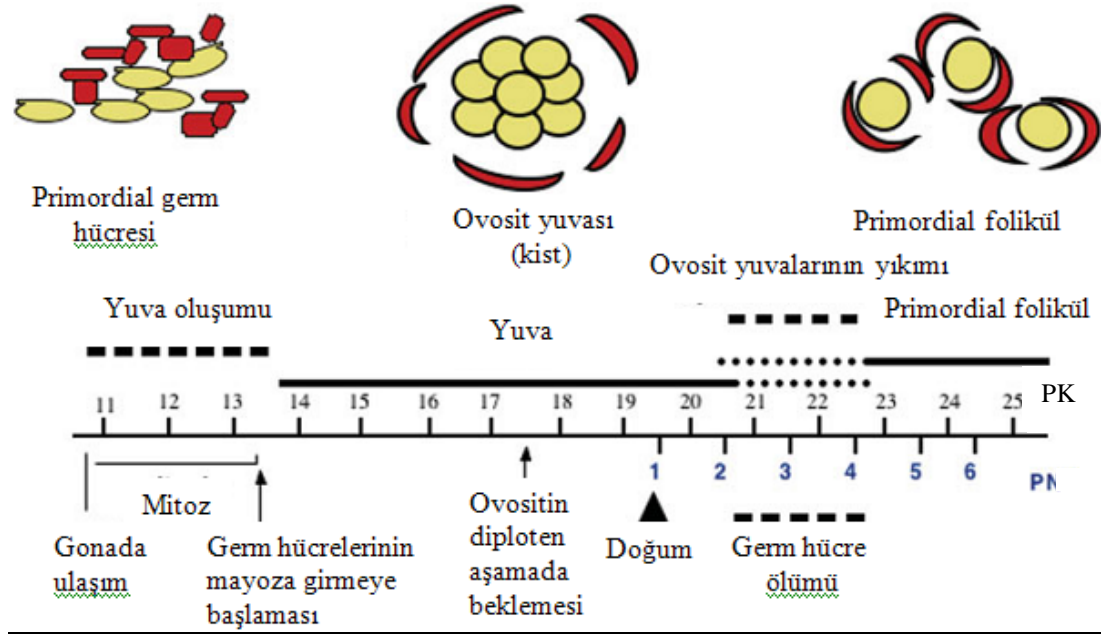
Yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan basit prizmatik veya kübik epitel ile döşelidir. Ancak bursa ovarikanın bağlandığı hilus bölgesi tek katlı yassı epitelle döşelidir (Krinke, 2000). Germinal epitel altında tunika albuginea adı verilen düzensiz sıkı bağ dokusu yoğun olarak yer alır. Bu tabakanın altında ise çeşitli gelişim aşamasında foliküller ile farklılaşma yeteneğine sahip hücreleri içeren korteks bölgesi bulunur (Krinke, 2000; Özer 2010). Bu hücrelerden fibrositler interstisyel hücrelere dönüşerek hormon (östrojen/ E₂) salgırlar (Özer, 2010). İç kısımda kalan medulla ise bağ dokusundan oluşur. Kollagen ve elastik iplikler ile az sayıda düz kas hücresi içerir. Bağ doku içerisinde yaygın kan ve lenf damarları ile sinir telleri bulunur (Tanyolaç, 1999).

1.1.3. Ovaryum Gelişimi ve Folikülogenezis

1.1.3.1. Hücre Bölünmesi ve Ovosit Yuvalarının (Kistlerinin) Oluşumu

Memeli ovaryumu somatik hücreler ve germ hücreleri olmak üzere iki genel hücre popülasyonu içerir. Ovaryumun somatik unsurları mezonefrozda oluşan (Frojdman ve ark., 1989) embriyonik genital kabartıdan gelişir (Surani, 2001). Germ hücreleri ise vitellus kesesinindeki ekstraembriyonik (ekstragonadal) bölgeden köken alır. Sıçanlarda ekstragonadal bölgede post koitum (çiftleşme sonrası) 7,0-7,5. (PK7,0-7,5) günlerde germ hücreleri primordiyal foliküle farklılaşır ve gonad taslağına göçe başlarlar (Uzumcu ve Zachow, 2007). Post koitum 10,5-11,5. günde arka bağırsak ve mesenter boyunca göç ederek genital kabartıya yerleşirler (Surani, 2001; Clement ve ark., 2007). Göç esnasında hızlı bir proliferasyon geçiren primordiyal germ hücreleri (Tam ve Snow, 1981) genital kabartıya ulaştıktan sonra da birkaç mitoz bölünme daha geçirirler (Hirshfield, 1997). Bu süreçte dişi ve erkek ayrımı yapılamaz. Bununla birlikte Sertoli hücrelerinde Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinin SRY geni, PK10,5. günde genital bölgede, PK11,5. günde ürogenital alanda ve 12,5. günde az miktarda testiste ekspresyon olur. Bu aşamada bu genin ekspresyonunun varlığı ya da yokluğuna bağlı olarak cinsiyet belirlenebilir. (Koopman ve ark., 1990; Clement ve ark., 2007). Gonada girdikten sonra oogonia olarak isimlendirilen germ hücreleri ile ileri gelişimi desteklemede yardımcı fonksiyon gören somatik (pregranuloza) hücreler birbirlerine karışırlar (Hirshfield 1997). Tek bir hücre (progenitor hücre), sitokin eksikliğinde, senkronize bir şekilde bölünerek birbirlerine sitoplazmik köprülerle bağlı kalan 2^n sayıda hücre kümeleri meydana getirir (Pepling 2006). Bu olaylar farelerde PK10,5- 13,5. güne kadar sürer (Pepling 2006) ve 13,5. günden itibaren mitoz bölünmeleri tamamlamış oogonialar mayoz bölünmeye girerler (Pepling, 2006; Hirshfield, 1997). Mayoz bölünmenin başlamasıyla oogonialar “ovosit” olarak; pregranuloza hücreleri ile ilişkili ovosit kümeleri ise “ovosit kistleri veya ovosit yuvaları” olarak adlandırılırlar (Choi ve Rajkovic, 2006, Pepling, 2006). Ovositler 17,5. günden itibaren, I. mayoz

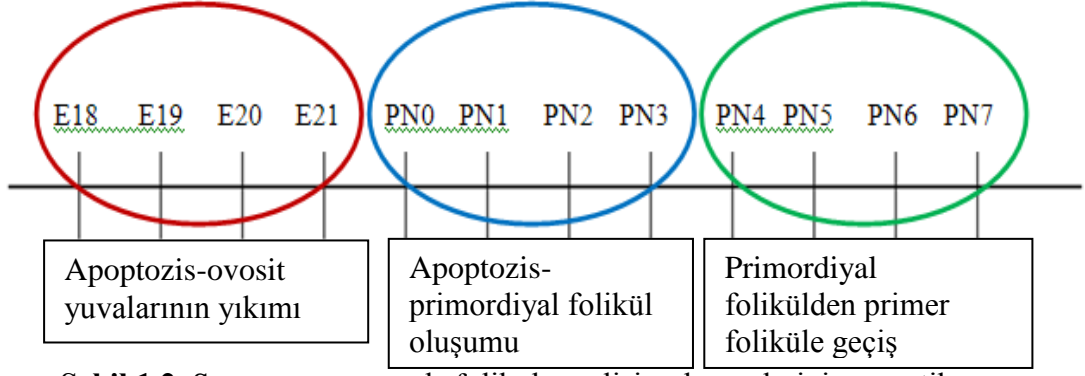
bölünmenin profaz aşamasının diploten döneminde sabit olarak kalırlar (Pepling, 2006) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Erken dönem fare germ hücre gelişimi; germ hücreleri sarı, somatik hücreler kırmızı ile şematize edilmiştir (Pepling, 2006).

1.1.3.2. Ovosit Yuvalarının Yıkımı ve Primordiyal Folikül Oluşumu

Erken dönem ovaryum gelişiminde I. mayoz bölünme aşamasında bekleyen ovositleri iki anahtar gelişim süreci bekler, 1: Primordiyal folikül oluşumu, 2: Primordiyalden primer foliküle geçiş (McGee ve Hsueh, 2000). Bu süreç sıçanlarda ovositlerin çoğunluğunun ovosit yuvacıklarının içerisinde olduğu ve apoptozisin gözlemlendiği E18-21. günleri; apoptozisin ve primordiyal folikül oluşumunun pik yaptığı PN0-3. günleri; tüm ovosit yuvacıklarının yıkımlanıp primordiyal folikülleri şekillendirdiği için artık ovaryum kesitlerinde ovosit yuvacıklarının gözlenmediği ve primordiyalden primer foliküle geçişin olduğu PN4-7. günleri kapsar (Hirshfield ve DeSanti 1995; Pepling ve Spradling, 2001; Kezele ve Skinner, 2003) (Şekil 1.2).



Şekil 1.2. Sıçan ovaryumunda foliküler gelişim dönemlerinin şematik görünümü.

Ovaryumun erken foliküler gelişimi, birbirleriyle oldukça koordineli çalışan, ovaryuma spesifik faktörler, lokal büyüme faktörleri, ovaryum steroid hormonları ve muhtemelen gonodotropinler aracılığıyla düzenlenir (Skinner, 2005; Uzunucu ve Zachow, 2007).

Primordiyal foliküllerin oluşumu için ovosit yuvalarının rastgele apoptozis geçirerek yıkılması ve ovositlerin tek tek izole olması gerekir. İzole olan ovositler yassı pregranuloza hücreleri ile bağlantı kurarak primordiyal folikülü şekillendirirler (Skinner, 2005). Primordiyal folikülün oluşması sırasında, tümör nekroz faktör alfa (TNF- α) apoptozisi uyarırken, B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) germ hücrelerinin korunmasını sağlar (Marcinkiewicz ve ark., 2002; Skinner, 2005; Greenfeld ve ark., 2007). Apoptotik bir faktör olan Bcl-2-ilişkili X protein (Bax) da TNF- α gibi apoptozisi uyarır ayrıca yetersizliğinde primordiyal folikül sayısında artış meydana gelir (Tingen ve ark., 2009). Bu süreçte steroid hormonlardan progesteron (P₄), TNF- α 'yı baskılayarak ovaryumlarda apoptozisi inhibe eder ve ovosit yuvalarının yıkımını azaltarak primordiyal foliküllerin sayısını önemli ölçüde düşürür. Diğer bir steroid hormon olan E₂ ise sıçanlarda folikül oluşumu üzerine hafif baskılayıcı bir etki yaparken farelerde ovosit yuvalarının yıkımını, primordiyal folikül oluşumunu ve primer foliküle geçişi şiddetli bir şekilde azaltır (Uzunucu ve Zachow, 2007).

Embriyonik gelişim sırasında gonaddan eksprese olan Wnt-4 germ hücrelerinin hayatta kalmasını sağlar. Eksikliğinde ise PK 14,5. güne kadar germ hücreleri normal sayıdayken doğumla birlikte sağlıklı germ hücre sayısı %10 oranında azalır (Tingen ve ark., 2009). Sadece germ hücre kümeleri ile folikülogenezis boyunca ovositlerde görülen ve zona pellusida organizatörlerini bağlayan transkripsiyon faktörü olan faktör in the germline alfa (figa, figla), farelerde E13. gün gibi erken dönemde eksprese olur (Soyal ve ark., 2000; Choi ve Rajkovic, 2006). Figa nakavt fareler kısırken, eksikliğinde germ hücrelerinin göçü, proliferasyon ve gonad morfolojisi normaldir. Fakat ovosit yuvaları yıkılmırlırken tüm ovositler ölür ve sonuçta primordiyal folikül gelişemez (Soyal ve ark., 2000; Choi ve Rajkovic, 2006; Tingen ve ark., 2009).

Ovosit ya da somatik hücrelerde üretilen faktörler germ hücre apoptozisi sırasında, sadece ovosit yuvaların yıkımını etkilemez aynı zamanda birçoğu yuvaların yıkımının başlama sürecinde görev alır (Şekil 1.3). Ovaryuma spesifik faktörlerden synaptonemal kompleks protein-1 (SCP1) ovosit yuvalarının yıkımının başlangıcında etkilidir. Sadece ovaryumlarda bulunan bu proteinin ekspresyonu ovosit yuvalarının yıkılmırlmaya başladığı doğum sonrası 24 saat içinde birden azalır. Daha önemlisi SCP1 ekspresyonu ortadan kalktığında ovosit diploten aşamasına erken girer ve erken yıkılan yuvalar sağlıklı primordiyal foliküller üretir (Tingen ve ark., 2009). Forkhead box L2 (Foxl2), yenidoğan ovaryum homeobox protein (Nobox) ve Notch sinyal yolağı üyeleri ve transforme edici büyüme faktörü (TGF- β) süper ailesi gibi pek çok faktör ovosit yuvalarının yıkımı yanında yıkım zamanını da etkileyebilir (Tingen ve ark., 2009). Bir transkripsiyon faktörü olan ve granuloza hücrelerinde eksprese edilen Foxl2'nin mutasyonunda granuloza hücreleri gelişimine devam edemez. Germ hücre kümeleri erişkin dönemde varlığını devam ettirir ama primordiyal folikül oluşamaz, sonuçta dişi steril olur (Pepling, 2006). Nobox da yine bir erken folikülogenezis transkripsiyon faktörüdür. Embriyonal 13,5. günde spesifik olarak germ hücrelerde belirlenebilen bu proteinin ekspresyonu E15,5. günde ve sonrasında önemli ölçüde artar. Yenidoğan ovaryum homeobox protein germ hücre kümelerinde, primordiyal folikülde ve folikülogenezisin farklı aşamaları boyunca gelişmekte olan ovositte eksprese olmaya devam eder (Choi ve

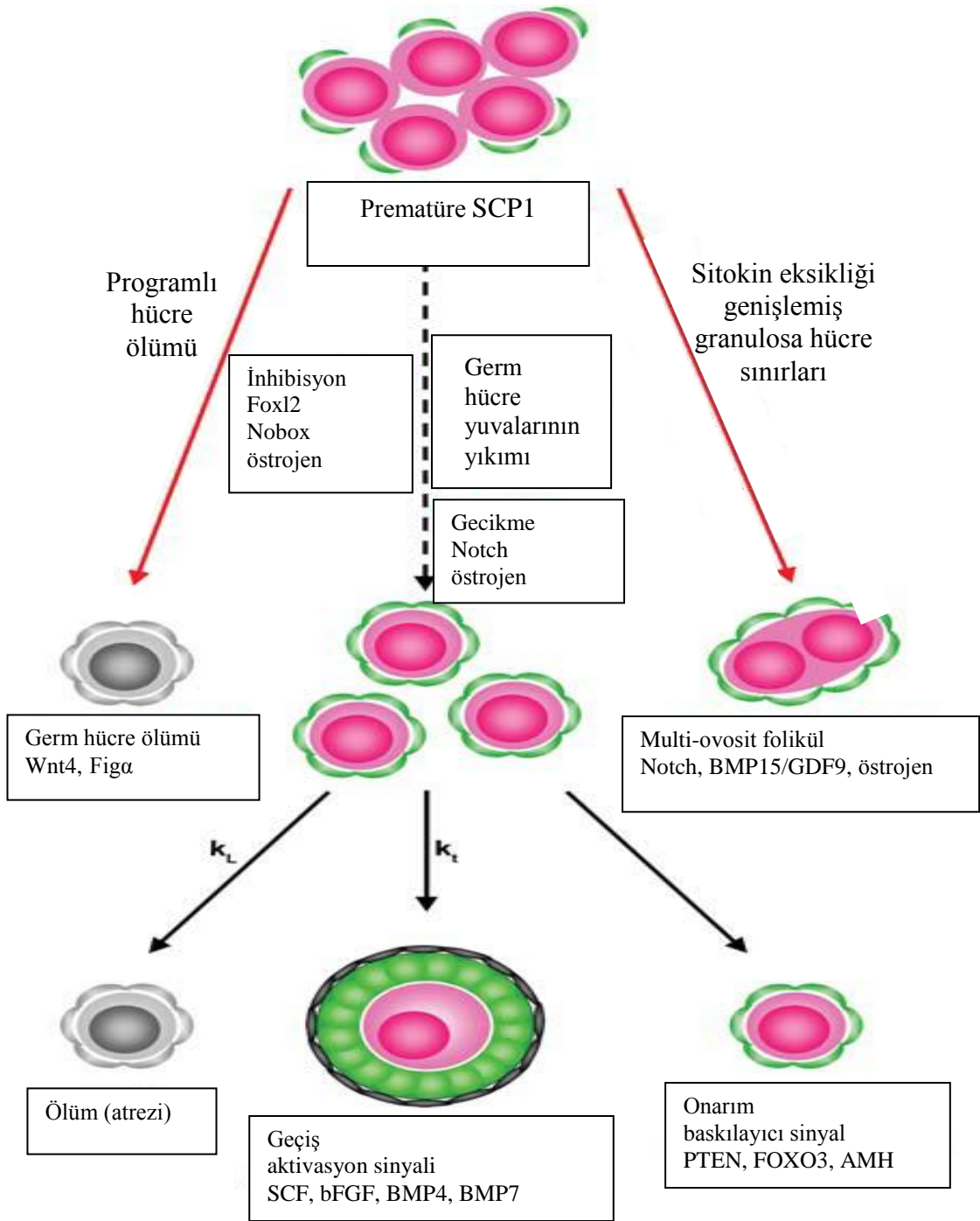
Rajkovic, 2006). Yenidoğan ovaryum homeobox protein eksikliğinde ovaryumda büyüme farklılaşma faktörü (GDF9), kemik morfojenik protein (BMP15), Mos and oktamer-bağlayıcı transkripsiyon faktör (Oct4)'ünde içinde bulunduğu çok sayıda spesifik genin ekspresyonu baskılanır ve erken folikülogenezis bozulur. Sonuçta doğumda normal olarak oluşan ovosit yuvaları şiddetli bir şekilde yıkılır ve pek çok germ hücresi yıkım tamamladıktan sonra yuva içinde kalır ayrıca postnatal ovosit kaybı olur ve primordiyal folikülün primer foliküle geçişi ortadan kalkar (Rajkovic ve ark., 2004; Choi ve Rajkovic, 2006; Tingen ve ark., 2009). Yuvaların yıkımında oldukça önemli olan Notch sinyal yolağının bileşenleri, yuvalar içindeki germ hücreleri ve etrafındaki pregranuloza hücreleri tarafından eksprese edilir. Bu sinyal baskılandığında ovosit yuva yıkımı azalır ya da gecikir ve yuva içinde normale göre daha fazla sayıda germ hücresi kalır, sinyalin tamamen ortadan kalkmasıyla da multi-ovosit folikül oluşur (MOF). Multi-ovosit folikül bir bazal membranla ayrılmadan iki ya da daha fazla ovositin aynı folikül içinde bulunmasıdır. Bunlar yuvaların yıkımı sırasında germ hücre çekirdeklerini bağlayan sitoplazmik halkaların kopmaması sonucu oluşur ve fertilizasyon oranını olumsuz yönde etkiler (Tingen ve ark., 2009).

Embriyonal 9.5. günde fetal ovaryumunda bulunan ve folikülogenezis süresince pregranuloza ve granuloza hücrelerinden eksprese olan Kit ligand (KL) ekspresyonunu aktivin (TGF- β ailesi üyesi) düşürür. Düşen KL düzeyiyle birlikte, kit reseptörünün (c-kit) germ hücrelerinde ekspresyonunda da bir azalma olur. Sonuçta azalan c-kit germ hücrelerinin mayozu girmeden proliferasyona devam etmesine ve primordiyal folikül sayısının artmasına neden olur (Choi ve Rajkovic, 2006; Tingen ve ark., 2009). Ovositte eksprese olan diğer TGF- β ailesi üyeleri GDF9 ve BMP15'in primordiyal folikül oluşum sürecinde önemli rolleri yoktur, ancak GDF9 ovosit çevresindeki granuloza hücrelerinin büyümesi ve farklılaşması için gereklidir ayrıca GDF9 ya da BMP15 eksikliklerinde daha fazla MOF oluşur. (Pepling ve Spradling, 2001; Choi ve Rajkovic, 2006; Yan ve ark., 2001).

Ovosit yuvalarının yıkımı ve primordiyal folikül oluşumu sırasında henüz fonksiyonel folikül stimulan hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) reseptörleri gelişmediğinden bu gonadaotropinlerin etkileri sınırlıdır. Sekonder foliküle kadar

fonksiyonel FSH reseptörüne sahip olmasa da primordiyal foliküldeki pregranuloza hücreleri adenozin 3', 5'-siklik monofosfat (cMAP) yolağı aktivatörlerine aromataz ve FSH reseptör artışıyla yanıt verir (McGee ve Hsueh, 2000). Hamsterda FSH nötralize edici antikörlerle ve FSH reseptör nakavt farelerde yapılan çalışmalar FSH'nın folikülogenezisin erken safhalarında bazı türlere spesifik fonksiyonlara sahip olduğunu göstermiştir (Uzumcu ve Zachow, 2007).

Fötal veya neonatal dönemde pek çok faktörün etkisi altında meydana gelen bu olaylar dişinin reproduktif yaşamı boyunca kullanacağı primordiyal folikül havuzu oluşturur. Etrafı tek katlı yassı pregranuloza hücreleriyle çevrili ovosite sahip, birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasında olan primordiyal folikülü, foliküler gelişimin başlamasıyla birlikte iki farklı son bekler. Ya gelişimi tamamlayarak ovulasyonla atılır ya da çeşitli gelişim aşamalarında hücrel apoptozis ile atretik folikül olur. Ovulasyon ya da foliküler atrezi sonucunda azalmaya başlayan bu primordiyal rezervinin yeri asla doldurulamaz genellikle orta yaş sonrası biter ve sonuçta menopoş şekillenir (Hirshfield ve Tinkle, 1975; Peters ve ark., 1975; Cran ve Moor, 1980; Nelson ve ark., 1985; Kezele e ark., 2002).



Şekil 1.3. Primordiyal folikül üzerine moleküler düzenleyicilerin etkisi. “Dişi germ hücre yuvalarının yıkımı ve sonrasında oluşan primordiyal folikülün kaderinde moleküler düzenleyiciler rol alır. Pek çok moleküler faktör germ hücrelerinin yıkımlanarak primordiyal folikül oluşturma zamanının ve yıkım düzeyininin kontrolde birbirleriyle etkileşiminin içindedir. Anormal yıkım germ hücre kaybına ya da MOF oluşumuna yol açabilir. Oluşan primordiyal foliküller ya atreziye uğrar ya primordiyal folikül olarak kalmaya devam eder ya da gelişim sürecine girerler” (Tingen ve ark., 2009).

1.1.3.3. Primordiyal Folikülden Primer Foliküle Geçiş

Primordiyal folikülün tek katlı kübik pregranuloza hücreleri ile çevrili bir ovosite sahip olan primer foliküle geçişi ile folikül gelişim süreci başlar. Bu geçiş dişi reproduktif yaşamının sürekliliği için son derece önemlidir. Bu süreçte Kit ligand (KL), lökemi inhibitör faktör (LIF), kemik morfojenik protein 4 ve 7 (BMP4; 7), trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF/FGF2) ve 7 (FGF-2; 7)'nin de içinde bulunduğu pek çok faktörün düzenleyici rolü vardır.

Steel faktör, stem cell (kök hücre) faktör ya da multipotent büyüme faktörü olarak bilinen KL granuloza hücrelerinde eksprese olur (Şekil 4) ve mutasyonunda erken folikülogenezis döneminde folikül gelişimi sekteye uğrar (McGee Hsueh, 2000; Skinner, 2005; Choi ve Rajkovic, 2006; Clement ve ark., 2007). Kit ligandın primordiyal folikülden primer foliküle geçişteki öneminin belirlenmesinde kullanılan anti c kit (ACK-2) antikoru ile KL'nin bloke edilmesi, primordiyal folikül oluşumunda herhangi bir etkiye neden olmazken, primer folikül gelişimini engeller (Parrott ve Skinner, 1999). In vitro KL ilavesi ise primordiyal folikülden primer foliküle geçişi hızlandırır (Skinner, 2005; Choi ve Rajkovic, 2006). Kit ligandın primordiyal folikül gelişimindeki rolü tam olarak aydınlatılamamakla birlikte primordiyal folikülün primer foliküle geçişinde oldukça önemli bir faktör olduğu açıktır.

Lökemi inhibitör faktör pek çok dokuda eksprese olan ve çok farklı fonksiyonlara sahip bir sitokindir. Ovaryumda primordiyal ve primer foliküllerin granuloza ve somatik hücrelerinde bulunur (Choi ve Rajkovic, 2006) (Şekil 4). 4 günlük sıçan organ kültüründe LIF uygulanması primordiyalden primer foliküle geçişi atırır. Primordiyal folikül sayısı hızla azalırken gelişen folikül sayısı artar (Nilsson ve ark., 2002). “Granuloza hücre kültüründe LIF ilavesi hücre proliferasyonunu etkilemez, diğer yandan KL mRNA miktarında bir artış meydana gelir. Bu durum LIF'in primordiyal folikülden primer foliküle geçişte KL

ekspresyonunu indükleyerek indirek olarak etki ettiğini düşündürür” (Choi ve Rajkovic, 2006).

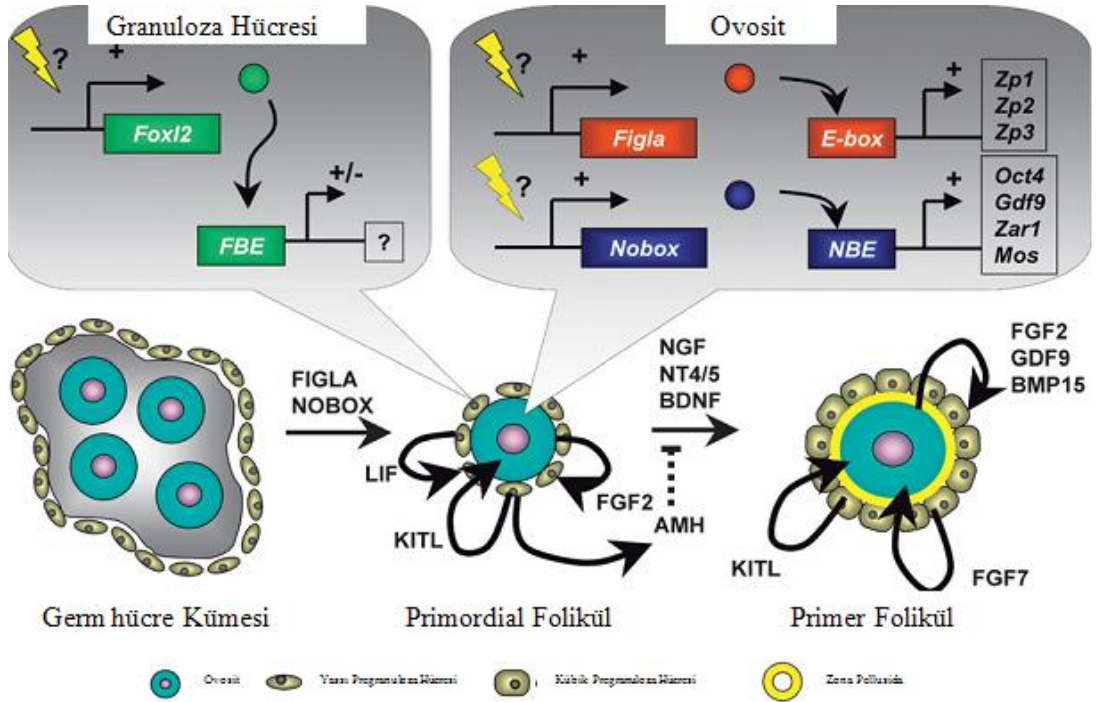
Erken foliküler gelişimde rol alan önemli faktörlerden birisi de nörotropin (NT) ailesi üyesi olan sinir büyüme faktörü (NGF)'dür. Bu faktör folikül oluşumu öncesinde somatik hücrelerden ve ovositten eksprese olur ve primordiyal folikülden primer foliküle geçişte rol alır. sinir büyüme faktörünün yokluğu ovosit yuvası içindeki ovosit sayında artış ile birlikte başarılı bir şekilde folikül yapısına katılan ovosit, primer ve sekonder folikül sayısında azalmaya neden olur. Yetersizliği ise pregranuloza hücrelerinde proliferasyonun azalmasına yol açar (Dissen ve ark., 2001; Choi ve Rajkovic, 2006). Yine bir nörotropin olan NT3 de primordiyalden primer foliküle geçişte uyarıcı bir rol üstlenir. (Nilsson ve ark., 2009).

TGF- β süperailisi üyesi olan BMP ailesi üyelerinden BMP15, 7 ve 4 erken foliküler gelişim aşamasında rol oynarlar. Ovositlerde eksprese olan BMP15'nin primordiyal folikül gelişimiyle ilişkili oluşu bilinmesine rağmen primordiyal folikülden primer foliküle geçişteki düzenleyici etkisi tam olarak aydınlatılmış değildir. Kemik morfojenik protein 7 stromal hücreler ve primordiyal folikül arasında etkileşimde rol alır (Skinner, 2005). Kemik morfojenik protein 4 ise primordiyal folikülden primer foliküle geçişi uyarmakla birlikte ovositlerin canlılıklarını devam ettirebilmesinde de etkin bir role sahiptir (Nilsson ve Skinner, 2003) (Şekil 1.3). Diğer BMP'lerde erken dönemdeki foliküler gelişimden ziyade antral folikül düzeyinde etkili olur. (Skinner, 2005).

Primer folikülün ovositinde eksprese olan bir diğer TGF- β süperailisi üyesi olan GDF9 pek çok türde foliküler gelişim sürecinde oldukça önemlidir (McLaughlin ve Mciver, 2009) (Şekil 1.4). Bu faktör ovositi çevreleyen granuloza hücrelerinin büyüüp farklılaşması, antral folikül gelişimi ve ovulasyon için gereklidir. Büyüme farklılaşma faktörü 9 yokluğu foliküllerin büyümesini primer folikül aşamasında duraklatır ve sonuçta dişilerde infertiliteye sebep olur (Choi ve Rajkovic, 2006). Yine erken gelişim döneminde ovositte eksprese olan ve komşu granuloza ve teka

hücrelerini etkileyen PDGF, ovositte eksprese olan bFGF ile teka hücrelerinde belirlenen FGF7 de primordiyal folikülden primer foliküle geçişi uyaran diğer faktörlerdir (Nilsson ve ark., 2001) (Şekil 1.3 ve Şekil 1.4). Temel fibroblast büyüme faktörü, primordiyal folikül gelişim sürecinde ovosit stroma ve teka hücrelerinin proliferasyonu uyarır (Nilson ve ark., 2001) ve diğer bir büyüme faktörü olan KL mRNA ekspresyonunu artırır. (Nilsson ve Skinner, 2004). bFGF yine bir büyüme faktörü olan vaskular endotelial büyüme faktörü (VEGF) ile birlikte ovaryum anjiyogenezinde rol alır (Losordo ve Dimmeler, 2004).

Primordiyal folikülden primer foliküle geçişte uyarıcı faktörlerin yanı sıra Anti Müllarian hormon (AMH) ve ovositte eksprese edilen ve bir kemokin olan stromal hücre kaynaklı faktör 1 (SDF1) gibi baskılayıcı faktörlerin de düzenleyici rolü büyüktür. Bu faktörler primordiyal folikülden primer foliküle geçişi inhibe ederler (Holt ve ark., 2006). AMH null farelerde primer folikül geçiş sürecine dahil olan primordiyal folikül sayısında bir artış olurken (Durlinger ve ark., 1999; Durlinger ve ark., 2001), AMH uygulanması folikül gelişimini azaltır (Durlinger ve ark., 2002).



Şekil 1.4. “Primordiyal ve primer folikül oluşumunda rol alan önemli genler. Folikül yapısı ovosit, zona pellusida ve granuloza hücrelerini içermektedir. Hücre-hücre etkileşimlerine *KITL*, *FGF2*, *FGF7*, *GDF9*, *BMP15*, *NGF*, *NT4 / 5*, *BDNF*, *AMH* ve *FOXL2* aracılık eder. Transkripsiyonel düzenlemeler *figa* (*figla*) ve *NOBOX* tarafından kontrol edilir. Zona pellusida proteinlerinin transkripsiyon başlamama bölgelerinin yukarısında lokalize olan *E-Box*, *figa*'nın bağlandığı organizatör bir motiftir. *NBE*, *NOBOX*'un bağlayıcı bir unsuru kabul edilir. *NOBOX*'un, *Oct4*, *GDF9*, *ZAR1* ve *Mos*'a doğrudan veya dolaylı etki gösterip göstermediği bilinmemektedir. *FBE* *FOXL2*'nin bağlayıcı bir unsuru olarak kabul görür. *figa* ve *Nobox* ise germ hücre yuvalarında ki ovositler ile primordiyal ve daha ileri aşamadaki foliküllerde eksprese olur” (Choi ve Rajkovic, 2006).

1.1.3.4. Sekonder ve Preantral Folikül Gelişimi ve Farklılaşması

Primer folikül, granuloza hücrelerinin köklü değişiklikler geçirmesiyle farklı özelliklere sahip iki yada üç sıra granuloza hücrelerinin bulunduğu sekonder foliküle dönüşür (Uzumcu ve ark., 2006). Ovosit gelişimi devam ederken zona pellusida şekillenir, zona pellusida folikülün etrafını çevirir ve folikülü besleyecek damarlar oluşur (McGee ve Hsueh, 2000). Sekonder folikülün gelişiminin devam etmesiyle de

üçten fazla granuloza hücre katmanına sahip antrum içermeyen preantral folikül oluşur (Uzumcu ve ark., 2006). Bu olayların tam zamanı tartışılmakla birlikte türe spesifik olarak farklı zamanlarda gelişir (McGee ve Hsueh, 2000). Bu dönemde de ovosit-granuloza etkileşimi oldukça önemlidir. İmmature ovosit ile granuloza hücreleri arasında bağlantıların olmadığı durumlarda ovosit gelişemezken, ovosit ve granuloza hücreleri gap junctionlar aracılığıyla iletişim sağlandığında ovosit normal oranlarda büyür. Bu bağlantıda konneksin 37 oldukça önemli role sahiptir ve eksikliğinde ise bu süreç normal işleyemez. Konneksin 37 yokluğunda foliküllerde zona pellusida oluşur, granuloza hücreleri normal gelişimine devam eder ancak gap junctionların yetersizliğine bağlı olarak ovosit-granuloza iletişimi bozulur; normal süreçte folikül gelişimine devam eder sınırlı sayıda küçük antral folikül meydana gelir. Sonuçta ovosit tam boyutuna ulaşamaz ve mayoz bölünme yeteneğine sahip olmaz (McGee ve Hsueh, 2000). Bu süreçte de granuloza hücre fonksiyonlarının çoğu, ovositin salgıladığı faktörler tarafından düzenlenmekte ve bunların başında da granuloza hücre fonksiyonu ve bölünmeleri, LH reseptör oluşumu, steroidogenesis ve aynı zamanda kumulus hücre büyümesini düzenleyen faktörler gelmektedir (McGee ve Hsueh, 2000).

Gonadotropinler (FSH ve LH), reseptörlerinin sekonder folikül aşamasında (PN7) eksprese olmasıyla birlikte folikül gelişimi boyunca etkin bir şekilde rol alırlar (Uzumcu ve ark., 2007; Zama ve Uzumcu, 2010). Postnatal 10-20 arasında artan FSH seviyeleri ve ilk foliküler gelişim dalgası arasında güçlü bir korelasyon vardır. Gonotropinler preantral foliküllerin büyümesini ve farklılaşmasını uyarsa da gonodotropin yokluğunda da foliküller antral aşamaya kadar gelişebilirler (Uzumcu ve Zachow, 2007; Zama ve Uzumcu, 2010) fakat daha ileriki aşamalarının görülebilmesi için preantral folikülün maturasyonu sırasında FSH ve LH salgılanması gereklidir (Uzumcu ve ark., 2007). Aktivin, FSH ile birlikte gençlerde folikülerin şekillenmesini ve büyümesini aktive eder. Neonatal dönemde FSH'nın, inhibin ve östrojen üretimindeki uyarımını tetikler. İn vivo olarak sekonder folikülden salınan aktivin küçük antral foliküllerin durağan kalmasına neden olur. Bununla birlikte aktivinin erken folikül gelişiminde, aşamalara bağlı etkileri tam olarak aydınlatılmış değildir (McGee ve Hsueh, 2000). Steroid hormonların ise

preantral folikül gelişimindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte androjen uygulaması maymunlarda preantral ve küçük antral folikül sayısını, farelerde de preantral folikül büyümesini artırır (McGee ve Hsueh, 2000). Sekonder folikülde yüksek düzeyde eksprese olan KL ve GDF9, preantral folikül gelişimde de rol oynarlar (McGee ve Hsueh, 2000). Kit ligand ayrıca teka hücrelerinin oluşumunda görev alır. Kemik morfojenik protein 15, FGF-7, inhibitörler, ve NT preantral folikül gelişimini düzenleyen diğer faktörlerdir (Zama ve Uzun, 2010). Sıçanlarda preantral folikül gelişimi sırasında postnatal dönemde IGF-I ve IGF-IR düzeyi yüksektir ancak IGF I yoksun mutant farelerde de foliküller erken antral aşamaya kadar nispeten normal olarak gelişir (McGee ve Hsueh, 2000).

Neonatal ve infantil dönemde ovosit gelişimi hızlıken daha sonraki dönemlerde ovositlerin mayoz bölünme süreci yavaşlar (Hirshfield, 1991; McGee ve Hsueh, 2000). Ayrıca preantral foliküllerin gelişimi büyük antral foliküllere göre daha yavaş ilerler, bu durum ovaryum büyüme farklılaşma genlerinin gelişimin erken döneminde baskılanmasıyla mümkün olmaktadır. Primer folikül granuloza hücrelerinde yüksek düzeyde, sekonder folikülde daha düşük seviyede, ilerleyen aşamalarda ise önemsiz miktarlarda “Wilms” tümör geni (WT1) eksprese eder. Bu gen, farklı hücre türlerinde pek çok büyüme faktörü ve reseptörünün ekspresyonunu değiştirebilir (McGee ve Hsueh, 2000).

1.1.3.5. Folikül Seçimi, Antral Folikül Gelişimi

Foliküler gelişimin ilerleyen aşamalarında foliküller arasından folikülogenezi ve ovulasyonu tamamlayacak monoovulatörlerde bir, poliovulatörlerde birkaç adet folikül seçilir (Zama ve Uzun, 2010). Bu seçim folikülogenezisin antral aşaması sırasında gerçekleşir. Seçilen folikül büyüdükçe folikülün antrumu foliküler sıvı ile dolar, diğer yandan da teka ve granuloza hücrelerinin sayısı artmaya devam eder.

Granuloza hücrelerinde, cAMP indüksiyonunu düzenleyen FSH bağımlı sinyal iletimi, steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR), sitokrom P450 yan zincir bölünme (P450_{scc}, CYP11A), 3β hidroksisteroid dehidrojenaz tip 1 (3β-HSD) ve P450 aromataz (CYP19) gibi proteinlerin ekspresyonunu artırır. Bu sinyal iletim yolu kolesterolün progesterona dönüşmesinin yanı sıra androstenedionun ve testosteronun östrojene özellikle de E₂'ye aromatisasyonunu teşvik eder (Uzumcu ve Zachow, 2007). Teka ve granuloza hücrelerinin işbirliğinde östrojen üretimi, seçilen folikülde nispeten yüksek düzeyde tutulur (Zama ve Uzumcu, 2010). Büyük antral foliküllerde inhibin üretiminin başlamasıyla birlikte hipofizden gonadotropinlerin sekresyonu bloke edilir. Seçilen folikülde inhibin aracılığıyla gonadotropinler daha da baskılanır. Buna rağmen seçilen folikülün, diğer seçilmeyen foliküllere göre FSH'ya duyarlı olduğu, bunu da bulundurduğu daha fazla sayıda FSH reseptörü (FSHR) ile sağladığı ifade edilir. FSH etkisinin ortadan kalmasıyla birlikte seçilmeyen foliküllerin granuloza hücrelerinde apoptozis başlar ve sonuçta atrezi şekillenir (Uzumcu ve Zachow, 2007). Bu süreçte ki ince ayarlara ise insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), aktivinler, hepatosit büyüme faktörü, TGF- α ve β ile FGF7 gibi lokal büyüme faktörleri aracılık eder. Bunlardan IGF'ler folikül olgunlaşması için çok önemli kabul edilirler ve bu yüzden co-gonadotropinler olarak ifade edilirler. IGF-I yetersiz fareler, FSH nakavt (FSH-KO) farelere benzer ovaryum fenotipi gösterir. IGF-I çeşitli türlerin granuloza hücrelerinde hücre çoğalması ve steroidogenezi uyarırken, IGF bağlayıcı proteinler (IGFBP) de IGF-I protein ile kompleks oluşturup aktivasyonunu baskılayarak, atreziye yol açan FSH bağlı foliküler büyümeyi ve farklılaşmayı önleyebilir (Zama ve Uzumcu, 2010).

1.1.3.6. Ovulasyon

“Ovulasyon öncesi aşamada FSH ve LH yükselişi seçilen folikülde steroidogenezi artırır ve luteinizasyonu başlatır, böylece östrojen üretimine özel olan granuloza hücreleri östrodiol ve progesteron üretimine geçer. Bu süreçte yaklaşan ovulasyon için LH reseptör (LHR) geninin de içinde bulunduğu çok sayıda gende artış olur. Yüksek oranda LH, daha düşük oranda FSH, luteinizasyon için önemli olan

granuloza hücrelerinin terminal farklılaşmasını teşvik eder. Östrojen reseptör β (ER β), progesteron reseptör (PrR), proteaz, epidermal büyüme faktörü benzeri proteinler ve prostaglandin sentaz-2’inde içinde bulunduğu birçok gen ovulasyonda rol alabilir. Ovulasyonu takiben ovule folikülün kalıntıları LH tarafından son olarak korpus luteuma farklılaşmak üzere uyarılırlar. Korpus luteum birincil olarak progesteron kaynağıdır gebeliğin başlangıcı ve devamlılığı için zorunludur” (Uzumcu, 2010).

Burada belirtildiği gibi ovaryum hormonlara duyarlı bir dokudur ve bu durum bütün gelişim aşamasındaki folikülleri ve korpus luteumu kapsar (Zama ve Uzumcu, 2010).

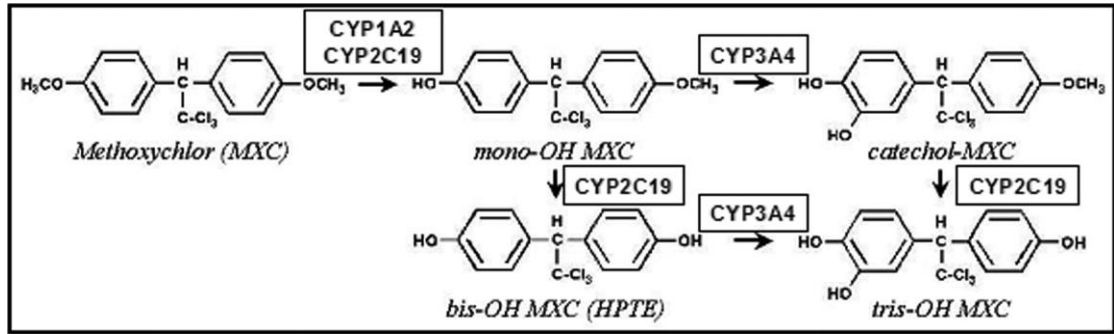
1.2. Methoxychlor/Metoksiklor (MXC)

1.2.1 Methoxychlor’un Genel Özellikleri

Methoxychlor tarla ve bahçe ürünlerini, çiftlik hayvanlarını, tahıl ambar silolarını haşerelerden korumak için yaygın olarak kullanılan iki halkalı organik klorlu bir pestisitir. Bu pestisid, dikloro difenil trikloroethan (DDT; 1,1,1-trichloro-2, 2-bis[4-chlorophenyl]ethane)’nin yerine geliştirilmiştir ve DDT’den daha az dirençlidir. Buna rağmen, güçlü bir çevresel zehir olduğu düşünülmektedir (Wauchope ve ark., 1992; Cummings ve ark., 1997; Laws ve ark; 2000; Younglai ve ark., 2005). İlk olarak 1893 yılında sentezlenmiş ve ABD’de 1946 yılında ticari üretimine başlanmış; 87 tarım bitkisi, besi sığırı, süt sığırı, keçi, koyun ve domuzda böcek ilacı olarak kullanılması onaylanmıştır (Cummings ve ark., 1997). Ticari olarak Maralate, Marlate, Metox, Methoxcide Dimethoxy-DDT, Methoxy-DDT gibi isimlerle anılır. Kimyasal ismi 2,2-di(p-methoxy phenyl) 1, 1, 1 –trichloroethane; kimyasal formülü ise $C_{16}H_{15}Cl_3O_2$ ’dir. Saf kimyasal % 50-88 MXC içerir, gerisi ise izomerleri ve reaksiyon ürünleridir (Cummings ve ark., 1997). Methoxychlor in vivo olarak sitokrom (cytochrome) P-450 enzimi aracılığıyla mono-OH MXC [(1,1,1-trichloro-2-

(4-hydroxyphenyl)-2-(4-methoxyphenyl)ethane)], HPTE [2, 2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane], kateşol (catechol) MXC ve tris-hydroxy MXC' ye metabolize olur (Gaido ve ark., 2000; Gupta ve ark., 2007). (Şekil 1.5).

Methoxychlor östrojenik etkilidir ve özellikle reproduktif sistem üzerine pek çok olumsuz etkiye sahiptir (Hall ve ark., 1997). Bu nedenle MXC, 2003'te Amerika'da (Anonim, 2004), 2002'de Avrupa'da (Anonim 2, 2009) ve 2009 yılında ülkemizde yasaklanmıştır (Anonim 3, 2009). Ancak çevrede yaygın olarak bulunan pek çok benzer endokrin bozucuya model teşkil ettiği için çalışmalarda kullanılmaya devam edilmektedir.



Şekil 1.5. MXC ve metabolitleri (Gupta ve ark., 2007).

1.2.2. Methoxychlor'un Ovaryum Üzerine Etkileri

Ovaryumda normal folikül gelişimi ve kaliteli ovosit üretimi endokrin sisteminin fonksiyonunu düzenli ve sorunsuz bir şekilde yerine getirmesine bağlıdır. Ancak, günümüzde pek çok alanda kullanılan pestisitler (örn metoxychlor), herbisitler, polikarbonat plastik (örn: bisphenol A), kozmetik ürünler, kişisel bakım ürünleri (örn: fitalatlar) ve sanayi atıkları (örn: dioksin) gibi endokrin bozucular, gelişmekte olan reproduktif sistemde özellikle de gelişen ovaryum folikülleri ve ovosit için büyük bir risk oluşturmaktadır (Kwintkiewicz ve Giudice, 2009).

Pestisitlere maruz kalma ile kadın doğurganlığı arasında güçlü bir ilişki olduğu yapılan epidemiyolojik çalışmalar ile gösterilmiştir. Tarımsal işlerle uğraşan kadınlarda infertilitede bir artış söz konusudur (Fuortes ve ark., 1997). Bununla birlikte insan foliküler sıvısında endokrin bozucuların konsantrasyonları ve başarısız in vitro fertilizasyon teşebbüsleri arasındaki bağlantı dikkat çekicidir (Younglai ve ark., 2005).

Reprodüktif bir zehir olarak bilinen MXC, östrojenik aktiviteler gösteren (Hall ve ark., 1997) ve erken ovaryum gelişimini, folikülogenezisi ve yetişkin ovaryum fonksiyonunu etkileyen endokrin bozucu bir ajandır (Cummings ve ark., 1997). Sıçanlarda MXC'nin farklı dozlarına (25, 50, 100, 200 mg/kg/gün) kronik olarak maruz kalınması erken vajinal açılmaya ve östrusa bağlı olarak erken pubertaya girişe sebep olurken, 200 mg/kg/günlük yüksek dozu bu etkilere ilave olarak kalıcı östrusa ve çiftleşmeye rağmen gebeliğin oluşmamasına neden olur (Gray jr Le, 1989). Methoxychlor'un reprodüktif sistem üzerine olumsuz etkilerinin şiddeti ve süresi, MXC dozunun yanı sıra maruz kalınan sürece bağlıdır. Erişkin dönemde maruz kalındığında, bu ajanın ortadan kalkmasıyla birlikte östrus siklusu normale dönerken, ovaryumda foliküler havuzun büyüklüğünün belirlendiği fetal ve neonatal dönemde maruz kalınması durumunda, MXC'nin üreme parametreleri üzerindeki olumsuz etkileri erişkin dönemde de devam eder. Bu dönemlerde MXC uygulamaları vajinal açılmanın ve ilk östrus başlangıcının hızlanmasına, düzensiz östrus sikluslarına, kalıcı vajinal östrusa, düşük gebelik oranına, küçük yavru boyutlarına, erken reprodüktif yaşlanmaya (Uzumcu ve Zachow, 2007; Armenti ve ark., 2008), ve embriyo taşıma hızını artırarak implantasyon öncesi embriyo kaybına (Cummings ve ark., 1990; Cummings ve ark., 1993) neden olur. Bunların yanı sıra ovaryum parametreleri, serum hormon düzeyleri ve ovaryum için anahtar markırlar üzerine de güçlü etkiler gösterir (Tiemann, 2008). Methoxychlor ovosit ve ovositi çevreleyen kumulus hücreleri arasındaki gap junction bağlantılarının oluşumunu inhibe eder. Bu bağlantılar foliküler gelişimin kontrolünde, ovositin mayotik olgunlaşması, luteal büyüme ve gerileme olaylarında ovosit ve etrafındaki kumulus hücreleri arasında iletişim sağlar (Tiemann, 2008). Ayrıca mayoz bölünme sırasında mekik ipliklerinin oluşumunu bozarak da ovosit olgunlaşmasını etkileyebilir (Tiemann, 2008). Yüksek

doz MXC ovaryumda foliküler kompozisyonunu değiştirir. Fötal ve erken postnatal döneminde 100 mg ve 500 mg dozları primordiyal, primer ve sekonder folikül sayısını etkilemezken (Uzumcu ve ark., 2006; Armenti ve ark., 2008) preantral folikül sayısını artırır, antral folikül ve korpus luteum (CL) sayısını azaltır (Uzumcu ve ark., 2006). Methoxychlor'un yanısıra metaboliti HPTE, foliküler gelişimin ve farklılaşmasının negatif düzenleyicisi AMH ekspresyonunu uyararak, foliküler inhibisyona neden olur (Armenti ve ark., 2008). Methoxychlor, serum LH düzeyini artırır, ovaryum LHR düzeyini düşürür (Armenti ve ark., 2008). Bununla birlikte ekzojen gonodotropinlerle uyarılan ovulasyon düzeyinde azalmaya neden olur. Bu durumun LHR ekspresyonundaki azalmaya bağlı olduğu düşünölmektedir (Armenti ve ark., 2008). FSH ekspresyonu üzerine etkilerine dair veriler ise çelişkilidir. Armenti ve ark. (2008), serum FSH düzeyini etkilemediğini belirtirken, Chapin ve ark. (1997) ise azalttığını bildirmiştir. Methoxychlor'un düşük dozu (20 mg/kg/gün) E₂ sentezini uyarırken, yüksek dozu (100 mg/kg/gün) P₄ seviyesini düşürür. Methoxychlor steroidogenezi, kolestrolün preglona dönüşmeden önce meydana gelen bir mekanizma ile inhibe eder (Crellin ve ark., 2001). Steroid hormon sentezi kolestrolün StAR aracılığıyla mitokondriye taşınmasına bağlıdır (Stocco ve Clark, 1996). MXC uygulaması StAR ekspresyonunu değiştirmezken, steroidogeneziste anahtar role sahip P450scc ise CL'larda önemli derecede düşürür. Diğer yandan HPTE, FSH uyarımlı P450scc mRNA üretimini granulaza hücrelerinde inhibe eder (Zachow ve Uzumcu, 2006) ve sonuçta steroid sentezi sekteye uğrar.

Östrojenik etkili MXC ER'ye düşük affinite gösterirken metabolik ürünü olan HPTE, ER alt tiplerine bağlı olarak, daha güçlü östrojenik, antiöstrojenik ve anti androjenik aktiviteler gösterir. İnsan ve sıçan ER α ve β ile yapılan denemeler OH-MXC ve HPTE'nin ER α için agonist, ER β için androjen reseptörlerde olduğu gibi antagonist davrandığını göstermiştir (Gaido ve ark.,1999; Gaido ve ark., 2000). Her iki östrojen reseptör alt tipleri, hem gelişim hem de yetişkinlik döneminde ovaryumda eksprese olur. ER α germinal epitel, stroma hücreleri ve teka hücrelerinde birinci postnatal günde belirlenebilir, ER β gelişen foliküllerin granuloza hücrelerinde beşinci günden başlayarak aktiftir (Sar ve Welsch, 1999). Östrojen reseptör α , steroidogenesis ve hipotalamo hipofizer sistemde ki östrojen aracılı geri bildirim

(feedback) mekanizması için gereklidir (Woodruff ve Mayo, 2005). Methoxychlor, foliküllerde ER α ekspresyonunu artırarak folikül atrezisine yol açarken (Tomic ve ark., 2006), ER α bağımsız olarak ER β ekspresyonunu inhibe ettiği ve buna bağlı olarak gonadotropinlere cevabı azalttığı dolayısıyla da dişi fertilitasını düşürdüğü bildirilmektedir (Armenti ve ark., 2008). DNA metilasyonu ve diğer epigenetik mekanizmalar MXC’inde dahil olduğu çevresel östrojenik bileşikler tarafından etkilenir (Ruden ve ark. 2005; Crews ve McLahlan 2006). Methoxychlor’a maruz kalmanın, ovaryum fonksiyonu için önemli olan ER β anahtar geninin epigenetik profilini değiştirdiği ve bu değişikliğin ovulasyonda rol oynayan ER β gen ekspresyonunu ve dişi infertilitesine neden olan foliküler olgunlaşmayı inhibe ettiği bildirilmiştir (Zama ve Uzumcu, 2009). Aynı araştırma grubunun başka bir önemli çalışmasında, endokrin bozuculara testiküler farklılaşma esnasında maruz kalmanın, erkek infertilitesine neden olan nesilden nesile aktarılabilen epigenetik etkilere yol açabildiği gösterilmiştir (Anway ve ark., 2005). İnsan ve hayvan sağlığı için bu bulguların anlamı çok önemlidir. Methoxychlor gibi östrojenik bileşiklere erken gelişim döneminde maruz kalınması, erişkin ovaryum fonksiyon bozukluğuna ve dişi infertilitesine yol açabilir. Daha da önemlisi, ovaryum üzerine doğrudan bu zararlı etkileri ile daha sonraki nesillerin dişi cinsiyet hücre hattını etkileyerek epigenetik bozukluklara neden olabilir.

MXC, folikülogenezis sürecinde atreziyle sonuçlanan folikül gelişiminin inhibisyonuna (Cummings ve ark., 1997; Gupta ve ark., 2006), CL sayısında azalmaya (Swartz ve Eroschenko, 1998; Armenti ve ark., 2008) ve ovaryum atrofisine sebep olur. Diğer yandan hormonların sekresyonunu ve salgılanmasını değiştirebilir (Martinez ve Swartz, 1992; Swartz ve Corkern, 1992). Antral folikülleri ise seçici olarak etkiler ve bu etkisini de hiptalamo hipofizer gonadal (HPG) eksenini etkilemeden ER α (Tomic ve ark., 2006) yanı sıra Bcl-2 ve Bax aracılı yollar (Borgeest ve ark., 2004, Miller ve ark., 2005) ve oksidatif stres yoluyla (Gupta ve ark., 2006) gibi yollar aracılığı ile gerçekleştirir.

1.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktör Sistemi (İnsülin-Like Growth Factor System)

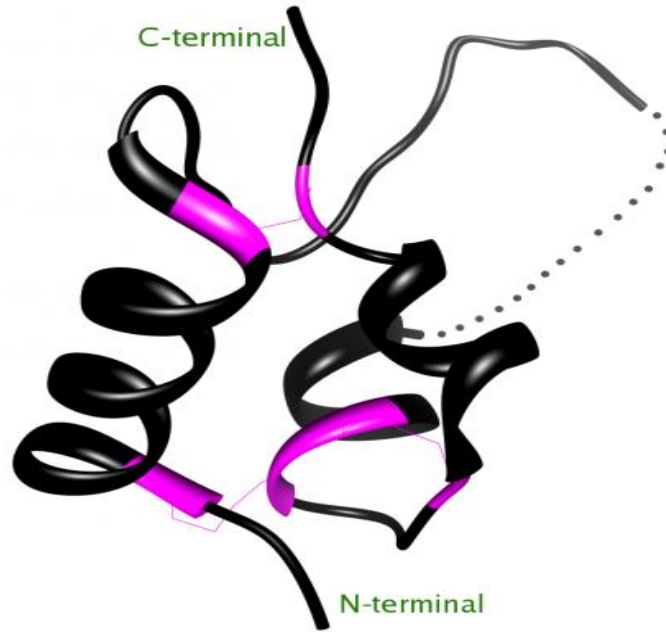
İnsüline benzer etkileri ve yapısal benzerlikleri nedeniyle bu isimle adlandırılan IGF sistemi, iki ligand (insülin benzeri büyüme faktörü: IGF-I ve IGF-II), iki reseptör (insülin benzeri büyüme faktörü reseptörleri: IGF-IR ve IGF-IIR) ve insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı proteinler (IGFBP 1-6) ile insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein proteazlarından oluşan geniş bir ailedir (Poretsky ve ark., 1999). İnsülin benzeri büyüme faktörü I ve II hücre proliferasyonu, hücre sel büyüme ve farklılaşma ile anti-apoptozis de önemli role sahip mitojenik (Gederet ve ark 2004; Durai ve ark., 2005) özellikteki peptid hormonlardır (Frohman, 1987; Clemmons ve ark., 1992; Siddle ve ark., 1994; Whitley ve ark., 1996). Bunlardan IGF-I en önemlisi ve üzerinde en çok çalışma yapılmış olanıdır.

1.3.1.İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I (IGF-I)

İnsülin benzeri büyüme faktörü I, 70 amino asitten oluşan ve IGF-II ile önemli oranda homoloji gösteren tek zincirli bir polipeptiddir (Şekil 1.6). Onikinci kromozomda lokalize olan IGF-I sahip olduğu üç adet disülfid bağı ile sabit yapısını korur. Somatomedin C olarak da adlandırılan IGF-I özellikle postnatal dönemde karaciğer başta olmak üzere pek çok dokuda üretilir (Poretsky ve ark., 1999; Tawil, 2008). Kısa vadede metabolik, uzun vadede ise büyüme üzerine etki gösterir (Ota ve ark., 1988; Yarden ve Ullrich, 1988). Fötal ve çocukluk evresi boyunca normal gelişimde önemli rol oynar. Erişkin dönemde ise bu sistem, hücre sel metabolizmada rol almanın yanı sıra hücre çoğalması ve farklılaşması ile apoptozisin önlenmesi gibi fonksiyonların düzenlenmesinde görev alır (Froesch ve ark., 1985; Jerome ve ark., 2003). Mitojenik etkisi insüline göre çok daha güçlüdür (Lammers ve ark., 1989). İnsülin benzeri büyüme faktörü I postnatal büyüme süresince pek çok metabolik etki ile büyüme hormonunun [growth hormone (GH)] anabolik etkilerinin başlatılmasına aracılık eder (Lehninger, 1982). İnsülin benzeri büyüme faktörü I'in karaciğerde ekspresyonu GH'nin serum düzeyine bağılıyken ekstrahepatik dokularda üretimi ise

GH'ye bağımsız olarak gerçekleşmektedir (Zapf ve ark., 1981; Clemmons ve Van Wyk, 1981; Mathews ve ark.,1986). Lokal olarak eksprese olan IGF-I, biyolojik etkilerini otokrin ve parakrin mekanizmalar ile gösterir (Chen ve ark., 1999).

İnsülin benzeri büyüme faktörleri peptid yapıda olduklarından dolaşımında serbest halde taşınmazlar, bağlayıcı proteinlere ihtiyaç duyarlar. Bu yoldan hareketle yapılan çalışmalarda altı farklı IGFBP tanımlanmıştır. (Rechler ve Nissley, 1991; Clemmons, 1994). İnsülin benzeri büyüme faktörü I hedef dokulara kan yoluyla IGFBP-3 aracılığıyla taşınır ve proteolitik yıkımlanmadan korunarak reseptörü ile etkileşimi sağlanır (Morimoto ve ark., 2005a; b) IGF-I'in mitojenik ve antiapoptotik etkileri IGFBP-3 ile düzenlenir. İnsülin benzeri büyüme faktörü I apoptotik Bcl ve Bax proteinlerinin ekspresyonunu düzenleyerek hücre ölümünü engellerken, IGFBP-3 apoptozisi uyararak IGF-I'in mitojenik etkisini inhibe eden antiproliferatif bir etki gösterir (Fürstenberger ve Senn, 2002; Morimoto ve ark., 2005a; b).



Şekil 1.6. IGF-I şematik gösterimi (Tawil, 2008).

1.3.2. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I Reseptörü (IGF-IR)

IGF'ler spesifik etkilerini kendilerine özgü tetramerik transmembran glikoprotein reseptörleri (IGF-IR ve IGF-IIR) aracılığıyla gösterir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü I yüksek düzeyde IGF-IR'ye (Ullrich ve ark., 1986) düşük oranlarda da IGF-IIR'ye (Morgan ve ark., 1978) ve insülin reseptörüne (Massague ve Czech, 1982) affinite gösterir. İnsülin benzeri büyüme faktörü I reseptörünün insülin reseptörü ile yüksek benzerlik gösteren IGF-IR α (hücre dışı) ve IGF-IR β (hücre içi) olmak üzere disülfid bağları ile bağlı iki altbirimi bulunmaktadır. İnsülin reseptörü ile benzerlik, IGF-IR α 'nın sisteinden zengin hormon bağlama bölgesi ve IGF-IR β 'nin trozin kinaz aktiviteli sitoplazmik bölgesinden kaynaklanmaktadır. (Baserga, 1992; Leroith, 1996; Sepp-Lorenzino, 1998; Baserga, 2000). İnsülin benzeri büyüme faktörü I, IGF-IR'ye insüline göre yüz kat daha fazla affinite ile bağlanır. İnsülin benzeri büyüme faktörü I'in reseptörüne (IGF-IR α alt birimine) bağlanması; trozin fosforilasyonu ile birlikte insulin-reseptör substrat-1 (IRS-1) ve Shc gibi adaptör proteinlerin fosforilasyonuna neden olur (Dudek ve ark., 1997). Böylece proliferatif ve antiapoptotik bir sinyal başlar sonuçta hücrenin çoğalmasında ve hayatta kalmasında rol alan Ras / Raf / mitojen-aktive edici protein kinaz (MAPK)'ın ya da fosfatidilinositol-3 kinaz (PI-3K) yolağının aktivasyonu gibi insülin reseptörünün etkilerine benzer olaylar meydana gelir. (Porter ve Vaillancourt, 1998; Poretsky ve ark., 1999; Vivanco ve Sawyers, 2002). Hücreye ait iyi korunan ve MAPK kaskadında önemli bir protein olan p21 Ras'ın da bu süreçte rol aldığı ve büyüme faktör reseptör ile insulin reseptör tirozin kinaz aktivasyonunda kritik faktör olduğu düşünülmektedir (Poretsky ve ark., 1999).

İnsülin benzeri büyüme faktörü I bağlanmasıyla aktive olan IGF-IR hücre çoğalması ve farklılaşması ile hücrenin hayatta kalmasında kritik rol oynar (Duncan ve ark 1994; Chen ve ark., 1999; Jehle ve ark., 1999; Su ve ark., 1999; Baserga, 2000). İnsülin benzeri büyüme faktörü I'in kanser hücrelerin büyümesindeki etkisi de IGF-IR trozin kinaz aracılığı ile gerçekleşir (Durai ve ark., 2005). Ancak bu etki

IGFBP-3 tarafından aktive edilen fosfotirozin fosfatazın (sinyalizasyonu bozup ve inhibitör etki gösteren) IGF-IR'yi defosforile etmesiyle ortadan kalkar (Samani ve ark., 2007).

1.3.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü I (IGF-I) ve Reseptörü (IGF-IR)'nün Ovaryumdaki Fonksiyonları

Ovaryumun temel fonksiyonu olan folikülogenezis sürecinin, steroid hormonlar (Findlay ve ark., 2001), gonodotropinler ve IGF'lerinde içinde bulunduğu pek çok büyüme faktörü (Skinner ve ark., 2005) tarafından kontrol edildiği bilinen bir gerçektir. Bunlardan IGF ekspresyonu, sinyal mekanizması ve IGF üyelerinin (ligand, reseptör, bağlayıcı protein) ovaryum folikül fonksiyonundaki rolleri uzun yıllardır aydınlatılmaya çalışılan bir konu olmuştur.

İnsülin benzeri büyüme faktörleri (IGF-I ve IGF-II) ve reseptörleri (IGF-IR ve IGF-IIR) ovaryum gelişimi boyunca farklı düzeylerde eksprese olarak, kendilerine özgü rolleri ile foliküler gelişim sürecini düzenlerler (Levy ve ark., 1992). İnsülin benzeri büyüme faktörleri folikül gelişimi, seleksiyon, atrezi, hücresel farklılaşma, steroidogenezis ve ovosit mürasyonu gibi pek çok olayın intraovarian düzenlenmesinde anahtar rol oynarlar (Mazerbourg ve ark., 2003).

İnsülin benzeri büyüme faktörü I sıçan ovaryumunda puberta öncesi ve sonrası tüm foliküllerde; primordiyal folikülden itibaren özellikle de sağlıklı antral folikülde granuloza hücrelerinde, atretik ve luteinize foliküllerde eksprese olur (Zhou ve ark., 1991). İnsülin benzeri büyüme faktörü I sıçanlarında içinde bulunduğu pek çok memeli türünde granuloza hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarır (Monget ve ark., 2002; Mazerbourg ve ark., 2003; Quirk ve ark., 2004). Ayrıca bu hücreleri apoptozize karşı koruyarak hayatta kalmalarını sağlar ve bu şekilde foliküler atreziyi önler. (Guthrie ve ark., 1998; Hu ve ark., 2004).

İnsülin benzeri büyüme faktörü I, ovaryumda fonksiyon gören diğer hormonlarla etkileşim içindedir. Granuloza ve teka hücrelerinde LH reseptör ekspresyonu uyarır ve granuloza hücrelerinde FSH reseptör ekspresyonu için gerekli olduğu düşünülür. FSH ve LH ile sinerjizma göstererek, steroidogenezis, foliküler olgunlaşma ve gonodotropin reseptör ekspresyonunda etkili olurlar. FSH ile birlikte granuloza hücrelerinden E₂ ve P₄ üretimini, LH ile de granuloza ve teka hücrelerinde androjen salınımını artırır (Poretsky ve ark., 1999). İnsanda progesteron (Devoto ve ark., 1995) ve östrojen (Johnson ve ark., 1996) üretimini artırarak luteal steroidogenezi düzenler.

1.4. Endokrin Bozucuların IGF-I Sinyal Yolağı Üzerine Etkileri

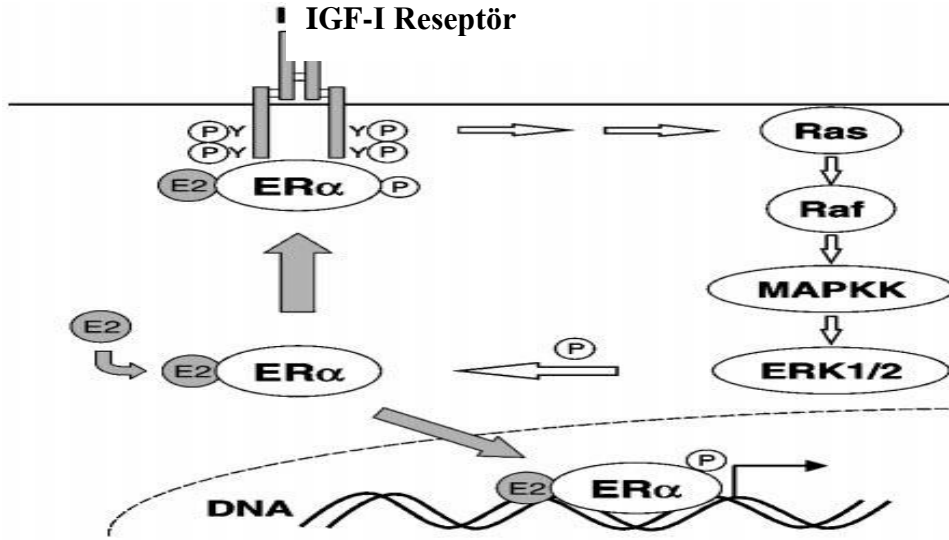
Östrojen ovaryumda (Hernandez, 1995) ve uterusu (Murphy ve ark., 1987; Kapur ve ark., 1992) IGF-I ekspresyonunu ve gelişmekte olan meme bezinde IGF-I uyarımını artırır (Ruan ve ark., 1995). Ayrıca pek çok endokrin bozucunun (çevresel östrojenin) ovaryum ve uterus gibi östrojen duyarlı organlarda da IGF-I ve IGF-IR ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir. MXC'nin metabolitlerinden HPTE'nin de içinde bulunduğu östrojenik özellikteki pek çok madde uterusu özellikle IGF-I mRNA ekspresyonunu artırır ve IGF-IR sinyal yolağını aktive eder. Bu yolda ER α rol alırken, ER β 'nin etkisi yoktur (Klotz ve ark., 2000). HPTE ve östrojenik özellikteki pek çok madde, ER α yanısıra IGF-I ve östrojenin sinyal iletim yollarının bir parçası olan MAPK sinyal kaskadını da aktive eder. Bu kaskad hücre büyümesi, proliferasyon, farklılaşma ve apoptozis gibi olaylarda etkilidir. (Frigo ve ark., 2004; Li ve ark. 2006).

Östrojen ve IGF-I etkilerini reseptör aracılı sinyal yolları ile gerçekleştirir. Bu sinyal yolları MAPK sinyal kaskadında çakışır. Bu nedenle MAPK sinyal kaskadı IGF-I ve östrojen için potansiyel etkileşim yerlerinden biridir (Kato ve ark., 1995; Bunone ve ark. 1996) ve büyümedeki sinerjik etkilerinin bu sinyal yolları arasındaki etkileşimin sonucunda olduğu düşünülmektedir (Aronica ve Katzenellenbogen, 1993; Ma ve ark., 1994; Smith, 1998). IGF-I'in mitojenik yanıtı,

ligand indüksiyonuyla IGF-IR tirozin otoposforilasyonunun başlamasıyla oluşur ve bu durum Ras/Raf/MAPK sinyal kaskadının aktivasyonu ile sonuçlanır. Östrojen duyarlı genlerin aktivasyonunu indüklediği bilinen IGF-I, östrojen reseptörünü ise Af-I'nin direkt fosforilasyonu ile oluşan MAPK sinyali aracılığıyla aktive eder (Kato ve ark., 1995; Bunone ve ark., 1996). Östrojen ise artan MAPK aktivasyonunu izleyen IGF-I ve insülin reseptör substrat-1 tirozin fosforilasyonuna neden olur. IGF-IR'in modülasyonunu ve membranla ilişkili IGFBP'leri uyarır (Kleinman ve ark., 1995; Richards ve ark., 1996; Richards ve ark., 1998; Lee ve ark. 1999). Ayrıca östrojenin bağlanmasıyla aktive ve fosforile olan ER α , IGF-IR'üne bağlanabilir, böylece östrojen için potansiyel bir mekanizma ile IGF-IR sinyal yolağı özel olarak aktive edilir. Bağlanma sonrası IGF-IR otoposforile ve aktive olur. IGF-IR'nin aktivasyonu MAPK'ı ve dolayısıyla sinyal kaskadının bir parçası olan ERK1/2'yi uyarır. ERK1/2'nin E₂ tarafından fosforilasyonu gerekir. Ortamda ER α varlığında E₂ tarafından bu fosforilasyon oldukça hızlı gerçekleşir. ERK1/2 ER α 'nın fosforilasyonuna yol açabilir bu da ligand bağımsız olası bir mekanizma sağlayabilir (Kahlert ve ark., 2000) (Şekil 1.7).

Kısacası östrodiol ve çevresel östrojenlerin IGF-I sinyal yolağı üzerine etkisi ER α aracılığıyla gerçekleştirdiği dikkat çekmektedir. Dolayısıyla çevresel bir östrojen olan MXC de östrojen ve IGF-I için ortak bir sinyal yolağı olan MAPK sinyal yolağını etkiliyor olabilir.

Endokrin bozucu bir ajan olan BPA'nın aromataze nakavt (ArKO) farelerde östrojen verilenlere benzer bir etki göstererek IGF-I ve IGF-IR ekspresyonunu artırdığı bildirildi (Toda ve ark., 2002). Diğer bir çalışmada ise BPA'nın insan granuloza benzeri tümör hücre hattında (human granulosa-like tumor line) IGF-I ve IGF-IR ekspresyonunu azalttığı gösterildi (Kwintkiewicz ve Giudice, 2009). Bu veriler MXC'nin de IGF-I sinyal yolağı üzerine bir takım etkilerinin olabileceğini düşündürmektedir. Dolayısıyla ovaryumda folikülogenezisi ve steroidogenezisi yakından etkileyen MXC'nin bu etkilerini IGF-I sinyal yolağı üzerinden gösteriyor olması da muhtemeldir



Şekil 1.7. IGF-I ve östrojen arasındaki etkileşimi için kabul edilen mekanizma (Kahlert ve ark 2000)

HİPOTEZ I: Fötal ve neonatal folikül gelişimi esnasında MXC'ye maruz kalınması erişkin dönemdeki foliküler kompozisyonu değiştirir.

AMAÇ I: E18-PN7 zaman aralığında MXC uygulamasının, erişkin (PN50-60) dönemde toplanan ovaryumlarda folikül aşamalarının (safhalarının) oransal dağılımını nasıl etkilediğini ortaya çıkarmak.

HİPOTEZ II: Ovosit yuvacıkların oluşumu ve yıkılmasının başlaması, primordiyal foliküllerin şekillenmesi ve primordiyalden primer foliküle geçiş dönemlerini kapsayan erken foliküler gelişimin sürecinde (E18-PN7) MXC'ye maruziyet, erişkin dönemdeki IGF-I ve IGF-IR ekspresyonlarını değiştirir

AMAÇ IIa: Foliküler gelişimin IGF-I sinyal yolağının üyelerinin farklı folikül aşamalarındaki spesifik lokalizasyonlarını belirlemek ve ekspresyonlarının seviyesini saptamak.

AMAÇ IIb: Bu zaman aralığı içerisinde MXC uygulamasının IGF-I ve IGF-IR protein ekspresyonlarında değişikliğe sebep olup olmadığını göstermek.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

İki aylık, Wistar ırkı, 12 adet dişi sıçan Afyon Kocatepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarında ışık (aydınlık periyodu 07:00-21:00 arası), ısı (26–28°C) ve nem (30–70%) kontrollerinin yapıldığı odalarda bakıldı.

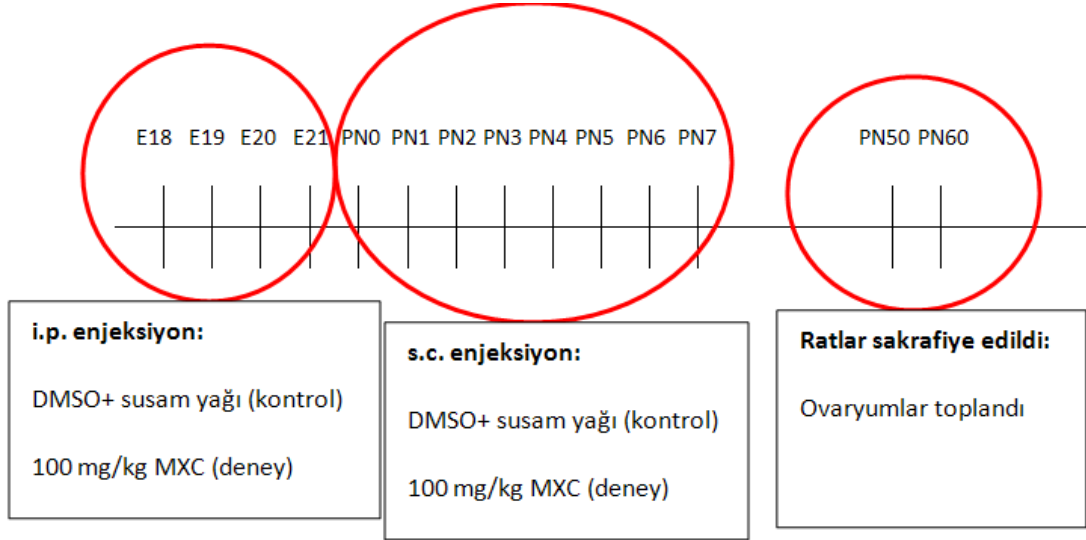
Sıçanların östrus siklusu vaginal sitoloji ile sabah saat 08:00-09:00 arasında günlük olarak takip edildi. Her bir dişi sıçan ikinci proöstrus döneminde akşam saat 17:00'de çiftleştirilmek için erkek sıçan ile gece boyu aynı kafese konuldu. Ertesi sabah vajinal smear'de sperm görülmesi başarılı bir çiftleşmenin olduğunu gösterdi ve sperm pozitif vaginal smear gebeliğin 0. günü olarak belirlendi. Hayvanların 7 gün boyunca östrus siklusları vaginal smear yöntemi ile takip edildi ve bu süre zarfında vaginal sitolojilerinde lökosit görülen sıçanlar gebe olarak kabul edildi.

Gebe hayvanlar deney (n:6) ve kontrol (n:6) olmak üzere iki ana gruba ayrıldı.

2.2. Deneysel Prosedür

Gebe sıçanlara E18 günden başlayarak günlük saat 09:00 da, intraperitoneal olarak (i.p.) deney grubuna 100 mg/kg/gün MXC ve kontrol grubuna ise taşıt madde DMSO (dimetil sülfoksit)-susamyağı 1:2 oranında karıştırılarak uygulandı. MXC solüsyonu taşıt madde içinde çözdürülerek hazırlandı. 1ml DMSO içerisinde 300 mg MXC çözdürüldükten sonra bu solüsyona 2 ml susam yağı eklendi böylelikle 100mg/kg dozda 3ml MXC solüsyonu elde edildi. Taşıt madde ve MXC doğuma kadar günlük takip eden i.p. enjeksiyonlarla uygulandı. Doğum sonrası yavru dişi sıçanlara ise

subkutan (s.c.) olarak postnatal 7 gün boyunca 100 mg/kg/gün MXC ve taşıt madde uygulamasına devam edildi.



Şekil 2.1. Deney prosedürü

2.3. Dokuların Alınması

DeneySEL prosedürün uygulanmasını takiben 50 ile 60. günler arasında proöstrusa giren hayvanlar belirlendi. Proöstrus aşamasında genel anestezi (21.1 mg/kg ketamin ve 4,2 mg/kg ksilazinin i.p.) altında servikal dislokasyon ile hayvanlar öldürüldü (Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu, AKÜHADYEK-67-10). Sıçanların karın boşluğu açılarak ovaryumlar toplandı. Sol ovaryum foliküllerin sayılarının belirlenmesi ve immunohistokimyasal boyamalar için Bouin solüsyonunda tespit edildi. Sağ ovaryum ise protein izolasyonu ve western blotting analizi için -80°C’de saklandı.

2.4. Tespit, Doku Takibi ve Kesit Alma

2.4.1. Tespit, Doku Takibi ve Kesit Almada Kullanılan Malzemeler

Ekipmanlar

- Etüv (Nüve EN500)
- Parafin tankı (Leica EG 1120)
- Mikrotom (Leica RM 2125RT)
- Su banyosu (Apex instruments)
- Lam (Isolab)
- Lamel (Isolab)

Kimyasallar

- %37 Formaldehit (Merck, 1.04002.2500)
- Pikrik asit (Sigma, 80452-500G)
- Asetik asit (Tekkim, 010030.01000)
- %100 Alkol (Merck, 1.00986.2500)
- %96 Alkol (Tekkim)
- %80 Alkol (Tekkim)
- %70 Alkol (Tekkim)
- %50 Alkol (Tekkim)
- Ksilen (Xylene) (Sigma-Aldrich, 16446)
- Parafin (56°C-58°C) (Merck, 107150)
- Polilizin (Polylysine) (Sigma-Aldrich, 8920-100)
- Jelatin (Gelatin) (Merck, 1.04078.500)

2.4.2. Tespit

Bouin Tespit Solüsyonu

- Pikrik asit :75 ml
- %37 Formaldehit :25 ml
- Asetik asit :5 ml

Yöntem

Ovaryumlar Bouin tespit solusyonunda 48 saat tespit edildi.

2.4.3. Doku Takibi

Solüsyonlar

%80 Alkol

- %96 Alkol :80 ml
- Distile su :16 ml

%70 Alkol

- %96 Alkol :70 ml
- Distile su :26 ml

%50 Alkol

- %96 Alkol :50 ml
- Distile su :46 ml

Yöntem

Dokular dereceli alkol serisinden geçirilerek suyu uzaklastırıldı (dehidrasyon).

- %50 Alkol :1 saat
- %70 Alkol :1 saat
- %80 Alkol :1 saat

- %96 Alkol :1 saat
- %100 Alkol :1 saat
- %100 Alkol :1 saat

Ksilen'de parlatıldı

- Ksilen 1 :1 saat
- Ksilen 2 :1 saat
- Ksilen 3 :1 saat

56-58°C'de eriyen parafinin ksilen ile yer değiştirerek dokuya nüfuz etmesi sağlandı.

- Ksilen/Parafin (1:1) :1 saat
- Parafin 1 :1 saat
- Parafin 2 :1 saat

Dokular parafine gömüldü.

2.4.4. Kesit Alma

2.4.4.1. Polilizinli Lam Hazırlanması

Solüsyon

- Polilizin :30 ml
- Distile su :70 ml

Yöntem

30 dakika polilizin solüsyonunda bekletilen lamalar 1 gece etüvde kurutuldu.

2.4.4.2. Kesitlerin Alınması

Mikrotom ile 5 µ'luk kesitler alındı. Polilizin ile kaplı lamlara çekildi. Oda ısısında kurumaya bırakıldı.

2.5. Folikül Sayımı

Crossman'nın Modifiye Üçlü Boyama Yöntemi ile boyanan kesitlerde folikül sayıları belirlendi.

2.5.1. Crossman'nın Modifiye Üçlü Boyama Yöntemi

2.5.1.1. Crossman'nın Modifiye Üçlü Boyama Yönteminde Kullanılan Malzemeler

Kimyasallar

- Hematoksilen krist (Hematoxylin crystals) (Merck, 70225752)
- Demir-3-Klorür (Merck, 1.03946. 2500)
- Metanol (Merck, 1.06009.2500)
- Asit fuksin (fuchsin) (Surechem Products Ltd., C.I.42685)
- Orange G (Merck, 1.15925.0025)
- Timol (Tymol) (Merck, 108167)
- Asetik asit (Tekkim, 010030.01000)
- Fosfotungstik (Phosphotugstie) Asit (Merck, 1.00582.0100)
- Anilin (Carlo Erba, 428582)

- Entellan (Merck, 1.07961.0100)

Solüsyonlar

Weigert Hematoksilen Solüsyonu

Solüsyon A

- Hematoksilen krist :1 g
- %95 Alkol :100 ml

Solüsyon B

- Distile su :90 ml
- Demir-3-Klorür :1 ml
- HCl :1 ml

A ve B solüsyonları eşit miktarlarda karıştırıldı.

Metil Alkol (Metil Karbonat)

- Distile su :125 ml
- Metil alkol (Metanol) :125 ml

Az miktarda Sodyum Karbonat ilave edildi.

Asit Füksin Orange G Solüsyonu

- Asit fuksin :0,7 g
- Orange g solüsyonu :0,3 g
- Distile su :200 ml
- Timol :0,13 g
- Asetik asit :2 ml

Fosfotungistik (Phosphotugstie) Asit Solüsyonu

- Fosfotungistik asit :3 g
- Distile su :100 ml

Anilin Blue Solüsyonu

- Anilin blue :2 g
- Distile Su :100 ml
- Asetik asit :2 ml

Asetik Asit Solüsyonu

- Asetik asit : 2 ml
- Distile su :100 ml

2.5.1.2. Yöntem

Deparafinizasyon ve Rehidrasyon

- Ksilen :2 x 10 dakika
- %100 Alkol :2 x 3 dakika
- %96 Alkol :3 dakika
- %80 Alkol :3 dakika
- %70 Alkol : :3 dakika
- %50 Alkol :3 dakika
- Distile Su :2 x 3 dakika

Boyama

- Musluk suyu :5 dakika
- Hematoksilen :10 dakika
- Musluk suyu :5 dakika
- Metil karbonat :1 dakika
- Musluk suyu :5 dakika
- Distile su :2 x 3 dakika
- Asit fuksin :2 x 2 saniye
- Distile su :2 x 3 dakika
- Fosfotungstik asit :15 dakika
- Distile su :2 x 3 dakika
- Anilin :2 dakika
- Distile su :2 x 3 dakika

Alkol Serilerinden Geçirilmesi

- % 96 Alkol :2 x 3 dakika
- %100 Alkol :2 x 3 dakika

Ksilende Parlatma

- Ksilen 1 :5 dakika
- Ksilen 2 :10 dakika
- Ksilen 3 :15 dakika

Kapatma

- Boyanan kesitler entellan ile kapatıldı.

2.5.2. Foliküllerin Sayılması

2.5.2.1. Foliküllerin Sayılmasında Kullanılan Malzemeler

Ekipmanlar

- Mikroskop (Olympus BX50)
- Görüntüleme sistemi (Olympus DP25)

2.5.2.2. Kesitlerin Mikroskopta İncelenmesi

Foliküllerin sayısını belirlemek üzere, ovaryum merkezinde en büyük kesit bölgesini kapsayan ve Crossman'nın modifiye üçlü boyama yöntemi ile boyanan ardışık iki kesit incelendi.

2.5.3. Değerlendirme

Uzumcu ve ark. (2006)'nın belirttiği şekilde sınıflandırılan foliküllerin (Tablo 2.1), Nilsson ve ark. (2007)'nin çalışmalarında bildirdikleri şekilde ortalaması alındı.

Tablo 2.1. Ovaryum foliküllerinin sınıflandırılması (Uzumcu ve ark., 2006).

Folikül	Ovosit	Ovositi çevreleyen folikül epitel hücreleri
Primordiyal folikül	Primer ovosit	Tek katlı yassı pregranuloza hücreleri ve en fazla bir tane kübik granuloza hücresi içerenler
Primer folikül	Primer ovosit	Tek katlı iki ya da daha fazla sayıda kübik granuloza hücreleri
Sekonder folikül	Primer ovosit	İki ya da üç katlı kübik granuloza hücreleri
Preantral folikül	Primer ovosit	Üç kattan daha fazla granuloza hücreleri, antrum şekillenmemiş ya da granuloza hücreleri arasında küçük aralıklar oluşmuş
Antral folikül	Primer ovosit	Çok katlı granuloza hücreleri ve antrum şekillenmiş

2.6. İmmunohistokimya

2.6.1. İmmunohistokimyasal Yöntemde Kullanılan Kimyasallar

İmmunohistokimyasal (IHK) yöntem olarak İndirekt Streptavidin-Biotin Peroksidaz yöntemi uygulandı ve zıt boyama olarak Periodik Asit Schiff (PAS) ve Hematoksilin (H) yöntemi yapıldı.

Ekipmanlar

- pH metre (Inolab WTW pH 720)
- Hassas terazi (Precisa XB 220A)
- Mikrodalga fırın (Arçelik MD 554)
- Buz dolabı (+4°C) (İndesit)

Kimyasallar

- Tris (Bio asic Inc., TB0196)
- EDTA (Merck 1.08418.0100) pH 9 solüsyonu
- Hidrojen peroksit (%35) (Merck, 1.08600.2500)
- Serum Bloking (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen 859043)
- Antikor dilüent (Zymed 00-3118)
- Primer antikor
 - IGF-I (Santa Cruz Biotechnology H-70, sc-9013 rabbit poliklonal antikor),
 - IGF-IR (Santa Cruz Biotechnology C-20, sc-713 rabbit poliklonal antikor)
- Sekonder antikor (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen 859043),

- Horseradish peroksidaz enzimi (Histostain Plus Broad Spectrum, Invitrogen 859043)
- Substrat-kromojen (DAB) (Vector 4100)
- PBS (Phosphate buffer solution= fosfat tampon solüsyonu)
- Tween 20 (Sigma P1379)
- Periodik asit (Merck 1.00524.0100)
- Basic fuksin (Merck 1.1597.0100)
- HCl (Best Kimyasalları)
- Sodyum metabisülfid (Merck)
- Hematoksilen krist (Hematoxylin crystals) (Merck, 70225752)
- Potasyum alum (Merck, 1.01047.1000)
- Civa (II) oksit [(Mercury (II) oxide red] (Merck, 1.04465.0100)
- %100 Alkol (Merck, 1.00986.2500)

Solüsyonlar

PBS

- Sodyum klorid, NaCl :7,20 g
- Sodyum dihidrojen fosfat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:0,43 g
- Disodyum dihidrojen fosfat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:1,48 g
- Distile su :1000 ml

Tris-EDTA pH 9 solüsyonu

- Tris base :10 mM
- EDTA :1 mM
- Tween 20 :%0,05
- Distile su :1000 ml

pH NaOH ile 9'a ayarlandı.

Hidrojen Peroksit

- Distile su :64 ml

- %35'lik hidrojen peroksit :4 ml

Primer Antikor (IGF-I, IGF-IR)

IGF-I: 1/100

- IGF-I primer antikoru :1ml
- Antikor dilüent solüsyonu :99 ml

IGF-IR: 1/1000

- IGF-I primer antikoru :1ml
- Antikor dilüent solüsyonu :999 ml

Substrat- Kromojen Solüsyonu

- Distile su :5 ml
- Buffer stok solüsyon :2 damla
- DAB substrat reagent :4 damla
- Hidrojen peroksid :2 damla

Schiff Reagent Solüsyonu

- Basic fuksin (fuchsin) :1 g
- Distile su :200 ml
- Anhyrous sodium metabisulfit :2 g
- 1 Normal HCL :20 ml

200 ml sıcak distile suda basic fuksin çözdürülerek 50 °C'ye soğutuldu. Soğuduktan sonra anhyrous sodium metabisulfite ve HCL eklendi. 48 saat karanlıkta tutularak saman sarısı rengini alması sağlandı (Luna ve ark., 1968).

Periodik Asit

- Periodik Asit :0,5 g
- Distile su :100 ml

(Luna ve ark., 1968).

Harris Hematoksilen

- Hematoksilen krist (Hematoxylin crystals) :5 g

- %100 Alkol :50 ml
- Potasyum alum :100 g
- Distile su :1000 ml
- Merkurik oksit [Mercuric oxide (red)] :2,5 g

Hematoksilen alkol içinde; potasyum alum sıcak distile su içinde eritildi. Isıtma işlemi bırakılarak iki solüsyon karıştırıldı ve bu karışımın hemen kaynama noktasına gelmesi sağlandı. Daha sonra karışım ateşten alınıp üzerine yavaşça Merkurik oksit ilave edildi. Su içerisinde menekşe mor rengi alana kadar soğutularak boya hazır hale getirildi (Luna ve ark., 1968).

2.6.2. Yöntem

Deparafinizasyon ve Rehidrasyon

- Ksilen :3 x 5 dakika
- %100 Alkol :2 x 3 dakika
- %96 Alkol :3 dakika
- %80 Alkol :3 dakika
- %70 Alkol : :3 dakika
- %50 Alkol :3 dakika
- Distile Su :2 x 3 dakika

Antijen retrieval (antijenlerin açığa çıkarılması)

Tris-EDTA (pH 9) :20 dakika

Yıkama

- PBS :3 x 5 dakika

Endojen peroksit aktivitesinin giderilmesi

- H₂O₂ (%35) :10 dakika

Yıkama

- PBS :3 x 5 dakika

İnkübasyon

• Normal preparatlara primer antikor, negatif kontrol preparatlarına ise sadece antikor dilüent konuldu. + 4 °C’de 1 gece (16 saat) inkübe edildi.

Yıkama

- PBS :3 x 5 dakika

Sekonder Antikor Uygulaması

- Biotinlenmiş sekonder antikor :10 dakika

Yıkama

- PBS :3 x 5 dakika

Horseradish Peroksidaz Enzim Uygulaması

Streptavidin-HRP :10 dakika

Yıkama

- PBS :3 x 5 dakika

Substrat-Kromojen Uygulaması

- DAB substrat-kromojen solüsyonu :3 dakika

Yıkama

- Distile su :5 dakika

Zıt Boyama

- Periodik asit :10 dakika
- Distile su :5 dakika
- Schiff reagent :30 dakika
- Preparatlar pembe renk olana kadar akarsuda yıkandı
- Harris hemotoksilen :25 saniye
- Çeşme suyu :10 dakika
- Distile su :5 dakika

(Luna ve ark., 1968).

Alkol Serilerinden Geçirilmesi

- % 96 Alkol :2 x 3 dakika
- %100 Alkol :2 x 3 dakika

Ksilen'de Parlatılma

- Ksilen 1 :5 dakika
- Ksilen 2 :10 dakika
- Ksilen 3 :15 dakika

Kapatma

- Boyanan kesitler entellan ile kapatıldı.

2.6.3. Değerlendirme

İmmunohistokimyasal değerlendirme; hedef dokunun boyanıp boyanmamasına, hedef doku yapılarının hangi bölümlerinin boyandığına ve oluşan boyanma yoğunluğuna bakılarak yapıldı. Yapılan değerlendirme iki bağımsız gözlemci tarafından, boyanmama (-), zayıf boyanma (+), orta şiddette boyanama (++) , şiddetli boyanma (+++) özelliklerine göre 0'dan 3'e kadar değerler verildi (Fromowitz ve ark., 1987; Ergin ve ark., 2008).

2.7. Western Blotting

2.7.1. Western Blotting Yönteminde Kullanılan Malzemeler

Ekipmanlar

- pH metre (İnolab WTW pH 720)
- Hassas terazi (Precisa XB 220A)
- Vorteks (Biosan V-32)
- -85⁰C ultra derin dondurucu
- Homojenizatör
- Eliza reader (okuyucu) (Thermo LabSystems Revelation, 4.25)
- 96 well plate (Rotilabo)
- Güç kaynağı (Thermo E.C. Appratus, E.C. 250-90)
- Mini Trans-Blot tank (BioRad,153BR)
- Magnetik karıştırıcı(Biosan, MSH 300)
- Mini Trans-Blot filter paper (BioRad, 1703932)
- Görüntüleme sistemi (DNr Bio-imaging systems, MF-3.2)
- Shaker (Wise Shake, SHO-10)

Kimyasallar

- Tris HCl (Fisher BioReagent, BP153-1)
- NaCl (Merck, 1.06404.1000)
- EDTA (Merck, 1.08418.0100)
- Triton X (MP Biomedicals, LLC 807426)
- Sodyum dodesil sülfat (SDS) (Sigma-Aldrich, L6026)
- Sodyum deoxylcholate (Sigma-Aldrich, D6750)
- Proteaz inhibitör kokteyl (Roche, 11 836 170 001)

- Fosfotaz inhibitör kokteyl (Roche, 04 906 845 001)
- BSA (Santa Cruz Biotechnology, sc:2323)
- Protein assay kit (Bio Rad, 500-0006)
- Tris base (Bio Basic Inc., TB0196)
- HCl (Best Kimyasalları)
- %30 Akrilamid/Bis solüsyon (Bio Rad, 161-0158)
- Amonyum persülfat (APS) (Merck 1.01201.0500)
- Glisin (Bio Basic Inc., GB0235)
- Temed (Merck 1.10732.100)
- Laemli buffer (BioRad, 161-0737)
- B-merkapt ethanol (Sigma, 7154)
- Metanol (Merck, 1.06009.2500)
- Ponceu S (Sigma-Aldrich, P7170)
- Tween 20 (Sigma, P1379)
- Yağsız süt tozu (Santa Cruz Biotechnology, sc:2325)
- Kemilüminesans (BioRad, 170-5070)
- Kaleidoscope prestained standards (BioRad, 161-0324)
- Any kD hazır jel (BioRad 456-1043)

Antikorlar

Primer Antikor

- Rabbit IGF-I (Santa Cruz Biotechnology H-70, sc-9013)
- Rabbit IGF-IR (Santa Cruz Biotechnology C-20, sc-713)
- Mouse monoklonal anti tubulin (Abcam, ab-44928)

Sekonder Antikor

- Goat anti mouse (Abcam, ab-6789)

- Goat anti rabbit (Santa Cruz Biotechnology, sc:2004)

2.7.2. Protein İzolasyonu

Solüsyonlar

Ripa buffer: (50 mM Tris HCl pH: 7.4; 150 mM NaCl; 2 mM ETDA; %1 Triton-X 100; %1 sodyum deoxylcholate; %0.1 SDS)

1litre için:

- 1M Tris HCl pH :7.4 :50 ml
- 4M NaCl :37,5 ml
- 0.5M Etda (titriplex III-) pH: 8.0 :4 ml
- Triton-X 100 :10 ml
- Sodyum deoxylcholate :10 g
- %10 SDS (10 gr SDS 100 ml distile su içerisinde) :10 ml

Solüsyonlar sırası ile karıştırılarak 1000 ml'ye tamamlandı.

Kullanmadan önce her 10 ml'ye birer tablet proteaz inhibitör kokteyl ve fosfataz inhibitör kokteylden ilave edildi.

2.7.2.1.Yöntem

- Örnekler saat camı üzerinde parçalandı.
- Darası alınan tüplere konulan dokular tartıldı.
- Doku ağırlığının 5 katı ripa buffer ilave edildi.
- Dokular 1 saat boyunca 10 dakikada bir vortekslendi.

- Homojenizatör yardımıyla dokular parçalanarak doku lizatları elde edildi.
- +4°C 15000g'de 10 dakika santrifüj yapıldı.
- Elde edilen süpernatantlar tüplere alındı.

2.7.3. Protein Miktarının Belirlenmesi

Protein Assay Kit (protein dye solusyon) kullanılarak protein miktarı “bradford yöntemi” ile belirlendi.

Solüsyonlar

1mg/ml BSA

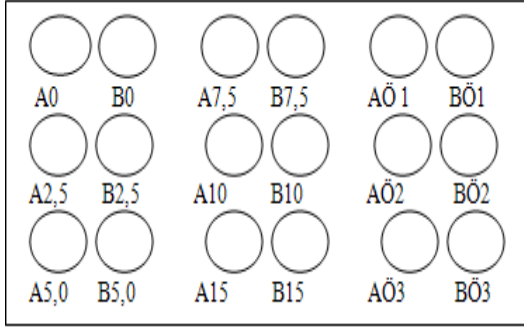
BSA'dan 50 mg tartılıp 37 °C'lik su banyosunda 600 µl distile suda çözdürüldü ve 1ml (1000 µl)'ye tamamlandı. 50 mg/ml stok solusyon'dan 2 µl alınarak üzerine 98 µl distile su eklendi. Böylece 1mg/ml BSA elde edildi.

Protein Assay Kit (Bio Rad)

- Protein Assay Kit :1 ml
- Distile su :4 ml

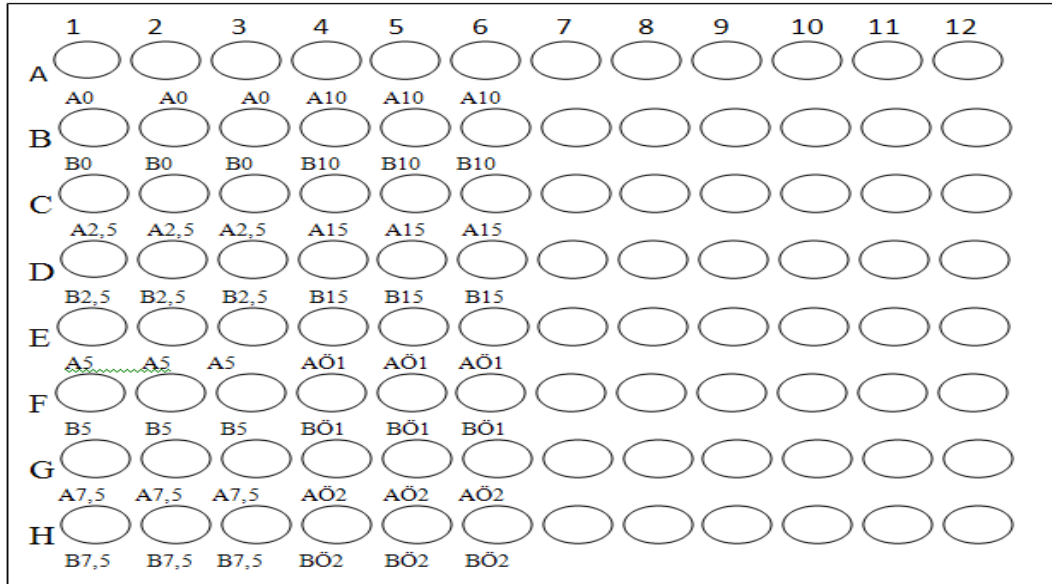
2.7.3.1.Yöntem

Tüm standartlar ve numuneler için A ve B olmak üzere ikişer tüp içine 2 ml Protein Assay Kit + distile su solüsyonundan konuldu. Standart için hazırlanan tüplere 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15 µl 1mg/ml BSA'dan, numuneler için hazırlanan tüplere de 1 µl örnekten ilave edildi. Vortekslenen tüplerden 96 kuyucuklu tabakların kuyucuklarına 200 µl konuldu.



*Ö: Örnek numune

Şekil 2.2. Standartlar ve numunelerin tüp dizaynı



Şekil 2.3. 96 well plate standart ve örnek numune (Ö)'lerin konulması.

96 kuyucuklu plate Eliza okuyucusuna konularak absorbans değerleri 595 nm dalga boyunda okutuldu ve yüklenecek protein miktarları hesaplandı.

2.7.4. Poliakrilamid Jel Elektroforez

2.7.4.1. Jel Hazırlanma

Solüsyonlar

Resolving buffer 1.5 M Tris pH: 8,8

- Tris base (MA:121,14) :90,85 g
- Distile su :500 ml
- HCl ile pH 8,8'e ayarlandı.

Stacking buffer 0.5 M Tris pH: 6,8

- Tris base (MA:121,14) :30,3 g
- Distile su :500 ml
- Konsantre HCl ile pH: 6,8'e ayarlandı.

%10 Amonyum persülfat

- Amonyum persülfat :0,1 g
- Distile su :1 ml

IGF-I için Bio Rad Any kD (Cat No BioRad 456-1043:) hazır jel kullanıldı; IGF-IR için %10'luk jel hazırlandı.

Resolving jel (ayırıştırma jeli)%10

- %30 Bis akrilamid :5,33 ml
- Resolving buffer :4 ml
- Distile su :6,3 ml
- %10 SDS :160 µl
- %10 APS :160 µl
- Temed :16 µl

Stacking jel (Toplama jeli)%4

- %30 Bis akrilamid :1,33 ml
- Resolving buffer :2,5 ml

- Distile su :6,0 ml
- %10 SDS :100 μ l
- %10 APS :100 μ l
- Temed :10 μ l

Jelin Dökülmesi

- Resolving buffer, stacking buffer ve bis akrilamid buzdolabından alınarak çeker ocak altında oda ısısına gelmeleri sağlandı.
- Jel aparatlarının tamamı %70 alkol ile temizlendi.
- Cam plakalar kısa cam önde olacak şekilde ortası delikli raka yerleştirildi.
- Sızıntı olup olmadığı yeşil çizgi hizasına kadar su konarak kontrol edildi.
- Su dökülerek uzaklaştırıldı ve plakalar arası peçete ile kurulandı.
- Vakum altında 125 ml nuche erlenine sırası ile konan aşağıdaki maddeler manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı.
- Resolving jel yeşil çizgi hizasına kadar cam plakalar arasına döküldü ve üzeri distile su ile tamamlandı. Resolving jel donduktan (yaklaşık 1-1,5 saat) sonra distile su dökülerek uzaklaştırıldı. Resolving jelin üzerine stacking jel küçük cam hizasına kadar döküldü ve ardından tarak yerleştirildi ve jelin donması beklendi.

2.7.4.2. Jel Elektroforez

Stok Solüsyon

Running buffer 10X

- Tris :15 g
- Glisin :72 g
- Distile su :500 ml

Çalışma Solüsyonları

Running buffer 1X

- 10X running buffer :100 ml
- %10 SDS :10 ml
- Distile su :890 ml

2X Laemli Buffer

- 2X sample buffer :950 µl
- B-merkapto ethanol :50 µl

Jelde Koşurma

- Bir ependorf tüp içine hesaplanan miktarlarda örnekler ve 2X laemli buffer 1:1 oranında dilue edildi.
- Vortekslenen örnekler 1,5 dakika kaynayan suda tutuldu.
- Jel kutusuna yerleştirilen jel (kısa cam plaka arkada kalacak şekilde) ile buffer damın orta kısmı runnig buffer ile doldurularak sızıntı olup olmağı kontrol edildi.
- Taraklar jelden uzaklaştırılarak tekrar vortekslenen örnekler jele yüklendi.
- İlk kuyucuğa 7 µl ladder konuldu.
- Jel kutusunun jel dışındaki boşluğuna da bir miktar running buffer ilave edildi.
- 175 volt ve 400 mA (constant)'da vertikal elektroforezde koşturuldu.
- Proteinler (bantlar) alttaki yeşil çizgiye ulaşınca, elektroforez sonlandırıldı.

2.7.5. Transfer

Stok Solüsyon

Towbin buffer 10X (15 mM Tris, 92 mM glisin. %20 metanol) pH: 8,2

- Tris base :30,3 g
- Glisin :144 g
- Distile su :900 ml

Çalışma Solüsyonu

Towbin buffer 1X 350mA (constant 100V) 60 dakika (BioRad)

- Towbin buffer 10X :100 ml
- Metanol :200ml
- Distile su :700 ml

2.7.5.1.Yöntem

- Sandviç hazırlandı, siyah kısım üzerine sırasıyla
 - Transfer buffer ile ıslatılmış sünger
 - Transfer buffer filtre kağıdı
 - Jel
 - Metanol ve transfer buffer ile ıslatılmış PVDF membran [küçük proteinler (15kd ve altı) için 0.2 μ 0.45 μ PVDF membran kullanıldı]
 - Transfer buffer filtre kağıdı
 - Transfer buffer ile ıslatılmış sünger yerleştirildi.
- Blotlama tankına sandviç siyah kısım siyaha gelecek şekilde konuldu.
- Tank su dolu kaba alınarak su içine buz aküleri konuldu.
- 1X transfer buffer'da 1,5 saat 400 mA'da blotlama işlemi yapıldı.

2.7.6. Yıkama

Yıkama solüsyonları

10X TBS

- Tris :12,114 g
- NaCl :43,83 g
- Distile su :500 ml

pH:7.2 (HCl ile ayarla)

TBS-T

- 10X TBS :100 ml
- Tween 20 :5 ml
- Distile su :895 ml

Blotlama sonrasında ve sonraki tüm aşamalar arasında membran yıkandı.

- TBS-T :3 x 10 dakika

2.7.7. Western Blotting İşaretleme

Solusyonlar

TBS-T +%5 süt tozu

- TBS-T :20 ml
- Süt tozu :1 g

Primer antikolar

- TBS-T +%5 süt tozu içerisinde (IGF-I ve IGF-IR) :1/500

Sekonder antikor

- PBS içerisinde :1/1000
- İşaretleme

- Primer antikor (+ 4 °C'de) :1 gece
- TBS-T :3 x 10 dakika
- Sekonder antikor :2 saat
- TBS-T :3 x 10 dakika

2.7.8.Görüntüleme

Kemilüminesans

- Önerilen şekilde A ve B solüsyonundan eşit oranda karıştırıldı.
- Kemilüminesans bir kap içerisinde membranın üst yüzeyine dökülüp 5 dakika karanlıkta bekletildi.
- Görüntüleme sisteminde görüntü elde edildi.

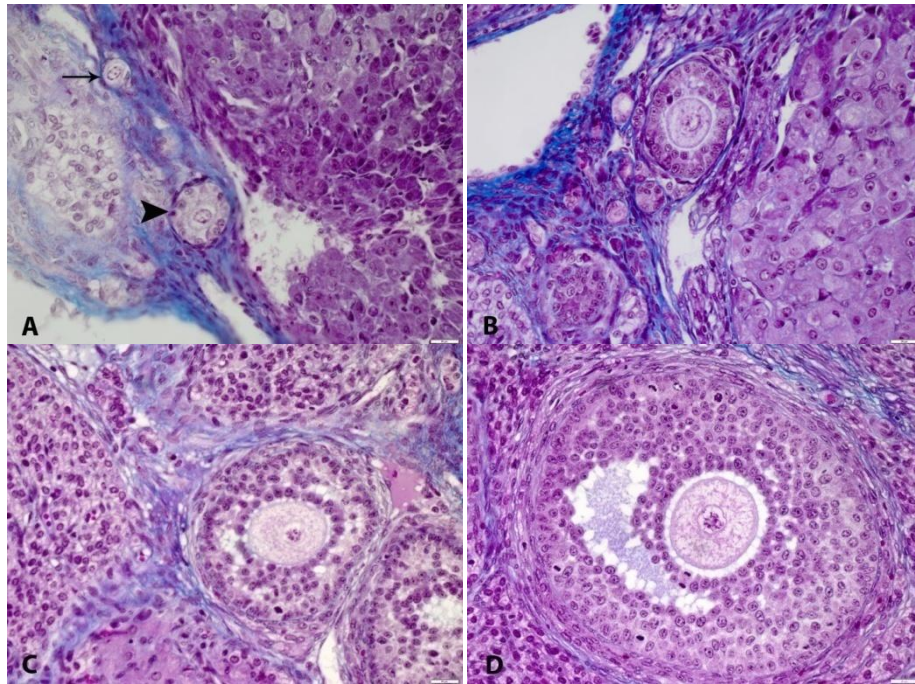
2.8. İstatistiksel Analiz

Folikül sayımı, immunohistokimya ve western blotting değerlendirme sonucunda elde edilen verilerin ortalama ve standart hata değerleri bulunarak gruplar arasındaki farklılıkların istatistiksel açıdan önem gösterip göstermediği belirlendi. Kontrol ve deney gruplarının verileri non-parametrik Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. Folikül sayıları ile granuloza hücrelerindeki IGF-I ve IGF-IR ekspresyonları arasındaki korelasyonun belirlenmesi amacıyla Spearman'nın rho korelasyon analizi yapıldı. Güven düzeyini göstermede $p < 0.05$ için *, $p > 0,001$ ** simgeleri kullanıldı. Çalışmanın istatistiksel analizleri SPSS 13.0 (Statistical Package For Social Sciences) programı kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. Folikül Kompozisyonu

Üçlü boyama ile boyanan ovaryum kesitlerinde tek katlı yassı pregranuloza hücreleri (bir tane kübik granuloza hücresi içerenler de dahil) ile çevrili bir primer ovositten oluşan **primordiyal foliküller**, tek katlı, iki veya daha fazla kübik folikül epitel hücreleri ile sarılmış primer ovositten oluşan **primer foliküller**, iki yada üç katlı kübik granuloza hücreleri ile kuşatılmış primer ovosit içeren **sekonder foliküller**, 4 yada daha fazla katlı granuloza hücreleri ile çevrili primer ovositten oluşan ve antrumun henüz şekillenmediği ya da granuloza hücreleri arasında küçük aralıkların görüldüğü **preantral foliküller**, çok katlı granuloza hücreleri ile kuşatılmış primer ovosit içeren ve antrumun şekillendiği **antral foliküller** gözlemlendi (şekil 3.1).



Şekil 3.1. Foliküllerin sınıflandırılması; A primordiyal (ok) ve primer foliküller (ok başı), B sekonder folikül, C preantral folikül, D antral folikül, (üçlü boyama), 1 bar=20 mikron.

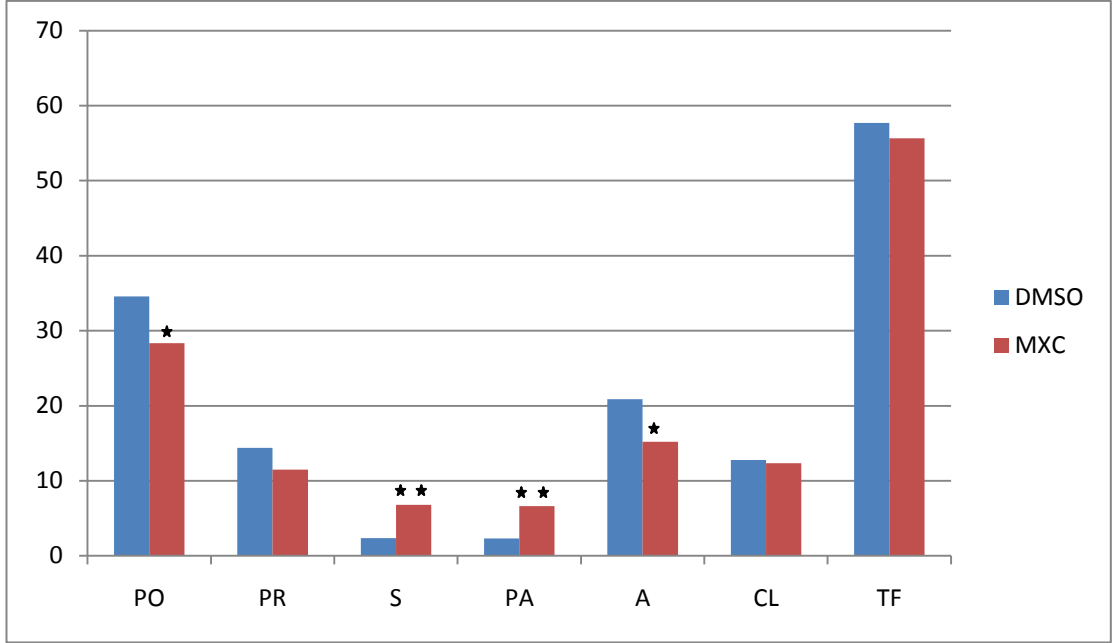
3.2. MXC'nin Folikül Kompozisyonu Üzerine Etkisi

Çalışmamızda foliküler kompozisyon incelendiğinde deney (MXC) grubunda, kontrole (DMSO) göre primordiyal (PO) ve primer (PR) folikül sayısında azalma gözlemlendi. Primordiyal folikül sayısında azalma $p<0,05$ düzeyinde önemli iken, primer folikülde istatistiki açıdan bir önem belirlenmedi. Deney grubunda sekonder (S) ve preantal folikül (PA) sayısında artış ($p<0,01$) saptanırken; antral folikül (A) sayısında ise azalma ($p<0,05$) gözlemlendi. Bunun yanında korpus luteum (CL) ve toplam folikül (TF) sayılarında gruplar arasında önem saptanmadı (Tablo 3.1, Grafik 3.1).

Tablo 3.1. Deney ve kontrol gruplarında foliküler kompozisyon

Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	p
PO	Deney	6	28,36±2,26	0,039*
	Kontrol	6	34,59±1,81	
PR	Deney	6	11,21±1,25	0,059
	Kontrol	6	14,62±1,22	
S	Deney	6	6,81±1,01	0,000**
	Kontrol	6	2,39±0,37	
PA	Deney	6	6,64±0,72	0,000**
	Kontrol	6	2,31±2,28	
A	Deney	6	15,21±1,53	0,012*
	Kontrol	6	20,89±1,50	
CL	Deney	6	12,36±0,93	0,757
	Kontrol	6	12,77±0,94	
TF	Deney	6	55,67±3,78	0,712
	Kontrol	6	57,70±3,96	

* $p<0,05$ ** $p<0,01$



*p<0,05 **p<0,01

Grafik 3.1. Deney ve kontrol gruplarındaki folikül sayıları

3.3. MXC'nin IGF-I Sistemi Üzerine Etkisi

3.3.1. İmmünohistokimyasal Bulgular

IGF-I

Yaptığımız çalışmada IGF-I, ovositler (O)'de zayıf ile şiddetli arasında değişen bir reaksiyon gösterdi. Primordiyal (Şekil 3.4, 3.6) ve antral (Şekil 3.16, 3.18) foliküllerin ovositlerinde zayıf ile orta şiddet arasında değişen bir ekspresyon varken, primer (Şekil 3.4, 3.6), sekonder (Şekil 3.8, 3.10) ve preantral (Şekil 3.12, 3.14) foliküllerin ovositlerinde orta ile şiddetli arasında değişen bir reaksiyon belirlendi. Kontrol ve deney grupları arasında ovosit IGF-I ekspresyonu yönünden fark saptanmadı (Tablo 3.2; Grafik 3.2). Kontrol (Şekil 3.4, 3.8, 3.12, 3.16) ve deney (Şekil 3.6, 3.10, 3.14, 3.18) gruplarının granuloza (G) hücrelerinde ise negatif ve zayıf arasında değişen bir reaksiyon belirlendi. Kontrol ile karşılaştırıldığında deney

grubunda sadece preantral (Şekil 3.12, 3.14) ve antral (Şekil 3.16, 3.18) foliküllerin granuloza hücrelerinde ekspresyon şiddetinde istatistiki olarak önemli bir azalma saptandı ($p<0,05$) (Tablo 3.3; Grafik 3.2). Kontrol (Şekil 3.8, 3.12, 3.16) ve deney (Şekil 3.10, 3.14, 3.18) gruplarının her ikisinde teka internalarda (Tİ) zayıf reaksiyon belirlendi. Gruplar arasında fark saptanmadı (Tablo 3.4; Grafik 3.4). Kontrol (Şekil 3.12, 3.16) ve deney (Şekil 3.14, 3.18) gruplarının teka eksternalarında (TE) ise şiddetli reaksiyon gözlemlendi. Gruplar arasında önem belirlenmedi (Tablo 3.5; Grafik 3.4). Her iki grupta, korpus luteumlarda ve interstisyel hücrelerde orta (Şekil 3.20, 3.22), damar düz kas hücrelerinde ise şiddetli (Şekil 3.24, 3.26) bir reaksiyon gözlemlendi.

Deney ve kontrol gruplarında folikül gelişim aşamaları arasında (PO-PR; PR-S; S-PA; PA-A) IGF-I ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. Hem kontrol hem de deney gruplarında IGF-I ekspresyonu ovositlerde primordiyalden itibaren sekondere doğru artış gösterdi. Sekonder ile preantral folikül arasında ovositin IGF-I ekspresyonu değişmezken, antral folikülde ekspresyonun azaldığı gözlemlendi. Fakat hem kontrol hem de deney gruplarında ovositlerin IGF-I ekspresyonları yönünden farklı folikül aşamaları arasında (PO-PR; PR-S; S-PA; PA-A) istatistiksel bir önem gözlemlenmedi (Grafik 3.3) Granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu kontrol grubunda primordiyal ve primer folikül arasında değişmezken, primer folikülden itibaren antral foliküle doğru giderek artış gösterdi. Deney grubunda foliküler büyüme sürecindeki foliküller arasında IGF-I ekspresyonu doğrusal olmayan bir eğri çizdi. Bu grupta IGF-I ekspresyon düzeyi primordiyal folikülden primer foliküle geçişte azalırken, primer folikül ve sekonder folikül arasında değişmedi. Sekonder folikülden preantral foliküle geçişte azalan IGF-I ekspresyonu antral folikülde artış gösterdi. Bununla birlikte hem kontrol hem de deney gruplarında birbirini takip eden folikül gelişim aşamaları arasında (PO-PR; PR-S; S-PA; PA-A) granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu yönünden istatistiki olarak bir fark saptanmadı (Grafik 3.4).

Tablo 3.2. Deney ve kontrol gruplarının ovositlerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri

Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	p
PO	Deney	6	1,83±0,21	0,803
	Kontrol	6	1,75±0,26	
PR	Deney	6	2,33±0,22	0,610
	Kontrol	6	2,50±0,23	
S	Deney	6	2,83±0,11	0,170
	Kontrol	6	2,58±0,14	
PA	Deney	6	2,83±0,11	0,422
	Kontrol	6	2,58±0,28	
A	Deney	6	1,83±0,27	1,00
	Kontrol	6	1,83±0,30	

Deney ve kontrol gruplarında gelişmekte olan foliküllerin [primordiyal (PO), primer (PR), sekonder (S), preantral (PA) ve antral (A)] ovositlerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri belirlendi. Gruplar arasında fark gözlenmedi.

Tablo 3.3. Deney ve kontrol gruplarının granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri

Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	p
PO	Deney	6	0,50±0,12	0,100
	Kontrol	6	0,25±0,075	
PR	Deney	6	0,33±0,11	0,545
	Kontrol	6	0,25±0,075	
S	Deney	6	0,33±0,14	0,594
	Kontrol	6	0,42±0,06	
PA	Deney	6	0,17±0,11	0,028*
	Kontrol	6	0,50±0,09	
A	Deney	6	0,42±0,10	0,043*
	Kontrol	6	0,75±0,12	

*p<0,05

Deney ve kontrol grupları arasında sadece preantral ve antral foliküllerinin granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyon düzeyinde istatistiki önem saptandı (p<0,05).

Tablo 3.4. Deney ve kontrol gruplarının teka interna hücrelerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri

Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	p
S	Deney	6	0,58±0,16	1,000
	Kontrol	6	0,58±0,10	
PA	Deney	6	0,92±0,10	0,544
	Kontrol	6	1,00±0,09	
A	Deney	6	1,25±0,08	0,157
	Kontrol	6	1,00±0,15	

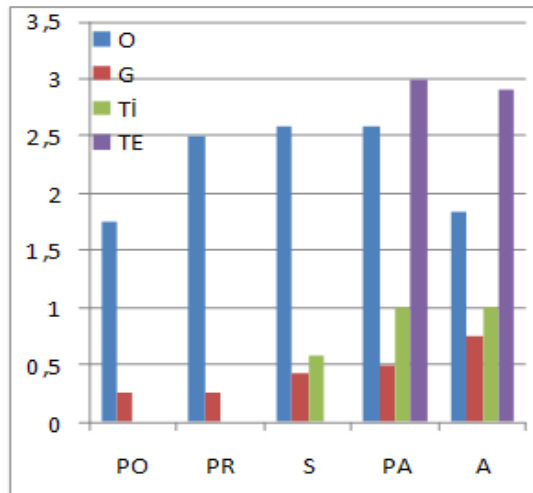
Gruplar arasında teka internada IGF-I ekspresyonu yönünden fark belirlenmedi.

Tablo 3.5. Deney ve kontrol gruplarının teka eksterna hücrelerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri

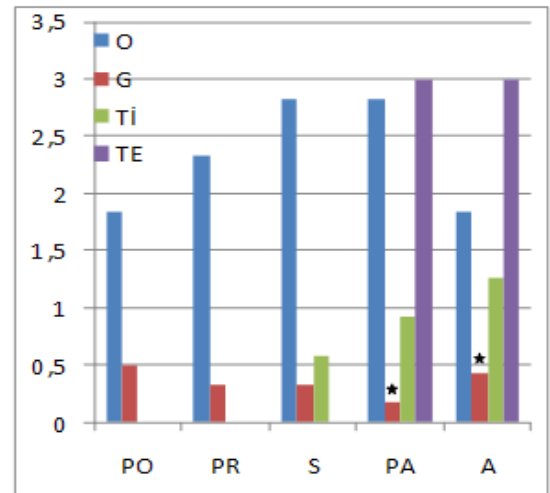
Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	p
PA	Deney	6	3,00±0,00	--
	Kontrol	6	3,00±0,00	
A	Deney	6	3,00±0,00	0,166
	Kontrol	6	2,91±0,56	

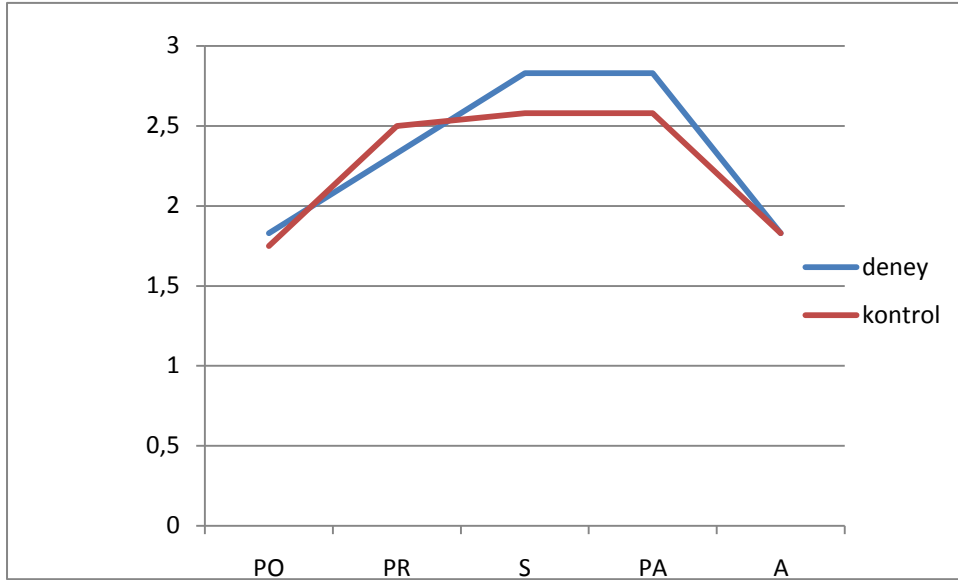
Gruplar arasında teka eksternada IGF-I ekspresyonu bakımından fark gözlenmedi.

K

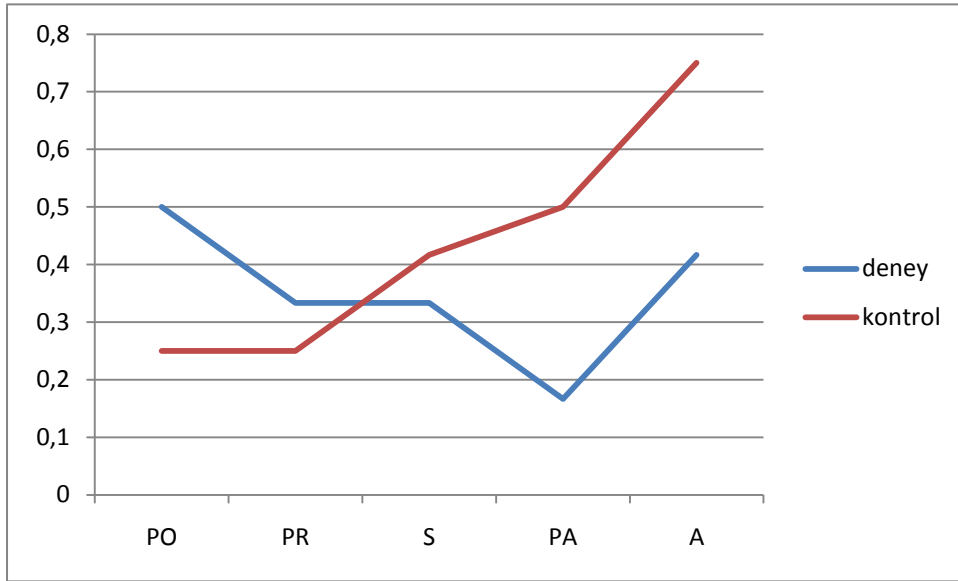


D

**Grafik 3.2.** Kontrol (K) ve deney (D) grubunda, ovaryum foliküllerinde IGF-I ekspresyon düzeyleri belirlendi. 100 mg/kg/gün dozda MXC preantral ve antral foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonunu azalttı (*p<0,05).



Grafik 3.3. Deney ve kontrol gruplarında gelişim sürecindeki foliküllerin ovositleri arasında IGF-I ekspresyon düzeyleri



Grafik 3.4. Deney ve kontrol gruplarında gelişim sürecindeki foliküllerin granuloza hücreleri arasında IGF-I ekspresyon düzeyleri

IGF-IR

Çalışmamızda kontrol ve deney gruplarında IGF-IR ekspresyonu primordiyal, primer (Şekil 3.5, 3.7) ve sekonder foliküllerin (Şekil 3.9, 3.11) ovositlerinde zayıf ile orta arasında, preantral folikül (Şekil 3.13, 3.15) ve antral folikülde (Şekil 3.17, 3.19) ise negatif ve zayıf arasında değişen bir şiddette gözlemlendi. Gruplar arasında ovosit IGF-IR ekspresyonu yönünden sadece sekonder folikülde fark belirlendi (Tablo 3.6; Grafik 3.5). Kontrol grubunun primordiyal foliküllerinin granuloza hücrelerinde negatif ile zayıf arasında değişen şiddette bir reaksiyon belirlenirken (Şekil 3.5), deney grubunun primordiyal foliküllerinin granuloza hücrelerinde zayıf ile orta arasında değişen şiddette bir reaksiyon saptandı (Şekil 3.7). Hem kontrol hem de deney gruplarında primer (Şekil 3.5, 3.7) ve sekonder (Şekil 3.9, 3.11) foliküllerin granuloza hücrelerinde zayıf ile orta arasında değişen şiddette bir reaksiyon belirlendi. Preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde deney grubunda orta ile şiddetli (Şekil 3.15), kontrol grubunda ise zayıf ile orta arasında değişen (Şekil 3.13) bir IGF-IR ekspresyonu gözlemlendi. Gruplar incelendiğinde deney grubunda sekonder ve preantral folikülün granuloza hücrelerindeki ekspresyon şiddetindeki artışın istatistiki olarak önemli olduğu saptandı ($p<0,05$) (Tablo 3.7; Grafik 3.5). Her iki grubun antral foliküllerinin granuloza hücrelerinde zayıf ile orta arasında değişen IGF-IR ekspresyonu gözlenirken (Şekil 3.17, 3.19) gruplar arasında istatistiki bir fark saptanmadı (Tablo 3.7; Grafik 3.5). Hem kontrol hem de deney gruplarında sekonder foliküllerin (Şekil 3.9, 3.11) ve preantral (Şekil 3.13, 3.15) foliküllerin teka interna katmanlarında negatif ile zayıf arasında değişen reaksiyon saptanırken, antral folikülün (Şekil 3.17, 3.19) teka internasında ise zayıf ile orta şiddette bir reaksiyon belirlendi. Gruplar arasında istatistiki bir önem gözlenmedi (Tablo 3.8; Grafik 3.5). Tüm gruplarda foliküllerin teka eksterna katmanında ise IGF-IR ekspresyonuna rastlanmadı (Şekil 3.13, 3.15, 3.17, 3.19; Tablo 3.9; Grafik 3.5). Her iki grubun ovaryum kesitlerinde IGF-IR ekspresyonunun şiddeti damar düz kas hücrelerinde zayıf olarak gözlenirken (Şekil 3.25, 3.27), korpus luteumlarda ve interstisiyel hücrelerinde ise IGF-IR ekspresyonunun orta ile şiddetli arasında değiştiği (Şekil 3.21, 3.23) belirlendi. Gruplar arasında istatistiki önem saptanmadı (Tablo 3.11; Grafik 3.8).

Kontrol grubunda folikül gelişim aşamaları arasında (PO-PR; PR-S; S-PA; PA-A) IGF-IR ekspresyon düzeyleri değerlendirildi. Kontrol grubunun ovositlerinde IGF-IR ekspresyonu primordiyalden preantral foliküle doğru azaldı. Antral folikülde ise ovositin IGF-IR ekspresyonunda çok az bir artış gözlemlendi. Fakat kontrol grubunda foliküler aşamalar arasında ovositlerin IGF-IR ekspresyonu yönünden istatistiksel bir önem gözlenmedi (Şekil 3.6). Deney grubunda ise ovositlerin IGF-IR ekspresyonunun düzeyi primordiyal folikülden primer foliküle geçişte azaldı. IGF-IR ekspresyonu sekonder folikülün ovositinde en yüksek seviyeye ulaşırken, preantral foliküle doğru şiddetli bir şekilde azalarak en düşük seviyeye geldi. IGF-IR ekspresyonu antral folikülün ovositinde ise az miktarda arttı. Ovositlerdeki IGF-IR ekspresyonu yönünden deney grubunda sadece sekonder folikül ve preantral folikül arasında fark gözlemlendi ($p<0,01$). Her iki grubun granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu preantral foliküle doğru bir artış gösterdi. Kontrol grubunda preantral folikülden antral foliküle geçişte granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyon düzeyi değişmezken, deney grubunun antral folikülünde granuloza hücrelerinin IGF-IR ekspresyonu azaldı. Her iki grupta granuloza hücre IGF-IR ekspresyonu yönünden folikül gelişim aşamaları arasında fark gözlenmedi (Şekil 3.7).

Tablo 3.6. Deney ve kontrol gruplarının ovositlerinde IGF-IR ekspresyon düzeyleri

Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	p
PO	Deney	6	1,67±0,14	0,754
	Kontrol	6	1,58±0,22	
PR	Deney	6	1,50±0,15	0,152
	Kontrol	6	1,20±0,13	
S	Deney	6	1,75±0,12	0,006*
	Kontrol	6	1,08±0,18	
PA	Deney	6	0,67±0,14	1,000
	Kontrol	6	0,67±0,07	
A	Deney	6	0,33±0,11	0,091
	Kontrol	6	0,70±0,17	

* $p<0,05$

Deney grubunda sekonder folikülün ovositinde IGF-IR ekspresyonu artarken ($p<0,05$), diğer folikül ovositlerinde herhangi bir fark saptanmadı.

Tablo 3.7. Deney ve kontrol gruplarının granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyon düzeyleri

Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	p
PO	Deney	6	1,25±0,14	0,058
	Kontrol	6	0,80±0,17	
PR	Deney	6	1,75±0,12	0,053
	Kontrol	6	1,40±0,12	
S	Deney	6	1,92±0,06	0,012*
	Kontrol	6	1,58±0,10	
PA	Deney	6	2,17±0,11	0,012*
	Kontrol	6	1,67±0,14	
A	Deney	6	1,75±0,21	0,745
	Kontrol	6	1,67±0,14	

*p<0,05

Deney grubunda sekonder ve preantral folikül granuloza hücrelerinde IGF-IR düzeyinde artış belirlendi (p<0,05). Diğer foliküllerin granuloza hücrelerinde fark gözlenmedi.

Tablo 3.8. Deney ve kontrol gruplarının teka interna hücrelerinde IGF-IR ekspresyon düzeyleri

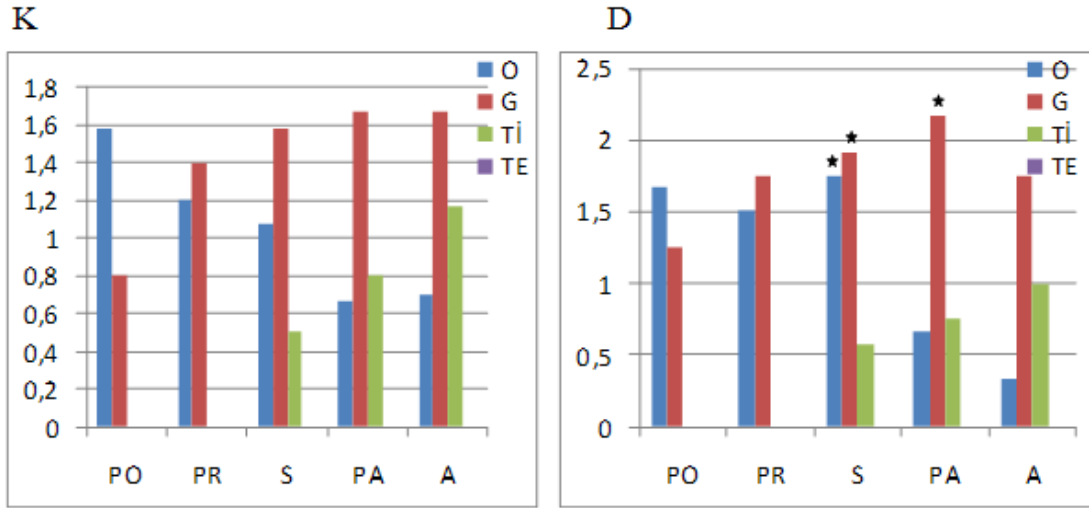
Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	p
S	Deney	6	0,58±0,18	0,728
	Kontrol	6	0,50±0,15	
PA	Deney	6	0,75±0,12	0,727
	Kontrol	6	0,80±0,08	
A	Deney	6	1,00±0,15	0,386
	Kontrol	6	1,17±0,11	

Gruplar arasında teka interna IGF-IR ekspresyonu yönünden fark belirlenmedi.

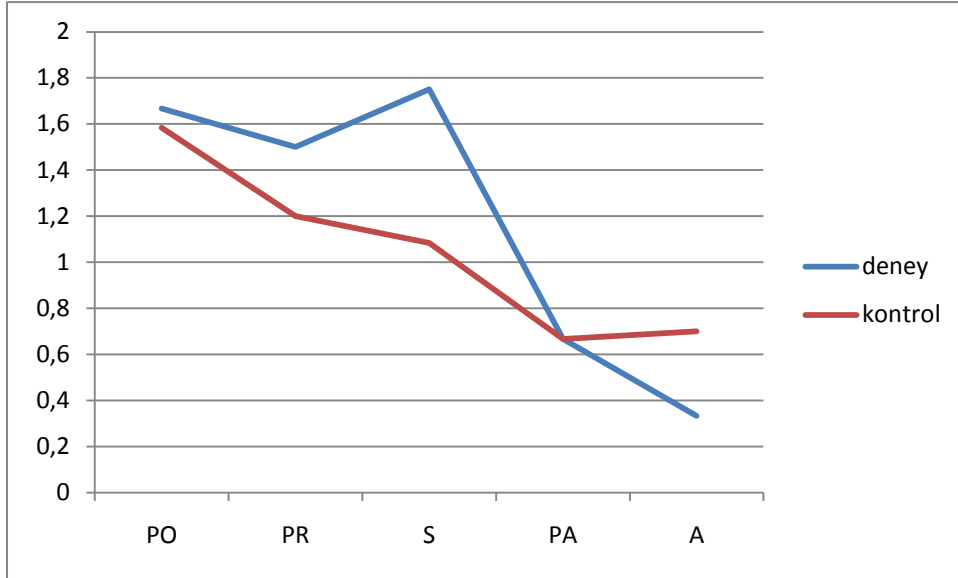
Tablo 3.9. Deney ve kontrol gruplarının teka eksterna hücrelerinde IGF-IR ekspresyon düzeyleri

Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	p
PA	Deney	6	0,00±0,00	--
	Kontrol	6	0,00±0,00	
A	Deney	6	0,00±0,00	--
	Kontrol	6	0,00±0,00	

Gruplar arasında teka eksterna IGF-IR ekspresyonu bakımından fark gözlenmedi.

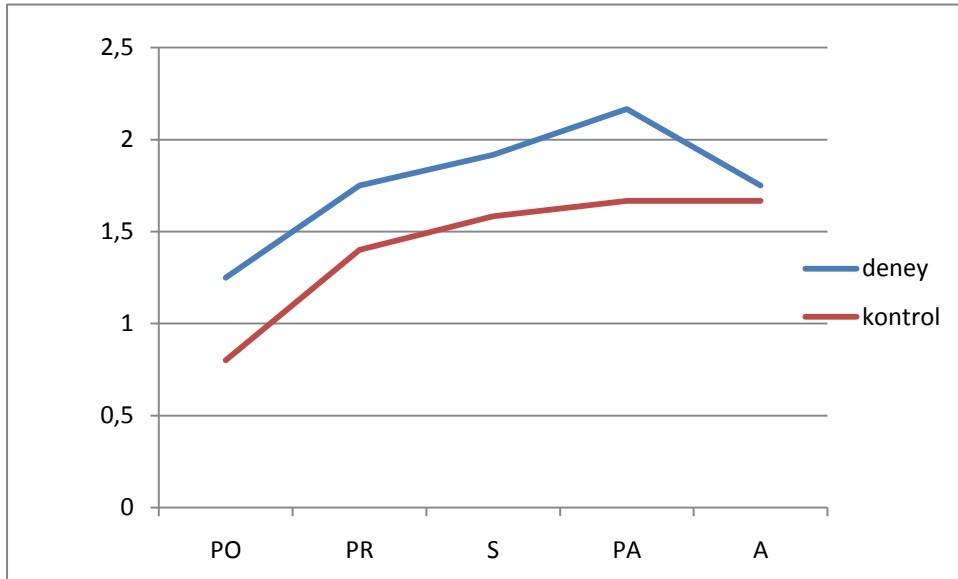


Grafik 3.5. Kontrol (K) ve deney (D) grubunda, ovaryum foliküllerinde IGF-IR ekspresyon düzeyleri belirlendi. Sekonder folikülün ovosit ve granuloza hücreleri ile preantral folikülün granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyon düzeylerinde * $p < 0,05$ düzeyinde bir artış saptandı.



Deney grubu S-PA $p < 0,01$

Grafik 3.6. Deney ve kontrol gruplarında gelişmekte olan foliküllerin ovositleri arasında IGF-IR ekspresyon düzeyleri



Grafik 3.7. Deney ve kontrol gruplarında gelişim sürecindeki foliküllerin granuloza hücreleri arasında IGF-IR ekspresyon düzeyleri

3.3.2. Folikül Sayıları ile İmmunohistokimyasal Veriler Arasında Korelasyon Analizi

Deney ve kontrol gruplarında IGF-I ve IGF-IR ekspresyon düzeyleri ile ovaryum folikül sayıları arasındaki korelasyon Spearman'ın rho korelasyon analizi ile belirlendi. Kontrol grubunda preantral folikül sayıları ile preantral folikülün granuloza hücrelerinde eksprese olan IGF-I arasında negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon tespit edildi ($r = -0,828$; $p < 0,05$). Deney grubunda ise preantral folikülün sayısı ile bu folikülün granuloza hücrelerinde eksprese olan IGF-I arasında da negatif yönde istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptandı ($r = -0,913$; $p < 0,01$).

Tablo 3.10. Deney ve kontrol gruplarında granuloza hücrelerindeki IGF-I ve IGF-IR ekspresyonları ile folikül sayıları arasındaki korelasyon analizi

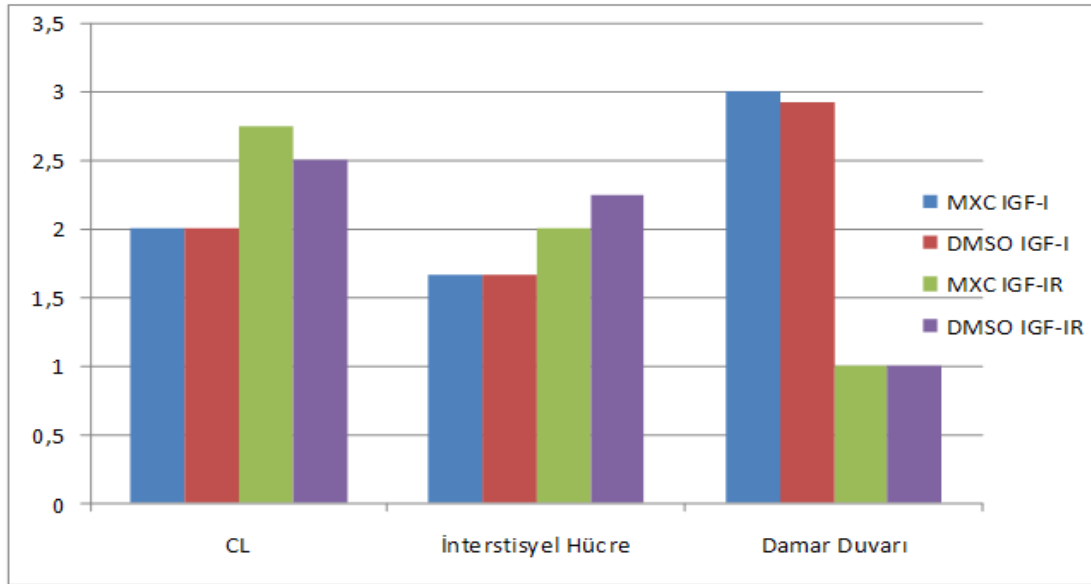
Gruplar	Folikül Safhası	Değişkenler	Korelasyon Katsayısı	p	N	
Kontrol	PO	Folikül Sayısı- IGF I	-0,239	0,648	6	
		Folikül Sayısı-IGF IR	-0,647	0,165	6	
	PR	Folikül Sayısı- IGF I	-0,741	0,092	6	
		Folikül Sayısı-IGF IR	-0,101	0,848	6	
	S	Folikül Sayısı- IGF I	-0,414	0,414	6	
		Folikül Sayısı-IGF IR	-0,393	0,441	6	
	PA	Folikül Sayısı- IGF I	-0,828	0,042*	6	
		Folikül Sayısı-IGF IR	0,131	0,805	6	
	A	Folikül Sayısı- IGF I	0,000	1,000	6	
		Folikül Sayısı-IGF IR	-0,577	0,231	6	
	Deney	PO	Folikül Sayısı- IGF I	-0,144	0,758	6
			Folikül Sayısı-IGF IR	0,205	0,741	6
PR		Folikül Sayısı- IGF I	0,282	0,499	6	
		Folikül Sayısı-IGF IR	-0,821	0,089	6	
S		Folikül Sayısı- IGF I	-0,433	0,244	6	
		Folikül Sayısı-IGF IR	0,299	0,514	6	
PA		Folikül Sayısı- IGF I	-0,913	0,002**	6	
		Folikül Sayısı-IGF IR	-0,030	0,954	6	
A		Folikül Sayısı- IGF I	-0,091	0,815	6	
		Folikül Sayısı-IGF IR	0,247	0,555	6	

*p<0,05 **p<0,01

Tablo 3.11. Deney ve kontrol gruplarının interstisyel hücrelerinde, damar duvarındaki düz kas hücrelerinde ve CL'larda IGF-I ve IGF-IR ekspresyon düzeyleri

Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	p
İnterstisyel hücre, IGF-I	Deney	6	1,67±0,14	1,000
	Kontrol	6	1,67±0,17	
İnterstisyel hücre, IGF-IR	Deney	6	2,00±0,17	,207
	Kontrol	6	2,25±0,08	
Damar duvarı, IGF-I	Deney	6	3,00±0,00	,166
	Kontrol	6	2,92±0,06	
Damar duvarı, IGF-IR	Deney	6	1,00±0,00	--
	Kontrol	6	1,00±0,00	
CL, IGF-I	Deney	6	2,00±0,00	1,000
	Kontrol	6	2,00±0,09	
CL, IGF-IR	Deney	6	2,75±0,12	,152
	Kontrol	6	2,50±0,12	

Gruplar arasında IGF-I ve IGF-IR ekspresyonu bakımından interstisyel hücrelerde, damar duvarındaki düz kas hücrelerinde ve CL'larda fark gözlenmedi.



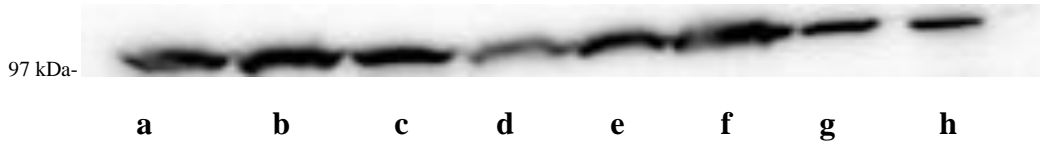
Grafik 3.8. Deney ve kontrol grupları arasında korpüs luteum (CL), interstisyel hücreler ve damar duvarındaki düz kas hücrelerinde IGF-I ve IGF-IR ekspresyonu bakımından herhangi bir fark belirlenmedi.

3.3.3. Westen Blotting Bulguları

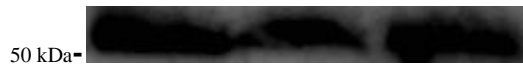
Çalışmamızda Western blotting yönteminde elde edilen veriler sonucunda ovaryumlarda gruplar arasında IGF-IR yönünden fark saptanmadı ($p>0,005$); (tablo 3.12).

Tablo 3.12: Kontrol ve deney gruplarında ovaryumlarında IGF-IR ekspresyonu (WB)

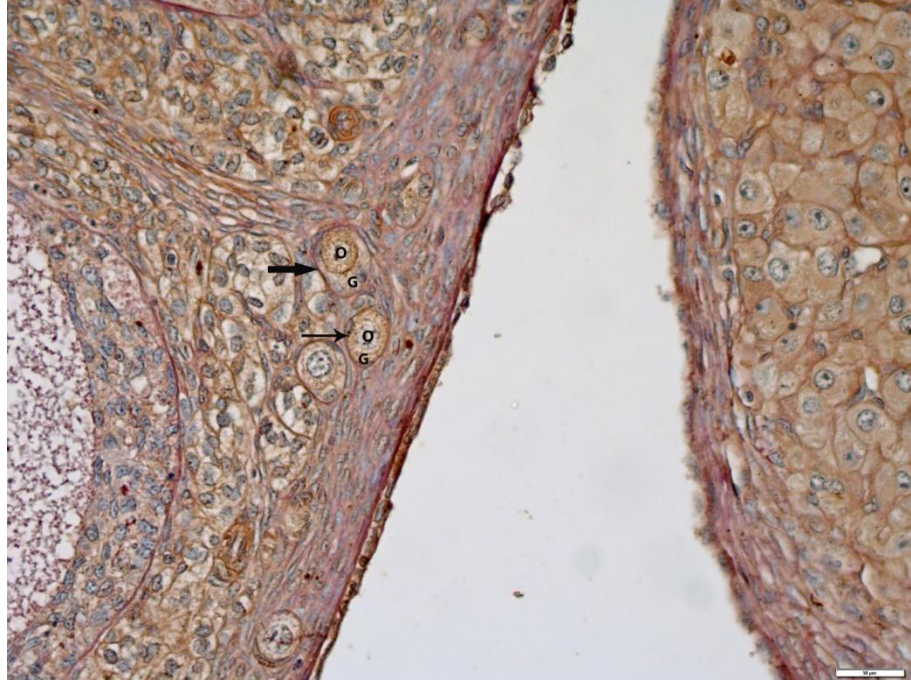
Değişken	Grup	N	Ortalama±S.H.	P
IGF-IR	Deney	4	9486,58±2171,72	,773
	Kontrol	4	11292,74±1072,98	



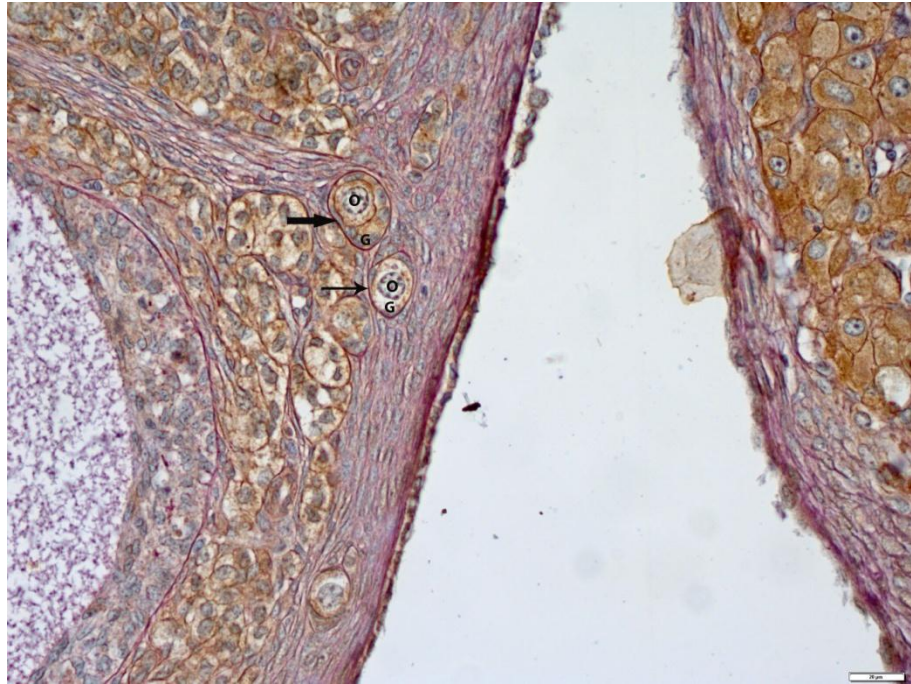
Şekil 3.2. Kontrol ve deney gruplarına ait Western blotting bantları. Kontrol grubu ilk dört bant (a, b, c, d), deney grubu son dört bant (e, f, g, h). Gruplar arasında fark gözlenmedi.



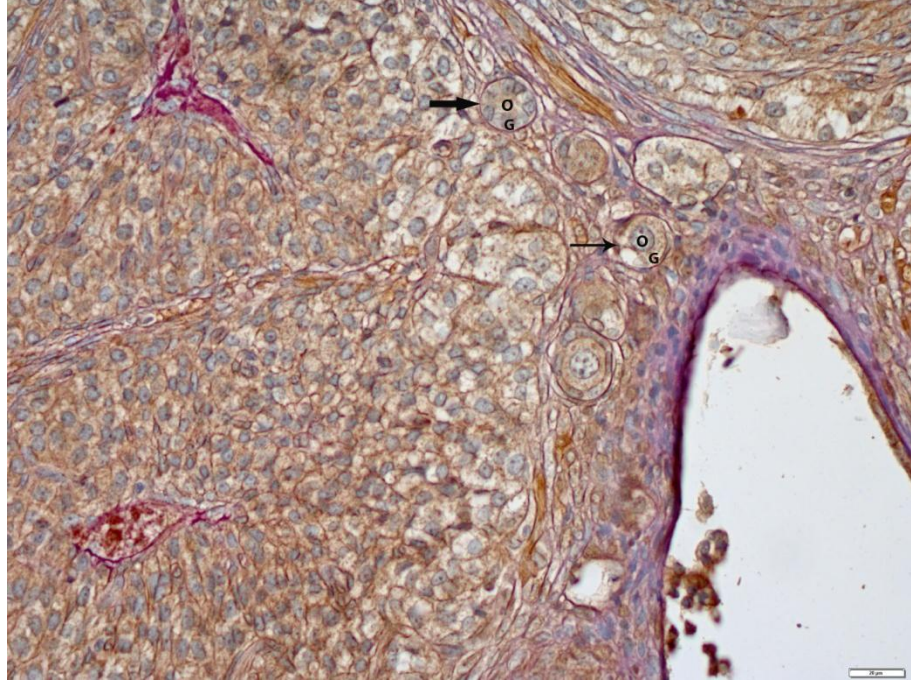
Şekil 3.3. Pozitif kontrol, ovaryum tubulin ekspresyonu



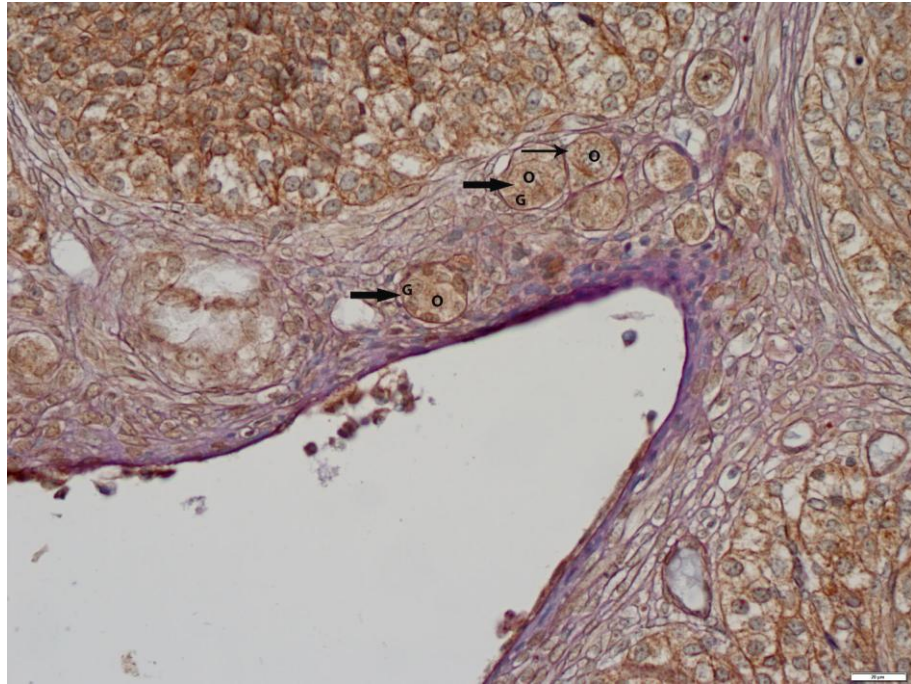
Şekil 3.4. Kontrol grubunda primordiyal (ince ok) ve primer (kalın ok) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücrelerinde (G) IGF-I ekspresyonu (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



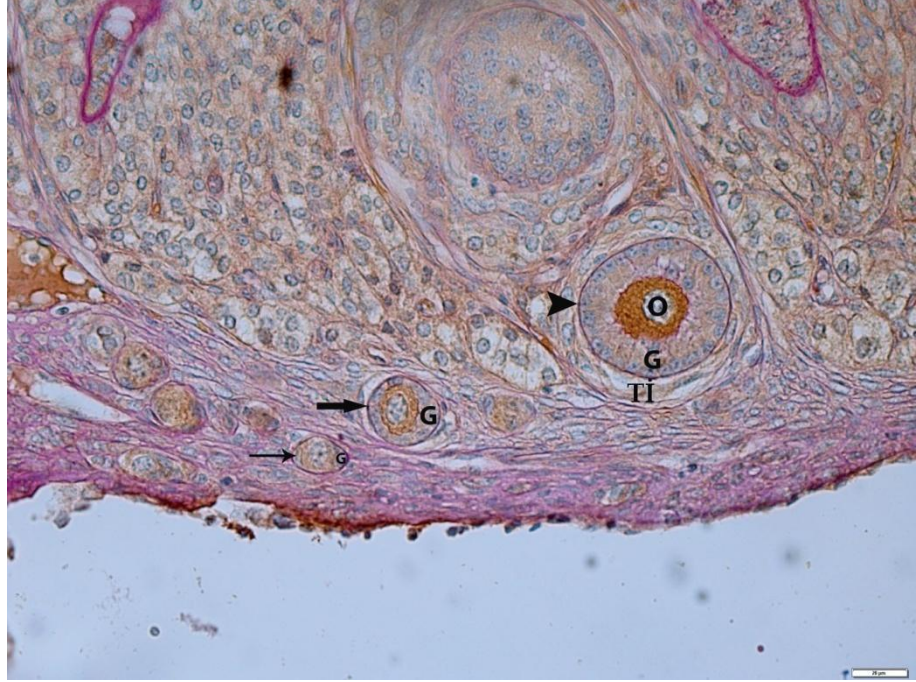
Şekil 3.5. Kontrol grubunda primordiyal (ince ok) ve primer (kalın ok) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücrelerinde (G) IGF-IR ekspresyonu (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



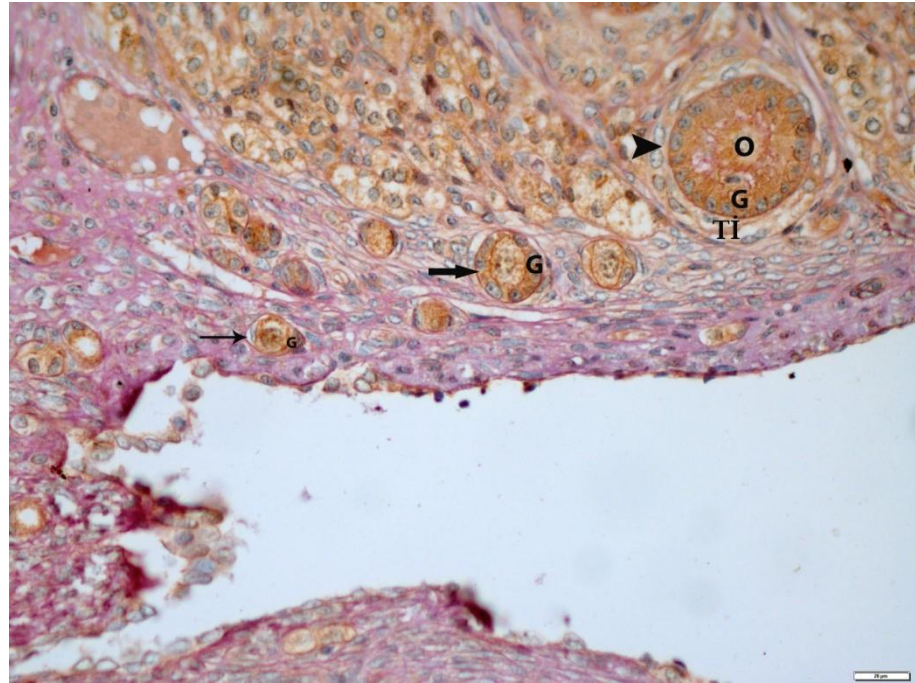
Şekil 3.6. Deney grubunda primordiyal (ince ok) ve primer (kalın ok) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücrelerinde (G) IGF-I ekspresyonu (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



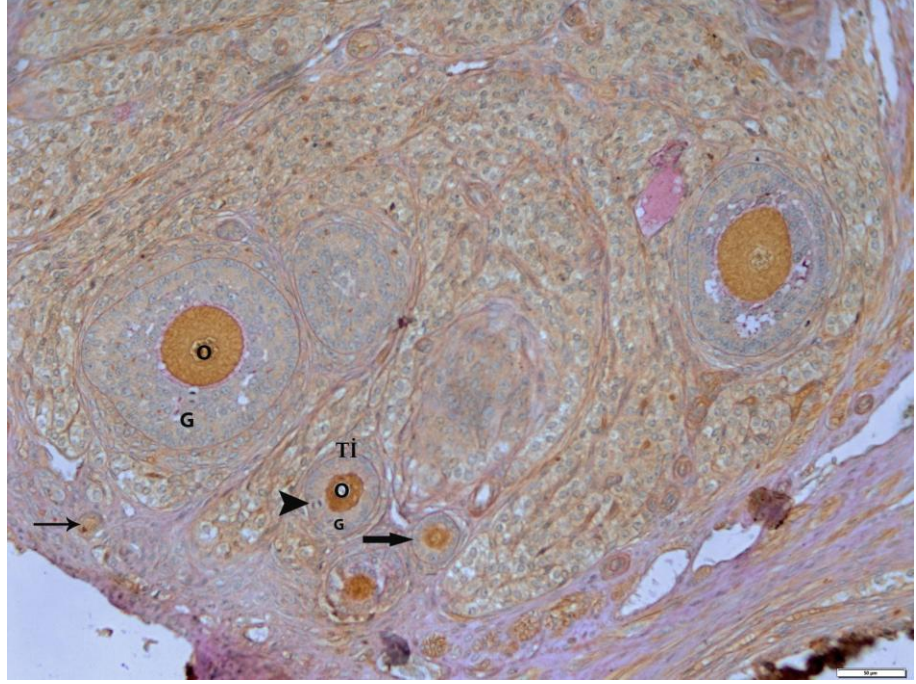
Şekil 3.7. Deney grubunda primordiyal (ince ok) ve primer (kalın ok) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücrelerinde (G) IGF-IR ekspresyonu (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



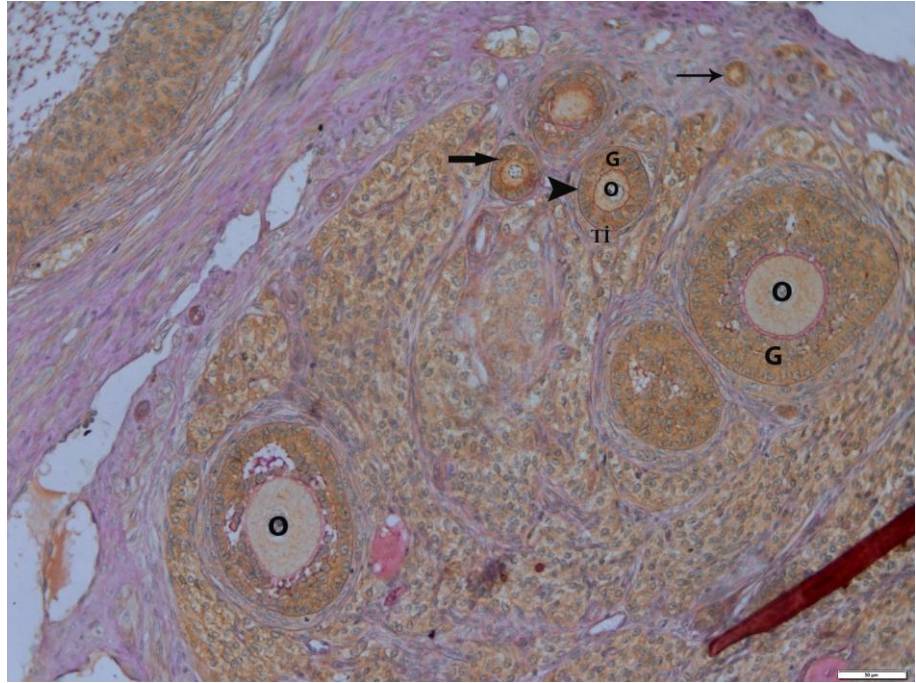
Şekil 3.8. Kontrol grubunda primordiyal (ince ok), primer (kalın ok) ve sekonder (ok başı) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile sekonder folikülün teka internasında IGF-I ekspresyonu (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



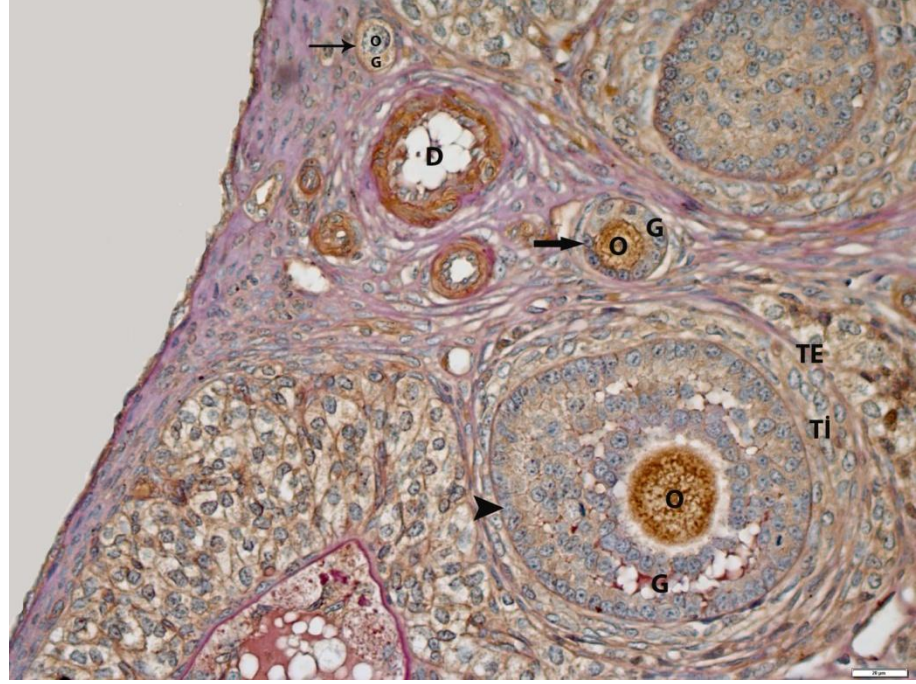
Şekil 3.9. Kontrol grubunda primordiyal (ince ok), primer (kalın ok) ve sekonder (ok başı) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile sekonder folikülün teka internasında IGF-IR ekspresyonu (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



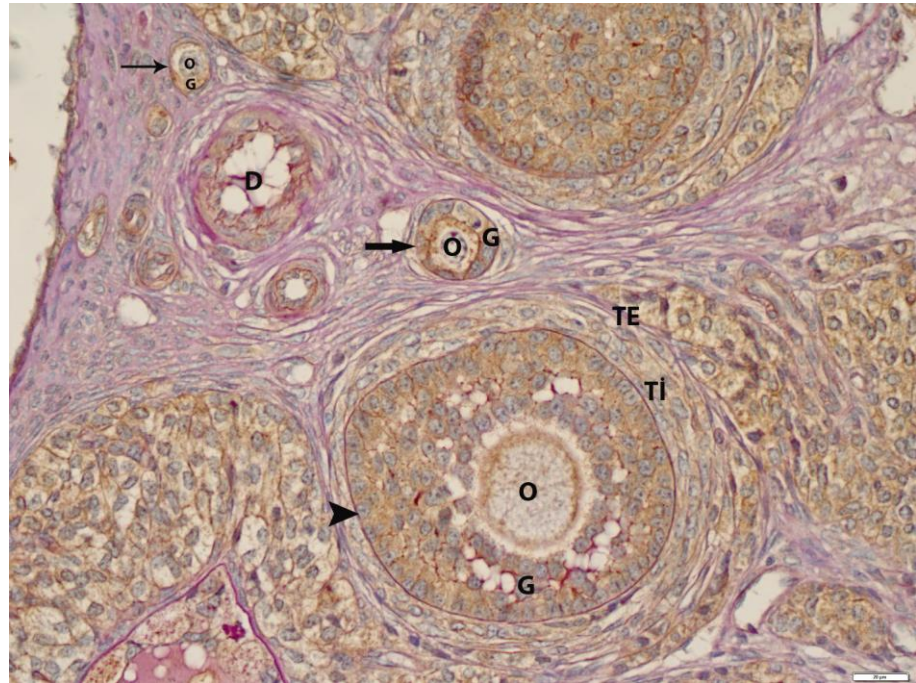
Şekil 3.10. Deney grubunda primordiyal (ince ok), primer (kalın ok) ve sekonder (ok başı) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile sekonder folikülün teka internasında IGF-I ekspresyonu (IHK, PAS-H), 1 bar= 50 mikron.



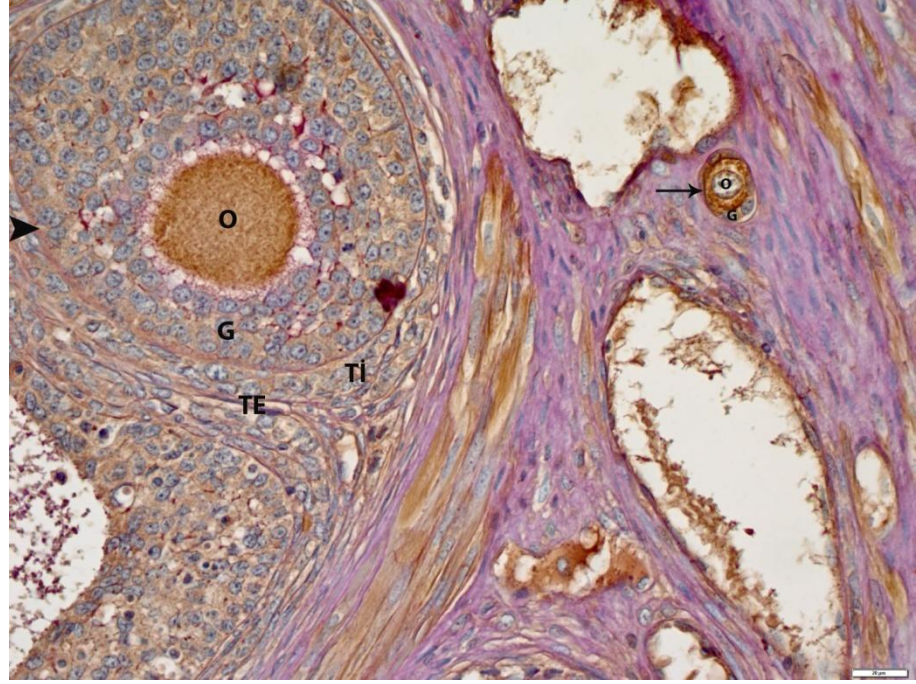
Şekil 3.11. Deney grubunda primordiyal (ince ok), primer (kalın ok) ve sekonder (ok başı) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile sekonder folikülün teka internasında IGF-IR ekspresyonu (IHK, PAS-H), 1 bar= 50 mikron.



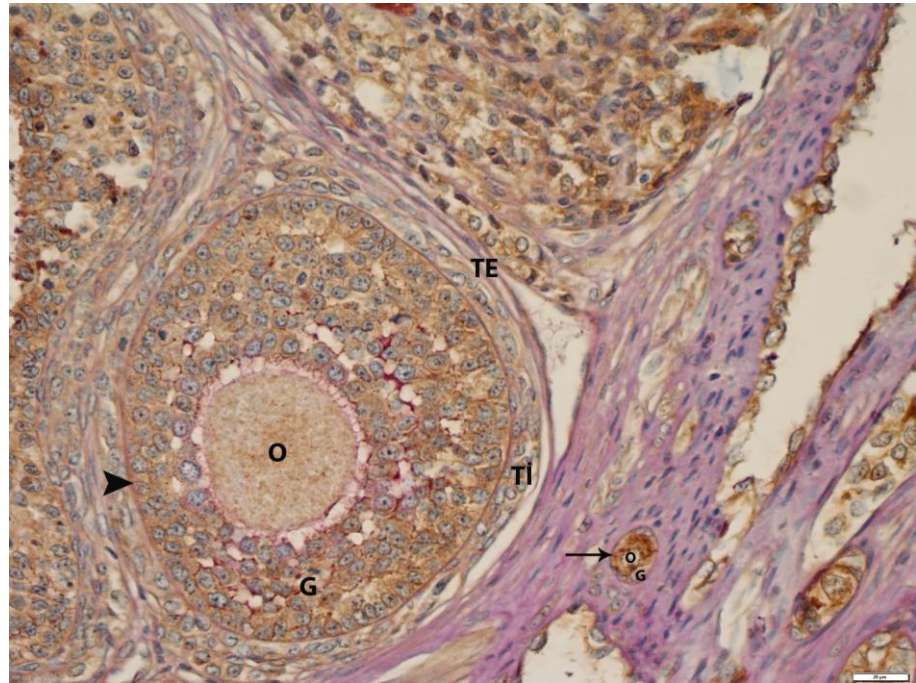
Şekil 3.12. Kontrol grubunda primordiyal (ince ok), primer (kalın ok) ve preantral (ok başı) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile teka interna ve ekstenalarında IGF-I ekspresyonu, damar (D) (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron



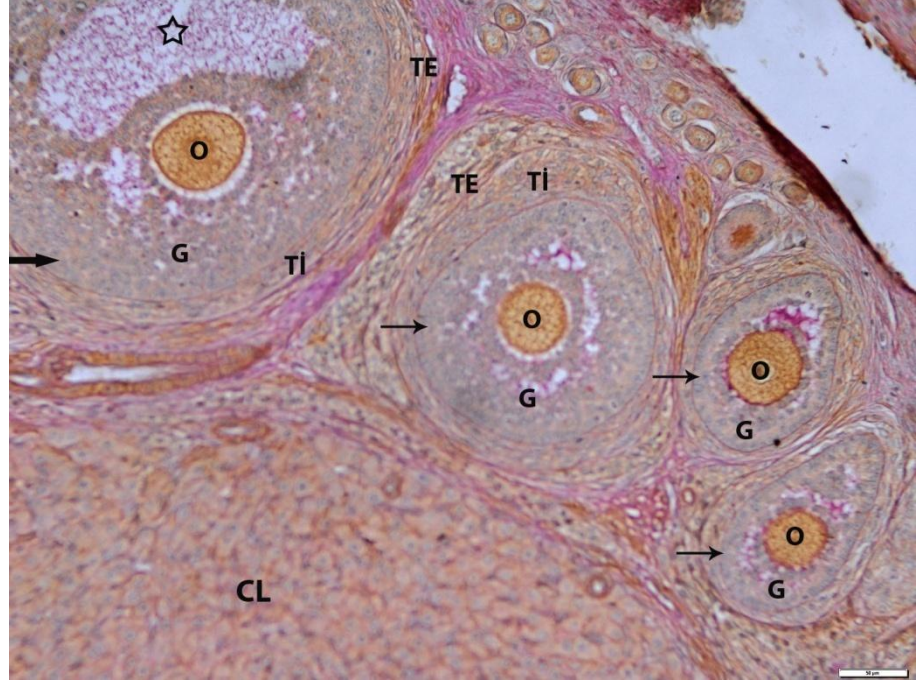
Şekil 3.13. Kontrol grubunda primordiyal (ince ok), primer (kalın ok), ve preantral (ok başı) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile teka interna ve eksternalarında IGF-IR ekspresyonu, damar (D) (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



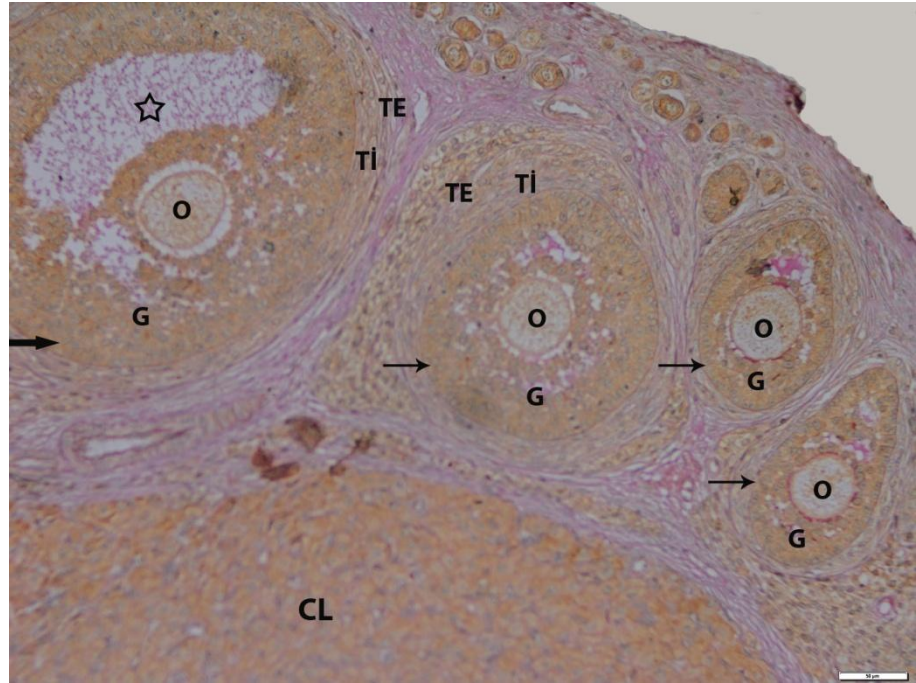
Şekil 3.14. Deney grubunda primordiyal (ince ok) ve preantral (ok başı) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile teka interna ve eksternalarında IGF-I ekspresyonu (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



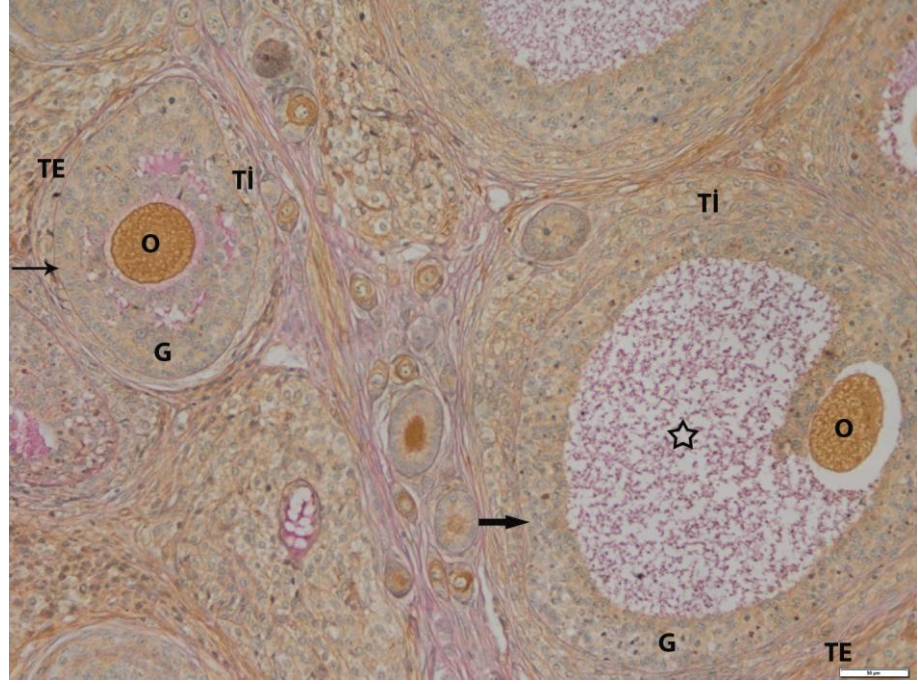
Şekil 3.15. Deney grubunda primordiyal (ince ok) ve preantral (ok başı) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile teka interna ve eksternalarında IGF-IR ekspresyonu (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



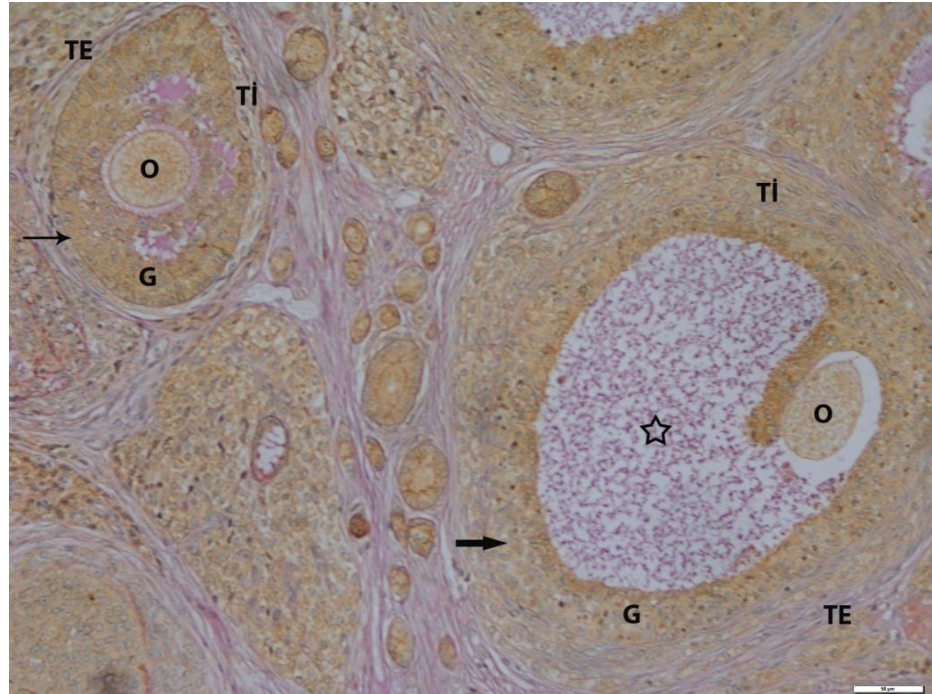
Şekil 3.16. Kontrol grubunda preantral (ince ok) ve antral (kalın ok) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile teka interna ve eksternalarında IGF-I ekspresyonu, antrum (yıldız), korpus luteum (CL), (IHK, PAS-H), 1 bar= 50 mikron.



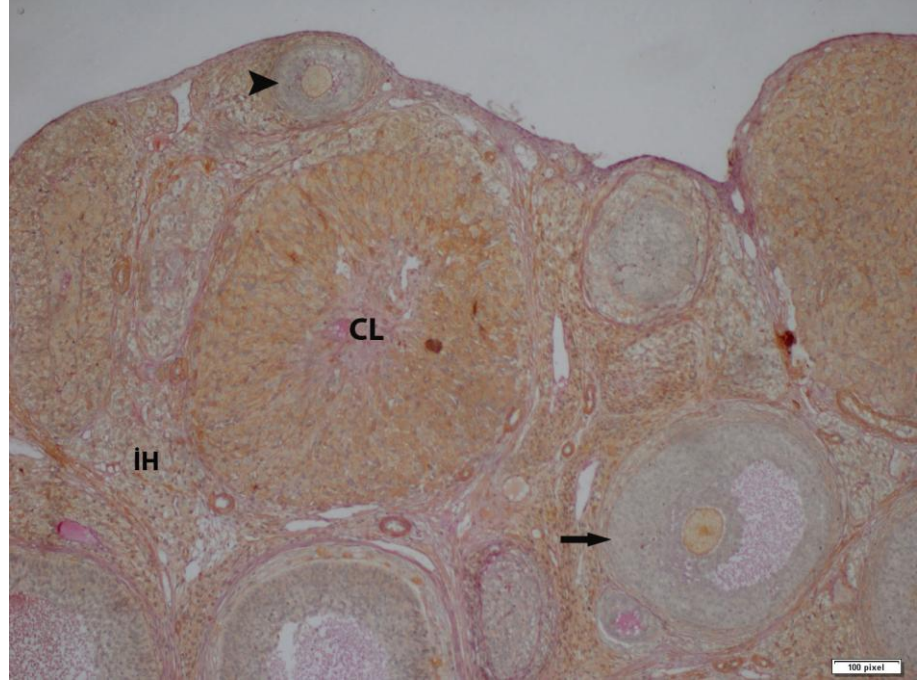
Şekil 3.17. Kontrol grubunda preantral (ince ok) ve antral (kalın ok) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile teka interna ve eksternalarında IGF-IR ekspresyonu, antrum (yıldız), korpus luteum (CL), (IHK, PAS-H), 1 bar= 50 mikron.



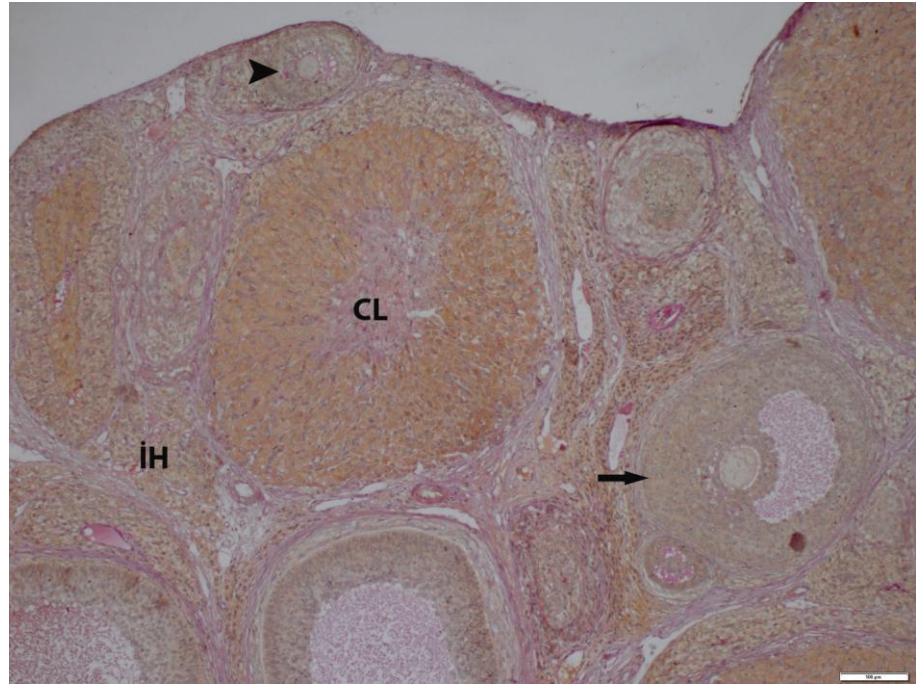
Şekil 3.18. Deney grubunda preantal (ince ok) ve antral (kalın ok) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile teka interna ve eksternalarında IGF-I ekspresyonu, antrum (yıldız), (IHK, PAS-H), 1 bar= 50 mikron.



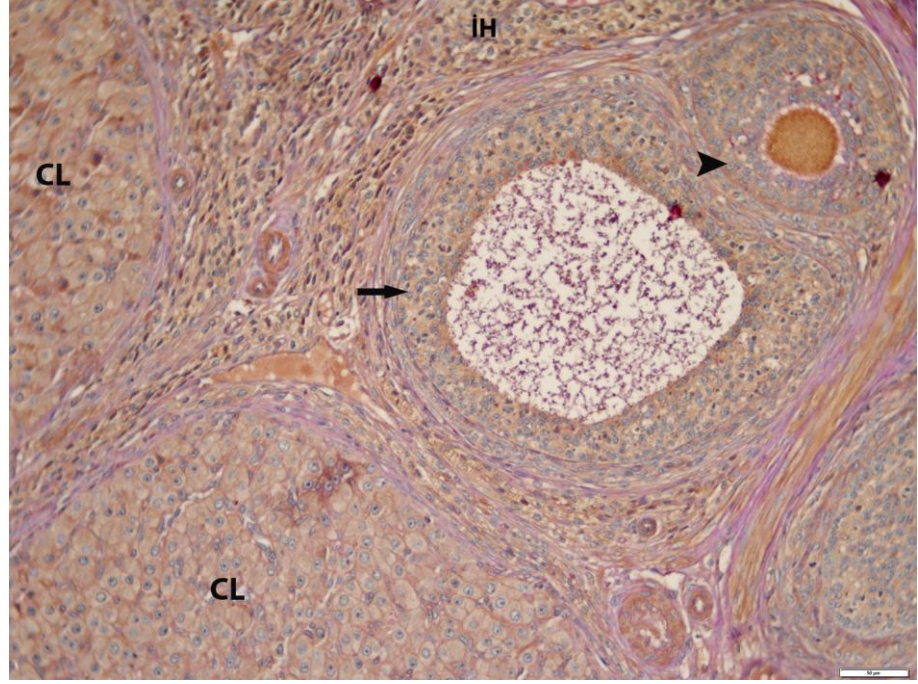
Şekil 3.19. Deney grubunda preantral (ince ok) ve antral (kalın ok) folikülün ovosit (O) ve granuloza hücreleri (G) ile teka interna ve eksternalarında IGF-IR ekspresyonu, antrum (yıldız), (IHK, PAS-H), 1 bar= 50 mikron.



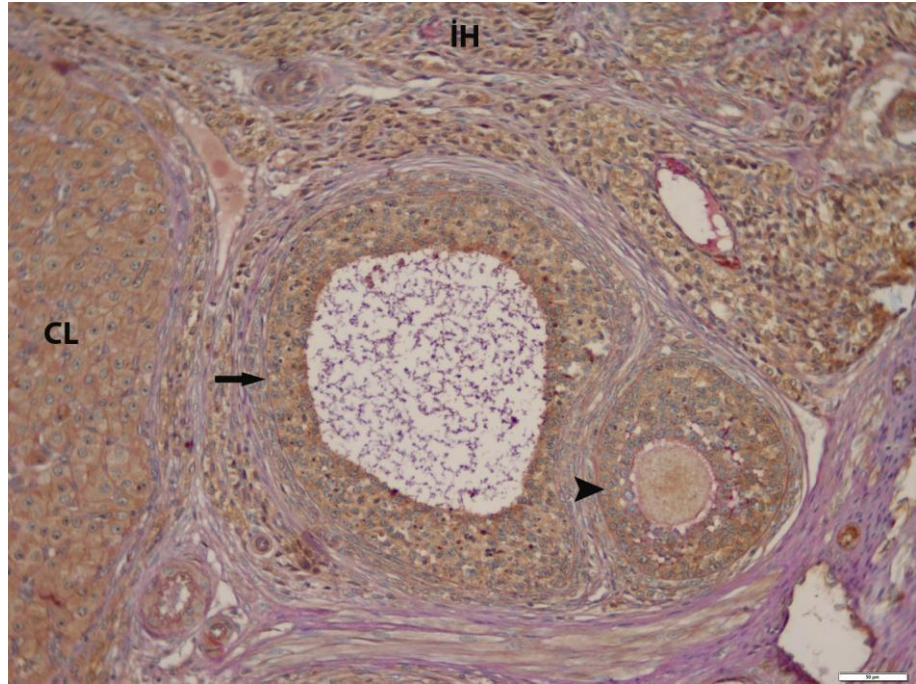
Şekil 3.20. Kontrol grubunda korpus luteum (CL) ve interstisyel hücrelerde (IH) IGF-I ekspresyonu, preantral (ok başı) ve antral (kalın ok) folikül, (IHK, PAS-H), 1 bar= 100 mikron.



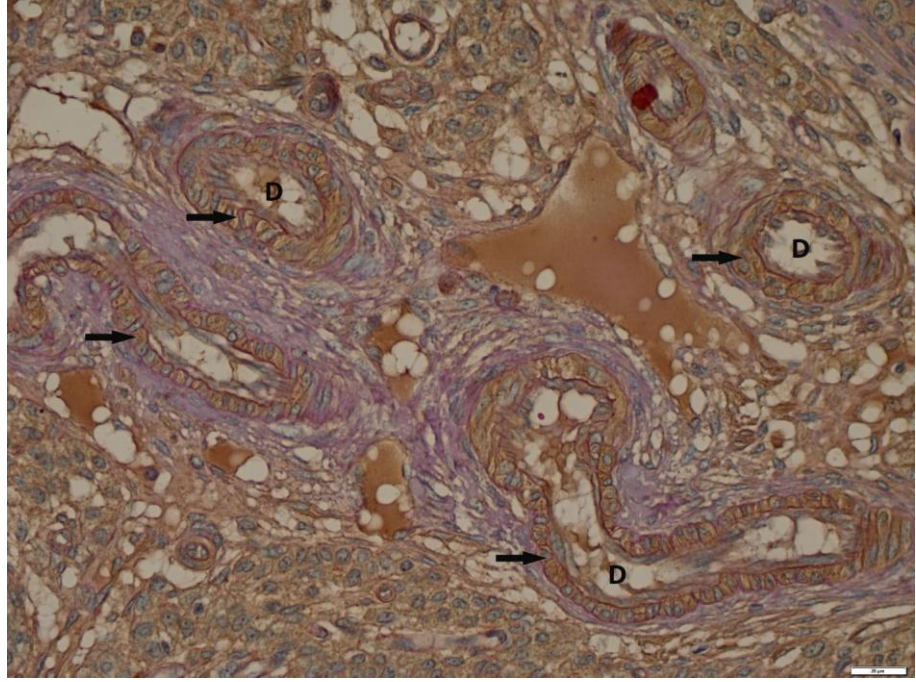
Şekil 3.21. Kontrol grubunda korpus luteum (CL) ve interstisyel hücrelerde (IH) IGF-IR ekspresyonu, preantral (ok başı) ve antral (kalın ok) folikül, (IHK, PAS-H) 1 bar= 100 mikron.



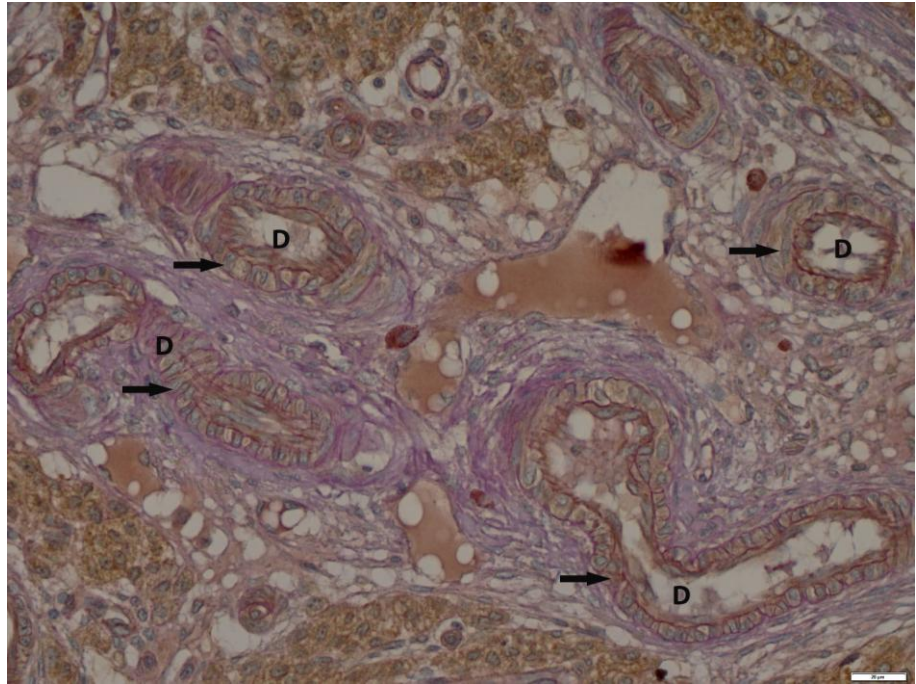
Şekil 3.22. Deney grubunda korpus luteum (CL) ve interstisyel hücrelerde (IH) IGF-I ekspresyonu, preantral (ok başı) ve antral (kalın ok) folikül, (IHK, PAS-H), 1 bar= 50 mikron.



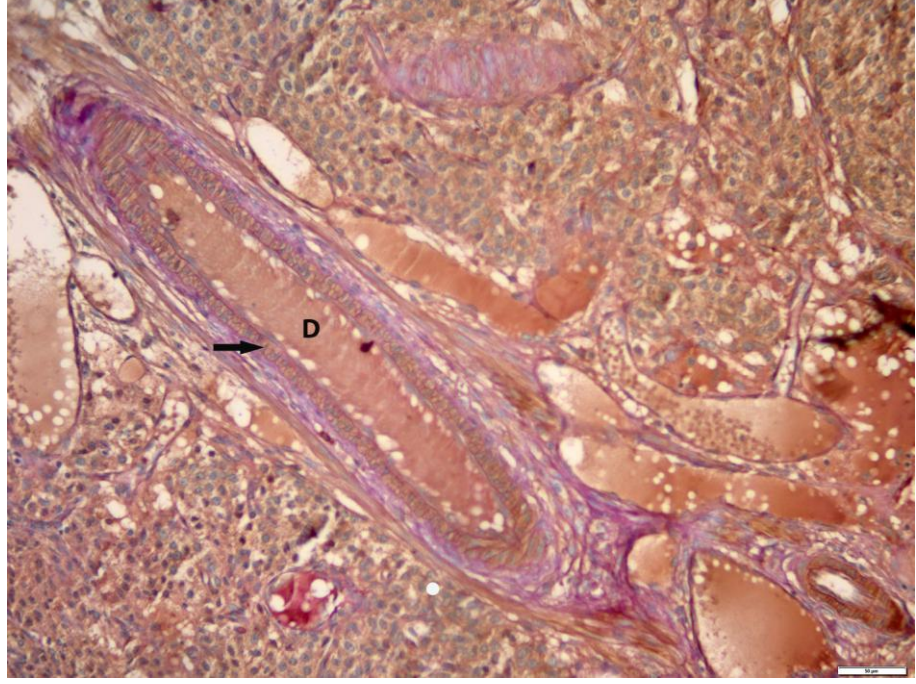
Şekil 3.23. Deney grubunda korpus luteum (CL) ve interstisyel hücrelerde (IH) IGF-IR ekspresyonu, preantral (ok başı) ve antral (kalın ok) folikül, (IHK, PAS-H), 1 bar= 50 mikron.



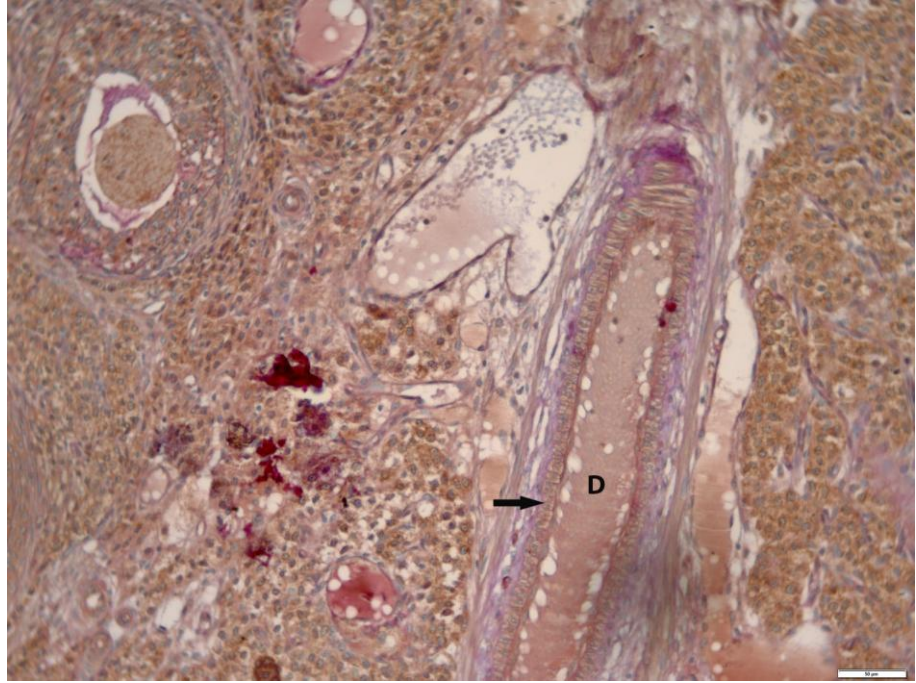
Şekil 3.24. Kontrol grubunda damar (D) düz kas hücrelerinde (ok) IGF-I ekspresyonu, (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



Şekil 3.25. Kontrol grubunda damar (D) düz kas hücrelerinde (ok) IGF-IR ekspresyonu, (IHK, PAS-H), 1 bar= 20 mikron.



Şekil 3.26. Deney grubunda damar (D) düz kas hücrelerinde (ok) IGF-I ekspresyonu, (IHK, PAS-H), 1 bar= 50 mikron.



Şekil 3.27. Deney grubunda damar (D) düz kas hücrelerinde (ok) IGF-IR ekspresyonu, (IHK, PAS-H), 1 bar= 50 mikron.

4.TARTIŞMA

4.1. MXC Uygulaması

MXC'nin östrojenik aktiviteler sergileyen (Hall ve ark., 1997) ftal ve neonatal folikül gelişimini, folikülogenezisi ve yetişkin ovaryum fonksiyonunu etkileyen endokrin bozucu bir pestisit ajan olduğu bilinmektedir (Uzumcu ve Zachow, 2007). Dişi reproduktif sistemi üzerine östrojenik etkili endokrin bozucuların mekanizmasının anlaşılması için yapılan deney hayvan model çalışmalarında MXC ajanının yaygın olarak kullanıldığı görülmektedir.

MXC'nin bildirilen vresel seviyeleri litrede 160 mg MXC ya da 160 ppm (akarsu içerisinde ya da MXC püskürtülen alanlarda)'dir. FDA (Amerila Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi) tarafından rapor edilen günlük ortalama MXC alımı yetişkinlerde 0.1 ng/kg'dır (ATSDR, 2002). Primatlar kemiricilerden daha fazla MXC'ye duyarlıdır (Golub ve ark., 2003, 2004; Gupta ve ark., 2008). Bu da göstermektedir ki insanlar daha büyük bir risk altındadır. Dolayısıyla sıçan, fare gibi kemiricilerde daha yüksek dozlarda gözlenen reproduktif fonksiyon bozuklukları insanlarda daha düşük vresel dozlarda ortaya çıkabilir. Çalışmamızda belirttiğimiz MXC doz uygulaması (100mg/kg/gün) benzer deneysel hayvan çalışmalarında kullanılan MXC doz aralığındadır (Chapin ve ark., 1997; Hall ve ark., 1997; Armenti ve ark., 2008). MXC'nin 100mg/kg/gün olarak uygulanan dozu sıçanlarda yüksek doz olarak belirlenmiştir (Zama ve Uzun, 2009; Sobinoff ve ark., 2010). Yapılan alışmalar bu dozun, ovaryum fonksiyonlarını ve parametrelerini 20 µg/kg/gün (Armenti ve ark., 2008) ile 50 mg/kg/gün (Sobinoff ve ark., 2010) dozlarına göre daha ciddi oranda etkilediğini göstermiştir. Örneğin 100 mg/kg/gün MXC uygulaması, sıçanlarda puberta yaşı ile ilk östrusun ne çekilmesine ve sonrasında düzensiz östrusa neden olur. Ovaryumda gonodotropinlere yanıtı ve ovule olan ovosit sayısını azaltır. Ayrıca hormonal mekanizmayı bozar, progesteron sentezini azaltır ve ERβ, LHR, AMH, P450 gibi ovaryum markırlarının ekspresyonunu

değiştirir (Armenti ve ark., 2008). Bununla birlikte ovaryumda foliküler kompozisyonun değişmesine, foliküllerde atreziye, (Uzumcu ve ark., 2006; Armenti ve ark., 2008; Sobinoff ve ark., 2010) ve erken reproduktif yaşlanmaya neden olur (Armenti ve ark., 2008). Diğer yandan ovosit lipid peroksidasyonunu artırarak ovosit membranının hasarına sebep olur. Bu durum ise spermin ovosite füzyonunu azaltır (Sobinoff ve ark., 2010). Sonuç olarak MXC'nin 100 mg/kg/gün dozu dışı reproduktif sisteminde meydana getirdiği olumsuzluklara bağlı olarak dışı fertilitelerini etkiler ve gebelik oranını azaltır (Armenti ve ark., 2008).

Embriyonal ve fetal gelişimin belli periyodlarında endokrin bozuculara maruz kalınması, meme bezi (Wang, 2006), uterus ve testis gibi hormon bağımlı organların erişkin dönemdeki fonksiyonlarını etkileyebilmektedir (Newbold ve ark., 2004; Anway ve ark., 2005; Ho ve ark., 2006; Soto ve ark., 2008). Ovaryum için bu kritik dönem ise; apoptozis ile ovosit yuvalarının yıkılması (E18-21), apoptozisin devam etmesi ve primordiyal foliküllerin oluşması (PN0-3) ve primordiyalden primer foliküle geçiş (PN4-7) safhalarını içeren E18 ve PN7 günler arasını kapsamaktadır (Armenti ve ark., 2008). Bu yüzden çalışmamızda Armenti ve ark. (2008)'nin çalışmalarında uyguladıkları deney modelini kullandık. Bu deney modeline göre fetal ve neonatal (E18-PN7) dönem içerisinde MXC uyguladık ve erişkin dönemde MXC'nin ovaryum foliküler kompozisyonu ve IGF sinyal yolağı üzerine etkilerini belirlemek için sıçanları postnatal 50-60. günler arasında proöstrus gözlemlediğimiz günde öldürdük ve ovaryumları topladık.

4.2. Ovaryum Folikül Kompozisyonu

Çalışmamızda MXC uygulamasının ovaryumda foliküler kompozisyonu değiştirdiğini saptadık. MXC'nin hayvanların ovaryumunda primordiyal ve primer folikül sayısını azalttığını, sekonder folikül sayısını arttırdığını gözlemledik ve primordiyal ($p<0,05$) ve sekonder folikül ($p<0,01$) sayılarındaki değişimin istatistiki olarak önemli olduğunu saptadık (tablo 3.1). Bizim deney modelimize benzer olarak kurgulanmış çalışmalarda (Uzumcu ve ark. 2006; Armenti ve ark. 2008)

bulgularımıza benzer veriler elde edildiği fakat bu foliküllerin sayılarındaki değişikliklerin istatistiksel olarak önemli olmadığı bildirilmektedir. Bu durum çalışmalarda kullanılan sıçan ırklarının farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Örneğin, Fischer 344 ırkı sıçanlar, Sprague-Dawley ırkı sıçanlara göre eksojen östrojene daha fazla duyarlıdır (Putz ve ark., 2001). Çalışmamızda endokrin bozuculara Sprague-Dawley ve Da/Han ırklarına göre daha duyarlı olduğu gösterilen (Diel ve ark., 2004) Wistar ırkı sıçanlar kullanıldı.

Neonatal dönemde östrojen hormonu ve bazı endokrin bozucuların uygulanmasının primordiyal folikül oluşumunu azalttığı bildirilmektedir (Chen ve ark., 2007; Schindler ve ark., 2010). Bu sonuçlar bizim bulgumuzla tutarlılık göstermektedir. MXC'ye bağlı olarak gözlemlenen erken reproduktif yaşlanmanın (Armenti ve ark., 2008) temelinde de; ovaryumdaki primordiyal folikül rezervlerindeki azalma yatıyor olabilir. Primordiyal folikül sayısının (rezervinin) az olmasının iki sebebi olabilir. Birincisi fetal dönemde ovosit yuvalarının yıkılıp primordiyal folikül şekillenmesini MXC inhibe etmiş olabilir; ikincisi ise MXC primordiyal folikülden primer ve sekonder foliküle geçişi indüklemiş olabilir.

Çalışmamızda, deney grubunun preantral foliküllerin sayısında istatistiki olarak belirgin bir artış ($p<0,01$) dikkat çekti. Armenti ve ark. (2008), aynı doz ve sürelerde yaptıkları çalışmalarında bulgularımıza benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Uzunçü ve ark. (2006), postnatal 3-10 gün arasında benzer doz uyguladıkları çalışmalarında da bizim bulgularımıza benzer olarak preantral foliküllerde artış gözlerken, Sobinoff ve ark. (2010) ise postnatal 4-7 gün arasında aynı doz uygulamasında preantral folikül sayısında azalma olduğunu göstermişlerdir. Sekonder ve preantral folikül sayılarında bir artışın gözlenmesi MXC'nin foliküler olgunlaşmayı hızlandırdığı buna bağlı olarak da primordiyal foliküler rezervi azalttığını göstermektedir.

Armenti ve ark., (2008)'nin araştırması ve bizim çalışmamız folikül gelişiminde üç farklı dönemi de içine alırken, Uzunçü ve ark (2006)'nin yapmış olduğu çalışma (PN3-10) primordiyal ve primer folikül gelişim sürecini; Sobinoff ve

ark. (2010)'nın yaptığı çalışma ise (PN4-7) primer folikül gelişim dönemini kapsamaktadır. İleriki çalışmalarda fetal ve neonatal ovaryum gelişiminin her bir döneminde (E18-21; PN0-3 ve PN4-7) sıçanlara MXC uygulanarak 3 farklı MXC grubu oluşturulması ve erişkin dönemde de foliküler kompozisyon açısından gruplar arasında farklılıklarının belirlenmesi önemli olacaktır.

Çalışmamızda MXC'ye bağlı olarak antral foliküllerin sayısında azalma gözlemlendi. Uzun ve ark. (2006) çalışmalarında antral folikül sayısında azalma belirlemişlerdir. Armenti ve ark. (2008) erken antral folikül sayısının arttığını, orta ve geç antral folikül sayılarında ise fark olmadığını bildirmişlerdir. Bulgularımız Uzun ve ark. (2006)'nın sonuçları ile uyumludur. Antral folikül sayısında azalma iki sebepten kaynaklanıyor olabilir. Birincisi preantral foliküllerin antral foliküllere geçişini MXC engelliyor olabilir. Bu durum preantral foliküllerin sayısının artmasına diğer yandan antral foliküllerin sayısının azalmasına neden olacaktır. İkincisi MXC daha çok antral foliküllerde atreziyi indüklüyor olabilir. Çünkü pubertanın hemen öncesi ve sonrasında MXC'ye maruz kalınması antral foliküllerde atreziye sebep olmaktadır (Borgeest ve ark., 2002; Miller ve ark., 2005; Gupta ve ark., 2006; Tomic ve ark., 2006).

4.3. İmmunohistokimya

IGF-I ve Granuloza Hücreleri

IGF-I ekspresyonu araştırmalarda in vivo (Oliver ve ark. 1989; Zhou ve ark., 1991; Wandji ve ark., 1998; Holloway ve ark., 2007; Cansu ve ark., 2008) ve in vitro (Armstrong ve ark., 2000) olarak insan ve çeşitli hayvan türlerinin granuloza hücrelerinde gösterildi. Biz de deney ve kontrol gruplarında bütün foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonunu gösterdik. Foliküler büyüme sürecinde kontrol grubunun granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu primer folikülden itibaren antral foliküle doğru arttı. Bununla birlikte foliküller arasında (PO-PR; PR-S; S-PA; PA-A) granuloza hücrelerinin IGF-I ekspresyonu yönünden istatistiksel bir fark

gözlenmedi. Deney grubunda ise folikül aşamaları arasında granuloza hücrelerinin IGF-I ekspresyonu doğrusal olmayan bir eğri çizdi fakat folikül aşamaları arasında istatistiksel bir önem saptanmadı.

Çalışmamızda kontrol grubuna göre deney grubunda primordiyal ve primer folikül sayısında azalma ve bu foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonunda artış gözlemlendi, ancak gruplar arasında istatistiksel bir önem belirlenmedi (tablo 3.3). Primordiyal ve primer folikül sayısında azalma ile IGF-I ekspresyonu arasında da önemli bir korelasyon saptanmadı (tablo 3.10). Sekonder ve preantral folikül sayısında artış, antral folikül sayısında azalma ile birlikte sekonder, preantral ve antral foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonunda bir düşüş gözlemlendi. Fakat gruplar arasında sadece preantral ve antral foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonu yönünden istatistiksel bir önem saptandı ($p<0,05$), (tablo 3.3). Ayrıca preantral folikül sayısı ve preantral IGF-I ekspresyonu arasında hem kontrol grubunda ($r=-0,828$, $p<0,05$) hem de deney grubunda ($r=-0,913$, $p<0,01$) negatif bir korelasyon saptandı (tablo 3.10). IGF-I, granuloza hücrelerinin çoğalmasını dolayısıyla foliküler gelişmeyi uyarırken (Monget ve ark., 2002; Mazerbourg ve ark., 2003 Quirk ve ark., 2004;) apoptozise karşı koruyarak da foliküler atreziiyi önlediği bildirilmektedir (Guthrie ve ark., 1998; Hu ve ark., 2004). Bu durumda primordiyal ve primer folikülde IGF-I ekspresyonundaki artış, primordiyal ve primer folikülde gelişimin uyarılmasına ve sonuçta bu foliküllerden sekonder ve preantral foliküle geçişin hızlanmasına neden olacaktır. Preantral folikül kültüründe IGF-I uygulamasının preantral folikül gelişimini ve antrum oluşumunu uyardığı bildirilmiştir (Gutierrez ve ark., 2000). Ovaryum doku kültüründe de benzer şekilde IGF-I eksikliğinde foliküller gelişemez ve antral folikülü şekillenemez (Stubbs ve ark., 2013). Dolayısıyla IGF-I'deki düşüşün preantral folikül gelişimini inhibe ederek preantral folikülden antral foliküle geçişi yavaşlattığını ya da bloke ettiğini söyleyebiliriz. Sonuçta preantral foliküllerde IGF-I ekspresyonundaki azalma preantral folikül büyümesinin yavaşlamasına dolayısıyla preantral aşamada kalan folikül sayısında bir artışa ve antral folikül sayısında da düşmeye neden olabilir. Bununla birlikte IGF-I'in foliküler atrezi durumunda seviyesinin düşük (Wandji ve ark., 1998), polikistik ovaryum sendromlarında ise yüksek düzeyde oluşu (Homburg,

1998), çalışmamızdaki antral folikül sayısındaki azalmanın IGF-I ekspresyonundaki azalmaya bağlı şekillendiğindüşündürmektedir. MXC'nin direk olarak preantral foliküllerde gelişimi bloke ettiğini göstermek ve bu foliküllerde IGF-I ekspresyonunu azalttığını kesin olarak belirlemek için ovaryumdan preantral foliküllerin izole edilerek kültüre edilmesi gerekmektedir. İleride MXC'nin foliküller üzerinde direk etkilerinin gözlenmesi için ovaryum folikül kültür çalışması planlanmaktadır. Düşünülen bu çalışmada kültüre edilen foliküllere MXC uygulanacak ve IGF-I protein düzeyleri western blotting ile, IGF-I mRNA düzeyleri ise QPCR yöntemiyle belirlenecektir.

IGF-I ve Ovosit

Çalışmamızda her iki grubun ovositlerinde zayıf ve şiddetli arasında değişen IGF-I reaksiyonları gözledik. Hem kontrol hem de deney gruplarının ovositlerinde IGF-I ekspresyonu primordiyal folikülden sekonder foliküle doğru artarken, preantral folikülden antral foliküle geçişte IGF-I ekspresyonunun azaldığı gözlemlendi. Fakat hem kontrol hem de deney gruplarında ovositlerin IGF-I ekspresyonları yönünden farklı folikül aşamaları arasında (PO-PR; PR-S; S-PA; PA-A) istatistiksel bir önem gözlenmedi. IGF-I gelişmekte olan foliküllerde ovosit maturasyonunu tetiklemektedir (Feng ve ark.1988). Foliküler safhalara bağlı olarak ovositlerde IGF-I ekspresyon seviyelerindeki farklılıklar ovositin büyümesi ve maturasyonu ile ilgili olabilir Dolayısıyla ovositin büyümesi ve maturasyonu ovositte eksprese olan IGF-I tarafından otokrin olarak kontrol ediliyor olabilir.

Deney ve kontrol gruplarında ise IGF-I ekspresyonu primordiyal ve antral foliküllerin ovositlerinde zayıf ile orta şiddet arasında değişirken, diğer foliküllerin ovositlerinde ise orta ile şiddetli arasında belirlendi. Gruplar arasında bir fark gözlenmedi (tablo 3.2). Dolayısıyla MXC ovositlerdeki IGF-I ekspresyonunu etkilememektedir.

IGF-I – Korpus Luteum, Teka İnterna Hücreleri, Teka Eksterna Hücreleri, İnterstisyel Hücreler, Damar Düz Kas Hücreleri

Yaptığımız çalışmada IGF-I ekspresyonunu ayrıca korpus luteumlarda, teka hücrelerinde, interstisyel hücrelerde ve damar düz kas hücrelerinde saptadık. Diğer araştırmalarda da bulgularımıza benzer olarak korpus luteumlarda (Gadsby ve ark.,1996; Holloway ve ark., 2007; Ergin ve ark., 2008), teka ve interstisyel hücrelerinde (Hernandez ve ark., 1992; Holloway ve ark., 2007; Ergin ve ark., 2008) IGF-I ekspresyonu gösterildi. IGF-I korpus luteumun oluşumunda rol alır ve aynı zamanda luteal progesteron seviyesinde artışa neden olarak streoidogenezin düzenlemesine katkıda bulunur (Devota ve ark. 1995). Streoidogenez ayrıca teka interstisyel alanlarda eksprese olan IGF-I tarafından LH benzeri etkiyle uyarılır. Bununla birlikte MXC metaboliti HPTE granuloza ve teka interstisyel hücrelerde progesteron sekresyonunu inhibe eder (Akgül ve ark., 2008). MXC ise serum progesteron düzeyini ve teka interstisyel hücrelerinde LHR ekspresyonunu azaltır (Armenti ve ark., 2008). Çalışmamızda gruplar arasında korpus luteumlar ile teka ve interstisyel hücrelerde IGF-I ekspresyonu yönünden fark çıkmadı (tablo 3.11). Bu durum MXC'nin progesteron üretimini IGF-I'den bağımsız bir mekanizma ile etkilediğini göstermektedir.

Ovaryumda yer alan damarların düz kaslarında IGF-I ekspresyonunu belirledik. Armstrong ve ark., (2000) ise ovaryumda bulunan damarların düz kas hücrelerinde değil damar endotel hücrelerinde IGF-I ekspresyonunu gösterdiler. Bununla birlikte yaptığımız literatür taramalarında ovaryumlarda olmasa da bizim bulgumuza benzer şekilde akciğerde bulunan damar düz kas hücrelerinde IGF-I ekspresyonu gözlemlendiği bildirilmektedir (Frenckner ve ark., 2005).

IGF-IR ve Granuloza Hücreleri

Yapılan araştırmalarda granuloza hücrelerinde IGF-IR protein (Zhou ve ark., 1991) ve mRNA (El-Roeiy ve ark., 1993; Ammstrong ve ark., 2000) ekspresyonları gösterildi. Çalışmamızda da benzer olarak granuloza hücrelerinde IGF-IR

ekspresyonu gözlemlendi. Kontrol grubunda granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyon düzeyi primordiyal folikülden antral foliküle doğru artış gösterirken, deney grubunun granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonu preantral foliküle kadar artış gösterdi, antral folikülde azaldı.

Çalışmamızın deney grubunda gelişim aşamasındaki foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-IR ekspresyonlarının kontrol grubundaki aynı gelişim aşamalarındaki foliküllerin granuloza hücrelerindeki IGF-IR ekspresyonlarına göre arttığı gözlemlendi. Bununla birlikte deney grubunda kontrol grubuna göre sadece sekonder ve preantral folikülün granuloza hücrelerindeki IGF-IR ekspresyonunun artışı istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0,05$); (tablo 3.7). Bu bulgulara dayanarak MXC'nin, sekonder ve preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonunu baskılamak; IGF-IR ekspresyonunu arttırdığını söylebiliriz. Aynı safhadaki foliküllerde IGF-I ekspresyonu azalırken reseptörünün ekspresyonunun artması bize IGF-I'in otokrin yolla granuloza hücrelerinde kendi kendisini etkileyebildiğini de göstermektedir. Ayrıca sekonder ve preantral safhalardaki folikülün granuloza hücrelerinde IGF-I ekspresyonunda azalma, bu granuloza hücrelerindeki reseptörün daha az kullanılmasına yol açacak ve IGF-IR ekspresyonunu arttıracaktır. Yapılan çeşitli çalışmalarda IGF-I düzeyinde azalmanın IGF-IR düzeyinde artışa (Werner ve ark., 1990; Thissen ve ark., 1994; Fu ve ark., 2001) ve IGF-I uygulamalarının da IGF-IR ekspresyonunda azalmaya neden olduğunun bildirilmesi (Cruickshank ve ark., 2005) bizim düşüncemizi doğrular niteliktedir.

IGF-IR ve Ovosit

Çalışmamızda IGF-IR ekspresyonunu tüm foliküllerin ovositlerinde gözledik. Kontrol grubunun ovositlerinde IGF-IR ekspresyonu primordiyal folikülden preantral foliküle doğru azaldı. Antral folikülde ise çok az bir artış gösterdi. Deney grubunda ise ovositlerin IGF-IR ekspresyonu primordiyal folikülden primer foliküle doğru azaldı. IGF-IR ekspresyonu sekonder folikülün ovositinde tekrar artarak en yüksek seviyeye ulaştı. Preantral folikülün ovositinde ise IGF-IR ekspresyonu şiddetli bir

şekilde düştü ve en düşük seviye ulaştı. Bununla birlikte antral folikülün ovositinde IGF-IR ekspresyonu az miktarda arttı. Deney grubunda ovositlerdeki IGF-IR ekspresyonu yönünden sadece sekonder ve preantral folikül arasında fark gözlemlendi ($p < 0,01$). Wasielek ve Bogacki (2007), IGF-I'in ovositleri sadece parakrin, granuloza hücrelerini ise hem otokrin hemde parakrin mekanizma ile etkilediğini öne sürmüştür. Ancak çalışmamızda ovositlerde hem IGF-IR hem de IGF-I ekspresyonunu gösterdik. Sonuç olarak bu durum IGF-I'nin ovositleri otokrin mekanizma ile de etkileyebildiğini göstermektedir.

Deney grubunda kontrol grubuna göre primordiyal, primer ve sekonder folikülün ovositlerinde IGF-IR ekspresyonda artış, antral folikülde azalma belirlendi. Preantral folikülde ise ovositin IGF-IR ekspresyonu bakımından gruplar arasında bir değişiklik gözlenmedi. Bununla birlikte gruplar arasında sadece sekonder folikülün ovositlerinde IGF-IR ekspresyonu yönünden istatistiksel bir fark belirlendi (tablo 3.6).

IGF-IR – Korpus Luteum, Teka İnterna Hücreleri, Teka Eksterna Hücreleri, İnterstisyel Hücreler, Damar Düz Kas Hücreleri

Çalışmamızda, IGF-I ekspresyona benzer şekilde IGF-IR ekspresyonunu korpus luteumlarda (Perks ve ark., 1999) interstisyel hücrelerde, teka interna hücreleri ve damar duvar düz kas hücrelerinde de gözlemledik. Teka eksternalarda ise IGF-I ekspresyonunu belirlerken IGF-IR ekspresyonunu saptamadık. Armstrong ve ark. (2000), sığırlarda IGF-I mRNA ekspresyonunu düşük düzeyde sağlıklı antral folikülün teka eksterna hücrelerinde saptarken, IGF-IR mRNA ekspresyonunu ise preantral ve antral foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde belirlediler. Ayrıca El-Roiety ve ark. (1999), insanlarda yaptıkları çalışmalarında IGF-IR mRNA'yı granuloza hücrelerinde, IGF-I mRNA'yı ise farklı olarak teka hücrelerinde gözlemlediler. Teka eksterna hücrelerinde IGF-IR ekspresyonunun gözlenmemesi bu hücrelerde eksprese olan IGF-I'in teka ekstenalar dışında farklı ovariyal yapıları etkilediğini düşündürmektedir.

4.4. Western Blotting

Western blotting yöntemi ile ovaryumda IGF-IR protein ekspresyon belirlendi. Yapılan çalışmalarda ovaryumda IGF-IR ekspresyonu IGF-IR α için 130 kDa (Srivastava ve ark., 1999), granuloza hücrelerinde IGF-IR β için ise 98 kDa civarında (Chabrolle ve ark., 2007) gösterildi. Çalışmamızda IGF-IR β alt ünitesine spesifik bir antikor kullanıldı ve üretici firma tarafından belirtilen kDa ağırlığı ile uyumlu olarak bantlar 97 kDa civarında gözlemlendi. Belirlenen ekspresyonlarda gruplar arasında ovaryum IGF-IR protein seviyeleri yönünden fark saptanmadı (tablo 3.12). Western blotting yöntemi ile tüm ovaryum dokusu homojenize edilip ovaryum dokusunun tümünde IGF-IR protein ekspresyonu belirlenmektedir. Dolayısıyla immunohistokimyasal boyamada olduğu gibi foliküle spesifik IGF-IR ekspresyonundaki değişiklikler bu metodla saptanamamaktadır. Eğer immunohistokimyasal sonuçlarımızı western blotting ile foliküle spesifik ekspresyonu göstererek desteklemek istiyorsak; in vivo hayvan deneyini takiben ovaryumların toplanması, ovaryumdaki foliküllerin izole edilmesi ve izole edilen foliküllerin büyüklüklerine ve morfolojilerine göre sınıflandırılması gerekmektedir. Ancak, sınıflandırılarak izole edilmiş foliküllerde western blotting metodu uygulanırsa hangi aşamadaki folikülde ekspresyonun arttığını ya da azaldığını gözlemleyebiliriz ve immunohistokimyasal bulgularımızı destekleyebiliriz. İleriki çalışmalarımızda gelişim aşamalarına spesifik folikül izolasyonu yapmayı planlamaktayız. Bu sınıflandırdığımız foliküllerde IGF-IR'ün hem mRNA hem de protein seviyelerini belirlemeyi düşünüyoruz.

5. SONUÇ

1-Sıçan ovariumunda IGF-I ve IGF-IR'ü gelişen foliküllerde ve diğer yapılarda eksprese olmaktadır.

Ovariumda IGF-I, folikül ovosit ve granuloza hücrelerinde, korpus luteumlarda, teka-interstisyel alanlarda ve damar düz kas hücrelerinde IGF-IR ile aynı anda eksprese olarak hem parakrin hem de otokrin etki gösterir.

2-MXC'ye fetal ve neonatal dönemde maruz kalınması, erişkin ovariumunda foliküler kompozisyonun değiştirir

Primordiyal ve primer folikülden, sekonder ve preantral foliküle geçiş hızlanarak rezerv foliküllerin sayısı azalır buna bağlı olarak sekonder ve preantral foliküllerin sayısı artar. Bununla birlikte folikül gelişiminin bir sonraki basamağı olan antral folikül aşamasına geçiş yavaşlar ve sonuçta antral folikül sayısı azalır.

3-MXC, ovariumda folikül safhasına spesifik olarak IGF-I ve IGF-IR ekspresyonlarını değiştirir.

Erken folikül gelişimi sırasında MXC'ye maruz kalınması, erişkin dönemde ovariumda IGF-I ve IGF-IR ekspresyon düzeylerini değiştirir. Değişen IGF-I ve IGF-IR ekspresyon düzeyleri ise IGF-I'in hem parakrin hem de otokrin mekanizması aracılığıyla folikül kompozisyonunun değişmesine ve folikül rezervinin azalmasına neden olur.

4-Folikül sayısı ve IGF-I ekspresyonu preantral folikül arasında negatif bir korelasyon vardır MXC bu negatif korelasyon düzeyini artırır.

5-MXC'ye ftal ve neonatal dönemde maruz kalınması IGF-I ekspresyonlarını değiştirerek folikül gelişimini ve buna bağlı olarak folikül kompozisyonlarını değiştirir.

6-MXC primordial folikül sayısındaki azalmayla folikül rezervlerinde; antral folikül sayısındaki azalmasıyla da ovule olacak folikül sayısında azalmaya neden olabilir. Bu durum ise dişi infertilite sorunlarına yol açabilir.

ÖZET

Metoxychlor'un Sıçan Ovaryumunda IGF-I Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi"

Folikül gelişimi ve fonksiyonları, IGF'lerinde içinde bulunduğu pek çok büyüme faktörü tarafından düzenlenir. Bununla birlikte bazı gıdalar ve ekzojen ajanlar da foliküllerin gelişimini ve ovaryum fonksiyonunu etkileyebilir. Endokrin bozucular olarak bilinen bu ekzojen ajanlardan bir tanesi de MXC'dir. Östrojenik, antiöstrojenik ve antiandrojenik etkilere sahip organik klorlu bir pestisit olan MXC, folikülogenezis ve steroidogenezis gibi ovaryum fonksiyonlarını ve pek çok reproduktif parametreyi değiştirerek dişilerde infertiliteye sebep olur.

Amacımız embriyonal (E18) ile postnatal (PN7) günler arası 100 mg/kg/gün MXC uygulamasını takiben erişkin dönemde MXC'nin folikül aşamalarının oransal dağılımını nasıl etkilediğini ortaya çıkarmaktır. Ayrıca ovaryumda folikül safhalarına spesifik IGF-I ve IGF-IR ekspresyonlarını belirlemek ve folikül gelişimi ile IGF-I ve IGF-IR ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişkiyi ortaya çıkarmak; MXC'nin folikül IGF-I ve IGF-IR protein seviyelerini değiştirip değiştirmediğini araştırmaktır. Foliküler kompozisyon yüzdesinde sekonder ve preantral foliküllerde ($p<0,01$) bir artış; primordial ve antral foliküllerde ($p<0,05$) ise azalma saptandı. İmmunohistokimyasal boyama ile foliküllerin ovosit ve granuloza hücrelerinde; luteal ve interstisyel hücrelerde, teka interna ve eksternada ve damar düz kas hücrelerinde IGF-I ekspresyonu belirlendi. IGF-IR ekspresyonu teka eksterna haricinde IGF-I ile aynı lokalizasyonu gösterdi. MXC uygulamasının IGF- I'nin ekspresyonunu preantral ve antral folikülde azalttığı ($p<0,05$), IGF-IR'in ekspresyonunu ise sekonder foliküllerin ovositleri ($p<0,05$) ile sekonder ve preantral foliküllerin granuloza hücrelerinde arttırdığı gözlemlendi.

Sonuçta, MXC'ye fetal ve neonatal ratların maruz kalması, erişkin ovaryumunda morfolojik ve moleküler düzeyde değişikliklere neden olur. MXC, ovaryumda folikül safhasına spesifik olarak IGF-I ve IGF-IR ekspresyonlarını değiştirir. IGF-I ve IGF-IR ekspresyonlarındaki değişikliklere bağlı olarak ovaryumunda foliküler kompozisyon değişir. MXC'nin indüklediği ovaryum fonksiyon bozukluklarında ve dişi infertilitesinde IGF sinyal yolağı önemli rol oynuyor olabilir.

Anahtar Kelimeler: Endokrin Bozucular, IGF-I, IGF-IR, Metoksiklor, Sıçan

SUMMARY

The Effect of Methoxychlor on IGF-I Signaling Pathway in Rat Ovary

Follicular development and ovarian functions are regulated by growth factors including in IGF's. In addition, some foods and exogenic agents can also affect follicular development and ovarian function. One of the exogenic agents is MXC which is known endocrine disruptor. MXC which has estrogenic, antiestrogenic and antiandrogenic effects is a organochloride pesticide and it causes infertility in female by changing many reproductive parameters and ovarian functions.

In this study, our aim is to detect how MXC effects proportional distribution of the follicle stages in adult rats after MXC treatment (100 mg/kg/day) between embryonal (E)18- postnatal day (PND) 7, and also determine stage specific IGF-I and IGF-IR expressions in ovarian follicles and relationship between follicular development and the levels of IGF-I and IGF-IR expression, and investigate if MXC changes levels of IGF-I and IGF-IR protein in ovary. An increase in secondary, preantral follicles ($p < 0,01$) and a decrease in primordial and antral follicles ($p < 0,05$) were detected in follicular composition. IGF-I expression in oocyte and granulosa cells of follicles, and the luteal and interstitial cells, theca externa and interna and also smooth muscle of ovary vessels were showed by using immunohistochemical staining. IGF-IR was expressed in same localizations with IGF-I in ovary except for theca externa. An increase in both IGF-I and IGF-IR expressions were indicated during follicular development. It was observed that MXC treatment decreased IGF-I expression in preantral and antral follicles ($p < 0,05$) and increased IGF-IR expression in oocytes of secondary follicles and granulosa cells of secondary and preantral follicles ($p < 0,05$).

In conclusion, MXC exposure to fetal and neonatal rats causes morphological and molecular alterations in adult ovary. MXC changes stage specific IGF-I and IGF-IR expressions in ovarian follicles, accordingly some differences can be seen in follicular composition of MXC treatment group when compared to that of control group. IGF signal pathway may be a significant role in MXC induced ovary dysfunction and female infertility.

Key Words: Endocrine Disruptors, IGF-I, IGF-IR, Methoxychlor, Rat

KAYNAKLAR

- AKGUL, Y., DERK, R.C., MEIGHAN, T., RAO, K.M.K., MURONO, E.P. (2008). The methoxychlor metabolite, HPTE, directly inhibits the catalytic activity of cholesterol side-chain cleavage (P450_{scc}) in cultured rat ovarian cells. *Reprod Toxicol*, **25**: 67-75.
- ANWAY, M.D., CUPP, A.S., UZUMCU, M., SKINNER, M.K. (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, **308**: 1466-1469.
- ANONIM. (2004). U.S. Environmental Protection Agency. (Methoxychlor Reregistration Eligibility Decision (RED). June 30, 2004 EPA Publication No. EPA 738-R-04-010. Erişim: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/methoxychlor_red.htm. Erişim Tarihi: 20/02/2013.
- ANONIM 2. (2009). European Union - DG SANCO. "EU Pesticides Database (EC) No 1107/2009 (repealing Directive 91/414/EEC) current legislation 2002/2076. Erişim:http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm?event=activesubstance.selection&a=1. Erişim Tarihi: 20/02/2013.
- ANONİM 3. (2009). 01–10–2009 Tarihinden itibaren halk sağlığı alanında zararlılarla m¼cadelede biyosidal amaçlı ruhsatlandırılması yasaklanan kimyasallar. T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Hizmetler Genel M¼d¼rl¼đ¼. B.10.0. TSH.0.10.00.03-15759.
- ARMENTI, A.E., ZAMA, A.M., PASSANTINO, L., UZUMCU, M. (2008). Developmental methoxychlor exposure affects multiple reproductive parameters and ovarian folliculogenesis and gene expression in adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol*, **233**: 286-296.
- ARMSTRONG, D.G., GUTIERREZ, C.G., BAXTER, G., GLAZYRIN, A.L., MANN G.E., WOAD, K.J., HOGG, C.O. WEBB R. (2000). Expression of mRNA encoding IGF-I, IGF-II and type 1 IGF receptor in bovine ovarian follicles. *Journal of Endocrinology*, **165**: 101-113.
- ARONICA, S. M., KATZENELLENBOGEN, B. S. (1993). Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Mol. Endocrinol*, **7**: 743-752.
- ATSDR (2002). Toxicological profile for methoxychlor. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA
- BASERGA, R. (1992). The double life of the IGF-1 receptor. *Receptor*, **2**: 261-266.
- BASERGA, R. (2000). The contradictions of the insulin-like growth factor 1 receptor. *Oncogene*, **20**: 5574-5581.
- BORGEEST, C., SYMONDS, D., MAYER, L., HOYER, P.B., FLAWS, J.A. (2002). Methoxychlor may cause ovarian follicular atresia and proliferation of the ovarian epithelium in the mouse. *Toxicol Sci*, **68**: 473-478.
- BORGEEST, C., MILLER, K.P., GUPTA, R., GREENFELD, C., HRUSKA, K.S., HOYER, P., FLAWS, J.A. (2004). Methoxychlor-induced atresia in the mouse involves Bcl-2 family members, but not gonadotropins or estradiol. *Biol Reprod*, **70**: 1828-35.

- BUNONE, G., BRIAND, P.A., MIKSICEK, R. J., PICARD, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J.*, **15**: 2174-2183.
- CANSU, A., GIRAY, S.G., SERDAROGLU, A., ERDOGAN, D., COSKUN, Z.K., KORUCUOGLU, U., BIRI, A.A. (2008). Effects of chronic treatment with valproate and oxcarbazepine on ovarian folliculogenesis in rats. *Epilepsia*, **49 (7)**: 1192-1201.
- CHABROLLE, C., TOSCA, L., DUPONT, J. (2007). Regulation of adiponectin and its receptors in rat ovary by human chorionic gonadotrophin treatment and potential involvement of adiponectin in granulosa cell steroidogenesis. *Reproduction*, **133 (4)**: 719-731.
- CHAPIN, R.E., HARRIS, M.W., DAVIS, B.J., WARD, S.M., WILSON, R.E., MAUNEY, M.A., LOCKHART, A.C., SMIALOWICZ, R.J., MOSER, V.C., BURKA, L.T., COLLINS, B.J. (1997). The effects of perinatal/juvenile methoxychlor exposure on adult rat nervous, immune, and reproductive system function. *Fundam Appl Toxicol*, **40**: 138-57.
- CHEN, K., NEZU, R., WASA, M., SANDO, K., KAMATA, S., TAKAGI, Y., OKADA, A. (1999). Insulin-like growth factor-1 modulation of intestinal epithelial cell restitution. *J Parenter Enteral Nutr (JPEN)*, **23**: 89-92.
- CHOI, Y., RAJKOVIC, A. (2006). Genetics of early mammalian folliculogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 579-590.
- CLEMENT, T.M., ANWAY, M.D., UZUMCU, M., SKINNER, M.K. (2007). Regulation of the gonadal transcriptome during sex determination and testis morphogenesis: comparative candidate genes. *Reproduction*, **134**: 455- 472.
- CLEMMONS, D.R., VAN WYK, J.J. (1981). Somatomedins: physiological control and effects on cell proliferation. In: Baserga R (ed.), Handbook New York: Springer-Verlag, **57**: 161-208.
- CLEMMONS, D.R., UNDERWOOD, L.E. (1992). Role of insulin like growth factors and growth hormone in reversing catabolic state. *Horm Res*, **38**: 37-40.
- CLEMMONS, D.R. (1994). Peptide growth factors. In: Kahn CR, Gordon, C.W, editors. Joslin's Diabetes Mellitus. 13th ed. Philadelphia: A Waverly Company, sy. 177-192.
- CREWS, D., MCLACHLAN J.A. (2006). Epigenetics, evolution, endocrine disruption, health, and disease. *Endocrinology*, **147 (6, suppl.)**: S4-10.
- CRAN, D.G., MOOR, R.M. (1980). The development of oocytes and ovarian follicles of mammals. *Sci Prog*, **66**: 371-383.
- CRELLIN, N.K., KANG, H.G., SWAN, C.L., CHEDRESE, P.J. (2001). Inhibition of basal and stimulated progesterone synthesis by dichlorodiphenyldichloroethylene and methoxychlor in a stable pig granulosa cell line. *Reproduction*, **121**: 485:492
- CRUICKSHANK, J., GROSSMAN, D.I., PENG, R.K., FAMULA, T.R; OBERBAUER,A.M. (2005). Spatial distribution of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I receptor and apoptotic chondrocytes during growth plate development. *J Endocrinol*, **184**: 543-553
- CUMMINGS, A.M., PERREAULT, S.D. (1990). Methoxychlor accelerates embryo transport through the rat reproductive tract. *Toxicol Appl Pharmacol*, **102**: 110-116.
- CUMMINGS, A.M., LASKEY, J. (1993). Effect of methoxychlor on ovarian steroidogenesis:role in early pregnancy loss. *Reprod Toxicol*, **7**: 17-23.

- CUMMINGS, A.M. (1997). Methoxychlor as a model for environmental estrogens. *Crit Rev Toxicol*, **27**: 367-379.
- DEVOTO, L., KOHEN, P., CASTRO, O., VEGA, M., TRONCOSO, J.L., CHARREAU, E. (1995). Multihormonal regulation of progesterone synthesis in cultured human midluteal cells. *J Clin Endocrinol Metab*, **80 (5)**: 1566-1570.
- DIEL, P., SCHMIDT, S., VOLLMER, G., JANNING, P., UPMEIER, A., MICHNA, H., BOLT, H.M., DEGEN, G.H. (2004). Comparative responses of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Archives of Toxicology*, **78 (4)**: 183-193.
- DISSEN, G.A., ROMERO, C., HIRSHFIELD, A. N., OJEDA, S.R. (2001). Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology*, **142**: 2078-2086
- DUDEK, H., DATTA, S.R., FRANKE, T.F., BIRNBAUM, M.J., YAO, R., COOPER, G.M., SEGAL, R.A., KAPLAN, D.R., GRENBERG, M.E. (1997). Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase AKT. *Science*, **275**: 661-665.
- DUNCAN, M.D., KORMAN, L.Y., BASS, B.L. (1994). Epidermal growth factor primes intestinal epithelial cells for proliferative effect of insulin-like growth factor I. *Dig Dis Sci*, **39**: 2197-2201.
- DURAI, R., YANG, W., GUPTA, S., SEIFALIAN, A.M., WINSLET, M.C. (2005). The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. *Int J Colorectal Dis*, **20**: 203-220.
- DURLINGER, A.L.L., KRAMER, P., KARELS, B., DE JONG, F.H., UILENBROEK, J.T.J., GROOTEGOED, J.A., THEMME, A.P.N. (1999). Control of primordial follicle recruitment by anti-müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, **140**: 5789-5796.
- DURLINGER, A.L.L., GRUIJTERS, M.J.G., KRAMER, P., KARELS, B., KUMAR, T.R., MATZUK, M.M., ROSE, U.M., DE JONG, F.H., UILENBROEK, J.T.J., GROOTEGOED, J.A., THEMME, A.P.N. (2001). Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of fsh on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, **142 (11)**: 4891-4899.
- DURLINGER, A.L., GRUIJTERS, M.J.G., KRAMER, P., KARELS, B., INGRAHAM, H.A., NACHTIGAL, M.W., UILENBROEK, J.T., GROOTEGOED, J.A., THEMME, A.P. (2002). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology*, **143**: 1076-1084.
- EL-ROEIY, A., CHEN, X., ROBERTS, V.J., LEROITH, D., ROBERTS JR, C.T., YEN, S.S. (1993). Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II and the IGF-I, IGF-II, and insulin receptor genes and localization of the gene products in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab*, **77(5)**: 1411-1418.
- ERGIN, K., GURSOY, E., BAŞIMOĞLU KOCA, Y., BAŞALOĞLU, H., SEYREK, K. (2008). Immunohistochemical detection of insulin-like growth factor-I, transforming growth factor-b2, basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in developing rat ovary. *Cytokine*, **43**: 209-214
- FENG, P., CATT, K.J., KNECHT, M. (1988). Transforming growth factor-beta stimulates meiotic maturation of the rat oocyte. *Endocrinology*, **122 (1)**: 181-186.
- FINDLAY, J.K., BRITT, K., KERR, J.B., O'DONNELL, L., JONES, M.E., DRUMMOND, A.E., SIMPSON, E.R. (2001). The road to ovulation: the role of oestrogens. *Reprod Fertil Dev*, **13**: 543-547.

- FRENCKNER, B., EKLÖF, A.C., ERIKSSON, H., MASIRONI, B., SAHLIN, L. (2005). Insulinlike growth factor I gene expression is increased in the fetal lung after tracheal ligation. *J Pediatr Surg*, **40**: 457-463.
- FRIGO, D.E., TANG, Y., BECKMAN, B.S., SCANDURRO, A.B., ALAM, J., BUROW, M.E., MCLACHLAN, J.A. (2004). Mechanism of AP-1-mediated gene expression by select organochlorines through the p38 MAPK pathway. *Carcinogenesis* **25**: 249-261.
- FROESCH, E. R., SCHMID, C., SCHWANDER, J., ZAPF, J. (1985). Actions of insulin-like growth factors. *Annu Rev Physiol*, **47**: 443-467.
- FROJDMAN, K., PARANKO, J., KUOPIO, T. AND PELLINIEMI, L. J. (1989). Structural proteins in sexual differentiation of embryonic gonads. *Int. J. Dev. Biol.* **33**: 99-103.
- FROHMAN, L.A. (1987). Disease of anterior pituitary. In: Frohman LA, editor. *Endocrinology and Metabolism*. Second ed. Mc Graw Hill Company. sy.265-256.
- FROMOWITZ, F.B., VIOLA, M.V., CHAO, S., ORAVEZ, S., MISHRIKI, Y., FINKEL, G., GRIMSON, R., LUNDY, J. (1987). Ras 21 expression in the progression of breast cancer. *Hum Pathol*, **18**: 1268-1275.
- FU, Z., NOGUCHI, T., KATO, H. (2001). Vitamin a deficiency reduces insulin-like growth factor (igf)-1 gene expression and increases igf-1 receptor and insulin receptor gene expression in tissues of japanese quail (*coturnix coturnix japonica*). *J Nutr*, **131**: 1189-1194.
- FUORTES, L., CLARK, M.K., KIRCHNER, H.L., SMITH, E.M. (1997). Association between female infertility and agricultural work history. *Am J Ind Med*, **31**: 445-451.
- FURSTENBERGER, G, SENN, H.J. (2002). Insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol*, **3**: 298-302.
- GADSBY J.E., LOVDAL, J.A., SAMARAS,S., J BARBER, J.S., HAMMOND J.M. (1996). Expression of the messenger ribonucleic acids for insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins in porcine corpora lutea. *Biol Reprod*, **54**: 339-346.
- GAIDO, K. W., LEONARD, L. S., MANESS, S. C., HALL, J. M., MCDONNELL, D. P., SAVILLE, B., SAFE, S. (1999). Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2,2-bis-(p-hydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane with estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, **140**: 57465753.
- GAIDO, K.W., MANESS, S.C., MCDONNELL, D.P., DEHAL, S.S., KUPFER, D., SAFE, S. (2000). Interaction of methoxychlor and related compounds with estrogen receptor alpha and beta, and androgen receptor: structure-activity studies. *Mol. Pharmacol.* **58**: 852-858.
- GEDERET, Y.T., ÖZTÜRK, B., KARAGÖZOĞLU, E., GÖK, M., TİFTİK, A.M. (2004). Malign-Nonmalign plevral efüzyon ayırıcı tanısında IGF ve IGFBP'lerin rolü. *Genel Tıp Derg*, **14 (4)**: 139-143.
- GOLUB, M., HOGREFE, C., GERMANN, S., LASLEY, B., NATARAJAN, K., TARANTAL, A.F. (2003). Effects of exogenous estrogenic agents on pubertal growth and reproductive system maturation in female rhesus monkeys. *Toxicol Sci*, **74**: 103-113.
- GOLUB, M., GERMANN, S., HOGREFE, C. (2004). Endocrine disruption and cognitive function in adolescent female rhesus monkeys. *Neurotoxicol Teratol*, **26**: 799-809.

- GRAY, L. E., JR., OSTBY, J., FERRELL, J., REHNBERG, G., LINDER, R., COOPER, R., GOLDMAN, J., SLOTT, V., LASKEY, J. (1989). A dose-response analysis of methoxychlor-induced alterations of reproductive development and function in the rat. *Funda. Appl Toxicol*, **12**: 92-108.
- GREENFELD, C.R., PEPLING, M.E., BABUS, J.K., FURTH, P.A., FLAWS, J.A. (2007). BAX regulates follicular endowment in mice. *Reproduction*, **133**: 865-876.
- GUPTA, R.K., MILLER, K.P., BABUS, J.K., FLAWS, J.A. (2006). Methoxychlor inhibits growth and induces atresia of antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol Sci*, **93** (2): 382-389.
- GUPTA, R.K., ABERDEEN G., BABUS J.K., ALBRECHT E.D., FLAWS, J.A. (2007). Methoxychlor and its metabolites inhibit growth and induce atresia of baboon antral follicles. *Toxicol Pathol*, **35**: 649-656.
- GUTHRIE, H.D., GARRETT, W.M., COOPER, B.S. (1998). Follicle-stimulating hormone and insulin-like growth factor-I attenuate apoptosis in cultured porcine granulosa cells. *Biol Reprod*, **58** (2): 390-396.
- GUTIERREZ, C.G., RALPH, J.H., TELFER, E.E., WILMUT, I., WEBB, R. (2000). Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod*, **62**: 1322-1328.
- HALL, D.L., PAYNE, L.A., PUTNAM, J.M., HUET-HUDSON, Y.M. (1997). Effect of methoxychlor on implantation and embryo development in the mouse. *Reprod Toxicol*, **11**: 703-708.
- HERNANDEZ, E.R., HURWITZ, A., VERA, A., PELLICER, A., I, E.Y., LEROITH D., ROBERTS, C.T. JR. (1992). Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors and their receptors in the human ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, **74**: 419-425.
- HERNANDEZ, E.R. (1995). Regulation of the genes for insulin-like growth factor (IGF) I and II and their receptors by steroids and gonadotropins in the ovary. *The J Steroid Biochem Mol Biol*, **53**: 219-221.
- HIRSHFIELD M.F., TINKLE D.W. (1975). Natural selection and the evolution of reproductive effort. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72** (6): 2227-2231.
- HIRSHFIELD, A.N. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol*, **124**: 43-101.
- HIRSHFIELD, A.N. DESANTÌ, A. M. (1995). Patterns of Ovarian Cell Proliferation in Rats during the Embryonic Period and the First Three Weeks Postpartum. *Biol Reprod*, **53**: 1208-1221.
- HIRSHFIELD, A.N. (1997). Overview of Ovarian Follicular Development: Considerations for the Toxicologist. *Environ Mol Mutagen*, **29**: 10-15.
- HO, S.M., TANG, W.Y., BELMONTE DE FRAUSTO, J., PRINS, G.S. (2006). Developmental exposure to estradiol and bisphenol A increases susceptibility to prostate carcinogenesis and epigenetically regulates phosphodiesterase type 4 variant 4. *Cancer Res*, **66**: 5624-5632.
- HOLLOWAY, A.C., PETRIK, J., YOUNGLAI E.V. (2007). Influence of dichlorodiphenylchloroethylene on vascular endothelial growth factor and Insulin-like growth factor in human and rat ovarian cells. *Reprod Toxicol*, **24**: 359-364.

- HOLT, J.E., JACKSON, A., ROMAN, S.D., AITKEN, R.J., KOOPMAN P., MCLAUGHLIN, E.A. (2006). CXCR4/SDF1 interaction inhibits the primordial to primary follicle transition in the neonatal mouse ovary. *Dev Biol*, **293**: 449-460.
- HOMBURG, R. (1998). Involvement of growth factors in the pathophysiology of polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*, **12**: 391-397.
- HU, C.L., COWAN, R.G., HARMAN, R.M., QUIRK S.M. (2004). Cell cycle progression and activation of akt kinase are required for insulin-like growth factor 1-mediated suppression of apoptosis in granulosa cells. *Mol Endocrinol*, **18** (2): 326-338.
- JEHLE, P.M., FUSSGAENGER, R.D., BLUM, W.F., ANGELUS, N.K., HOEFLICH, A., WOLF, E., JUNGWIRTH, R.J. (1999). Differential autocrine regulation of intestine epithelial cell proliferation and differentiation by insulin-like growth factor (IGF) system components. *Horm Metab Res*, **31**: 97-102.
- JOHNSON, M.C., DEVOTO, L., RETAMALES, I., KOHEN, P., TRONCOSO, J.L., AGUILERA, G. (1996). Localization of insulin-like growth factor (IGF-I) and IGF-I receptor expression in human corpora lutea: role on estradiol secretion. *Fertil Steril*, **65** (3): 489-494.
- JEROME, L., SHIRY, L., JONES, B.L. (2003). Deregulation of the IGF axis in cancer: epidemiological evidence and potential therapeutic interventions. *Endocr Relat Cancer*, **10**: 561-578.
- KAHLERT, S., NUEDLING, S., VAN EICKELS, M., VETTER, H., MEYER, R., GROHE, C. (2000). Estrogen receptor α rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem*, **275** (24): 18447-18453.
- KAPUR, S., TAMADA, H., DEY, S.K., ANDREWS G.K. (1992). Expression of Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) and Its Receptor in the pre-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol Reprod*, **46**: 208-219.
- KATO, S., ENDOH, H., MASUHIRO, Y., KITAMOTO, T., UCHIYAMA, S., SASAKI, H., MASUSHIGE, S., GOTOH, Y., NISHIDA, E., KAWASHIMA, H., METZGER, D., CHAMBON, P. (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, **270**: 1491-1494.
- KEZELE, P., NILSSON, E., SKINNER, M.K. (2002). Cell-cell interactions in primordial follicle assembly and development. *Front Biosci*, **7**: 1990-1996.
- KEZELE, P., SKINNER, M.K. (2003). Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology*, **144**: 3329-3337.
- KLEINMAN, D., KARAS, M., ROBERTS, C. T., LEROITH, D., PHILIP, M., SEGEV, Y., LEVY, J., SHARONI, Y. (1995). Modulation of insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors and membrane-associated IGF-binding proteins in endometrial cancer cells by estradiol. *Endocrinology*, **136**: 2531-2537.
- KLOTZ, D.M., HEWITT, S.C., KORACH, K.S., DIAUGUSTINE, R.P. (2000). Activation of a uterine insulin-like growth factor I signaling pathway by clinical and environmental estrogens: requirement of estrogen receptor- α . *Endocrinology*, **141** (9): 3430-3439.
- KOOPMAN, P., MUNSTERBERG, A., CAPEL, B., VIVIAN, N., LOVELL- BADGE, R. (1990). Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature*, **348**: 450-452.

- KRINKE, G.J. (2000). The handbook of experimental animals The Laboratory Rat. Academic Press.,USA. sy 302-303.
- KWINTKIEWICZ, J., GIUDICE, L.C. (2009). The interplay of insulin-like growth factors, gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and function. *Semin Reprod Med*, **27** (1): 43-51.
- LAMMERS, R., GRAY, A., SCHLESSINGER, J., ULLRICH, A. (1989). Differential signalling potential of insulin- and IGF-I-receptor cytoplasmic domains. *EMBO J*, **8**: 1369-1375.
- LAWS, S.C., CAREY, S.A., FERRELL, J.M., BODMAN, G.J., COOPER, R.L. (2000). Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats. *Toxicol Sci*, **54**: 154-167.
- LEE, A. V., JACKSON, J. G., GOOCH, J. L., HILSENBECK, S. G., CORONADO- HEINSOHN, E., OSBORN, C. K., YEE, D. (1999). Enhancement of insulin-like growth factor signaling in human breast cancer: estrogen regulation of insulin receptor substrate-1 expression in vitro and in vivo. *Mol. Endocrinol*, **13**: 787-796.
- LEHNINGER, A.L. (1982). Hormones. In: Nelson DL, ed. Principles of Biochemistry. New York: Worth Publ. sy 737-738.
- LEROITH, D. (1996). Insulin-like growth factor receptors and binding proteins. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, **10**: 49-73.
- LEVY, M.J., HERNANDEZ, E.R., ADASHI, E.Y., STILLMAN, R.J., ROBERTS JR, C.T., LEROITH, D. (1992). Expression of the insulin-like growth factor (IGF)-I and -II and the IGF-I and -II receptor genes during postnatal development of the rat ovary. *Endocrinology*, **131**: 1202-1206.
- LI, X., ZHANG, S., SAFE, S. (2006). Activation of kinase pathways in MCF-7 cells by 17 β -estradiol and structurally diverse estrogenic compounds. *J Steroid Biochem & Mol Biol*, **98**: 122-132.
- LOSORDO, D.W., DIMMELER, S. (2004). Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for ischemic disease. Part I: angiogenic cytokines. *Circulation*, **109** (21): 2487-2491.
- LUNA, L.G. (1968). Manual of histologic staining methods of the armed Forces institute of pathology (3rd ed.). McGraw - Hill Company, New York.
- MA, Z. Q., SANTAGATI, S., PATRONE, C., POLLIO, G., VEGETO, F., MAGGI, A. (1994). Insulin-like growth factors activate estrogen receptor to control the growth and differentiation of the human neuroblastoma cell line SK-ER3. *Mol. Endocrinol*, **8**: 910-918.
- MARCINKIEWICZ, J.L., BALCHAK, S.K., MORRISON, L.J. (2002). The involvement of tumor necrosis factor-alpha (TNF) as an intraovarian regulator of oocyte apoptosis in the neonatal rat. *Front Biosci*, **7**: 1997-2005.
- MARTINEZ, E.M., AND SWARTZ, W.J. (1992). Effects of methoxychlor on the reproductive system of the adult female mouse: 2. Ultrastructural observations. *Reprod Toxicol*, **6**: 93-98.
- MASSAGUE, J., CZECH, M.P. (1982). The subunit structures of two distinct receptors for insulin-like growth factors I and II and their relationship to the insulin receptor. *Biol Chem*, **257**: 5038-5046
- MATHEWS, L.S., NORSTEDT, G., PALMITER, R.D. (1986). Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA (PNAS)*, **83**: 9343-9347.

- MAZERBOURG, S., BONDY, C.A., ZHOU, J., MONGET, P. (2003). The insulin-like growth factor system: a key determinant role in the growth and selection of ovarian follicles? a comparative species study. *Reprod Domest Anim*, **38**: 247-258.
- MCGEE, E.A., HSUEH, A.J.W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, **21** (2): 200-214.
- MCLAUGHLIN, E.A., MCIVER, S.C. (2009). Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction*, **137**: 1-11.
- MILLER, K.P., GUPTA, R.K., GREENFELD, C.R., BABUS, J.K., FLAWS, J.A. (2005). Methoxychlor directly affects ovarian antral follicle growth and atresia through bcl-2- and bax-mediated pathways. *Toxicol Sci*, **88** (1): 213-221.
- MONGET, P., FABRE, S., MULSANT, P., LECERF, F., ELSEN, J.M., MAZERBOURG, S., PISSELET, C., MONNIAUX, D. (2002). Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Domest Anim Endocrinol*, **23**:139-154.
- MORGAN, D.O., EDMAN, J.C., STRANDRING, D.N., FRIED, V.A., SMITH, M.C, ROTH, R.A., RUTTER, W.J. (1978). Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein. *Nature*, **329**: 301-307.
- MORIMOTO, L.M., NEWCOMB, P.A., WHITE, E., BIGLER, J., POTTER, J.D. (2005). Insulin-like growth factor polymorphisms and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**: 1204-1211.
- MORIMOTO, L.M., NEWCOMB, P.A., WHITE, E., BIGLER, J., POTTER, J.D. (2005). Variation in plasma insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3: genetic factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**: 1394-1401.
- MURPHY, L.J., MURPHY, L.C., FRIESEN, H.G. (1987). Estrogen Induces Insulin-like Growth Factor-I Expression in the Rat Uterus. *Endocrinology*, **1** (7): 445-450.
- NELSON, J.F., GOSDEN, R.G., FELICIO, L.S. (1985). Effect of dietary restriction on estrus cyclicity and follicular reserve in aging C57BL/6J mice. *Biol Reprod*, **32**: 515-522.
- NEWBOLD, R.R., JEFFERSON, W.N., PADILLA-BANKS, E., HASEMAN J. (2004). Developmental exposure to diethylstilbestrol (DES) alters uterine response to estrogens in prepubescent mice: low versus high dose effects. *Reprod Toxicol*, **13** (3): 399-406.
- NILSSON, E., PARROTT, J.A., SKINNER, M.K. (2001). Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, **175**: 123-130.
- NILSSON, E.E., KEZELE, P., SKINNER, M.K. (2002). Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. *Mol. Cell. Endocrinol*, **188**: 65-73
- NILSSON, E.E., SKINNER M.K. (2003). Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. *Biol Reprod*, **69**: 1265-1272.
- NILSSON, E.E., SKINNER M.K. (2004). Kit ligand and basic fibroblast growth factor interactions in the induction of ovarian primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol*, **214**: 19-25.
- NILSSON, E., ROGERS, N., SKINNER, M. K. (2007). Actions of anti-Müllerian hormone on the ovarian transcriptome to inhibit primordial to primary follicle transition. *Reproduction*, **134**: 209-221.

- NILSSON, E., DOLE, G., SKINNER, M.K. (2009). Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Reproduction*, **138**: 697-707.
- OLIVER, J.E., AITMAN, T.J., POWELL, J.F., CATHERINE, A., WILSON, C.A., CLAYTON, R.N. (1989). Insulin-Like Growth Factor I Gene Expression in the Rat Ovary is Confined to the Granulosa Cells of Developing Follicles. *Endocrinology*, **124**: 2671-2679.
- OTA, A., WILSON, G.L., SPILBERG, O., PRUSS, R., LEROITH, D. (1988). Functional insulin-like growth factor I receptors are expressed by neural-derived continuous cell lines. *Endocrinology*, **122**: 145-152.
- ÖZER A., (2010). Dişi genital sitem Veteriner Özel Histoloji. Nobel Yayın Dağıtım, 219-221.
- PARROTT, J.A., SKINNER, M.K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, **140**: 4262-4271.
- PEPLING, M.E., SPRADLING, A.C. (2001). Mouse ovarian germ cell cysts undergo programmed breakdown to form primordial follicles. *Dev Biol*, **234**: 339-351.
- PEPLING, M.E. (2006). From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*, **44**: 622-632.
- PERKS, C.M., PETERS A.R., WATHES D.C. (1999). Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*, **116(1)**: 157-165.
- PETERS, H., BYSKOV, A.G., HIMELSTEIN-BRAW R., FABER M. (1975). Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary. *J Reprod Fertil*, **45**: 559-566.
- PORETSKY, L., CATALDO, N.A., ROSENWAKS, Z., GIUDICE, L.C. (1999). The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev*, **20**: 535-582.
- PORTER, A.C., VAILLANCOURT, R.R. (1998). Tyrosine kinase receptor-activated signal transduction pathways which lead to oncogenesis. *Oncogene*, **17 (11)**: 1343-52.
- PUTZ, O., SCHWARTZ, C.B., KIM, S., LEBLANC, G.A., COOPER, R.L., PRINS G.S. (2001). Neonatal low- and high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: 1. effects on the prostate gland. *Biol Reprod*, **65**: 1496-1505.
- QUIRK, S.M., COWAN, R.G., HARMAN, R.M., HU, C.L., PORTER, D.A. (2004). Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. *J Anim Sci*, **82 (E-Suppl)**: E40-52.
- RAJKOVIC, A., PANGAS, S.A., BALLOW, D., SUZUMORI, N., MATZUK, M.M. (2004). NOBOX deficiency disrupts early folliculogenesis and oocyte-specific gene expression. *Science*, **305**: 1157-1159.
- RECHLER, M.M., NISSLEY, S.P. (1991). Insulin-like growth factors, in Peptide Growth Factors and their Receptors I, Sporn, M., and Roberts, A, (Eds.), Springer- Verlag, New York, NY. sy. 263-365.
- RICHARDS, R. G., DIAUGUSTINE, R. P., PETRUSZ, P., CLARK, G. C., SEBASTIAN, J. (1996). Estradiol stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 in the uterus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**: 12002-12007.

- RICHARDS, R. G., WALKER, M. P., SEBASTIAN, J., DIAUGUSTINE, R. P. (1998). Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) receptor-insulin receptor substrate complexes in the uterus altered signaling response to estradiol in the igf-1m/M MOUSE J. *Biol Chem*, **273**: 11962-11969.
- RUAN, W., CATANESE, V., WIECZOREK, R., FELDMAN, M., KLEINBERG, D.L. (1995). Estradiol enhances the stimulatory effect of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on mammary development and growth hormone-induced IGF-I messenger ribonucleic acid. *Endocrinology*, **136**: 1296-1302.
- RUDEN, D.M., XIAO, L., GARFINKEL, M.D., LU, X. (2005). Hsp90 and environmental impacts on epigenetic states: a model for the trans-generational effects of diethylstilbestrol on uterine development and cancer, *Hum Mol Genet*, **14** (1): R149-155.
- SAMANI, A.A, YAKAR, S., LEROITH, D, BRODT, P. (2007). The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: Overview and recent insights. *Endocr Rev*, **28**: 20-47.
- SAR, M., WELSCH, F. (1999). Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology*, **140**: 963-971.
- SCHINDLER, R., NILSSON, E., SKINNER, M.K. (2010). Induction of ovarian primordial follicle assembly by connective tissue growth factor CTGF. *PLoS ONE*, **5** (9): e12979.
- SEPP-LORENZINO, L. (1998). Structure and function of the insulinlike growth factor I receptor. *Breast Cancer Res Treat*, **47**: 235-253.
- SIDDLE, K., SOOS, M.A., FIELD, C.E., NAVE, B.T. (1994). Hybrid an atypical insulin /insulin like growth factor I receptors. *Horm Res*, **41**: 56-65.
- SKINNER, M.K. (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update*, **11** (5): 461-471.
- SMITH, C. L. (1998). Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol. Reprod*, **58**: 627-632.
- SOBINOFF, A.P., PYE, V., NIXON B., ROMAN, S.D., MCLAUGHLIN E.A. (2010). Adding insult to injury: effects of xenobiotic-induced preantral ovotoxicity on ovarian development and oocyte fusibility. *Toxicol Sci*, **118** (2): 653-666
- SOTO, A.M., VANDENBERG, L.N., MAFFINI, M.V., SONNENSCHNEIN, C. (2008). Does breast cancer start in the womb? *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, **102**:125-133
- SOYAL, S.M., AMLEH, A., DEAN, J. (2000). FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. *Development*, **127**: 4645-4654.
- SRIVASTAVA, V.K., HINEY, J.K., DEES, W.L. (1999). Effects of Ethanol on the Intraovarian Insulin-Like Growth Factor-1 System in the Prepubertal Rat. *Alcohol Clin Exp Res*, **23** (2): 293-300.
- SU, H.Y., HCKFORD, J.G., BICKERSTAFFE, R., PALMER, B.R. (1999). Insulin- like growth factor 1 and hair growth. *Dermatol Online J*, **5** (2): 1.
- SURANI, M.A. (2001). Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature*, **414**: 122-128.
- SWARTZ, W.J., EROSCHENKO, V.P. (1998). Neonatal exposure to technical methoxychlor alters pregnancy outcome in female mice. *Reprod Toxicol*, **12** (6): 565-573.

- SWARTZ, W.J., CORKERN, M. (1992). Effects of methoxychlor treatment of pregnant mice on female offspring of the treated and subsequent pregnancies. *Reprod Toxicol*, **6**: 431-434.
- STOCCO, D.M., CLARK, B.L. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rew*, **17 (3)**: 221-244.
- STUBBS, S.A., WEBBER, L.J., STARK, J., RICE, S., MARGARA ,R., LAVERY, S., TREW, G.H., HARDY, K., FRANKS, S. (2013). Role of insulin-like growth factors in initiation of follicle growth in normal and polycystic human ovaries. *J Clin Endocrinol Metab*, **98 (8)**: 3298-3305.
- ULLRICH, A., GRAY, A., TAM, A.W., YANG-FENG, T., TSUBOKAWA, M., COLLINS, C., HENZEL, W., LE BON, T. KATHURIA, S., CHEN, E., JACOBS S , FRANCKE U, RAMACHANDRAN, J., FUJITA-YAMAGUCHI Y. (1986). Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *EMBO J*, **5**: 2503-2512.
- UZUMCU, M., KUHN, P.E., MARANO, J.E., ARMENTI, A.E., PASSANTINO, L. (2006). Early postnatal methoxychlor exposure inhibits folliculogenesis and stimulates anti-Mullerian hormone production in the rat ovary. *J. Endocrinol*, **191**: 549-558.
- UZUMCU, M., ZACHOW, R. (2007). Developmental exposure to environmental endocrine disruptors: Consequences within the ovary and on female reproductive function. *Reprod Toxicol*, **23**: 337-352.
- TAM, P.P.L., SNOW, M.H.L. (1981). Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol*, **64**: 133-147.
- TANYOLAÇ A. (1999). Özel Histoloji. Yorum Basın Yayın Sanayi LTD. ŞTİ. Sy. 145.
- TAWIL H. (2008). Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1). *MAP*.
- THISSEN, J. P., KETELSLEGGERS, J.M., UNDERWOOD, L. E. (1994). Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocr. Rev*, **15**: 80–163.
- TIEMANN, U. (2008). In vivo and in vitro effects of the organochlorine pesticides DDT, TCPM, methoxychlor, and lindane on the female reproductive tract of mammals: A review *Reprod Toxicol*, **25**: 316-326.
- TINGEN, C., KIM, A., WOODRUFF, T.K. (2009). The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. *Mol Hum Reprod*, **15(12)**: 795-803.
- TODA, K., MIYAURA, C., OKADA, T., SHIZUTA, Y. (2002). Dietary Bisphenol a prevents ovarian degeneration and bone loss in female mice lacking the aromatase gene (Cyp19). *Eur. J. Biochem*. **269**: 2214–2222.
- TOMIC, D., FRECH, M.S., BABUS, J.K., GUPTA, R.K., FURTH, P.,A., KOOS, R.D., FLAWS, J.A. (2006). Methoxychlor induces atresia of antral follicles in era- overexpressing mice. *Toxicol Sci*, **93 (1)**: 196-204
- VIVANCO, I., SAWYERS, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2**: 489-501.
- WANDJI, S.A., WOOD, T.L., CRAWFORD ,J., LEVISON, S.W., HAMMOND, J.M. (1998). Expression of mouse ovarian insulin growth factor system components during follicular development and atresia. *Endocrinology*, **139 (12)**: 5205-14.
- WANG, X.J., PAGE,E.B., FENTON, S.E., YOU, L. (2006). Altered mammary gland development in male rats exposed to genistein and methoxychlor. *Toxicol Sci*, **91 (1)**: 93-103.

- WASIELAK, M., BOGACKI, M. (2007). Apoptosis inhibition by insulin-like growth factor (IGF)-I during in vitro maturation of bovine oocyte. *J Reprod Dev*, **53** (2): 419-426.
- WAUCHOPE, R.D., BUTTLER, T.M., HORNSBY, A.G., AUGUSTIJN-BECKERS, P.W., BURT, J.P. (1992). The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Rev Environ Contam Toxicol*, **123**: 1-155.
- WERNER, H., SHEN-ORR, Z., STANNARD, B., BURGUERA, B., ROBERTS, C. T., JR., LEROITH, D. (1990) Experimental diabetes increases insulinlike growth factor 1 and 11 receptor concentration and gene expression in kidney. *Diabetes*, **39**: 1490-1497.
- WHITLEY, R.J., MEIKLE, A.W., WATTS, N.B. (1996). Pituitary Function. In: Burtis CA, Ashwood ER, editors. *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*. Fourth edition, W.B.Saunders Company, Philadelphia, 626-661.
- WOODRUFF, T.K., MAYO, K.E. (2005). To beta or not to beta: estrogen receptors and ovarian function. *Endocrinology*, **146**: 3244-3246.
- YAN, C., WANG, P., DEMAYO, J., DEMAYO, F.J., ELVIN, J.A., CARINO, C., PRASAD, S.V., SKINNER, S.S., DUNBAR, B.S., DUBE, J.L., CELESTE, A.J., MATZUK, M.M. (2001). Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Mol Endocrinol*, **15** (6): 854-866.
- YARDEN, Y., ULLRICH, A. (1988). Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem*, **57**: 443-478.
- YOUNGLAI, E.V., HOLLOWAY A.C., FOSTER, W.G. (2005). Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success. *Hum Reprod Update*, **11**: 43-57.
- ZACHOW, R., UZUMCU, M. (2006). The methoxychlor metabolite, 2,2-bis (phydroxyphenyl)-1,1,1-trichloroethane, inhibits steroidogenesis in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Reprod Toxicol*, **22**: 659-665.
- ZAMA, A.M., UZUMCU, M. (2009). Fetal and neonatal exposure to the endocrine disruptor methoxychlor causes epigenetic alterations in adult ovarian genes. *Endocrinology*, **150**: 4681-4691.
- ZAMA, A.M., UZUMCU, M. (2010). Epigenetic effects of endocrine-disrupting chemicals on female reproduction: An ovarian perspective. *Front Neuroendocrinol*, **31**: 420-439.
- ZAPF, J., FROESCH, E.R., HUMBEL, R.E. (1981). The insulin-like growth factor (IGF) of human serum: chemical and biological characterization and aspects of their possible physiological role. *Curr Top Cell Regul*, **19**: 257-309.
- ZHOU, J., CHIN, E., BONDY C. (1991). Cellular Pattern of insulin-like factor-I (IGF-I) and IGF-I receptor gene expression in the developing and mature ovarian follicle. *Endocrinology*, **129**: 3281-3288.