



**FARKLI BESLENME TIPLERİNİN
FOLİKÜLOGENEZ VE OOSİT GELİŞİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Semir GÜL
İnönü Üniversitesi ve Fırat Üniversitesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Ortak Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet GÜL
Ortak Tez Danışmanı: Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN

Doktora Tezi – 2020

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLI BESLENME TİPLERİNİN
FOLİKÜLOGENEZ VE OOSİT GELİŞİMİ
ÜZERİNE ETKİLERİ**

Semir GÜL

**İnönü Üniversitesi ve Fırat Üniversitesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Ortak Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Mehmet GÜL**

**Ortak Danışmanı
Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN**

**MALATYA
2020**

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ.....	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Dişi üreme sistemi	2
2.1.1. Dişi Üreme Sistemi Gelişimi.....	2
2.1.2. Ovaryum Histolojisi	4
2.1.3. Folikülogenez ve Oosit Spesifik Genler.....	8
2.1.4. Beslenme ve Dişi Üreme Sistemi	11
3. MATERYAL VE METOT	13
3.1. Deney düzeni ve uygulama süreci	13
3.2. Menstrual siklus evrelerinin belirlenmesi.....	15
3.3. Histolojik Teknikler.....	18
3.3.1. Doku Takibi ve Kesit Alma.....	18
3.3.2. Folikül sınıflandırması ve sayımı	18
3.3.3. Histomorfometrik Ölçümler	20
3.3.4. Histopatolojik Değerlendirmeler	21
3.3.5. İmmünohistokimyasal ve İmmünoflorasan Boyamalar	21
3.4. Transmisyon Elektron Mikroskopi Analizleri	23
3.5. Gen Ekspresyon Analizleri	25
3.5.1. RNA İzolasyonu	25
3.5.2. Genomik DNA'nın (gDNA) eliminasyonu ve cDNA Sentezi.....	25
3.5.3. Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu (qPCR) Analizi.....	27
3.5.4. RT-PCR Sonuçlarının Hesaplanması.....	28
3.6. Biyokimyasal Analizler	29
3.7. İstatistiksel yöntem	30
4. BULGULAR.....	31
4.1. Hayvan, Ovaryum ve Tüketilen Yem Ağırlıkları	31

4.2. Fizyolojik Menstrual Siklus Varyasyonları	33
4.3. Histolojik Bulgular	38
4.2.1. Ovaryal Folikül Sayıları	38
4.2.2. Morfometrik Ölçümler.....	43
4.2.3. Histopatolojik hasar skorları.....	46
4.2.4. İmmünohistokimyasal ve İmmunoflorasan Bulgular	53
4.2.5. Elektron Mikroskopik Bulgular.....	68
4.4. Biyokimya Analizleri.....	85
4.5. Moleküler Analizler.....	86
4.5.1. Real Time PCR Analizi	86
5. TARTIŞMA	93
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	108
KAYNAKLAR	109
EKLER.....	117
EK-1: Etik kurul belgesi.....	117

TEŐEKKÜR

Tez çalıőmamın baőlangıcından sonuna kadar her aşamasında titizlikle ve sabırla bana yol gösteren ve destek veren tez danıőmanlarım Sayın Prof. Dr. Mehmet GÜL ve Prof. Dr. İbrahim Enver OZAN Hocalarıma, tez çalıőmamın moleküler analizlerinde yardımcı olan Prof. Dr. Barıő OTLU Hocama, biyokimya analizlerinde yardımcı olan Doç Dr. Erman ERDEMLİ Hocama ve istatistiksel analizinde yardımcı olan Doç Dr. Harika Gőzde GÖZÜKARA BAĞ Hocama teőekkürlerimi arz ederim. Ayrıca Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Baőkanı Sayın Prof. Dr. Nigâr VARDI Hocama ve tüm Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalındaki Hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teőekkür ederim.

Ayrıca bu zorlu süreçte her zaman yanımda olan ve fedakârlıklarıyla çalıőmalarımı tamamlamamda büyük payı olan sevgili eőime teőekkürlerimi arz ederim.

ÖZET

Farklı Beslenme Tiplerinin Folikülogenez ve Oosit Gelişimi Üzerine Etkileri

Amaç: Farklı beslenme alışkanlıklarının folikülogenez ve oosit gelişimi üzerine etkileri araştırılarak beslenme ve infertilite arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışma *Wistar Albino* cinsi 21 günlük 40 adet dişi sıçan üzerinde yapıldı. Gruplar:

1. Kontrol (n=10): Normal bakım yemi grubu.
2. Karbonhidrat (n=10): %70 karbonhidrat ağırlıklı yem grubu.
3. Yağ (n=10): %60 yağ ağırlıklı yem grubu.
4. Protein (n=10): %50 protein ağırlıklı yem grubu.

Sıçanlar belirtilen diyetlerle 80 gün beslendi. Deney sonunda gruplar, menstrual siklus düzeni, ovaryumlarda folikül sayıları, oosit ve folikül çapları, folikülogenez spesifik gen, protein ve hormonların düzeyleri, ultrastrüktürel değişimler açısından değerlendirilerek karşılaştırma yapıldı.

Bulgular: Menstrual siklus evresinin yağ ve protein gruplarında uzadığı tespit edildi. Genel olarak, primordiyal folikül rezervi ve ileri düzey folikül tiplerinin sayıları kontrole göre karbonhidrat grubunda benzer, yağ ve protein gruplarında ise azalmış bulunurken atretik folikül sayısı yağ ve protein gruplarında kontrol ve karbonhidrat gruplarına göre yüksek bulundu. Rt-PCR sonuçlarına ve IHC skorlamalarına göre, her üç deneysel grupta da oosit gelişiminde önemli rol oynayan genler için kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede farklılıklar tespit edildi. Dişi üreme sistemi hormonları da her üç grupta kontrole göre anlamlı derecede farklı bulundu. Ultrastrüktürel olarak kontrol grubuna kıyasla diyet gruplarında granuloza hücreleri, granuloza lutein hücreleri ve oositlerde patolojik bulgulara ve zona pellusidada yapısal bozukluklara rastlandı.

Sonuç: Uzun süreli karbonhidrat, yağ ve protein ağırlıklı besin diyetleri folikülogenez spesifik genlerin ekspresyonunu ve folikülogenezde rol oynayan hormonların düzeylerini bozup folikül rezervini azaltarak ve normal folikül gelişimini baskılayarak infertiliteye yol açabilir.

Anahtar Kelimeler: Beslenme, folikülogenez, infertilite, karbonhidrat, oosit gelişimi, protein, yağ.

ABSTRACT

Effects of Different Nutrition Types on Folliculogenesis and Oocyte Development

Aim: To reveal the relationship between nutrition and infertility by investigating the effects of different feeding habits on folliculogenesis and oocyte development.

Material and Methods: The study was performed on 21 days old, 40 *Wistar Albino* female rats. Groups:

1. Control (n=10): Normal maintenance group.
2. Carbohydrate (n=10): 70% carbohydrate group.
3. Fat (n=10): 60% fat group.
4. Protein (n=10): 50% protein group.

The rats were fed for 80 days. The groups were evaluated in terms of menstrual cycle order, follicle numbers in ovaries, oocyte and follicle diameters, folliculogenesis specific gene, protein and hormonal levels, and a comparison was made in terms of ultrastructural changes.

Results: Menstrual cycle phase was prolonged in the fat and protein groups. In general, while the number of primordial follicle reserve and advanced follicle types were similar to the control in the carbohydrate group, they were decreased in the fat and protein groups. The number of atretic follicle was higher in the fat and protein groups compared to the control and carbohydrate groups. Significant differences were detected in all three groups compared to the control group for expression of different genes playing crucial role in folliculogenesis. Reproductive hormones were also significantly different in all three groups compared to the control. Pathological findings in granulosa cells, granulosa lutein cells, oocyte and in zona pellucida was detected in the diet groups compared to the control group.

Conclusion: Long-term carbohydrate, fat, and, protein-based diets may lead to infertility by reducing the follicle reserve, disrupting the expression of folliculogenesis-specific genes and ovarian hormone levels.

Keywords: Nutrition, folliculogenesis, infertility, carbohydrate, oocyte development, protein, fat.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACTB	: Beta Aktin
Atr. Fol.	: Atretik Folikül
BDMA	: Benzyldimethylamine
BMP15	: Bone Morphogenetic Protein 15
Cas 3	: Caspase 3
D	: Diestrous
DDSA	: Dodecenly Succinic Anhydride
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
E	: Estrous
E. Coli	: Escherichia Coli
E2	: Östrojen
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Fh	: Folikül Hücresi
Foxo3a	: Forkhead Box O3a
FSH	: Folikül Stimulan Hormon
g	: Gram
GAS2	: Growth Arrest-Specific Protein 2
GDF9	: Gowth Differention Factor 9
gDNA	: genomik Deoksiribonükleik Asit
gER	: granüllü Endoplazmik Retikulum
Gh	: Granuloza Hücresi
Glh	: Granuloza Lutein Hücresi
H&E	: Hematoksilen - Eozin
H₂O	: Su
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
HKG	: Housekeeping Gen
IF	: İmmünoflorasan
IHC	: İmmünohistokimya
i.p.	: İntraperitoneal
kg	: Kilogram

Kh	: Karbonhidrat
KL	: Korpus Luteum
L	: Litre
LH	: Luteinizan Hormon
M	: Metestrous
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
ng	: Nanogram
OMI	: Oosit Maturasyon İnhibitörü
P	: Proestrous
PBS	: Phosphate Buffered Saline
PCR	: Polymerase Chain Reaction
Pr	: Protein
Pr. Fol.	: Primer Folikül
Preov. Fol.	: Preovulatuvar Folikül
Prm. Fol.	: Primordiyal Folikül
qPCR	: Quantitative (kantitatif) Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribonükleik Asit
RNaz	: Ribonükleaz
RT	: Reverz Transkriptaz
Rt-PCR	: Real Time Polymerase Chain Reaction
SD	: Standart Sapma
Sek. Fol.	: Sekonder Folikül
SF	: Serum Fizyolojik
SRY	: Seks (eşey) Determining Region
TBF	: Testis Belirleyici Faktör
TEM	: Transmisyon Elektron Mikroskopi
TFS	: Toplam Folikül Sayısı
Th	: Teka Hücresi
Trs. Fol.	: Tersiyer Folikül
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
x	: Objektif Büyütmesi
Y	: Yağ

Zp1 : Zona Pellusida 1
Zp2 : Zona Pellusida 2
Zp3 : Zona Pellusida 3



ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1: Dişi üreme sistemi şematik çizimi	2
Şekil 2.2: Ovaryum korteks ve medullası	5
Şekil 2.3: Folikül tipleri.....	6
Şekil 2.4: Zona Pellusida moleküler yapısı	8
Şekil 2.5: BMP-15 etki mekanizması.....	9
Şekil 2.6: GDF9 etki mekanizması.....	10
Şekil 2.7: Foxo3a etki mekanizması.....	10
Şekil 3.1: Deney grupları.....	13
Şekil 3.2: Rat ovaryum dokuları.....	15
Şekil 3.3: Birebir takip için işaretlenen ratlar.....	16
Şekil 3.4: Vajinal smear için alınan örnekler	16
Şekil 3.5: Menstrual siklus evrelerine göre vajinal smear görünüşleri.....	17
Şekil 3.6: Seri kesit alımı ve folikül sayımı	19
Şekil 3.7: Foliküllerin morfolojik olarak sınıflandırılması	19
Şekil 3.8: Folikül ve oosit çap ölçümleri metodu.....	20
Şekil 3.9: Zona Pellusida kalınlık ölçüm metodu.....	21
Şekil 3.10: Oosit alanının tespiti ve ZP'nin görüntülenmesi.....	24
Şekil 3.11: Elisa kitleri referans standartının seri dilüsyon örneği.....	29
Şekil 4.1: Gruplar arası vücut kitle indeksleri karşılaştırması.....	32
Şekil 4.2: Tüketilen yem miktarları.....	33
Şekil 4.3: Gruplara göre puberte yaşları.....	35
Şekil 4.4: Ortalama menstrual siklus uzunlukları	36
Şekil 4.5: Menstrual siklus uzunlukları toplam adetleri ve normal siklus yüzdesi	37
Şekil 4.6: Menstrual siklus evre uzunluklarının karşılaştırması.....	38
Şekil 4.7: Gruplar arası primordiyal folikül sayıları	39
Şekil 4.8: Gruplar arası primer folikül sayıları.....	40
Şekil 4.9: Gruplar arası sekonder folikül sayıları.....	40
Şekil 4.10: Gruplar arası tersiyer folikül sayıları	41
Şekil 4.11: Gruplar arası preovulatuvar folikül sayıları	41
Şekil 4.12: Gruplar arası poliovulatuvar folikül sayıları	42

Şekil 4.13: Gruplar arası atretik folikül sayıları	42
Şekil 4.14: Gruplar arası korpus luteum sayıları	43
Şekil 4.15: Stromal doku konjesyonu.....	48
Şekil 4.16: Stromal doku konjesyonu.....	48
Şekil 4.17: Stromal doku inflamasyonu	49
Şekil 4.18: Stromal doku inflamasyonu	49
Şekil 4.19: Korpus luteumda konjesyon.....	51
Şekil 4.20: Korpus luteumda konjesyon.....	51
Şekil 4.21: Korpus luteum inflamasyonu	52
Şekil 4.22: Korpus luteum inflamasyonu	52
Şekil 4.23: Zona Pellusida 1 ekspresyonu.....	54
Şekil 4.24: Zona Pellusida 1 ekspresyonu.....	54
Şekil 4.25: Zona Pellusida 2 ekspresyonu.....	55
Şekil 4.26: Zona Pellusida 2 ekspresyonu.....	55
Şekil 4.27: Zona Pellusida 2 ekspresyonu.....	56
Şekil 4.28: Zona Pellusida 2 ekspresyonu.....	57
Şekil 4.29: Zona Pellusida 3 ekspresyonu.....	58
Şekil 4.30: Zona Pellusida 3 ekspresyonu.....	58
Şekil 4.31: Zona Pellusida 3 ekspresyon.....	59
Şekil 4.32: Zona Pellusida 3 ekspresyonu.....	60
Şekil 4.33: BMP15 ekspresyonu	61
Şekil 4.34: BMP15 ekspresyonu	62
Şekil 4.35: GDF9 ekspresyonu.....	62
Şekil 4.36: GDF9 ekspresyonu.....	63
Şekil 4.37: Foxo3a ekspresyonu.....	64
Şekil 4.38: Foxo3a ekspresyonu.....	64
Şekil 4.39: GAS2 ekspresyonu.....	65
Şekil 4.40: GAS2 ekspresyonu.....	66
Şekil 4.41: Caspase 3 ekspresyonu.....	67
Şekil 4.42: Caspase 3 ekspresyonu.....	67
Şekil 4.43: Kontrol grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri	69
Şekil 4.44: Kontrol grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri	69
Şekil 4.45: Kontrol grubu oosit ve zona pellusida	70
Şekil 4.46: Kontrol grubu granuloza hücreleri.....	70

Şekil 4.47: Kontrol grubu granuloza lutein hücreleri.....	71
Şekil 4.48: Karbonhidrat grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri	73
Şekil 4.49: Karbonhidrat grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri	73
Şekil 4.50: Karbonhidrat grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri	74
Şekil 4.51: Karbonhidrat grubu atretik folikül	74
Şekil 4.52: Karbonhidrat grubu granuloza hücreleri	75
Şekil 4.53: Karbonhidrat grubu granuloza lutein hücreleri	75
Şekil 4.54: Yağ grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri	77
Şekil 4.55: Yağ grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri	77
Şekil 4.56: Yağ grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri	78
Şekil 4.57: Yağ grubu atretik folikül.....	78
Şekil 4.58: Yağ grubu granuloza hücreleri.....	79
Şekil 4.59: Yağ grubu granuloza hücreleri.....	79
Şekil 4.60: Yağ grubu granuloza lutein hücresi	80
Şekil 4.61: Yağ grubu granuloza lutein hücreleri.....	80
Şekil 4.62: Protein grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri	82
Şekil 4.63: Protein grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri	82
Şekil 4.64: Protein grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücresi	83
Şekil 4.65: Protein grubu granuloza hücreleri.....	83
Şekil 4.66: Protein grubu granuloza hücreleri.....	84
Şekil 4.67: Protein grubu granuloza lutein hücreleri.....	84
Şekil 4.68: Gruplar arası gen ekspresyonlarının karşılaştırılması.....	89
Şekil 4.69: Gruplar arası ZP1, Zp2, ve Zp3 RNA ekspresyonu.....	90
Şekil 4.70: Gruplar arası BMP15 ve GDF9 RNA ekspresyonu	91
Şekil 4.71: Gruplar arası Foxo3a RNA ekspresyonu	91
Şekil 4.72: Gruplar arası GAS2 RNA ekspresyonu	92
Şekil 5.1: Besin diyetlerinin folikülogenez üzerine etki şeması.....	103

TABLULAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 3.1: Deneysel Yem İçerikleri.....	14
Tablo 3.2: Menstrual siklus evrelerine göre hücrelerin bulunma oranları.....	17
Tablo 3.3: Doku takip ve boyama prosedürleri	22
Tablo 3.4: IHC ve IF için kullanılan antikorlar	22
Tablo 3.5: EM Doku Takip ve Grid Boyama (Kontrastlama) Prosedürü	23
Tablo 3.6: Elektron mikroskopik doku takip basamaklarında kullanılan solüsyonlar... 24	
Tablo 3.7: gDNA eliminasyonunda ve cDNA sentezinde kullanılan solüsyonlar.....	26
Tablo 3.8: gDNA eliminasyon reaksiyonu	27
Tablo 3.9: Reverz transkripsiyon master miksi hazırlanması	27
Tablo 3.10: Çalışmada araştırılan genler ve primer dizileri	28
Tablo 3.11: Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyon Karışımının Hazırlanması	28
Tablo 3.12: Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu Döngü Sayısı ve Süresi	28
Tablo 3.13: Hormon analizlerinde kullanılan ELISA kitleri	29
Tablo 4.1: Sıçanların haftalık ağırlık değişimleri	31
Tablo 4.2: Deney başlangıç ile deney sonu ağırlık karşılaştırması.....	31
Tablo 4.3: Gruplar arası ovaryum ağırlıkları karşılaştırması.....	32
Tablo 4.4: Günlük menstrual siklus evreleri.....	34
Tablo 4.5: Gruplara göre puberte yaşları (gün)	35
Tablo 4.6: Menstrual siklus uzunluk ortalamaları	36
Tablo 4.7: Gruplara göre siklus uzunlukları ve anormal siklus toplamı.....	37
Tablo 4.8: Grup içi menstrual siklus evre (P, E, M, D) ortalamaları.....	38
Tablo 4.9: Folikül tipleri ve korpus luteum sayıları	39
Tablo 4.10: Oosit ve folikül çap ölçüm verileri (μm).....	44
Tablo 4.11: Primer folikül oosit ve folikül çap ölçüm karşılaştırmaları.....	45
Tablo 4.12: Sekonder folikül oosit ve folikül çap ölçüm karşılaştırmaları.....	45
Tablo 4.13: Tersiyer folikül oosit ve folikül çap ölçüm karşılaştırmaları	46
Tablo 4.14: Preovulatuvar oosit ve folikül çap ölçüm karşılaştırmaları	46
Tablo 4.15: Zona pellusida kalınlığı karşılaştırması.....	46
Tablo 4.16: Stromal doku histopatolojik skorlamalar.....	47
Tablo 4.17: Korpus luteum histopatolojik skorlamalar	50

Tablo 4.18: ZP1, ZP2, Zp3 IHC skorlamaları	53
Tablo 4.19: BMP15 ve GDF9 IHC skorları.....	61
Tablo 4.20: Foxo3a IHC skorlamaları	63
Tablo 4.21: GAS2 IHC skorlamaları	65
Tablo 4. 22: Caspase 3 IHC skorlamaları	66
Tablo 4.23: FSH ve LH düzeyleri.....	85
Tablo 4.24: Progesteron ve Östrojen düzeyleri.....	85
Tablo 4.25: Adiponektin, Resistin ve Leptin düzeyleri	86
Tablo 4.26: Real Time PCR sonuçlarına göre ortalama delta CT değerleri	87
Tablo 4.27: Real Time PCR sonuçlarına göre ortalama delta $2^{-\Delta Ct}$ değerleri	87
Tablo 4.28: Real Time PCR sonuçlarına göre gen ekspresyon artış katsayıları	88



1. GİRİŞ

İnfertilite (kısırlık) dünya çapında 186 milyon insanı etkilediği tahmin edilen (1, 2) ve gelişmekte olan ülkelerde ortalama oranı %30'lara ulaşabilen bir sağlık problemidir (3). Son yıllarda, yaşam tarzının kadın üreme sağlığı üzerindeki etkileri bilimsel açıdan oldukça ilgi görmektedir (4-6). Vücut ağırlığı, vücut kompozisyonu, fiziksel aktivite ve beslenme kadınların doğurganlığını doğrudan etkileyebilecek faktörlerdir (5). İnsanlarda ve hayvanlarda üreme ve metabolizma birbiriyle sıkıca ilişkili olup karşılıklı ve birbirinin etkisi altında düzenlenir (7, 8). Bu nedenle, vücut metabolizmasını doğrudan etkileyen beslenme alışkanlıklarının üreme sistemi üzerine olumlu veya olumsuz etkileri kaçınılmazdır. Bu etkilerin ortaya konması da olası infertilite problemlerinin önüne geçilmesi ve doğurganlığın artırılması açısından oldukça önemlidir.

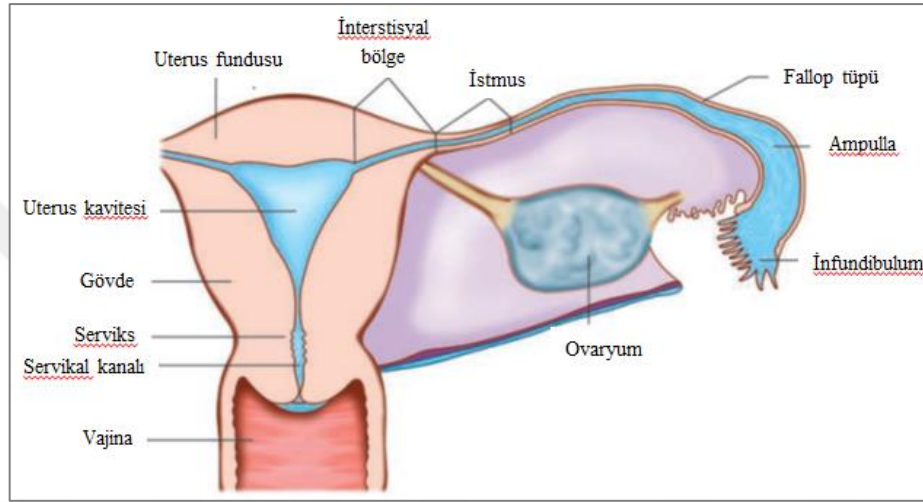
Yüksek kalorili gıda alımının dişi üreme sistemi üzerine etkilerini ortaya koyan deneysel literatür bilgileri, ağırlıklı olarak yüksek yağ diyetinin neden olduğu kilo alımı sonucu ortaya çıkan düzensizliklere dair verileri yansıtmaktadır. Bu nedenle farklı besin kaynaklı kalori alımının üreme sistemi üzerine etkilerine dair bilimsel veri oldukça kısıtlıdır. Karbonhidrat, yağ ve protein içerikli farklı besin kaynaklı beslenme tiplerinin dişi üreme sistemi üzerinde neden olabileceği etkilerin bilinmesi ve karşılaştırılması, olası infertilite problemlerinin önüne geçilmesi ve infertilite tedavisi süreçlerinde uygulanacak diyetlerin belirlenmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda, çalışmamızda karbonhidrat ağırlıklı, yağ ağırlıklı ve protein ağırlıklı besin diyetleri kullanılarak dişi ratlarda folikülogenez ve oosit oluşum süreçlerindeki değişiklikler incelendi.

Yapılan bu çalışmada, süttten kesilmiş 21 günlük dişi sıçanlar karbonhidrat ağırlıklı, protein ağırlıklı ve yağ ağırlıklı diyetler ile 80 gün beslendi. Anestezi altında ovaryum dokuları morfolojik, biyokimyasal ve genetik analizler yapılmak üzere alındı. Her bir besin diyetinin folikül rezervine, farklı gelişim aşamalarındaki folikül sayılarına, folikülogenez spesifik gen ve proteinlerin ekspresyon düzeylerine ve dişi üreme sistemi üzerinde düzenleyici rol oynayan hormonlar üzerine etkileri araştırılarak beslenme ve üreme sistemi arasındaki ilişki ortaya konuldu.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi üreme sistemi

Dişi üreme sistemi sağ ve sol ovaryumlar ile bir çift uterus tüpleri, uterus, vajina, dış genital bölge ve meme bezlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.1) (9, 10). Dişi üreme sistemi, dişi germ hücreleri olan oositlerin oluşması ve üreme fonksiyonu için gerekli steroid hormonların üretiminden sorumludur (11).



Şekil 2.1: Dişi üreme sistemi şematik çizimi

2.1.1. Dişi Üreme Sistemi Gelişimi

Cinsiyet genetik olarak fertilizasyonla birlikte belirlenir ancak 7. haftadan önce erkek ve dişi gonadlar morfolojik olarak farklılaşmamıştır ve her iki cinstede genital sistem birbirine benzerdir. Henüz farklılaşmanın başlamadığı bu aşamadaki evreye 'farklılaşmamış dönem' denir (12).

2.1.1.1. Gonadların Gelişimi

Gonadlar, mezodermal sölom epitel, mezenkim ve primordiyal germ hücreleri olmak üzere üç farklı kısımdan oluşur. Gonadal gelişim, mezonefrozun medial kenarında bulunan sölom epitelinin çoğalıp kalınlaşması ile başlar. Bu epitel altındaki mezenşim de çoğalarak, sıkılaşır ve mezenkimal blastemi meydana getirir. Mezonefroz ile dorsal mezenter arasında, orta çizginin her bir kenarında, uzunlamasına oluşan bu kabartı çiftine **gonadal kabartılar** denir (12, 13).

Primordiyal germ hücreleri ilk olarak embriyonik gelişimin 21. günü itibariyle allantois orijinine yakın vitellüs kesesinin kaudal duvarındaki endodermal hücreler arasında görülür. Gelişimin 5. haftasında germ hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenteri eksenince embriyonun lumbar bölgesindeki gonadal kabartıya göç ederler. 6. haftada primordiyal germ hücreleri, mezenşim içine girerler ve burada primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz yapıda kordonları oluştururlar. Erkek veya dişi embriyoda bu kordonlar yüzey epiteline tutunur ve bu evrede erkek ve dişi gonadları birbirinden ayırt edilemez (12, 13). Henüz farklılaşmamış bu gonadlarda korteks ve medulla ayırt edilir. Gonadal cinsiyet, Y kromozomunun kısa kolundan sentezlenen Testis Belirliyiçi Faktör (TBF) tarafından belirlenir ve TBF testiküler farklılaşmayı yönlendirir (13).

2.1.1.2. Ovaryumların Gelişimi

Farklılaşmamış gonaddan gelişimin ancak 10. haftasında belirgin bir ovaryum gelişir. Y kromozomu içermeyen ve XX kromozomlarına sahip dişi embriyoda primitif cinsiyet kordonları düzensiz hücre gruplarına ayrılırlar. Primitif germ hücrelerini içeren bu kümeler, medulla kısmında yerleştikten bir süre sonra dejenere olup kaybolarak yerlerini vasküler bir stroma olan **ovaryan medulla**ya bırakırlar (12, 13).

Erkek gonadların aksine dişi gonadlarda yüzey epiteli proliferasyona devam ederek bu epitelde **kortikal kordonlar** gelişir. Kortikal kordonlar, altta bulunan mezenşim içerisine doğru gömülürler. Kortikal kordonların boyutları arttıkça primordiyal germ hücreleri kordonların içlerine yerleşirler. 16. haftada kortikal kordonlar mezenşimle birlikte primordiyal germ hücrelerini sararak izole olmuş hücre kümelerine ayrılırlar. Bu hücre kümesinde bulunan primordiyal germ hücrelerinden oogonyumlar, kortikal germ kordonları hücrelerinden de oogonyum etrafında tek katlı yassı folikül hücreleri oluşur. Böylelikle kortekste **primordiyal foliküller** oluşmuş olur (12-14).

Oogonyumlar fetal yaşamda mitozla çoğalırlar ve 3. ayda oogonyumların bazıları 1. mayoz bölünmeye başlayarak primer oositleri oluştururlar. 8. ayda ise oogonyumların tamamı, primer oositlerin ise bazıları dejenerasyona uğrar. Geriye kalan primer oositler kortikal germ kordonlarından oluşan tek katlı yassı epitelle beraber **primordiyal folikülleri** oluşturur (12-14).

Postnatal yaşamda artık oogonia oluşmaz. Primer oositler doğuma yakın mayoz 1'in profaz evresinin diploten aşamasında duraksar. 1. mayoz bölünmeyi puberteden

kısa süre önce tamamlarlar. Primordiyal folikül hücrelerinin sentezlediği oosit gelişimini baskılayıcı bir madde olan OMI (oocyte maturation inhibitor) primer oositlerin 1. mayoz bölünmesini tamamlamalarını engeller (12-14).

Doğumdan sonra ovaryumun yüzey epiteli (germinatif epitel) kübikleşir ve tek tabakalı hale geçen hücreler, ovaryumun hilumunda periton mezoteli ile devamlılık gösterir. Yüzey epiteli ile korteksteki foliküller arasında tunika albuginea adı verilen, ince bir fibröz kapsül bulunmaktadır. Ovaryumlar, gerileyen mezonefrozdaki ayrıldıktan sonra, mezovaryum ile bağlanırlar (12).

2.1.2. Ovaryum Histolojisi

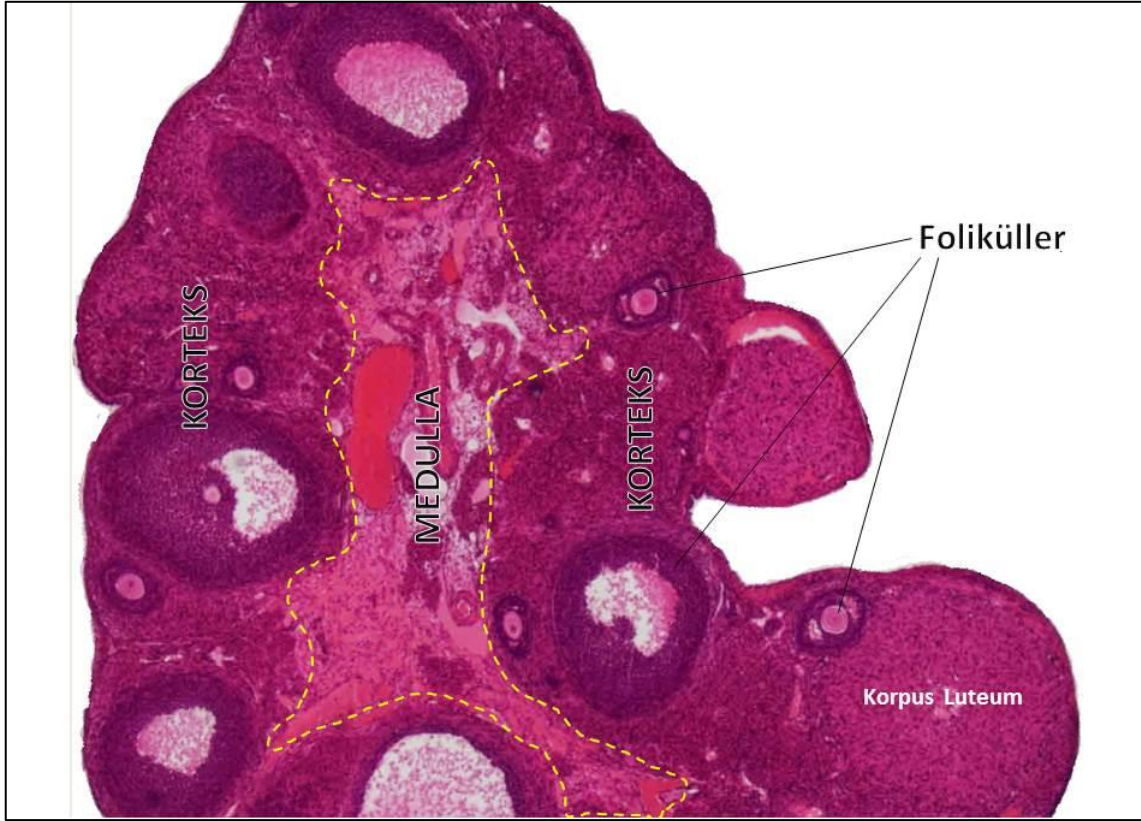
Ovaryumlar üreme hücresi olan oosit oluşumundan sorumlu organlardır. Aynı zamanda sekonder eşey karakterlerinin gelişmesi ve uterus endometriyumunun döngüsel değişikliklerinin gerçekleşmesini sağlayan hormonlar olan östrojen ve progesteron hormonlarının üretiminden sorumlu organlardır. Ovaryumlar histolojik olarak korteks ve medulladan oluşmaktadır (10).

2.1.2.1. Ovaryum Parankiması

Anatomik olarak ovaryum, doğum yapmamış kadınlarda 3 cm, 1,5 cm ve 1 cm ebatlarında oval şekilli bir organdır. Ovaryum parankiması histolojik olarak korteks ve medulla olmak üzere iki temel bölümden oluşur (11). **Korteks**, medullayı çevreleyerek ovaryumun periferinde bulunan ve folikülogenez sürecinde oluşan tüm folikül tiplerini barındıran, bağdoku hücrelerinden oldukça zengin bir bölgedir. Ovaryum yüzeyi, **germinatif epitel** denilen ve yer yer yassı şekilli olmakla birlikte genel olarak tek katlı kübik epitelten oluşan bir hücre tabakasıyla kaplıdır. Germinatif epitel mezovaryum bölgesinde mezotelyum olarak devamlılık gösterir. Germinatif epitel ile korteks arasında sıkı bağ dokusu yapısında **tunika albuginea** tabakası yer alır. **Medulla** ise ovaryumun merkezinde bulunan, gevşek bağ dokusu yapısında, geniş kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirlerden zengin bir bölgedir (10, 11) (Şekil 2.2).

Kortekste yer alan foliküller oositlerin olgunlaşmasından sorumlu yapılardır. Kortekste puberteye kadar sadece primordiyal foliküller bulunurken, puberteden sonra farklı gelişim evrelerindeki foliküller bulunur. Foliküllerin etrafında stroma içinde dağılmış düz kas fibrilleri bulunur (14). Doğumda sağlıklı bir bireyin her iki ovaryumunda yaklaşık 400.000-800.000 civarında primer oosit bulunur, ancak bunların

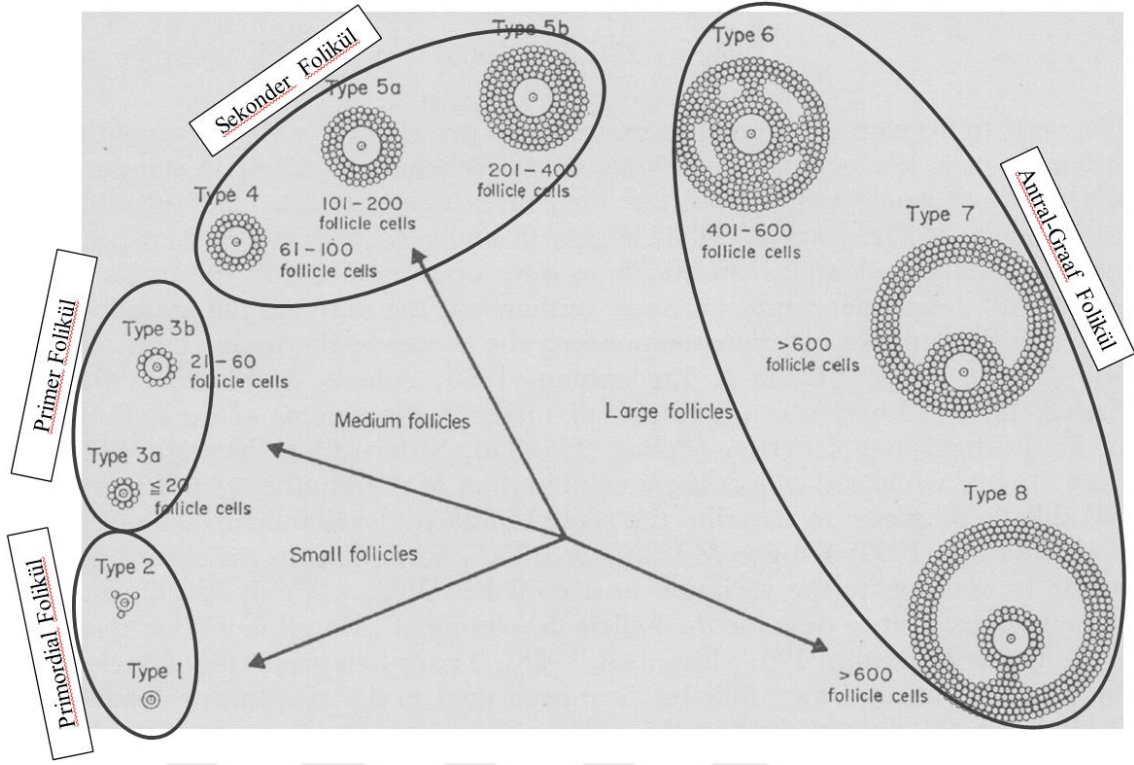
çoğu sonradan atreziye uğrar. Puberteden sonra kalan oositlerden yaklaşık 400 tanesi ovulasyon safhasına ulaşır (15).



Şekil 2.2: Ovaryum korteks ve medullası
HE, 4x

2.1.2.2. Ovaryum Folikülleri

Bir ovaryum folikülünü merkezde bir oosit ve bu oositi çevreleyen farklı sayıda katmanlardan oluşan hücreler oluşturur. Pedersen sınıflandırmasına göre, farklı gelişim aşamalarında primordiyal folikül, primer folikül, sekonder folikül ve antral folikül (graaf-terziyer folikül) olmak üzere dört temel folikül tipi bulunur (Şekil 2.3) (16). Bu foliküller de farklı gelişim aşamalarına göre alt gruplara ayrılır (16).



Şekil 2.3: Folikül tipleri

- **Primordiyal Folikül**

Primordiyal foliküller en ilkel folikül yapılarıdır. Genellikle tunika albugineanın altında olmakla birlikte, korteksin hemen hemen her yerinde tekil veya gruplar halinde bulunurlar. Tek katlı yassı şekilli folikül hücreleri ile merkezi konumlu bir primer oositin oluşur. Folikül hücrelerinin dış yüzeyinde bazal lamina bulunur. Bu aşamada primer oosit germinal vezikül olarak isimlendirilen eksantrik konumlu bir nükleusa sahip, yuvarlak şekilli bir hücredir. Primer oositi saran folikül hücreleri birbirlerine hücreler arası bağlantı kompleksi olan desmozomlar ile bağlanırlar (11, 17).

- **Primer Folikül**

Primordiyal foliküllerin hormonal regülasyonla birlikte indüklenmesiyle, oosit, folikül hücreleri ve çevredeki stromada bazı değişiklikler olur. Oositin hacmi artar, oositi saran folikül hücreleri mitozla sayılarını artırır ve şekil olarak da kübikleşir ve tek katlı kübik halini alır. Bu evredeki foliküle **primer folikül** denir ve bu evredeki folikülde oosit etrafında **zona pellusida** yapısı oluşmaya başlar (11, 16).

- **Sekonder Folikül**

Primer folikülü oluşturan folikül hücreleri çoğalmaya devam ederek oosit etra-

finda çok tabakalı bir yapı oluşturur. Bu evredeki foliküle **sekonder folikül** denir ve folikül hücreleri artık **granüloza hücreleri** olarak isimlendirilir. Gelişmekte olan primer oositin çapı insanlarda 100-150 µm'ye kadar büyür. Sekonder folikül etrafında bağ doku hücreleri de organize olup **teka folikülü tabakasını** oluştururlar (16).

- **Tersiyer - Antral Folikül**

Sekonder foliküllerde granüloza hücreleri arasında içi folikül sıvısı ile dolu boşluklar görülmeye başladığında bu foliküller **tersiyer veya antral folikül** olarak isimlendirilir (16). Folikül duvarındaki bu küçük boşluklar zamanla birleşerek antrum adı verilen tek bir büyük boşluk olutururlar. Granüloza hücreleri, oosit ile bağlantılı olduğu bölgede **kumulus ooforus** adı verilen küçük bir tümsek oluştururlar. Oositi saran granüloza hücreleri ise **korona radiatayı** oluşturur. Bu aşamada teka tabakası ise iç kısımda zengin damarlanmaya sahip teka internayı ve dış kısımda da stromaya benzer teka eksterna tabakalarını oluşturur (11).

Granüloza hücrelerinin proliferasyonu ve folikül sıvısının artması ile çapı 10 mm ve daha fazla hacme ulaşan foliküle **graaf folikülü (preovulatuvar folikül)** denir. Graaf folikülü ovaryum korteksi boyunca uzanır ve ovaryum yüzeyinde çıkıntılar oluşturur. Granüloza tabakasında yer alan antrum boşluğu genişlerken, kumulus ooforus ile folikül duvarı arasındaki bağlantı gittikçe zayıflar ve zamanla oosit, etrafındaki korona radiata hücreleri ile birlikte ovaryumdan tuba uterinaya atılır (11).

- **Atretik folikül**

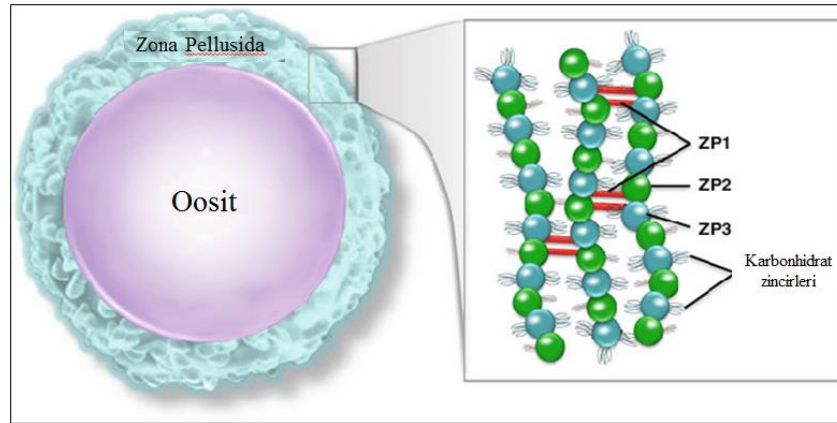
Ovaryum foliküllerinin doğumda sayısı ortalama 600.000 civarı iken, üreme hayatı sürecinde bunlardan yalnız yaklaşık 400 tanesi olgunlaşmasını tamamlayıp ovulasyon aşamasına ulaşır. Bu yüksek sayısal azalma, fetal gelişimde başlayıp, puberte, erişkin dönem ve menapozda da devam eden foliküler atreziden kaynaklanmaktadır. Foliküler atrezi, folikülogenezin herhangi bir aşamasında meydana gelebilen normal fizyolojik bir durumdur. Atrezide, ilk olarak oosit büzülür, folikül hücreleri piknotikleşir ve birbirlerinden ayrılıp otolize uğrarlar. Zona pellusida yapısı genişler ve uzun süre bu şekilde kalabilir. Teka hücreleri ise vasküler kordonlar halinde düzenlenip dejenere olurlar. Atretik foliküllerde granüloza hücreleri ile teka interna arasında bazal lamina kalıntıları görülebilir. Hücrelerin ölümünden sonra ise, hücre kalıntılarını fagosite etmek üzere makrofajlar folikül bölgesinde yoğunlaşır (26).

Üreme döneminin sona erdiği dönem olan menapozdan sonra ovaryumlar artık ovulasyon yapamaz. Menapozdan sonra ovaryumların hacmi küçülür, yaşla birlikte ovaryan stroma daha da yoğunlaşır, tunika albuginea kalınlaşır ve ovaryum yüzey epiteli çok inceler. Yaşlı ovaryumları büyük, anormal yapıda, içi sıvıyla dolu kistik foliküllerden zengindir (11, 17).

2.1.3. Folikülogenez ve Oosit Spesifik Genler

Folikül ve oosit gelişimi hem hormonal hem de genetik faktörlerin etkisi altındadır. Normal bir oosit gelişimi için rol oynayan genler (18) oldukça fazla sayıda olup önemli rol oynayan genlerden bazıları: Zp1, Zp2, Zp3, BMP15, GDF9, Foxo3a, GAS2 genleridir.

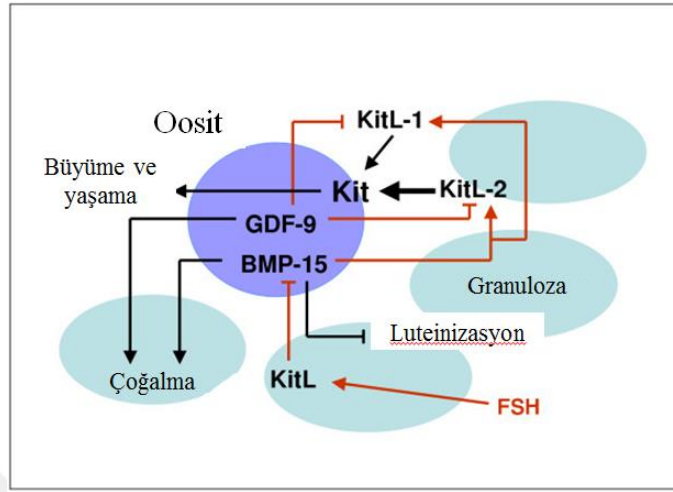
ZP1 (zona pellucida 1), **ZP2** (zona pellucida 2) ve **ZP3** (zona pellucida 3) proteinleri oositin etrafını saran zona pellusidanın (Şekil 2.4) (19) yapısına katılarak oosit gelişimde ve fertilizasyonda görev alırlar (20). ZP3 proteini tür-spesifik sperm bağlanmasını sağlar. ZP2 de ileri düzey sperm bağlanmasında rol oynar. ZP1 proteini ise ZP2 ile ZP3 proteinlerini çapraz olarak birbirine bağlar (21). Eksik ZP1 sentezi ZP3'ün stoplazmada çökmesine ve zona pellusidanın oluşmamasına neden olur (22).



Şekil 2.4: Zona pellusida moleküler yapısı

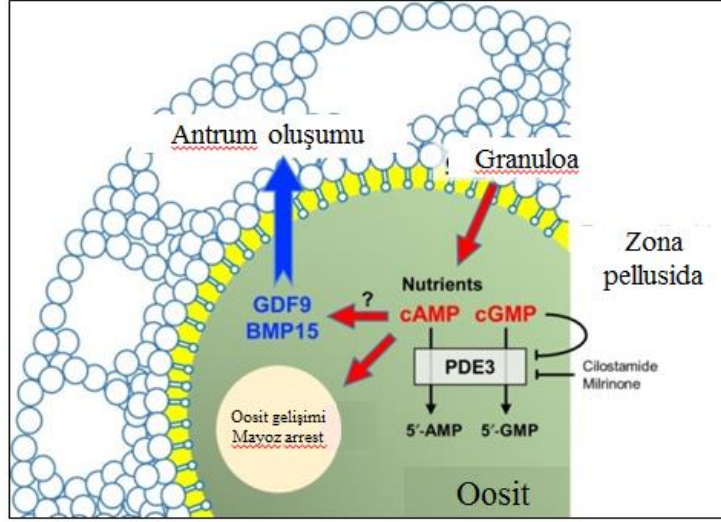
BMP15 (bone morphogenetic protein 15), oositte BMP15 geni tarafından kodlanan ve folikülogenezde rol oynayan bir proteindir (23, 24) (Şekil 2.5) (25). Bu protein -transforming growth factor beta (TGF- β)- superfamiliya grubundadır ve parakrin bir sinyal molekülüdür (26). BMP15, ovaryan foliküllerin ilk evresinde büyüme ve olgunlaşmalarının desteklenmesinde, granuloza hücrelerinin FSH hormonuna karşı duyarlılıklarını baskılayıp ileri evre folikül olgunlaşmasını

engelleyerek ovulasyona uğrayacak oositlerin sayısının belirlenmesinde ve granuloza hücrelerinin apoptoza uğramasının engellenmesinde ve çoğalmasında rol oynar (26, 27).



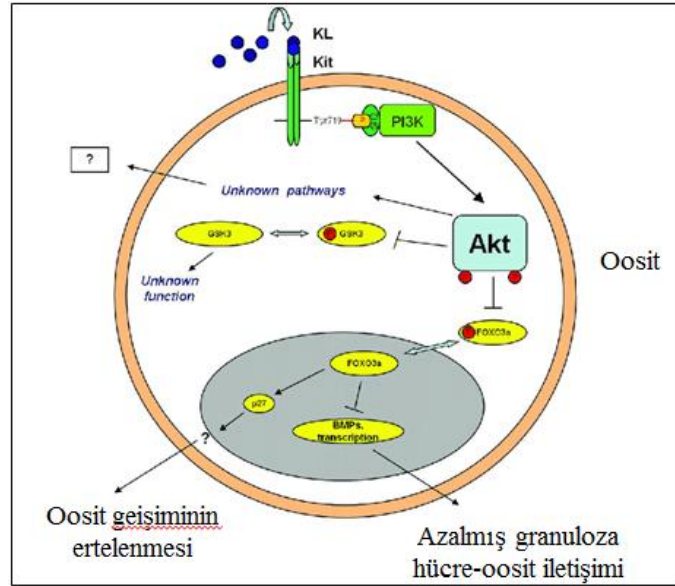
Şekil 2.5: BMP-15 etki mekanizması

GDF9 (growth differentiation factor 9), GDF9 geni tarafından oositlerden kodlanan, -transforming growth factor beta (TGF- β)- superfamiliya grubuna ait folikülogenezde rol oynayan bir proteindir (28, 29) (Şekil 2.6) (30). GDF9, gelişmekte olan oosit ile folikül hücreleri arasında parakrin etki göstererek tüm folikülogenez, oogenez ve ovulasyon sürecinde doğru gelişim için gerekli bir proteindir ve bu nedenle fertilitede büyük rol oynar (31). Memelilerde GDF9 granuloza hücreleri üzerinde direkt etki gösterip onların çoğalmasını ve farklılaşmalarını sağlayarak erken foliküler gelişimde temel bir fonksiyona sahiptir (29). İleri evre folikül gelişimin bir göstergesi kumulus hücrelerinin görülmesidir (31). Normal foliküler gelişimin bir karakteristiği olan kumulus hücrelerinin genişlemesine sebep olur (31). GDF9 granuloza hücrelerinde hyaluronik sentaz 2 (Has2) mRNA sentezini indüklerken ürokinaz plazminojen aktivatör (uPA) mRNA sentezini baskılar (32). Bu durum hyaluronik asit bakımından zengin ekstraselüler bir matriks sağlar ve kumulus hücrelerinin genişlemesine neden olur (33). Kumulus hücreleri ovulasyonda da oositle birlikte bulunduğundan, GDF9 proteinin üretimi oosit için gerekli uygun mikroçevrenin sağlanması için oldukça önemlidir (33). Ayrıca GDF9 prostoglandin-EP2 reseptör sinyal yolağını stimule ederek progesteron üretimini de destekler (34).



Şekil 2.6: GDF9 etki mekanizması

Foxo3a (forkhead box O3a), FOXO3 geni tarafından kodlanan bir proteindir (35). Hücre ölümü için gerekli olan Bim, PUMA gibi genleri aktive ederek (36) veya FLIP gibi anti-apoptotik proteinlerin sentezini baskılayarak (37) apoptozu tetikleyen bir fonksiyona sahiptir. Memeli ovaryumunda FOXO3a proteini granuloza hücrelerinin apoptozunu indükleyerek atrezi ve folikül büyümesini düzenler (38). Foxo3a proteini, rezerv foliküllerin aşırı aktivasyonunu inhibe ederek folikül rezervini koruyup dişi üreme periyodunun düzenlenmesinde rol oynar (38-40) (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Foxo3a etki mekanizması

GAS2, growth arrest-specific protein 2, GAS2 geni tarafından kodlanan bir proteindir (41). GAS2 proteini hücre iskeleti ile ilişkili bir proteindir. Drosophila ve domuzlarda GAS2 yokluğunun kısırlık ile sonuçlandığı görülmüştür. Ovaryum stromal hücrelerde sentezlenir ve normal folikül gelişimi için gerekli bir proteindir. GAS2 mutant farelerde farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerin etrafındaki bazal laminanın yapısının bozulduğu ve toplam folikül sayılarında büyük oranda azalma olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle stromal hücrelerden salgılanan GAS2 proteini folikülogenez sürecinde önemli bir rol oynamaktadır (42).

2.1.4. Beslenme ve Dişi Üreme Sistemi

Dişi hayvanlarda üreme ve metabolizma birbirleriyle ilişkilidir ve karşılıklı olarak düzenlenmektedir (7). Metabolizma için gerekli olan enerjinin sağlandığı besin öğeleri; gıdaların içinde bulunan ve temel besin öğeleri olan karbonhidratlar, proteinler, yağlar ile vitaminler, mineraller ve sudur (43). İhtiyaç duyulandan daha az enerji alındığında kilo kaybı meydana gelirken, harcanandan daha fazla enerji alındığında ise vücutta yağ olarak depolanarak obezite, diyabet, hipertansiyon, kalp ve damar hastalıkları gibi çeşitli hastalıklara neden olabilir (43, 44). Üreme fonksiyonlarının normal bir şekilde devam edebilmesi için de bireysel enerji alımı ile kullanımı arasındaki dengenin iyi korunması önemlidir (43, 44).

Birçok çalışmada gösterilmiştir ki Vücut Kütle İndeksi (VKİ) ile infertilite arasında J-şekilli bir ilişki vardır. Aslında bu ilişki bimodal bir seyre sahiptir. Yani hem zayıf ($VKİ < 19 \text{ kg/m}^2$) hem aşırı kilolu ($VKİ 25-29.9 \text{ kg/m}^2$) olan kadınlar benzer infertilite risklerine sahiptirler. Bununla birlikte obez kadınlar ($VKİ > 30 \text{ kg/m}^2$) iki kat daha fazla infertilite riskine sahiptirler (5, 45). Yapılan çalışmalar, sağlıklı bir üreme fonksiyonu için dengeli bir beslenme ile VKİ'yi normal aralıkta tutmanın önemini ortaya koymaktadır.

2.1.4.1. Karbonhidratlar ve Üreme

Karbonhidratlar vücut için temel enerji kaynağı olup 1 gr'ı 4 kkal enerji sağlar. Kan şekerinin düzenlenmesi, kasların çalışması, sıvı-elektrolit dengesinin sürdürülmesi ve boşaltım gibi birçok temel fonksiyon için önemli bir role sahiptirler. Üreme çağındaki kadın ve erkeklerin günlük olarak ortalama 130 gr karbonhidrat alması tavsiye edilmektedir (43, 46). Gerekli bu ihtiyacın karşılanması için glisemik indeks değeri düşük olan gıdalardan (buğday, arpa, yulaf, işlenmemiş pirinç, mercimek, fasulye, nohut, fındık

sebze ve meyveler vb.) tüketilmesi tavsiye edilmektedir (43, 44). Çünkü eğer karbonhidratlar fazla alınırsa yağa dönüştürülerek vücutta depolanır ve obezite riskini artırır. Yüksek oranda karbonhidrat tüketen kadınlarda, ovulasyona bağlı infertilite riskinin %78 daha fazla olduğu bildirilmektedir (46).

2.1.4.2. Proteinler ve Üreme

Proteinler organizmada büyüme, gelişme ve hücre yenilenmesi için gerekli bir besin kaynağıdır. 1 gr protein 4 kkal enerji sağlar. Yeterli enerji ihtiyacının karbonhidratlar ve yağlardan karşılanamadığı durumlarda proteinler kullanılır. Ayrıca bazı hormonların ve enzimlerin üretilmesi için proteinlere ihtiyaç duyulur (43, 47, 48) Üreme dönemindeki kadınların kilogramları başına günlük ortalama 0.83 gr protein almaları önerilmektedir (45). Gebelik öncesinde alınması tavsiye edilen günlük protein miktarı ise yaklaşık 46 gr'dır (44). Sağlıklı bir protein alımı için et, balık, kümes hayvanları, yumurta, süt ve süt ürünleri, baklagiller, yağlı tohumlar (fındık, ceviz vb.) ve tahıl ürünleri tüketilebilir (43-45). Fakat hayvansal kaynaklı proteinlerin çok fazla tüketilmesinin ovulasyona bağlı infertilite riskini %20 oranında arttırdığı bildirilmiştir. Bitkisel kaynaklı proteinlerin tüketilmesi durumunda ise infertilite riski %43 oranında daha az görülmektedir (46). Bununla birlikte vejetaryenler protein yetersizliği açısından risk altında olup protein gereksinimlerini karşılayacak gıdalarla beslenmeye (baklagiller, yağlı tohumlar, soya sütü, süt ve süt ürünleri vb.) ağırlık vermelidirler (49).

2.1.4.3. Yağlar ve Üreme

Yağlar organizma için en fazla enerji kaynağı olan besinlerdir ve 1gr'ı 9 kkal enerji vermektedir (45, 48). Yağda çözünen vitaminlerin (A, D, E, K) emilimi, vücut ısısının düzenlenmesi, bazı hormonların ve kolesterolün sentezi için yağlara ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca vücutta sentezlenmeyip dışarıdan alınan esansiyel yağ asitlerinin karşılanması için de yeterli yağ alınması gerekir (45, 48). İhtiyaç duyulandan daha fazla yağ tüketildiğinde obezite riski artar (47). Gebelik planlayan bireylerin günlük ortalama 1.1 gr omega-3 ve 11-12 gr omega-6 tüketmesi tavsiye edilmektedir (44). Esansiyel yağ asitleri fetüsün nöral gelişiminde önemli rol oynadığı, prematüre doğum ve düşük gibi riskleri azalttığı için mutlaka diyetle yeterli miktarda bulunmalıdır (50, 51). Gebelik planlayan kadınlar düzenli olarak balık, ceviz, fındık, bitkisel yağlar gibi gıdalar tüketerek esansiyel yağ asidi ihtiyaçlarını karşılayabilirler (44, 50, 52).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Deney düzeni ve uygulama süreci

Yapılan çalışmada İnönü Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden alınan 40 adet, 21 günlük yavru, 40-60 g ağırlığında *Wistar albino* cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar, deney hayvanları merkezinde $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik sıcaklık, mevsimsel gün ışığı ritimli aydınlatmalı ve havalandırılmalı odalarda özel kafeslerde beşerli gruplar halinde tutuldu.

40 adet sıçan rastgele seçilerek 10'arlı 4 gruba ayrıldı (Şekil 3.1):

1. Kontrol Grubu (n=10): Normal bakım sıçan yemi ile beslenen grup.
2. Karbonhidrat Grubu (n=10): %70 karbonhidrat ağırlıklı sıçan yemi ile beslenen grup.
3. Yağ Grubu (n=10): %60 yağ ağırlıklı sıçan yemi ile beslenen grup.
4. Protein Grubu (n=10): %50 protein ağırlıklı sıçan yemi ile beslenen grup.



Şekil 3.1: Deney grupları

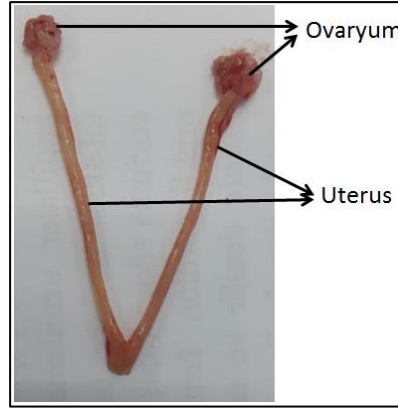
21 günlük yavru sıçanlar yukarıdaki gibi gruplandırıldıktan sonra 5'erli kafeslerde özel deneysel yemlerle (Tablo 3.1) (Research Diets, Inc., 20 Jules Lane, New Brunswick, NJ, 08901 USA) beslendi. Deney başlangıcında ve deney süresince

sıçanlar ve tüketilen yem miktarları tartılıp haftalık kilo alım oranları kaydedildi. Deney süresince günlük vajinal smear testi için sürüntü örnekleri alındı.

Tablo 3.1: Deneysel Yem İçerikleri

	60 kcal% Yağ		50 kcal% Protein		70 kcal% Karbonhidrat		Kontrol Grubu	
	gm%	kcal%	gm%	kcal%	gm%	kcal%	gm%	kcal%
Protein	26	20	49	50	18	18	24	24
Karbonhidrat	26	20	37	38	68	70	62	64
Yağ	35	60	5	12	5	12	5	12
Toplam		100		100		100		100
kcal/gm	5.2		3.9		3.9		3.9	
İçerik	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal	gm	kcal
Casein	200	800	507	2028	182.5	730	243.3	973
L-Cystine	3	12	3	12	3	12	3	12
Corn Starch	0	0	181.3	725	505.6	2022	445	1780
Maltodextrin 10	125	500	125	500	125	500	125	500
Sucrose	68.8	275	68.8	275	68.8	275	68.8	275
Cellulose, BW200	50	0	50	0	50	0	50	0
Soybean Oil	25	225	25	225	25	225	25	225
Lard	245	2205	28	252	28	252	28	252
Mineral Mix, S10026	10	0	10	0	10	0	10	0
DiCalcium Phosphate	13	0	13	0	13	0	13	0
Calcium Carbonate	5.5	0	5.5	0	5.5	0	5.5	0
Potassium Citrate, 1 H2O	16.5	0	16.5	0	16.5	0	16.5	0
Vitamin Mix, V10001	10	40	10	40	10	40	10	40
Choline Bitartrate	2	0	2	0	2	0	2	0
FD&C Yellow Dye #5	0	0	0	0	0.05	0	0.025	0
FD&C Red Dye #40	0	0	0.05	0	0	0	0.025	0
FD&C Blue Dye #1	0.05	0	0	0	0	0	0	0
Toplam	773.85	4057	1045.2	4057	1045	4057	1045.2	4057

Deney uygulama sürecinin 80. gününden itibaren sıçanlar sakrifiye edilmeye başlandı. Vajinal smear testi ile diestrous evresinde olduğu tespit edilen sıçanların aynı gün ketamin-ksilazin anestezisi altında kan örnekleri ve ovaryumları (Şekil 3.2) alındıktan sonra sıçanlar sakrifiye edildi. Takip eden üç gün içerisinde diestrous evresinde olduğu tespit edilen tüm sıçanların sakrifikasyonu ve doku alım işlemleri tamamlandı.

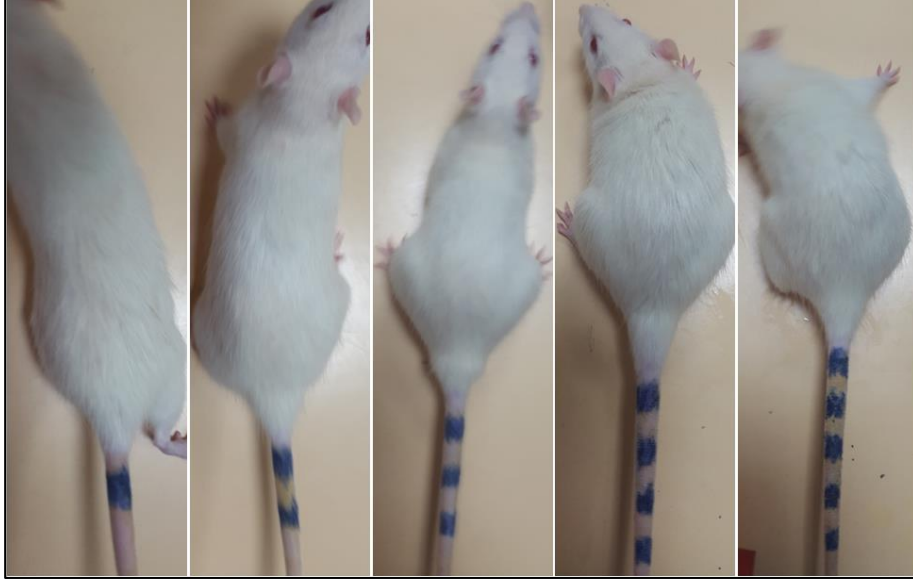


Şekil 3.2: Rat ovaryum dokuları

Sıçanların vücut kitle indeksleri belirlenmek üzere ketamin-ksilazin anestezisi altında iken boyları ölçüldü. Kalp sağ atriumundan kan örnekleri alınıp santrifüj edilerek serumları ayrıştırıldıktan sonra biyokimyasal hormon analizleri yapılmak üzere -80°C 'e muhafaza edildi. Her sıçanın sağ ovaryumu, histolojik inceleme ve histomorfometrik ölçümler için bouin solüsyonuna (her grup için $n=4$) ve %10'luk formaldehit solüsyonuna (her grup için $n=6$) alındı. Sol ovaryumlar ise RNA analizleri için (her grupta $n=5$) alınarak -80°C 'de muhafaza edildi. Transmisyon elektron mikroskopik incelemeler için (her grup için $n=6$) yaklaşık 1 mm^3 ovaryum doku örneği %2,5'luk gluteraldehit solüsyonuna alındı.

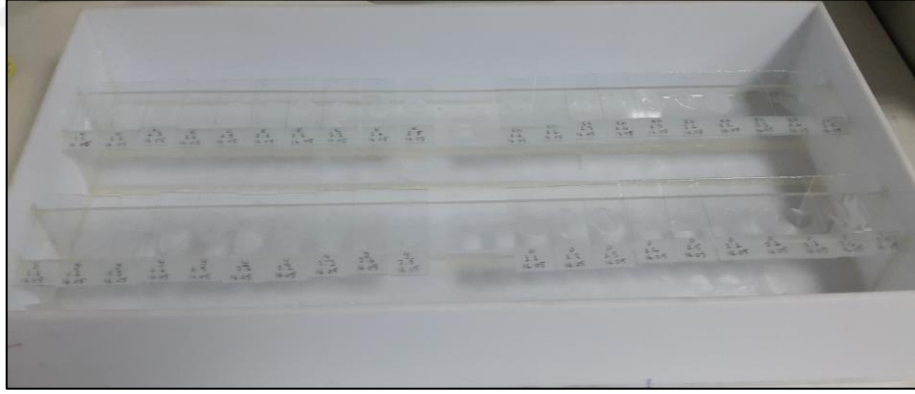
3.2. Menstrual siklus evrelerinin belirlenmesi

Deney başlangıcının 20. gününden itibaren (sıçanlar 40 günlük iken) vajinal plak testi ile ratların puberteye erişme yaşları belirlenerek kaydedildi ve vajinal smear alınmaya başlandı. Vajinal smear testi için ratlar grup içinde de bireysel olarak takip edildiğinden her sıçanın kuyruğu boya kalem ile işaretlendi (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Birebir takip için işaretlenen ratlar

Vajinal plak açıklığı tespit edildiği günden itibaren 60 gün boyunca ratlardan günlük olarak pastör pipet ile yaklaşık 0.5 ml serum fizyolojik (SF) verilerek vajinal smear alınıp (Şekil 3.4) her ratın menstrual siklus düzeni belirlenmek üzere ‘cresyl violet’ ile boyandı.



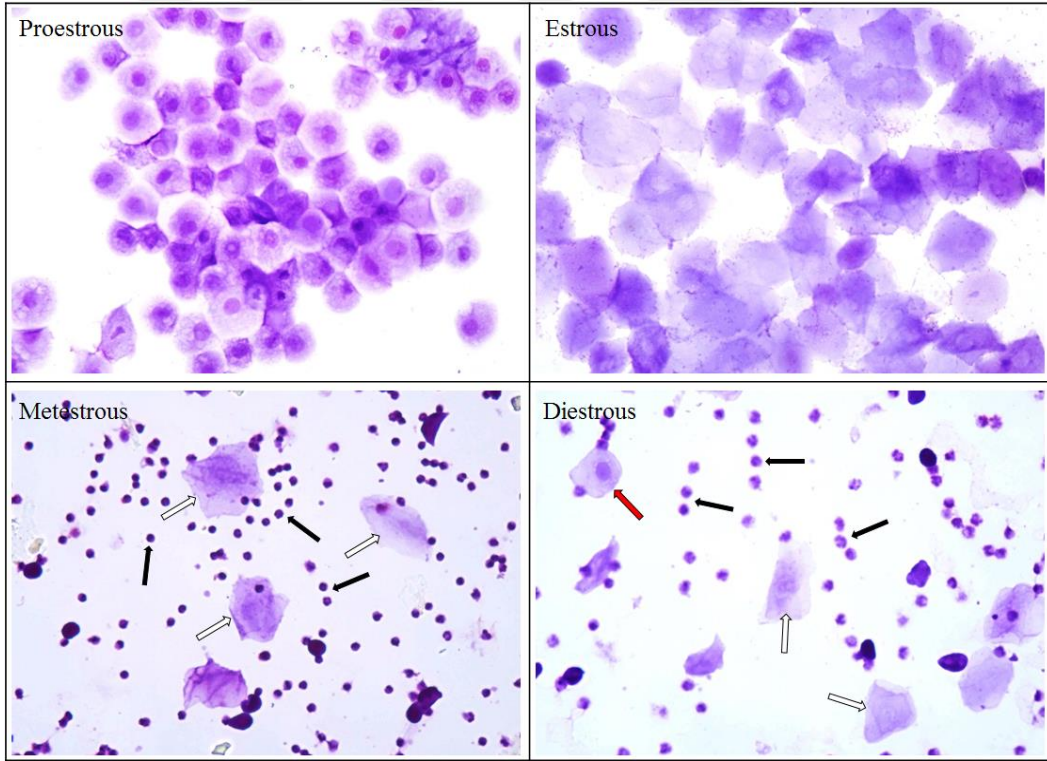
Şekil 3.4: Vajinal smear için alınan örnekler

Her bir sıçan için menstrual siklus evreleri literatürde belirtilen kriterlere göre (Tablo 3.2, Şekil 3.5) (53, 54);

- 1. Proestrous:** Kümeler halinde normal epitel hücrelerinin varlığı,
- 2. Estrous:** Dejenere epitel hücrelerinin varlığı,
- 3. Metestrous:** Dejenere epitel hücreleri ve yoğun lökosit varlığı,
- 4. Diestrous:** Lökosit ve az sayıda normal epitel hücrelerinin varlığı olmak üzere 4 evreye ayrıldı.

Tablo 3.2: Menstrual siklus evrelerine göre hücrelerin bulunma oranları

Evre	Tipik hücre sayıları					Güvenilirlik
	Lökositler	Nükleuslu epiteller	Kornifiye	Nükleussuz epiteller	Toplam	
<u>Estrous</u>	-	-/+	+++	+/-	+++	+++
<u>Metestrous</u>	+++	-	-/+	+	+++	++
<u>Diestrous</u>	++	+/-	+/-	+/-	+/>++	+++
<u>Proestrous</u>	-	++	-/+	-	+/>++	++



Şekil 3.5: Menstrual siklus evrelerine göre vajinal smear görünümleri
Siyah ok: Lökositler, beyaz ok: çekirdeksiz epitel hücreleri, kırmızı ok: normal epitel hücresi, cresyl violet, x40.

Cresyl violet ile boyanan smear örnekleri ışık mikroskobu altında incelenerek sıçanların menstrual siklus evreleri kaydedildi.

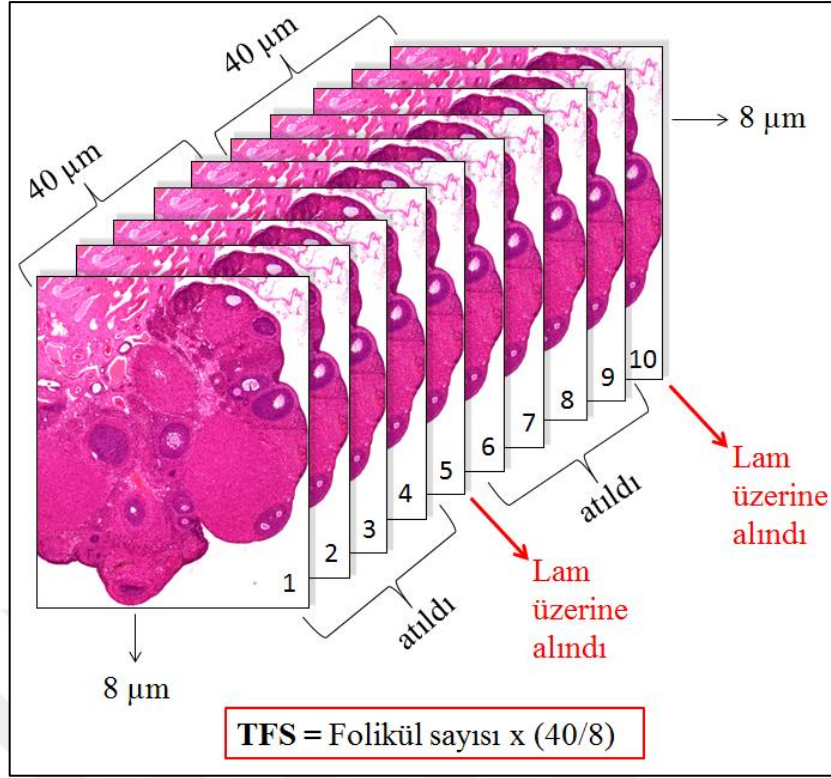
3.3. Histolojik Teknikler

3.3.1. Doku Takibi ve Kesit Alma

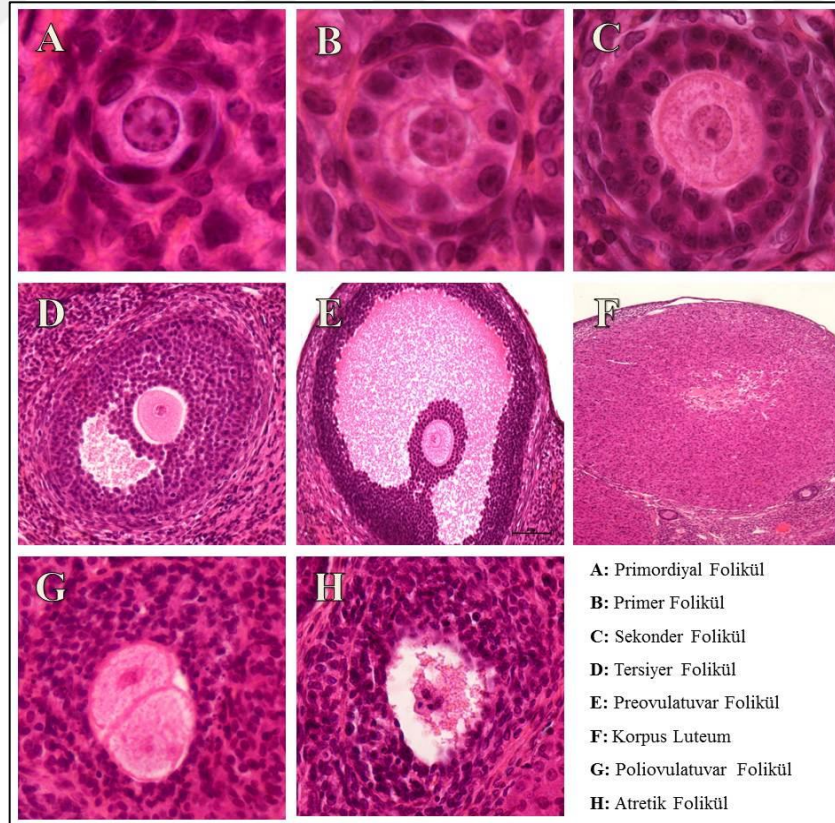
Formaldehit ve Bouin solüsyonuna alınan ovaryum örnekleri 24 saatlik tespit süresi sonunda Tissue-Tek VIP/SAKURA doku takip cihazında doku takip basamaklarından geçirildi (Tablo 3.2). Doku takip işlemlerinin ardından doku örnekleri parafin bloklara gömüldü. Folikül sayımı için Bouin ile tespit edilen ovaryumlardan 8 µm kalınlığında seri kesitler alındı (Şekil 3.6). İmmünohistokimyasal (IHC) ve immünflorasan (IF) uygulamalar için formolle tespit edilen ovaryumlardan 5 µm kalınlığında kesitler alındı.

3.3.2. Folikül sınıflandırması ve sayımı

Bouin solüsyonu ile tespit edilen ovaryumların tamamı kesilecek şekilde 40 µm aralıklarla 8 µm kalınlığında seri kesitler alındı (Şekil 3.6). Kesitler otomatik doku boyama cihazında (Leica Autostainer XL) hematoksilen eozin ile boyandı (Tablo 3.2). Her grupta seri kesitlerin tüm yüzey alanı 20x objektif ile taranarak folikül tipleri Pedersen sınıflandırmasına (16) göre (Şekil 2.3) gruplandırıldı. Bu sınıflandırmaya göre, eğer oosit birkaç tek katlı yassı folikül hücresi ile çevrili ise **primordiyal folikül**, tek katlı kübik hücrelerle çevrili ise **primer folikül**, çok katlı kübik hücrelerle (granuloza) çevrili ise **sekonder folikül**, granuloza hücreleri arasında belirgin en az bir antrum oluşmuşsa **tersiyer folikül**, büyük tek bir antrum ve kumulus ooforus yapısı varsa **preovulatuvar folikül**, birden fazla oosit içeriyorsa **poliovulatuvar folikül**, normal histolojik folikül ve oosit yapısı deforme olmuşsa **atretik folikül** olarak sınıflandırıldı (Şekil 3.7). Her folikül tipi için kesit düzleminde folikül ortasında belirgin bir oosit varsa sayıma dahil edildi. Korpus luteumlar 320 µm'de bir (sekiz kesitte bir) sayıldı. Elde edilen sayılar 5 ile çarpılarak $[(40 \mu\text{m} / 8 \mu\text{m}) = 5]$ bir ovaryumdaki her bir folikül tipi için Toplam Folikül Sayıları (TFS) ve korpus luteum sayıları hesaplandı (55).



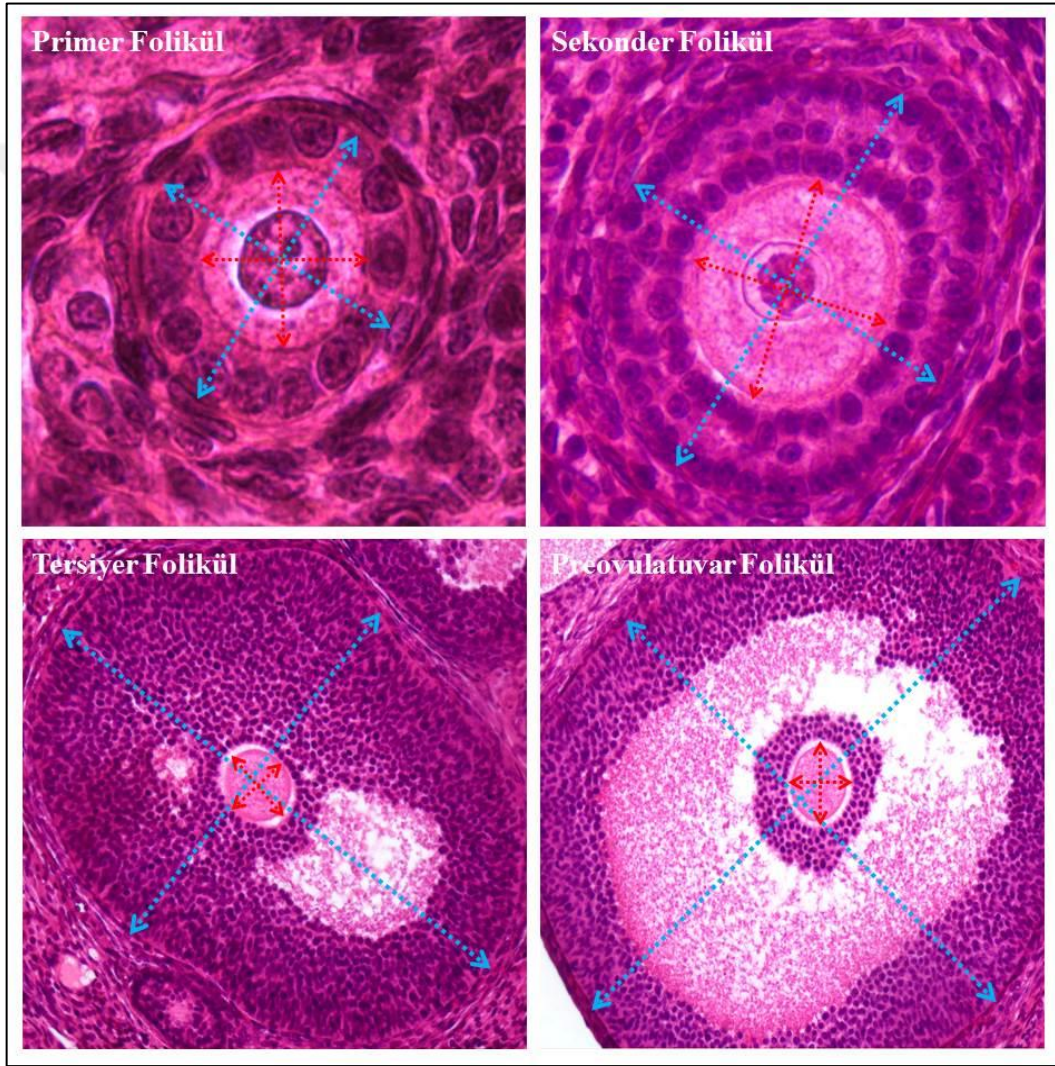
Şekil 3.6: Seri kesit alımı ve folikül sayımı
*TFS: toplam folikül sayısı



Şekil 3.7: Foliküllerin morfolojik olarak sınıflandırılması

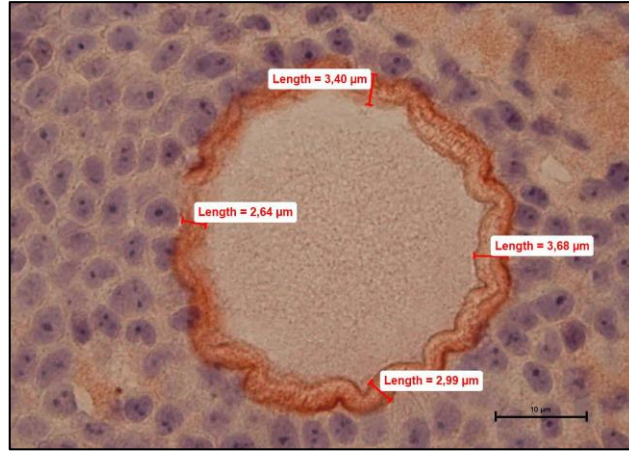
3.3.3. Histomorfometrik Ölçümler

Gruplar arası oosit ve folikül çapları karşılaştırması için primer folikülden preovulatuvar folikül evresine kadar tüm folikül tiplerinde, folikül çapları ve oosit çapları folikülün ve oositin en kısa ve en uzun eksenlerinden birbirini dik kesen iki çap çizgisi uzunluğunun ortalaması alınarak hesaplandı (Şekil 3.8). Folikül çapı, granuloza hücrelerinin bitiminden itibaren sınırlandırıldı (teka kılıfı ölçüme dahil edilmedi). Oosit çapı zona pellusida dahil olmak üzere sınırlandırıldı. Tüm ölçümler, merkezinde belirgin bir oosit içeren normal yapıdaki foliküller üzerinde yapıldı.



Şekil 3.8: Folikül ve oosit çap ölçümleri metodu
Mavi kesikli çizgiler: folikül çapları, kırmızı kesikli çizgiler: oosit çapları

Zona pellusida kalınlık karşılaştırması için tersiyer evredeki foliküllerde oositi çevreleyen zona pellusidayı dik kesecek şekilde karşılıklı dört farklı noktadan ölçüm yapılarak (Şekil 3.9) ortalaması alındı.



Şekil 3.9: Zona pellusida kalınlık ölçüm metodu
Zp2 (IHC), 40x

3.3.4. Histopatolojik Değerlendirmeler

Histopatolojik olarak ovaryum stromal dokuda konjesyon ve inflamasyon skorlaması; korpus luteumlarda konjesyon, inflamasyon değerlendirildi (0: yok, 1: zayıf, 2: orta, 3: şiddetli). Her bir ovaryumun (n=7) farklı seviyelerdeki 10 kesitinin, bağ doku alanları ve tüm korpus luteumları 40x objektifle incelenerek skorlama yapıldı.

3.3.5. İmmünohistokimyasal ve İmmünoflorasan Boyamalar

İmmünohistokimyasal analizler için, formolle tespit edilen ovaryumlardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Zp1, Zp2, Zp3, BMP15, Gdf9, Foxo3a, GAS2 ve Caspase 3 antikoları ile boyandı (Tablo 3.3). Antikolar kullanım klavuzlarında belirtilen oranlarda (Tablo 3.4) antikor diluenti ile seyreltilerek kullanıldı.

Her bir protein için immünreaktivite düzeyi, '0: boyanma yok, 1: zayıf boyanma, 2: orta şiddette boyanma, 3: şiddetli boyanma' skorlamasına göre yapıldı.

İmmünoflorasan boyama için formolle tespit edilen ovaryumlardan 5 µm kalınlığında kesitler alınarak Zp2, Zp3 (Tablo 3.4) antikoları ile boyandı (Tablo 3.3). Antikolar kullanım klavuzlarında belirtilen oranlarda %1 BSA ile seyreltilerek kullanıldı.

Tüm kesitler, Nikon Eclipse Ni-U ışık mikroskobu, DS-Fi3 camera (Nikon Instruments Inc., Melville, NY) ve NIS-Elements Documentation 5.02 Görüntü Analiz Sistemi (Nikon Corp., Tokyo, Japan) ile incelenerek analizler yapıp fotoğraflar alındı.

Tablo 3.3: Doku takip ve boyama prosedürleri

Doku takibi prosedürü		H&E boyama prosedürü	
1. Musluk suyu	1 saat	1. İnkübasyon (60°C)	1 saat
2. Musluk suyu	1 saat	2. Ksilen	5 dk x 3
3. %80 alkol	1 saat	3. %96 alkol	3 dk
4. %96 alkol	1 saat	4. %96 alkol	3 dk x 2
5. %96 alkol	1 saat	5. Absolü alkol	3 dk x 2
6. Absolü alkol	1 saat	6. Musluk suyu	5 dk
7. Absolü alkol	1 saat	7. Hematoksilen	10 dk
8. Ksilen	1 saat	8. Musluk suyu	5 dk x 3
9. Ksilen	1 saat	9. Eozin	2 dk
10. Ksilen	1 saat	10. %96 alkol	3 dk x 2
11. Parafin I	1 saat	11. Absolü alkol	3 dk x 2
12. Parafin II	1 saat	12. Ksilen	5 dk x 3
13. Parafin III	1 saat		
14. Parafin IV	1 saat		
IHC boyama prosedürü		IF boyama prosedürü	
1. Deparafinizasyon		1. Deparafinizasyon	
2. Antijen Retrieval	15 dk, 121°C	2. Antijen retrieval	15 dk, 121°C
3. Distile Su	1 dk	3. PBS	5 dk x 2
4. PBS	1 dk	4. %1 BSA	10 dk
5. Hidrojen Peroksit	10 dk	5. Primer antikor	Overnight, 4°C
6. PBS	1 dk	6. PBS	5 dk x 3
7. Protein Blok	5 dk	7. Sekonder antikor	1 saat
8. Primer Antikor	40 dk	8. PBS	5 dk x 3
9. PBS	5 dk	9. Kapama (DAPI'li medium)	
10. Sekonder Antikor	20 dk		
11. PBS	5 dk		
12. Streptevadin Peroksidaz (HRP)	10 dk		
13. PBS	1 dk		
14. Kromojen	10 dk		
15. PBS	1 dk		
16. Distile Su	1 dk		
17. Hematoksilen	2 dk		
18. Musluk Suyu	1 dk x 3		
19. Distile Su	1 dk		

Tablo 3.4: IHC ve IF için kullanılan antikorlar

Primer Antikor	Marka	Dilüsyon Oranı
BMP15	Bioss bs-6612R	IHC: 1/300
Gdf9	Bioss bs-4720R	IHC: 1/300
GAS2	Bioss bs-13289R	IHC: 1/500
Foxo3a	YL-biont YID2201	IHC: 1/500
Zp1	YL-biont YID 5393	IHC: 1/500
Zp2	YL-biont YID5394	IHC: 1/500
Zp3	YL-biont YID 5395	IHC: 1/500
Caspase 3	NeoMarkers RB-1197-p	IHC: 1/300

3.4. Transmisyon Elektron Mikroskopi Analizleri

Ovaryumlardan alınan yaklaşık 1 mm³ hacmindeki doku örnekleri ilk olarak %2,5'lük gluteraldehit içerisinde alınıp +4°C'de 12 saat tespit edildi. Tespit işlemini takiben Leica EM AMW cihazı ile elektron mikroskopik doku takibi yapılarak (Tablo 3.5, 3.6) dokular sikon kalıplar içerisinde rezine gömüldü. Rezin içine gömülen dokular 45°C etüvde 4 saat, 60°C etüvde 24 saat polimerizasyona bırakıldı.

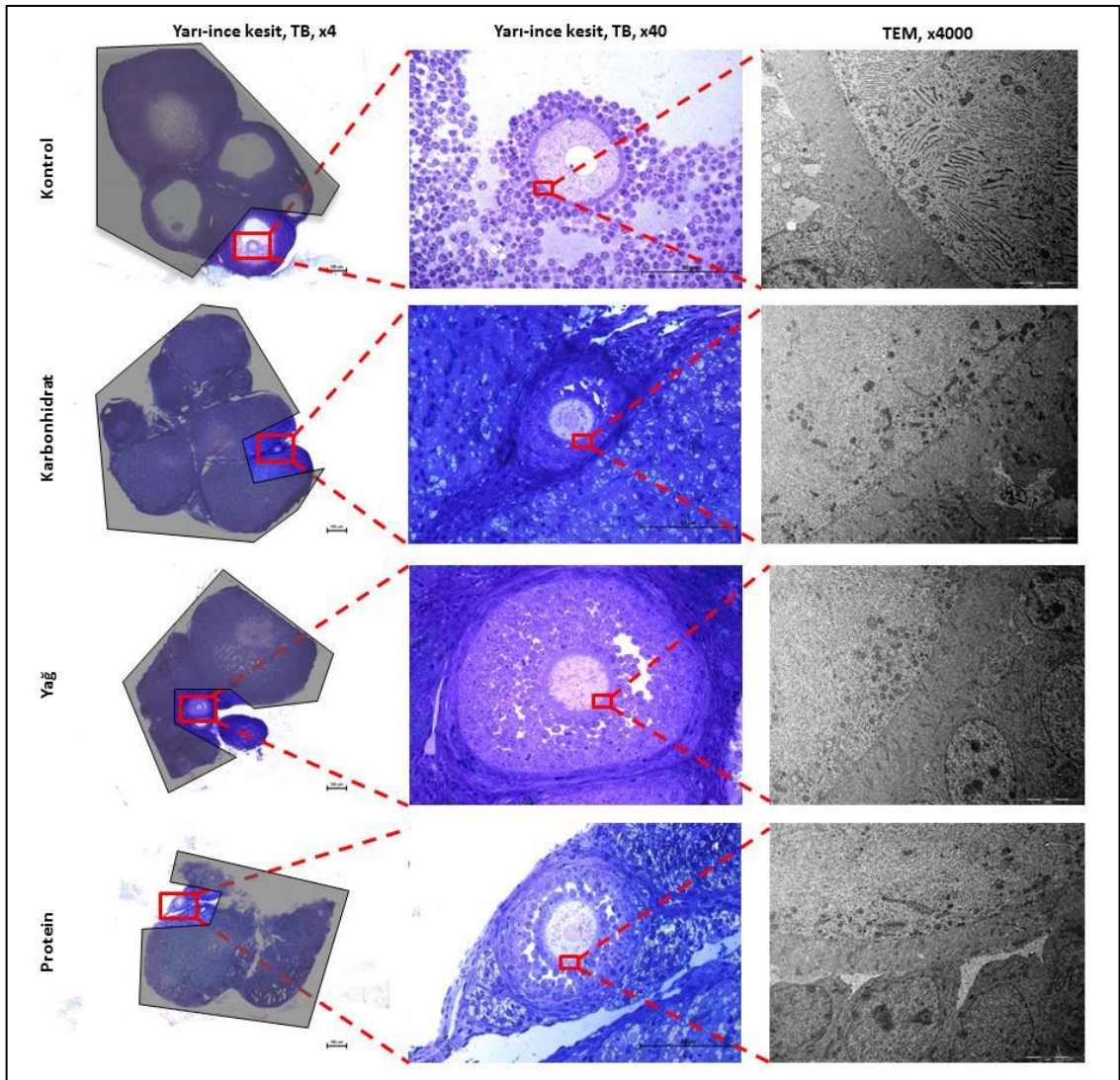
Polimerize olan rezin blokları trimlendikten (Leica EM Trimmer) sonra ultramikrotom (Leica Ultracut R) ile öncelikle yarı ince kesitler (1 µm) alınarak toluidine blue ile boyanıp oosit varlığı kontrol edildi. Oosit denk gelmeyen bloklar tekrar trimlenerek oosit görülünceye kadar trimleme ve yarı ince kesit alınmaya devam edildi. Yarı ince kesitlerde oosit tespit edilen bloklarda oosit etrafında kalan fazla alanlar tekrar traşlanarak (Şekil 3.10) sadece oositin bulunduğu bölgeden alınan 80 nm kalınlığındaki ultra-ince kesitler bakır gridler üzerine alındı. Kesitler uranil asetat ve kurşun sitrat ile kontrastlanıp (Tablo 3.5, 3.6) Zeiss Libra 120 TEM ile incelenerek fotoğraflar alındı.

Tablo 3.5: EM Doku Takip ve Grid Boyama (Kontrastlama) Prosedürü

EM doku takibi prosedürü		Kontrastlama	
1. PBS	2 dk x 3, 20°C	1. Uranil Asetat	5 dk
2. Osmium tetroksit % 1	1.5 saat, 20°C	2. Deiyonize su	1 dk
3. PBS	2 dk x 4, 20°C	3. Kurşun sitrat	3 dk, +4°C, karanlıkta
4. Aseton % 30	5 dk, 20°C	4. Deiyonize su	1 dk x 5
5. Aseton % 50	5 dk, 20°C		
6. Aseton % 70	5 dk, 20°C		
7. Aseton % 90	5 dk x 2, 20°C		
8. Aseton % 100	5 dk x 2, 20°C		
9. Araldit %50	30 dk, 37°C		
10. Araldit %75	30 dk, 37°C		
11. Araldit %100	1 saat, 37°C		

Tablo 3.6: Elektron mikroskopik doku takip basamaklarında kullanılan solüsyonlar

Fosfat tamponu (PBS)		%2,5 Gluteraldehit		%1 Osmium Tetroksit	
0,2 M Na ₂ HPO ₄ (3.56 g+100 ml dsu)	38 ml	0,2 M fosfat tamponu	50 ml	%4 Osmium tetraoksit	5 ml
0,2 M NaH ₂ PO ₄ (3.12 g+100 ml dsu)	12 ml	%25 Gluteraldehit	12 ml	0,2 M fosfat tamponu	10 ml
Deiyonize su	50 ml	Deiyonize su	38 ml	Deiyonize su	5 ml
Toplam	100 ml	Toplam	100 ml	Toplam	100 ml
Araldit		Uranil Asetat Boyası		Kurşun Sitrat Boyası	
DDSA	20 ml	Metil Alkol	80 ml	Kurşun sitrat	0,266 g
Araldit CY212	20 ml	Uranil Asetat	2 g	Trisotyum sitrat	0,352 g
BDMA	0,8 ml	Deiyonize su	20 ml	1 M sodyum hidroksit	1,6 ml
				Deiyonize su	8,4 ml



Şekil 3.10: Oosit alanının tespiti ve ZP'nin görüntülenmesi
Sol sütun-gri alanlar: oosit dışında kalıp traşlanan alanlar.

3.5. Gen Ekspresyon Analizleri

3.5.1. RNA izolasyonu

Ovaryum doku örneklerinde RNA izolasyonu için RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen), üretici firmanın önerilerine göre kullanıldı. RNA izolasyonu için sırasıyla aşağıdaki basamaklar uygulandı:

1. 25 mg ovaryum doku örneği alınıp, dondurularak, doku üzerine 350 µl RTL Buffer eklenip Qiagen Tissue Lyser LT cihazında homojenize edildi.
2. Homojenizat 2 ml'lik ependorf tüpe alınıp, 600 µl %70'lik etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
3. 700 µl'lik hacim alınıp RNeasy plus mini kit pembe spin kolonlarına yüklendi ve kapaklar kapatıldı (2 ml'lik toplama tüpleri kolon altına geçirilir). 15 saniye 8000g (10.000 rpm)'de santrifüj yapıldı, altta oluşan süzüntü atıldı.
4. 700 µl Buffer RW1 pembe spin kolonun üzerine eklendi. 15 saniye 8000g (10.000 rpm)'de santrifüj yapıldı, altta oluşan süzüntü atıldı.
5. 500 µl Buffer RPE pembe spin kolonun üzerine eklendi. 15 saniye 8000g(10.000 rpm)'de santrifüj yapıldı, altta oluşan süzüntü atıldı.
6. 500 µl Buffer RPE pembe spin kolonlarına yüklendi. 2 dakika 8000g (10.000 rpm)'de santrifüj yapıldı, toplama tüpleri atıldı.
7. Opsiyonel olarak RPE Buffer'in iyice uzaklaştırılması için toplama tüpleri değiştirilip 1 dakika son hızda santrifüj yapıldı, toplama tüpleri atıldı.
8. 1,5 ml'lik tüpler içine kolonlar yerleştirildi. Üzerine 30µl RNase Free Water eklendi.
9. 1 dakika 8000g'de santrifüj yapılarak RNA elüsyonları elde edildi. İzole edilen RNA örneklerinden miktar tayini ve saflık derecesinin belirlenmesi amacıyla spektrofotometre (Maestrogene, nano) kullanıldı ve 260 nm ve 280 nm'de ölçüm gerçekleştirildi. Ölçüm sonrasında her bir örnekteki toplam RNA miktarı ve Absorbans (260/280) oranından yararlanılarak RNA saflık derecesi belirlendi.

3.5.2. Genomik DNA'nın (gDNA) eliminasyonu ve cDNA Sentezi

Elde edilen total RNA elüsyonlarından gDNA eliminasyonunda ve cDNA sentezinde Quantiscript Reverz Transcriptaz, Quantiscript RT sentez kiti üretici firmanın prosedürüne göre aşağıdaki gibi kullanıldı:

1. RNA templateleri kuru buz üzerinde çözüldü. Quantiscript RT Solüsyonu, Quantiscript Reverz Transcriptaz, RT Primer Miksi gDNA eliminasyon solüsyonu, ve RNaz-bulundurmayan su oda sıcaklığında (15-25°C'de) çözüldü. (gDNA

eliminasyonunda ve cDNA sentezinde kullanılan solüsyonlar Tablo 3.7’de belirtilmiştir.)

2. gDNA eliminasyon reaksiyonu Tablo 3.8’de belirtildiği gibi hazırlandı.
3. 42°C’de 2 dakika inkübasyonun ardından buzun üzerine alındı.
4. Reverz-transkripsiyon master miks solüsyonu Tablo 3.9’a göre hazırlandı.
5. Template RNA’lar reverz-transkriptaz master miksi içerisine eklenerek karıştırılıp buz üzerine konuldu.
6. 42°C sıcaklıkta 15 dakika inkübasyon uygulandı.
7. Quantiscript Reverz Transcriptaz aktivitesini engellemek için 95°C sıcaklıkta 3 dakika inkübe edildi.
8. Elde edilen cDNA’lar RT- PCR karışımına eklenerek q-PCR işlemi gerçekleştirildi.

Tablo 3.7: gDNA eliminasyonunda ve cDNA sentezinde kullanılan solüsyonlar

Bileşen	Tanım
gDNA eliminasyon solüsyonu, 7x	Başlangıçtaki RNA materyalini, gDNA kontaminasyonundan etkin bir şekilde uzaklaştırma işlemi gerçekleştirmektedir.
Quantiscript Reverz Transcriptaz	Çift basamaklı RT-PCR uygulamalarında kullanılmak üzere geliştirilmiştir. <i>E. Coli</i> ’de eksprese edilen ve rekombinant heterodimerik yapıya sahip olan Omniscript ve Sensiscript reverz transkriptaz enzimlerinin karışımını içermektedir.
Quantiscript RT Solüsyonu, 5x	İçeriğinde dNTP bulunan ve Quantiscript Reverz Transcriptaz enzimi kullanılarak reverz transkriptaz işleminin yapılması amacıyla optimize edilen karışımdır.
RT Primer Miksi	Suda çözünen oligo-dT ve random primerleri içeren solüsyondur. RNA transkriptinin 5’ ucuda dahil bütün bölgelerinden cDNA sentezinin yapılmasını sağlamaktadır.
RNaz-bulundurmaya su	PCR saflığında ultra saf su.

Tablo 3.8: gDNA eliminasyon reaksiyonu

Komponent	Hacim/reaksiyon	Final Konsantrasyonu
gDNA Eliminasyon Solüsyonu, 7x	2 µl	1x
Template RNA	10 pg'dan 1 ug'a kadar değişebilir.	-
RNaz bulundurmaya su	RNA templatının hacmine göre değişkenlik gösterebilir.	-
Toplam hacim	14 µl	-

Tablo 3.9: Reverz transkripsiyon master miksi hazırlanması

Komponent	Hacim/reaksiyon	Final Konsantrasyonu
Reverse-transkripsiyon master miksi		
Quantiskript Reverz Transkriptaz	1 µl	-
Quantiskript RT Solüsyonu, 5x	4 µl	1x
RT Primer Miksi	1 µl	-
Template RNA		
Bir önceki basamakta elde edilen ürünün tamamı (genomik DNA reaksiyonunun tamamı)	14 µl (5. Basamakta eklendi)	-
Total hacim	20 µl	-

3.5.3. Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu (qPCR) Analizi:

Yapılan qPCR analizi Syber Green tabanlı bir çalışma olup, Qiagen RT2 SyberGreen Master Mix kullanıldı. Her 25 µl'lik PCR reaksiyonu için Tablo 3.10'da belirtilen primerler ve Tablo 3.11'de belirtilen reaktifler kullanılarak üretici firmanın talimatlarına göre qPCR analizi gerçekleştirildi. Toplam 7 hedef gen (ZP1, ZP2, ZP3, BMP15, GDF9, FOXO3A, GAS2) ve 1 Beta Actin referans gen (56) olmak üzere 8 genin ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Real Time PCR uygulaması için Qiagen Rotorgene Q cihazı kullanıldı. Polimer zincir reaksiyonu için reaksiyon karılımı Tablo 3.11'de belirtildiği gibi hazırlandı. Tablo 3.12'de belirtilen döngü sayıları ve sürelerine göre PCR analizi gerçekleştirildi.

Tablo 3.10: Çalışmada araştırılan genler ve primer dizileri

Gen Bölgesi	Forward	Reverse
ACBT	TCGAGTCGCGTCCACC	GGGAGCATCGTCGCCC
ZP1	GCCACCTTCACTCTCCTTGA	CGTCGATGCCTTGCTATCTC
ZP2	GGCTCTCCAGCCTGATCTACT	TGGGAGGCTAACCGTCATTG
ZP3	AGACTTCCCAGAGTTGGTTG	TGACATCAGCTTCATCCGTCA
BMP15	GATAAAGCCGTCAGCCAGTGC	AGGTTCCACATGGCAGGAGAG
GDF9	GGCTCCCAGCAACCAGATGA	GAGGAGGAAGCAGCGGAGTT
FOXO3A	CATCTCAAAGCTGGGTGCCA	GATGGCGTGGGAGTCACAAA
GAS2	AACAAGCCTGCCAAGACCCT	AGACACACTTCTCGGGGCTG

Tablo 3.11: Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

Reaktif	Miktar (µl)
RT ² qPCR Mastermiks	12,5
ddH ₂ O	10,5
cDNA template	1
Forward Primer	0,5
Reverse Primer	0,5
Total hacim	25

Tablo 3.12: Kantitatif Polimer Zincir Reaksiyonu Döngü Sayısı ve Süresi

Döngü	Süre	Sıcaklık
1	10 dakika	95°C
40	15 saniye 30 saniye	95°C 60°C

3.5.4. RT-PCR Sonuçlarının Hesaplanması

Real Time PCR sonrasında elde edilen Ct değerleri (threshold cycle) için Excel tablosu yapıldı. Rölatif gen ekspresyon düzeyleri RT² Profiler PCR Arrays & Assays (GenGlobe, Qiagen, Hilden) analiz programı kullanılarak $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu ile yapıldı. Tüm veriler ACTB housekeeping gen (HKG) düzeylerine göre normalize edildi. RNA

ekspresiyon düzey analizleri kontrol grubu ile kıyaslanarak aşağıda belirtildiği gibi yapıldı:

$$\text{Çalışma Grubu: } \Delta\text{Ct} = \text{Ct (hedef gen)} - \text{Ct (HKG)}$$

$$\text{Kontrol Grubu: } \Delta\text{Ct} = \text{Ct (hedef gen)} - \text{Ct (HKG)}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct (çalışma grubu)} - \Delta\text{Ct (kontrol grubu)}$$

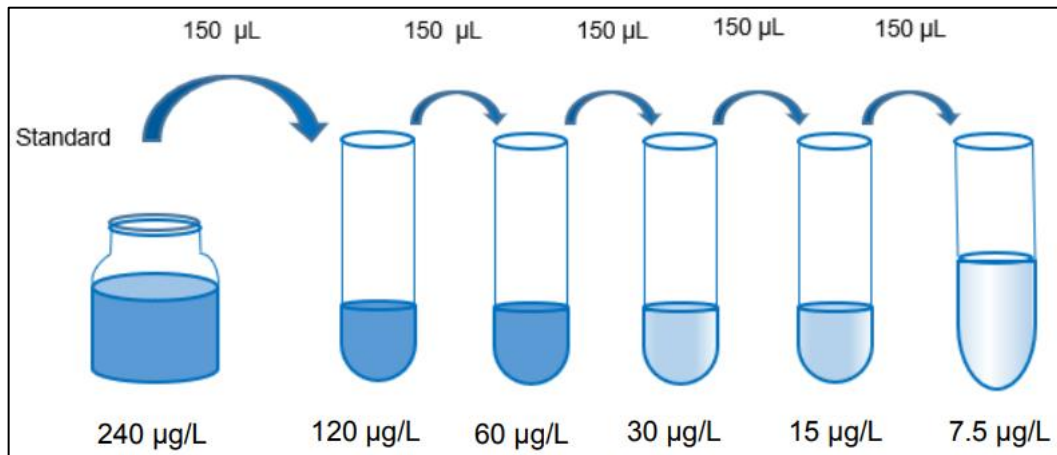
$$\text{Oran} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

3.6. Biyokimyasal Analizler

Serum FSH, LH, progesteron, östrojen, adiponektin, resistin, ve leptin hormon seviyelerinin ölçümü her bir hormon için spesifik ELISA kitleri ile (Tablo 3.13) yapıldı. Çalışma öncesi kit içerisindeki standart stok solüsyonları Şekil 3.11 örneğinde belirtildiği gibi 5 aşamalı seyreltilme işlemi yapılarak her bir kit için tanımlanan standart örnekleri hazırlandı. Çalışmanın ve sonuçların güvenilirliğini arttırmak için standartlar dublike çalışıldı.

Tablo 3.13: Hormon analizlerinde kullanılan ELISA kitleri

Hormon	Marka	Katalog no
FSH	SunRed	201-11-0180
LH	SunRed	201-11-0180
Progesteron	SunRed	201-11-0742
Östrojen	SunRed	201-11-0175
Adiponektin	Abbkine	KTE100343
Resistin	Abbkine	KTE100300
Leptin	Abbkine	KTE100709



Şekil 3.11: Elisa kitleri referans standartının seri dilüsyon örneği

Kit içerisindeki solüsyonlar ve serum örnekleri oda sıcaklığında 2 saat bekletildikten sonra çalışılmaya başlandı. Serum örnekleri tekrar santrifüj edildi. Serum örneklerinden belirtilen hormonların düzeyini belirlemek için kit protokolüne göre genel olarak aşağıdaki basamaklar uygulandı:

1. Analizde kullanılan 96 kuyucuklu plakanın kör kuyucuğu boş bırakıldı 50 µl standart ve 40 µl örnekler antikor ile kaplanmış kuyucuklarına eklendi.
2. Numune kuyucuklarının üzerine 10 µl antibody, standart ve numune kuyucuklarına 50 µl Streptavidin-HRP konjugat eklendi. Plakanın kapağı etiket ile kapatılarak 37°C’de 1 saat inkübasyona bırakıldı.
3. Her bir kuyucuğa 350 µl yıkama solüsyonu eklendi ve plaka ters çevirilerek kuyucuklar boşaltıldı. Bu işlem 5 kez tekrarlandı. Daha sonra plaka tamamen kurutuldu.
4. Bütün kuyucuklara 50 µl kromojen A ve 50 µl kromojen B solüsyonu eklenip plakanın kapağı kapatılarak 37°C’de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyonun sonrasında her kuyucuğa 50 µl durdurma solüsyonu eklenip plaka hafifçe çalkalandı.
6. Son olarak stop solüsyonunun eklenmesinden sonra 15 dk içerisinde ELISA reader cihazı kullanılarak plakalar 450 nm dalga boyunda okundu ve sonuçlar kit protokolünde belirlenen birimle ifade edildi.

3.7. İstatistiksel yöntem

Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Parametrik test varsayımlarını sağlayan veriler ortalama-standart sapma ile özetlendi ve karşılaştırmalarda tek yönlü varyans analizi ve sonrasında Tukey HSD ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı. Parametrik test varsayımını sağlamayan veriler medyan, minimum-maksimum değerler ile tanımlandı. Karşılaştırmalarda ise Kruskal-Wallis testi ve sonrasında Conover ikili karşılaştırma yöntemi kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Hayvan, Ovaryum ve Tüketilen Yem Ağırlıkları

Deneysel uygulama süresince sıçanlar haftalık olarak tartılarak gruplara göre kilo alım oranları kaydedildi (Tablo 4.1). Hayvan ağırlık değişimleri açısından yağ grubunda diğer gruplara kıyasla artış olduğu görülürken istatistiksel olarak gruplar arası fark bulunmadı (Tablo 4.2) ($p>0.05$).

Tablo 4.1: Sıçanların haftalık ağırlık değişimleri

Grup/Hafta	Kontrol (g)	Karbonhidrat (g)	Yağ (g)	Protein (g)
0. gün*	57.4	54.4	50.5	55.4
1. Hafta	91.5	87.1	81.2	87.8
2. Hafta	126.6	120.8	113.3	119.2
3. Hafta	154.5	148.4	141	147.5
4. Hafta	182.5	174.5	172.8	174.4
5. Hafta	204.8	194.4	193.9	195.4
6. Hafta	220.9	208.5	211.1	210.3
7. Hafta	232	220.2	223.6	220.7
8. Hafta	243.6	235.3	239.5	235.4
9. Hafta	249.9	241.5	245.6	239.9
10. Hafta	256.1	247.3	252.7	243.7
11. Hafta**	262.3	254.3	272.2	254.4

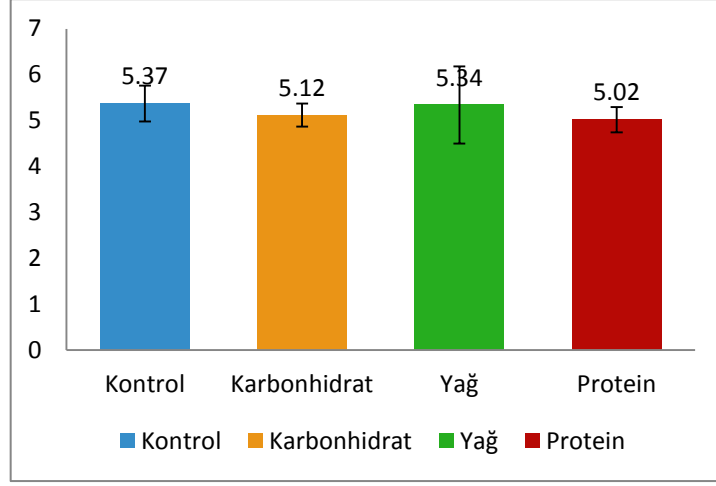
* Deney başlangıç gününü ifade etmektedir.

** Sakrifikasyon gününü ifade etmektedir.

Tablo 4.2: Deney başlangıç ile deney sonu ağırlık karşılaştırması

Grup/Hafta	0. Gün (g)	11. Hafta (g)	Fark (g)
Kontrol	57.4 ± 3.0	262.3 ± 25.7	204.9 ± 26.5
Karbonhidrat	54.6 ± 5.0	254.3 ± 8.5	199.9 ± 8.0
Yağ	50.5 ± 16.7	272.2 ± 56.7	221.7 ± 42.6
Protein	55.4 ± 15.0	254.4 ± 23.0	199.0 ± 22.3

Vücut kitle indekslerinin (VKİ) belirlenmesi için deney sonunda sıçanlar ketamin-ksilazin anestezisi altında iken boy ölçümleri yapıldı. “**VKİ = [ağırlık (kg)/boy² (m)]**” formülü ile vücut kitle indeksleri hesaplandı. Vücut kitle indeksleri açısından istatistiksel olarak gruplar arası fark bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.1).



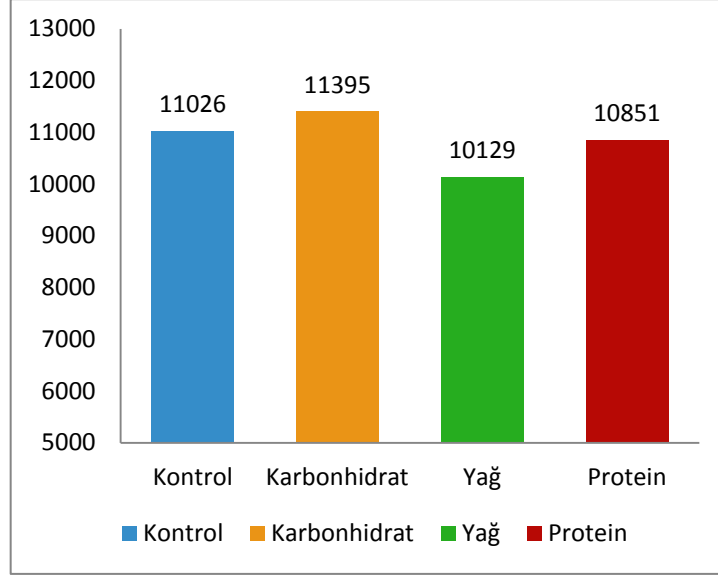
Şekil 4.1: Gruplar arası vücut kitle indeksleri karşılaştırması

Çalışma sonunda ketamin-ksilazin anestezisi altında iken her sıçanın ovaryumlarından bir tanesi tartılarak kaydedildi (Tablo 4.3). Ovaryum ağırlıkları açısından kontrol grubu diğer gruplara göre yüksek olmakla beraber gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Tablo 4.3: Gruplar arası ovaryum ağırlıkları karşılaştırması

Grup/Ağırlık	Ovaryum Ağırlığı (mg)
Kontrol	55.7 ± 5.9
Karbonhidrat	51.8 ± 8.1
Yağ	51.8 ± 5.6
Protein	52.1 ± 6.1

Çalışma boyunca tüketilen yem miktarları kaydedilerek yem tüketim oranları tespit edildi (Şekil 4.2). En yüksekten en düşüğe doğru yem tüketim oranları sırasıyla karbonhidrat grubu, kontrol grubu, protein grubu ve yağ grubu olarak tespit edildi.



Şekil 4.2: Tüketilen yem miktarları

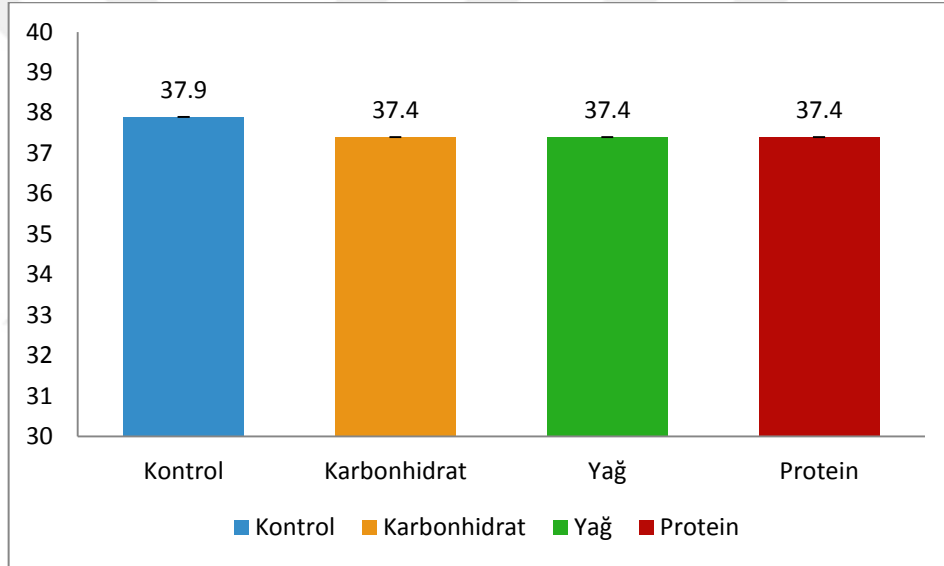
4.2. Fizyolojik Menstrual Siklus Varyasyonları

Tüm deneysel uygulama boyunca günlük olarak yapılan vajinal smear test örnekleri, gerekli boyama işlemlerinin ardından mikroskop altında analiz edilip her bir denek için günlük menstrual siklus evresi belirlenerek kaydedildi (Tablo 4.4). Elde edilen veriler değerlendirilerek sıçanların puberte yaşları, menstrual siklus uzunlukları ve her bir menstrual evre uzunlukları belirlendi.

Sıçanların sütten kesilmesinin 15. gününden itibaren vajinal plak açıklığı testi ile puberteye ulaşma yaşları belirlendi (Tablo 4.5, Şekil 4.3). Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında kontrol grubuna kıyasla her üç grupta da daha kısa sürede puberteye ulaşıldığı görülmekle birlikte istatistiksel olarak benzer bulundu.

Tablo 4.5: Gruplara göre puberte yaşları (gün)

Grup/Denek	Puberteye ulaşma günü										Ortalama
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	
Kontrol	38	38	38	38	38	38	37	38	38	38	37.9
Karbonhidrat	38	38	37	37	37	37	37	38	37	38	37.4
Yağ	36	36	38	38	38	37	38	38	38	37	37.4
Protein	37	38	37	37	38	38	38	38	36	37	37.4



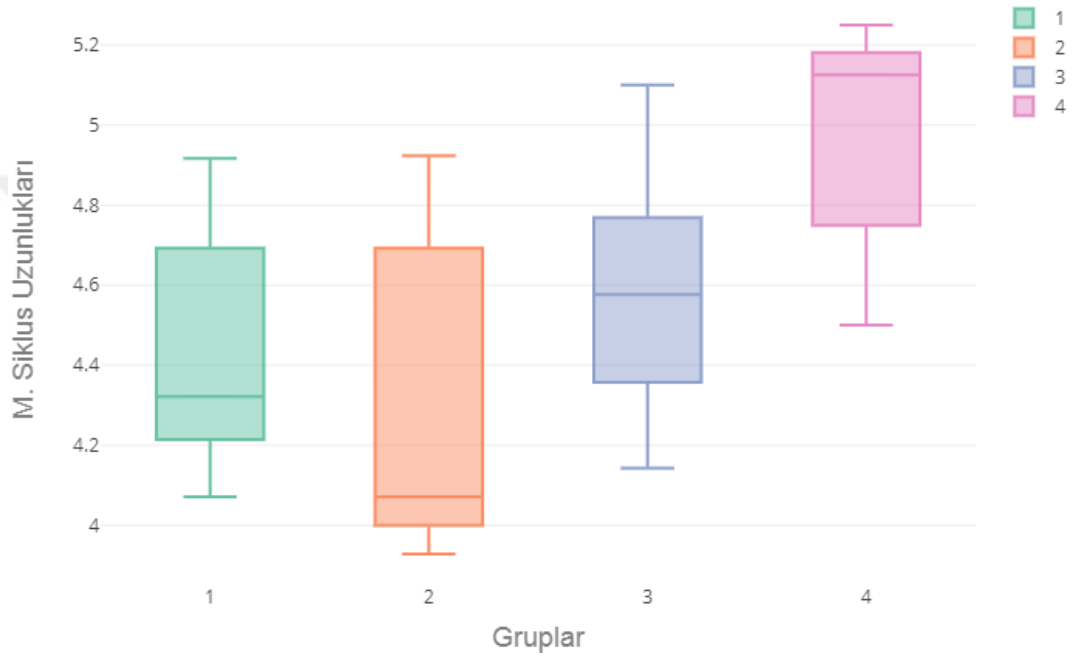
Şekil 4.3: Gruplara göre puberte yaşları

Menstrual siklus döngü uzunlukları karşılaştırıldığında, protein grubu kontrol ($p=0.001$) ve karbonhidrat ($p<0.001$) gruplarına göre; yağ grubu karbonhidrat grubuna göre ($p=0.015$) anlamlı derecede yüksek bulundu. Karbonhidrat ve kontrol grubu arasında ise anlamlı bir fark kaydedilmedi ($p=0.197$) (Tablo 4.6) (Şekil 4.4).

Tablo 4.6: Menstrual siklus uzunluk ortalamaları

Gruplar	Mens. Siklus Uzunlukları
Kontrol	4.4 ± 0.31
Karbonhidrat	4.3 ± 0.38
Yağ	4.6 ± 0.33 ^b
Protein	5 ± 0.28 ^{a,b,c}

a: kontrol grubuna göre farklı, b: karbonhidrat grubuna göre farklı, c: yağ grubuna göre farklı.



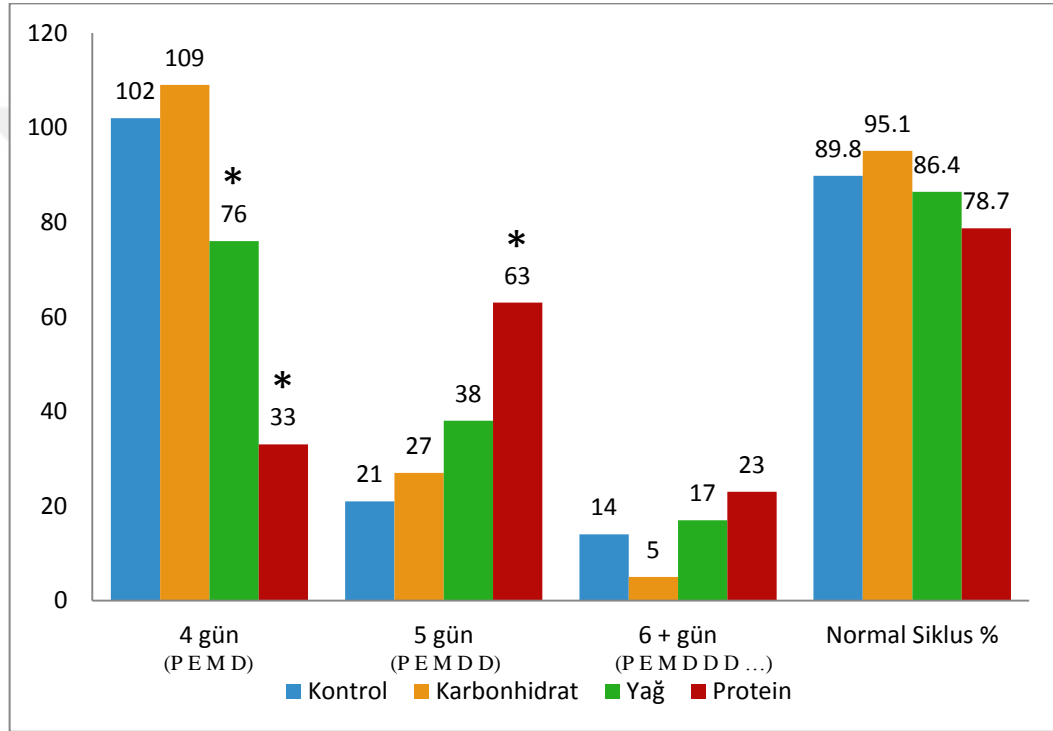
Şekil 4.4: Ortalama menstrual siklus uzunlukları
1: Kontrol, 2: Karbonhidrat, 3: Yağ, 4: Protein

Her bir grup için toplam normal siklus (4 gün), uzamış siklus (5 gün) ortalamaları ve anormal (6+ gün) siklus sayıları toplamı tablo 4.4'e göre hesaplandı. Normal siklus açısından karbonhidrat grubu kontrol grubuna yakinen yağ ve protein gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma görüldü ($p < 0.05$). 5 günlük uzamış siklus ortalaması ise kontrole göre karbonhidrat ve yağ grubunda benzer iken protein grubunda anlamlı derecede ($p < 0.05$) artmış olduğu tespit edildi (Tablo 4.7, Şekil 4.5). Deney süresince geçirilen toplam menstrual siklus sayıları içerisinde normal (4 günlük) siklus yüzdeleri hesaplandığında, toplam siklus sayısının kontrol grubunda %89.8, karbonhidrat grubunda %95.1, yağ grubunda %86.4, protein grubunda ise %78.7'nin normal siklus olduğu kaydedildi (Şekil 4.6).

Tablo 4.7: Gruplara göre siklus uzunlukları ve anormal siklus toplami

Gruplar	Normal Mens. Siklus	Uzamiş Mens. Siklus	Anormal Mens. Siklus
Kontrol	10.2 ± 3.5	2.7 ± 1.9	14
Karbonhidrat	10.9 ± 5.2	2.8 ± 3.9	7
Yağ	7.6 ± 4.6 ^b	3.8 ± 3.3	19
Protein	3.2 ± 2.9 ^{a,b,c}	6.3 ± 2.7 ^{a,b}	27

a: kontrol grubuna göre farklı, b: karbonhidrat grubuna göre farklı, c: yağ grubuna göre farklı.



Şekil 4.5: Menstrual siklus uzunlukları toplam adetleri ve normal siklus yüzdesi

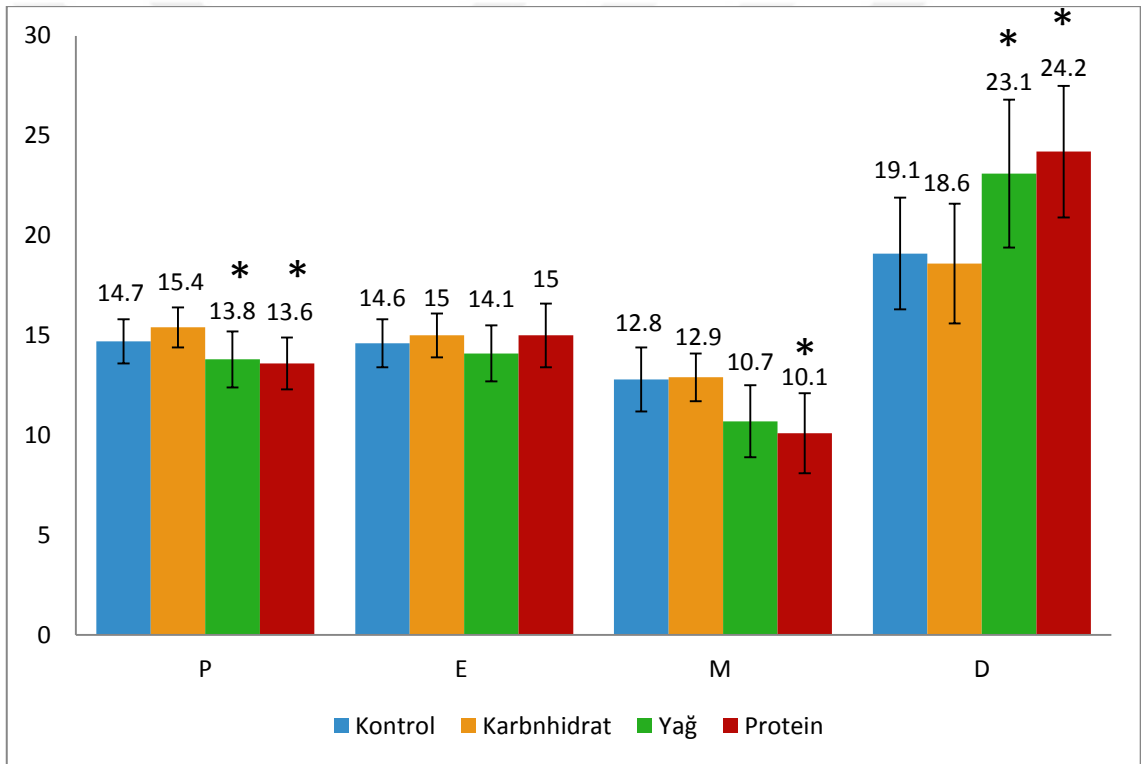
Yine tablo 4.4'teki verilere göre tüm gruplarda her bir sıçanın dört menstrual siklus evresinden (P, E, M, D) her birinde ortalama kaç kez tespit edildiği hesaplandı (Tablo 4.8, Şekil 4.6). Elde edilen verilere göre, proestrous evresi için karbonhidrat grubu kontrol grubuna benzer iken, protein grubu karbonhidrat grubuna, yağ grubu ise hem kontrol hem karbonhidrat grubuna göre anlamlı derecede ($p < 0.05$) düşük bulundu. Estrous evresi için gruplar arası fark bulunmadı ($p > 0.05$). Metestrous evresi için protein grubu hem kontrol hem karbonhidrat gruplarına göre anlamlı derecede ($p < 0.05$) düşük bulunurken yağ grubu kontrole göre anlamlı olmasa da düşük bulundu. Diestrous evresi açısından ise hem yağ hem de protein gruplarında kontrole kıyasla anlamlı derecede

($p < 0.05$) artış tespit edildi. Aynı evre için protein grubu karbonhidrat grubuna göre de anlamlı düzeyde ($p < 0.05$) yüksek bulundu.

Tablo 4.8: Grup içi menstrual siklus evre (P, E, M, D) ortalamaları

Grup/Menstrual evre	P	E	M	D
Kontrol	14.7 ± 1.1	14.6 ± 1.2	12.8 ± 1.6	19.1 ± 2.8
Karbonhidrat	15.4 ± 1.0	15 ± 1.1	12.9 ± 1.2	18.6 ± 3.0
Yağ	13.8 ± 1.4 ^{a,b}	14.1 ± 1.4	10.7 ± 1.8	23.1 ± 3.7 ^a
Protein	13.6 ± 1.3 ^b	15 ± 1.6	10.1 ± 2.0 ^{a,b}	24.2 ± 3.3 ^{a,b}

a: kontrol grubuna göre farklı, b: karbonhidrat grubuna göre farklı.



Şekil 4.6: Menstrual siklus evre uzunluklarının karşılaştırması
P: proestrous, E: estrous, Metestrous, D: diestrous

4.3. Histolojik Bulgular

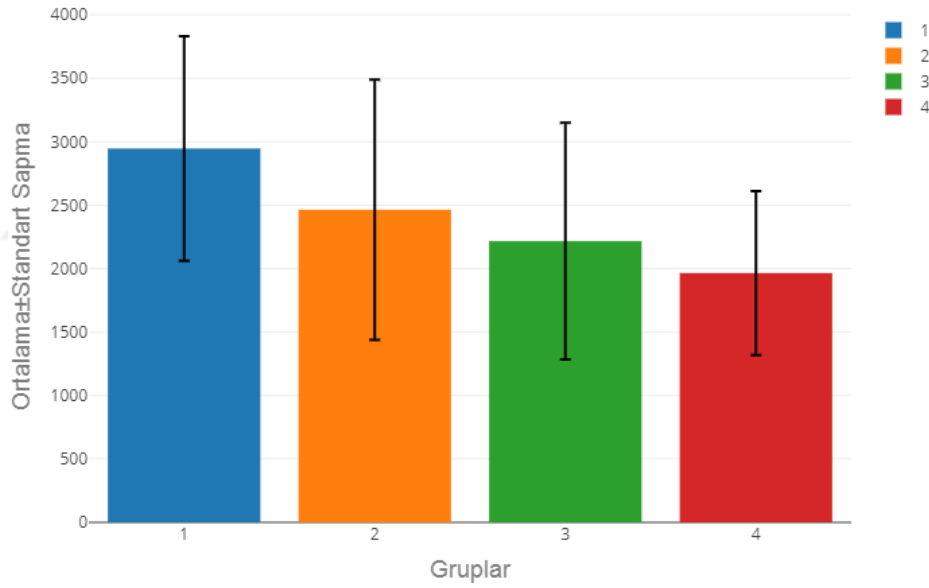
4.2.1. Ovaryal Folikül Sayıları

Yapılan seri kesitlerin analizinde her grupta (n=4) folikülogenez aşamalarında görülen primordiyal folikül, primer folikül, sekonder folikül, tersiyer folikül, preovulatuvar folikül, poliovulatuvar folikül, atretik folikül ve korpus luteum sayıları belirlendi (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: Folikül tipleri ve korpus luteum sayıları

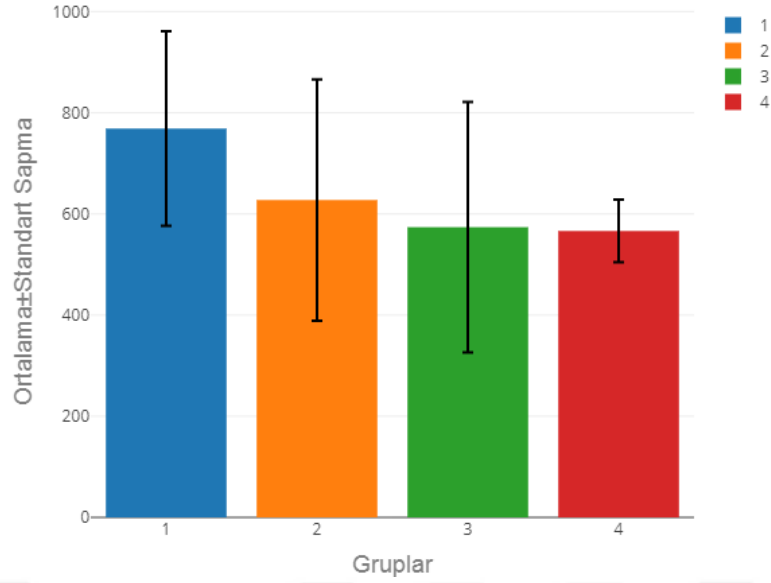
Gruplar	Primordial Folikül	Primer Folikül	Sekonder Folikül	Tersiyer Folikül	Preovulatuvar Folikül	Polioovulatuvar Folikül	Atretik Folikül	Korpus Luteum
Kontrol 1	1995	510	155	195	50	70	130	150
Kontrol 2	3960	925	275	275	50	65	140	275
Kontrol 3	2460	735	220	275	95	15	140	190
Kontrol 4	3370	905	340	205	45	50	160	200
Karbonhidrat 1	2505	570	275	225	70	10	185	225
Karbonhidrat 2	3695	920	270	175	70	30	185	215
Karbonhidrat 3	2470	675	230	185	15	25	135	175
Karbonhidrat 4	1185	345	165	135	40	0	125	175
Yağ 1	2895	555	185	175	40	15	375	225
Yağ 2	2975	845	190	185	35	80	440	175
Yağ 3	2015	645	195	210	55	5	390	160
Yağ 4	980	250	135	135	15	15	640	265
Protein 1	2505	595	245	200	35	20	300	240
Protein 2	2420	515	215	85	50	0	225	220
Protein 3	1825	515	240	135	30	10	275	238
Protein 4	1110	640	125	135	25	5	660	210

Primordiyal folikül rezervi açısından kontrol grubuna kıyasla sırasıyla karbonhidrat, yağ ve protein gruplarında artarak devam eden azalış görülmekle birlikte istatistiksel farklılık bulunmadı ($p>0.05$) (Şekil 4.7).



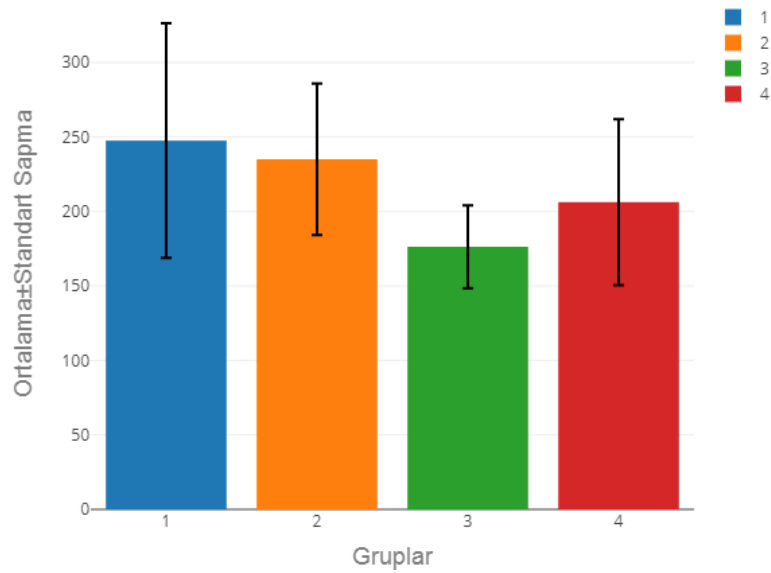
Şekil 4.7: Gruplar arası primordiyal folikül sayıları
1: Kontrol, 2: Karbonhidrat, 3: Yağ, 4: Protein

Primer folikül sayıları karşılaştırıldığında da yine istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte ($p>0.05$) kontrol grubuna göre diğer gruplarda sırasıyla giderek artan bir azalış olduğu tespit edildi (Şekil 4.8).



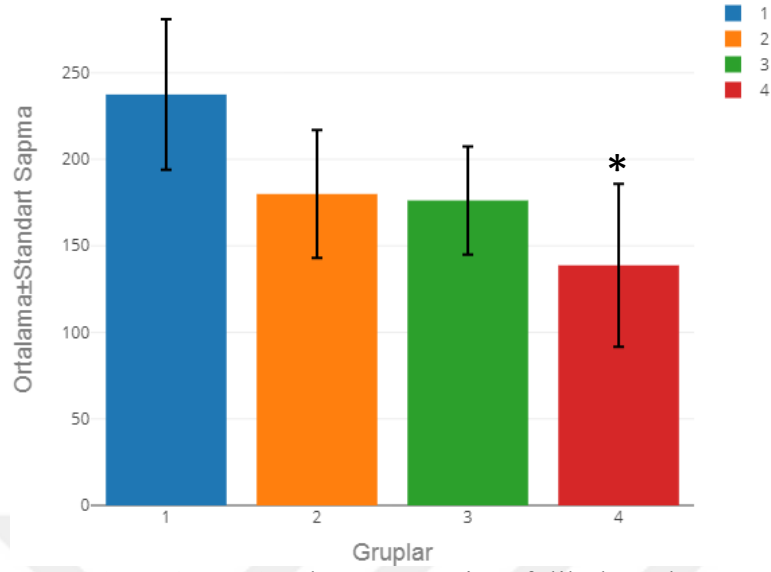
Şekil 4.8: Gruplar arası primer folikül sayıları
1: Kontrol, 2: Karbonhidrat, 3: Yağ, 4: Protein

Sekonder folikül sayıları açısından da kontrole kıyasla diğer gruplarda yine istatistiksel anlamlılık olmasa da ($p>0.05$) azalma olduğu ve en düşük ortalamının yağ grubunda olduğu görüldü (Şekil 4.9).



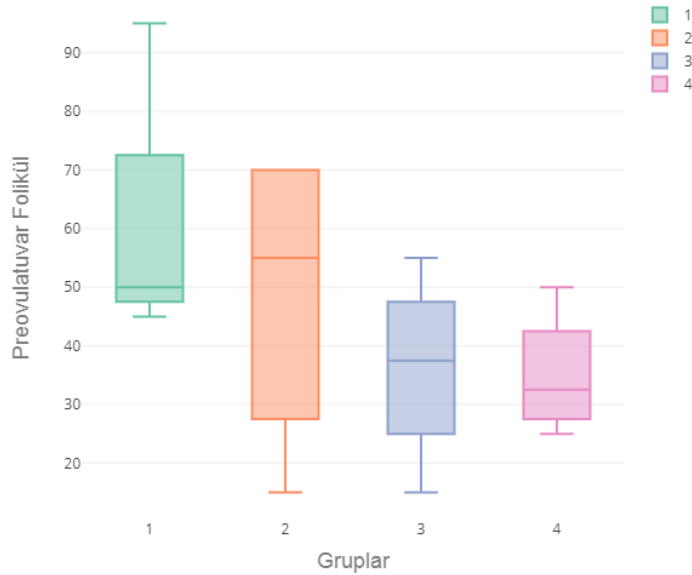
Şekil 4.9: Gruplar arası sekonder folikül sayıları
1: Kontrol, 2: Karbonhidrat, 3: Yağ, 4: Protein

Tersiyer folikül sayıları karşılaştırıldığında, kontrol grubuna göre protein grubundaki azalma anlamlı ($p<0.05$) iken, karbonhidrat ve yağ gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da azalma tespit edildi ($p>0.05$) (Şekil 4.10).



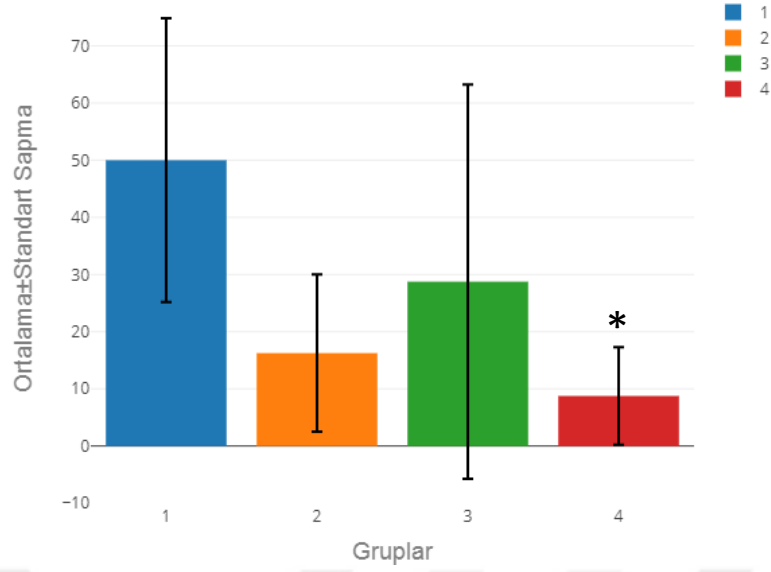
Şekil 4.10: Gruplar arası tersiyer folikül sayıları
1: Kontrol, 2: Karbonhidrat, 3: Yağ, 4: Protein

Gruplar arası preovulatuvar folikül sayıları karşılaştırıldığında istatistiksel fark bulunmama ile birlikte ($p>0.05$) yağ ve protein gruplarında kontrol grubuna göre azalma olduğu kaydedildi (Şekil 4.11).



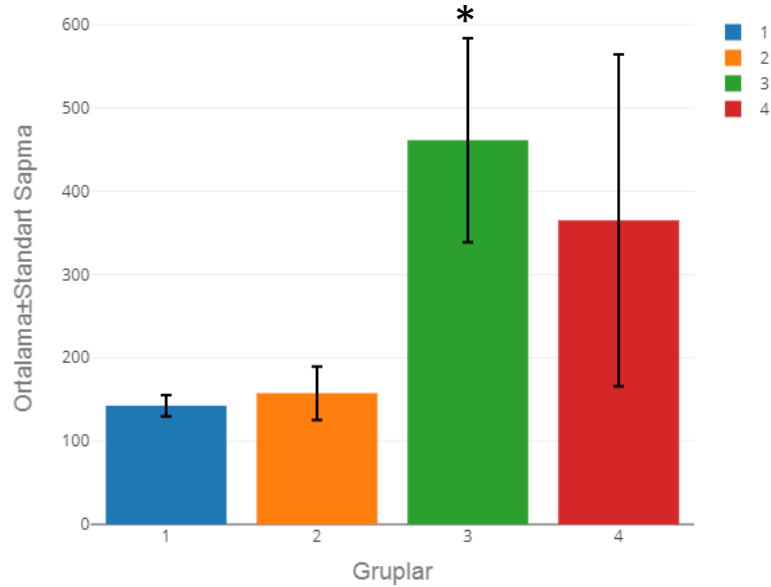
Şekil 4.11: Gruplar arası preovulatuvar folikül sayıları
1: Kontrol, 2: Karbonhidrat, 3: Yağ, 4: Protein

Poliiovulatuvar folikül sayıları açısından kontrol grubuna kıyasla protein grubunda anlamlı derecede ($p<0.05$) diğer gruplarda ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azalma olduğu görüldü ($p>0.05$) (Şekil 4.12).



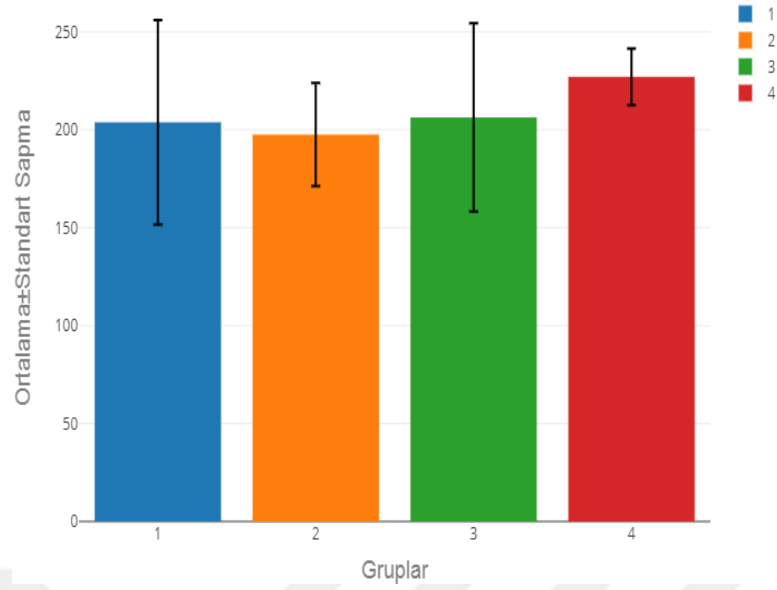
Şekil 4.12: Gruplar arası poliovulatuvar folikül sayıları
1: Kontrol, 2: Karbonhidrat, 3: Yağ, 4: Protein

Atretik folikül sayıları açısından yağ grubunun hem kontrole hem de karbonhidrat grubuna kıyasla anlamlı derece ($p<0.05$) yüksek olduğu saptandı. Protein grubunda da hem kontrole hem de karbonhidrat grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da artış olduğu görüldü (Şekil 4.13).



Şekil 4.13: Gruplar arası atretik folikül sayıları
1: Kontrol, 2: Karbonhidrat, 3: Yağ, 4: Protein

Korpus luteum sayıları açısından gruplar arası değerler birbirine benzer bulundu ($p>0.05$) (Şekil 4.14).



Şekil 4.14: Gruplar arası korpus luteum sayıları
1: Kontrol, 2: Karbonhidrat, 3: Yağ, 4: Protein

4.2.2. Morfometrik Ölçümler

Morfometrik olarak, primer folikülden preovulatuvar foliküle kadar tüm folikül tipleri için hem oosit çapları hem folikül çapları ile tersiyer evredeki foliküllerde zona pellusida kalınlıkları ölçüldü (Tablo 4.10).

Tablo 4.10: Oosit ve folikül çap ölçüm verileri (µm)

GRUP	Primer Oosit	Primer Folikül	PO/PF	Sekonder Oosit	Sekonder Folikül	SO/SF	Tersiyer Oosit	Tersiyer Folikül	AO/AF	Preovulatuvar Oosit	Preovulatuvar Folikül	PRO/PRF
Kontrol1	11.04	20.4	0.54	28.48	60.56	0.47	34.49	108.1	0.32	42.04	342.49	0.12
Kontrol2	11.48	20.64	0.56	27.99	56.07	0.50	34.21	90.48	0.38	44.25	299.98	0.15
Kontrol3	10.45	19.02	0.55	27.39	55.03	0.50	35.83	117.13	0.31	42.81	298.83	0.14
Kontrol4	9.78	18.1	0.54	28.79	55.27	0.52	35.35	121.46	0.29	40.03	259.03	0.15
Karbonhidrat 1	9.72	18.54	0.52	24.72	56.03	0.44	33.25	106.42	0.31	38.55	283.74	0.14
Karbonhidrat 2	8.99	17.31	0.52	25.09	56.3	0.45	30.77	118.12	0.26	38.83	261.23	0.15
Karbonhidrat 3	11.13	20.77	0.54	25.02	53.26	0.47	32.26	102.03	0.32	35.99	265.78	0.14
Karbonhidrat 4	10.68	19.27	0.55	24.02	43.6	0.55	34.26	108.61	0.32	37.23	248.78	0.15
Yağ 1	10.33	18.39	0.56	23.98	51.74	0.46	32.46	111.32	0.29	36.9	249.11	0.15
Yağ 2	10.06	19.31	0.52	25	48.27	0.52	35.84	134	0.27	41.43	261.8	0.16
Yağ 3	11.73	22.28	0.53	25.67	51.72	0.50	33.27	99.94	0.33	39.43	316.06	0.12
Yağ 4	10.71	19.99	0.54	24.88	50.58	0.49	33.86	115.87	0.29	39.25	275.66	0.14
Protein 1	10.95	20.5	0.53	24.25	49.59	0.49	37.27	139.82	0.27	41.8	331.5	0.13
Protein 2	11.23	20.76	0.54	23.74	45.93	0.52	36.23	134.17	0.27	41.12	313.84	0.13
Protein 3	11.52	20.53	0.56	24.48	49.92	0.49	33.5	112.67	0.30	36.99	248.3	0.15
Protein 4	11.43	19.66	0.58	18.97	31.51	0.60	36	130	0.28	40.32	309.8	0.13

*Primer oosit (PO): primer folikül (PF) evresindeki oositi,

Sekonder oosit (SO): sekonder folikül (SF) evresindeki oositi,

Tersiyet (Antral) oosit (AO): tersiyer (Antral) folikül (AF) evresindeki oositi,

Preovulatuvar oosit (PRO): preovulatuvar folikül (PRF) evresindeki oositi ifade etmektedir (Tablo 4.10 - 4.14).

Primer evre oosit ve primer folikül çapları karşılaştırıldığında primer oosit çapı protein grubunda karbonhidrat grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.05$). Diğer gruplar arasında oosit ve folikül çapları ve oranları açısından istatistiksel fark bulunmadı (Tablo 4.11).

Tablo 4.11: Primer folikül oosit ve folikül çap ölçüm karşılaştırmaları

GRUP	Primer Oosit	Primer Folikül	PO/PF
Kontrol	10.69 ± 0.74	19.54 ± 1.20	0.55 ± 0.1
Karbonhidrat	10.13 ± 0.96	18.97 ± 1.45	0.53 ± 0.02
Yağ	10.71 ± 0.73	19.99 ± 1.66	0.54 ± 0.02
Protein	11.28 ± 0.25^a	20.36 ± 0.48	0.55 ± 0.02

a: karbonhidrata göre yüksek. Primer oosit: primer folikül evresindeki oositi ifade etmektedir.

Sekonder evre oosit ve sekonder folikül çapları karşılaştırıldığında sekonder oosit çapı yağ ve protein gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede ($p<0.05$) düşük bulundu. Sekonder folikül çapları karşılaştırıldığında ise protein grubu kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük ($p<0.05$) bulundu. Diğer gruplar arasında oosit ve folikül çapları ve oranları açısından istatistiksel fark bulunmadı (Tablo 4.12).

Tablo 4.12: Sekonder folikül oosit ve folikül çap ölçüm karşılaştırmaları

GRUP	Sekonder Oosit	Sekonder Folikül	SO/SF
Kontrol	28.16 ± 0.61	56.73 ± 2.59	0.50 ± 0.02
Karbonhidrat	24.71 ± 0.49	52.29 ± 5.96	0.48 ± 0.05
Yağ	24.88 ± 0.69^a	50.58 ± 1.63	0.49 ± 0.02
Protein	22.86 ± 2.61^a	44.24 ± 8.68^a	0.52 ± 0.05

a: kontrole göre düşük. Sekonder oosit: sekonder folikül evresindeki oositi ifade etmektedir.

Tersiyer evre oosit ve tersiyer folikül çapları karşılaştırıldığında tersiyer oosit çapı karbonhidrat grubunda kontrol grubuna kıyasla, protein grubunda da karbonhidrat grubuna kıyasla anlamlı derecede ($p<0.05$) düşük bulundu. Tersiyer folikül çapları karşılaştırıldığında ise protein grubu hem kontrol hem karbonhidrat grubuna göre anlamlı derecede yüksek ($p<0.05$) bulundu. Diğer gruplar arasında oosit ve folikül çapları ve oranları açısından istatistiksel fark bulunmadı (Tablo 4.13).

Tablo 4.13: Tersiyer folikül oosit ve folikül çap ölçüm karşılaştırmaları

GRUP	Tersiyer Oosit	Tersiyer Folikül	TO/TF
Kontrol	34.97 ± 0.75	109.29 ± 13.72	0.32 ± 0.04
Karbonhidrat	32.66 ± 1.49^a	108.80 ± 6.79	0.30 ± 0.03
Yağ	33.86 ± 1.44	115.28 ± 14.16	0.30 ± 0.03
Protein	35.75 ± 1.60^b	129.17 ± 11.71^{a,b}	0.28 ± 0.01

a: kontrole göre farklı, b: karbonhidrata göre farklı. Tersiyet oosit: tersiyer folikül evresindeki oositi ifade etmektedir.

Preovulatuvar evre oosit ve folikül çapları karşılaştırıldığında preovulatuvar oosit çapı karbonhidrat ve yağ gruplarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede ($p<0.05$) düşük bulundu. Diğer gruplar arasında oosit ve folikül çapları ve oranları açısından istatistiksel fark bulunmadı (Tablo 4.14).

Tablo 4.14: Preovulatuvar oosit ve folikül çap ölçüm karşılaştırmaları

GRUP	Preovulatuvar Oosit	Preovulatuvar Folikül	PRO/PRF
Kontrol	42.28 ± 1.76	300.08 ± 34.08	0.14 ± 0.1
Karbonhidrat	37.65 ± 1.31^a	264.88 ± 14.48	0.14 ± 0.1
Yağ	39.25 ± 1.85^a	275.66 ± 29.04	0.14 ± 0.1
Protein	40.06 ± 2.13	300.86 ± 36.28	0.13 ± 0.1

a: kontrole göre düşük. Preovulatuvar oosit: preovulatuvar folikül evresindeki oositi ifade etmektedir.

Tersiyer evredeki foliküllerde yapılan zona pellusida kalınlık ölçümlerine göre göre gruplar arası fark bulunmadı ($p<0.05$) (Tablo 4.15).

Tablo 4.15: Zona pellusida kalınlığı karşılaştırması

Parametre	Grup	N	Median	Minimum	Maximum	p
ZP Kalınlığı	Kontrol	10	2.95	1.05	4.1	0.688
	Karbonhidrat	10	2.71	1.41	4	
	Yağ	10	3.01	2.5	4.19	
	Protein	10	3.34	2.12	4.87	

4.2.3. Histopatolojik hasar skorları

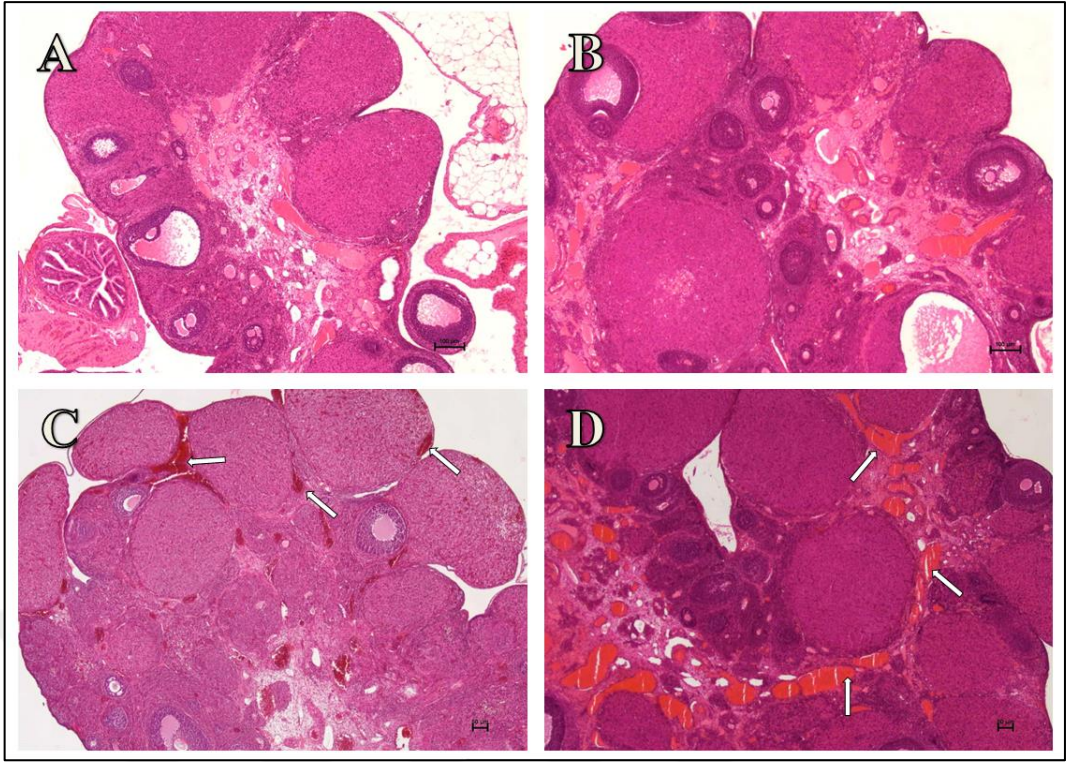
Histopatolojik olarak ovaryumların stromal doku alanlarında ve korpus luteumlarında konjesyon ve inflamasyon bulguları skorlandı.

Stromal dokuda konjesyon açısından yağ ve protein grupları kontrol grubuna kıyasla anlamlı derecede yüksek bulundu (Tablo 4.16) (Şekil 4.15, 4.16). Stromal doku inflamasyon değerlendirmesinde gruplar arası fark bulunmadı (Tablo 4.16) (Şekil 4.17, 4.18).

Tablo 4.16: Stromal doku histopatolojik skorlamalar

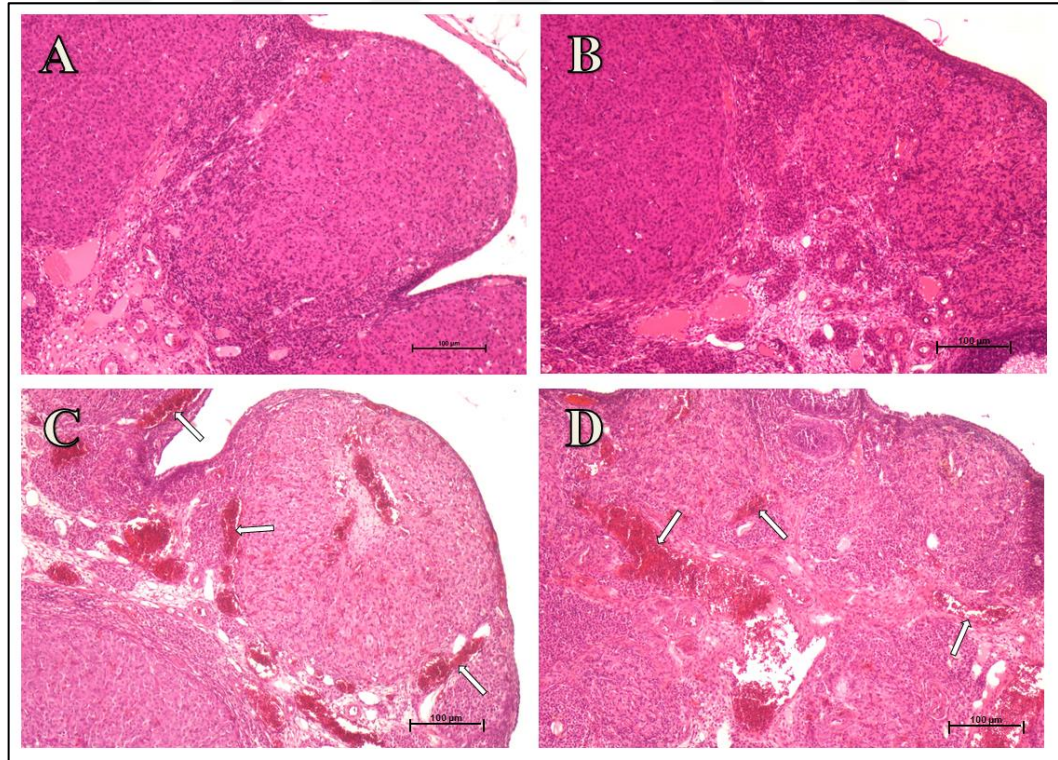
Parametre	Grup	N	Median	Minimum	Maximum	p
ST Konjesyon	Kontrol	7	0.07 ^a	.00	.33	0.006
	Karbonhidrat	7	0.27 ^{a,c}	.13	.67	
	Yağ	7	0.67 ^b	.27	1.36	
	Protein	7	0.60 ^{b,c}	.13	.80	
ST İnflamasyon	Kontrol	7	0.47	.13	.60	0.055
	Karbonhidrat	7	0.73	.40	1.33	
	Yağ	7	0.80	.40	1.27	
	Protein	7	0.93	.27	1.67	

*Aynı harfler benzerliği, farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.



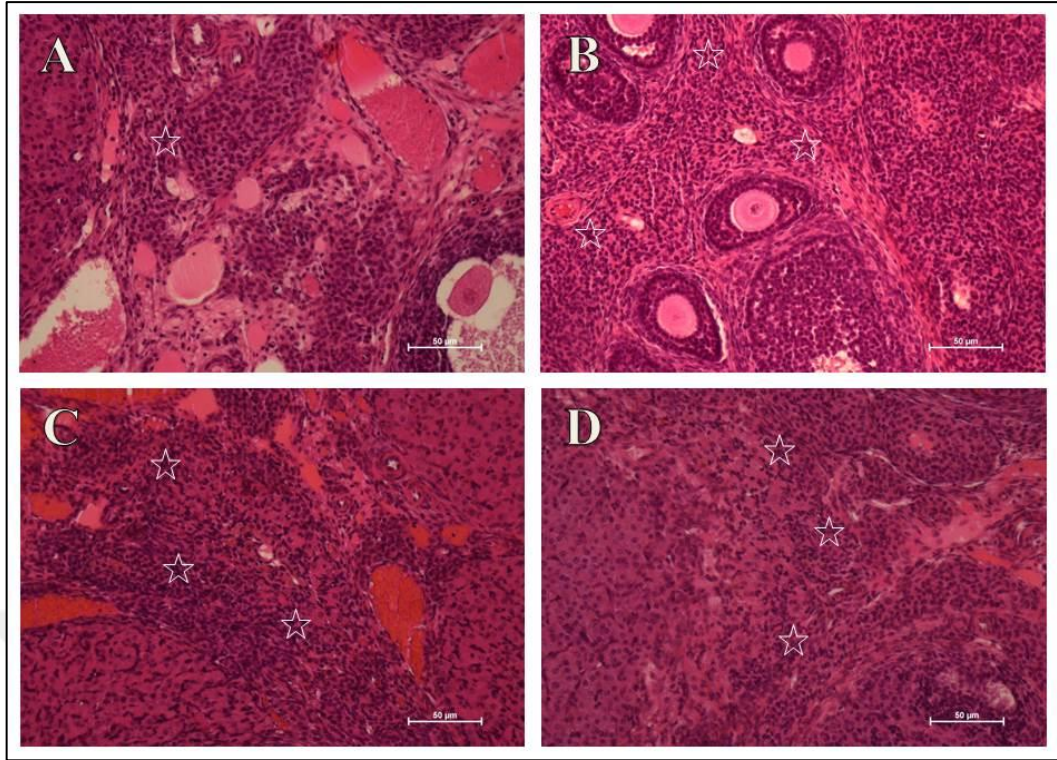
Şekil 4.15: Stromal doku konjesyonu

A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. Beyaz ok: konjesyon alanları. HE, 4x.



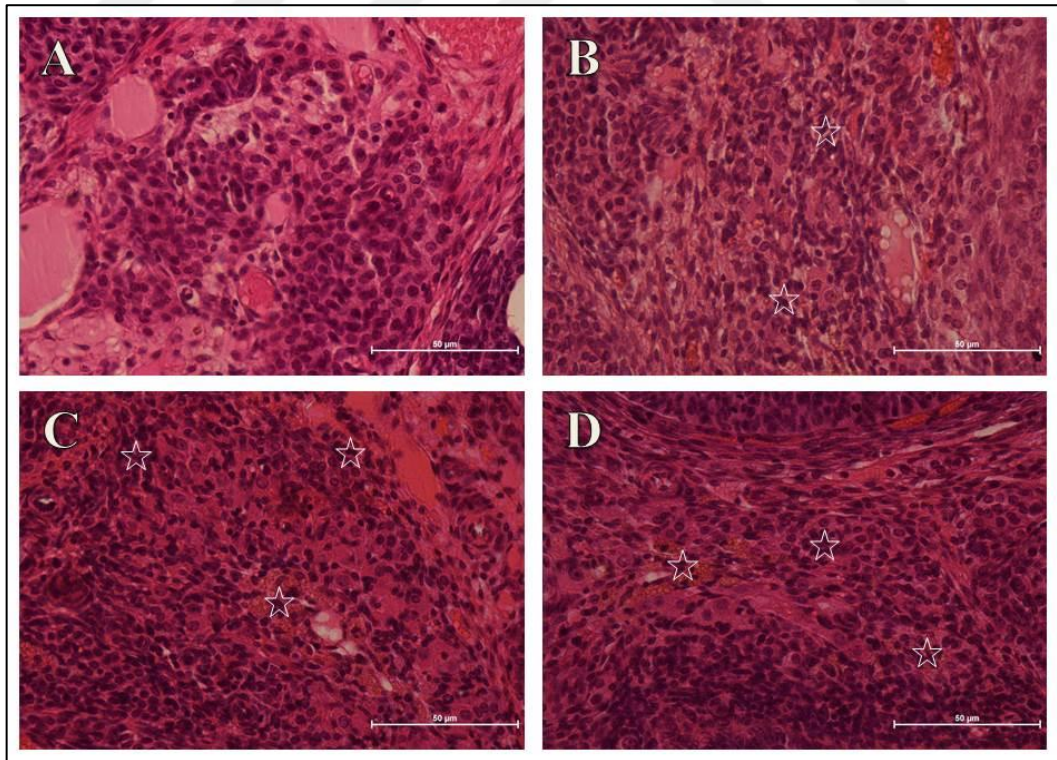
Şekil 4.16: Stromal doku konjesyonu

A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. Beyaz ok: konjesyon alanları. HE, 20x.



Şekil 4.17: Stromal doku inflamasyonu

A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. Yıldız: inflamasyon alanları. HE, 20x.



Şekil 4.18: Stromal doku inflamasyonu

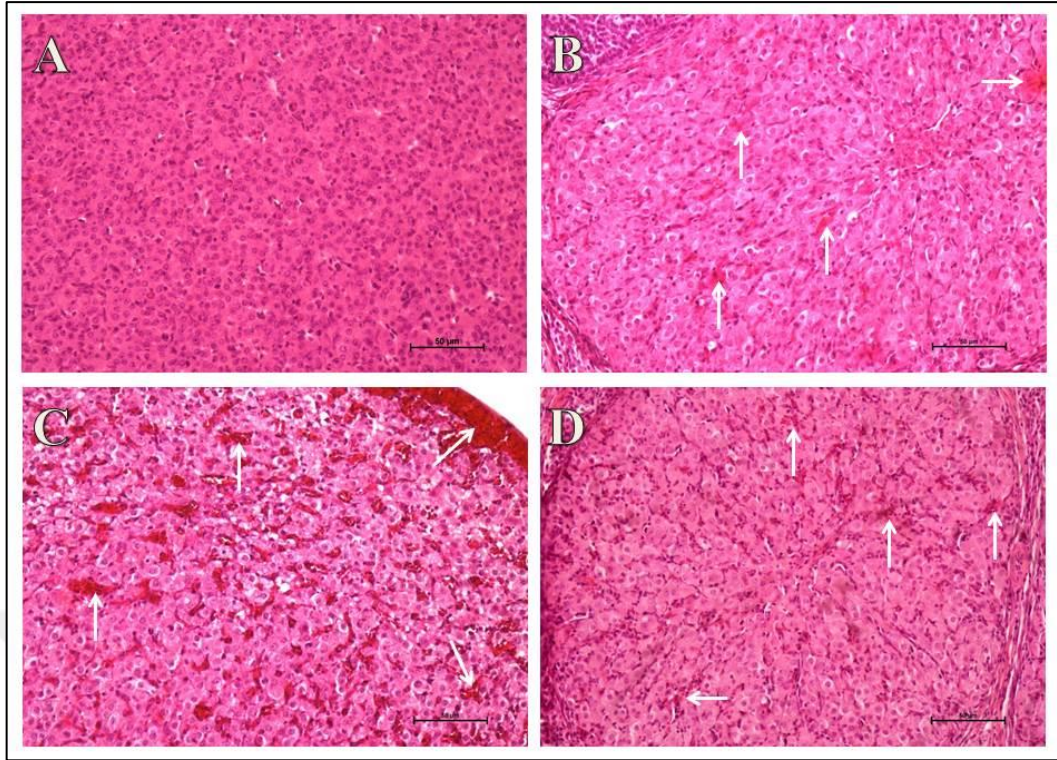
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. Yıldız: inflamasyon alanları. HE, 40x.

Korpus luteum değerlendirmesinde hem konjesyon (Şekil 4.19, 4.20) hem de inflamasyon (Şekil 4.21, 4.22) skorlamaları açısından karbonhidrat, yağ ve protein grupları kontrole kıyasla anlamlı derecede yüksek ve birbirlerine benzer bulundu. (Tablo 4.17).

Tablo 4.17: Korpus luteum histopatolojik skorlamalar

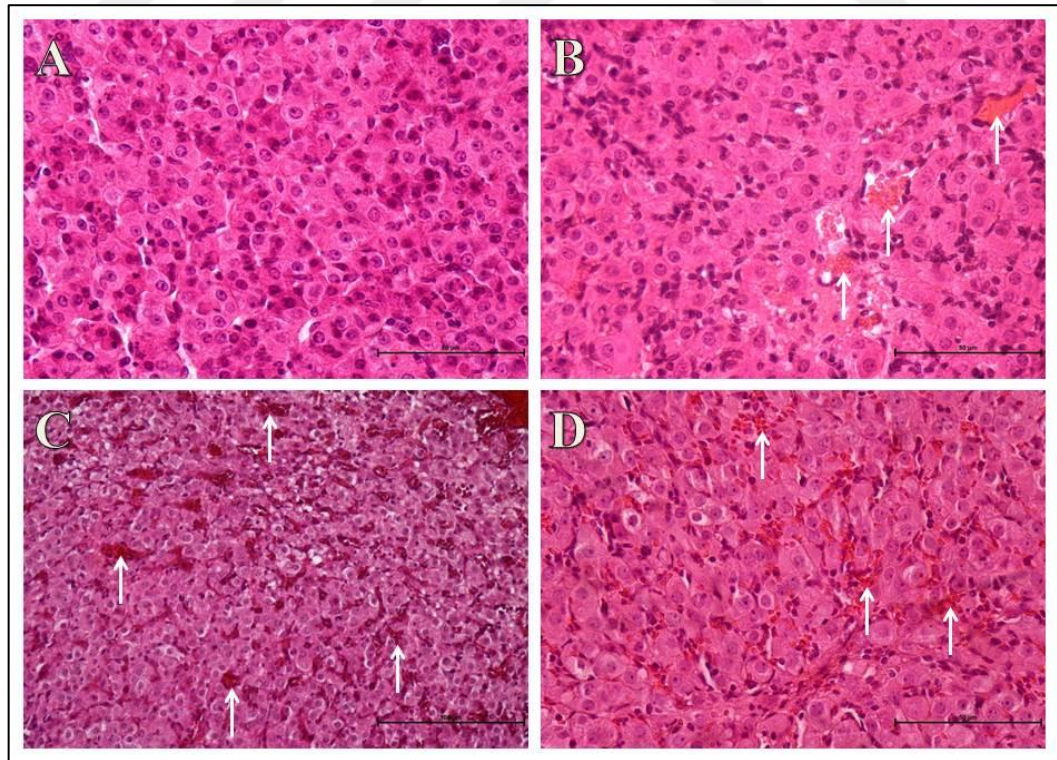
Parametre	Grup	N	Median	Minimum	Maximum	p
KL Konjesyon	Kontrol	7	0.07 ^a	.00	.33	0.003
	Karbonhidrat	7	0.40 ^b	.07	.87	
	Yağ	7	0.80 ^b	.27	2.80	
	Protein	7	1.00 ^b	.20	2.80	
KL İnflamasyon	Kontrol	7	0.27 ^a	.07	.47	0.007
	Karbonhidrat	7	0.80 ^b	.33	1.20	
	Yağ	7	0.60 ^b	.20	1.07	
	Protein	7	0.93 ^b	.53	1.80	

*Aynı harfler benzerliği, farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.



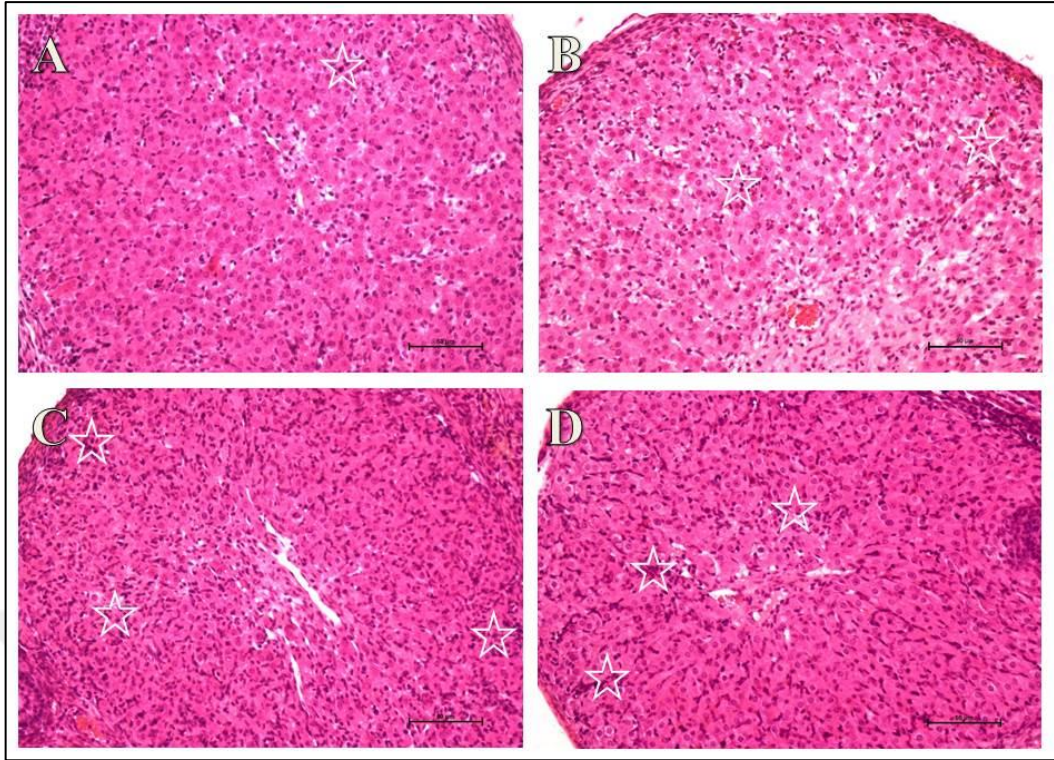
Şekil 4.19: Korpus luteumda konjesyon

A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. Beyaz ok: konjesyon alanları. HE, 20x.



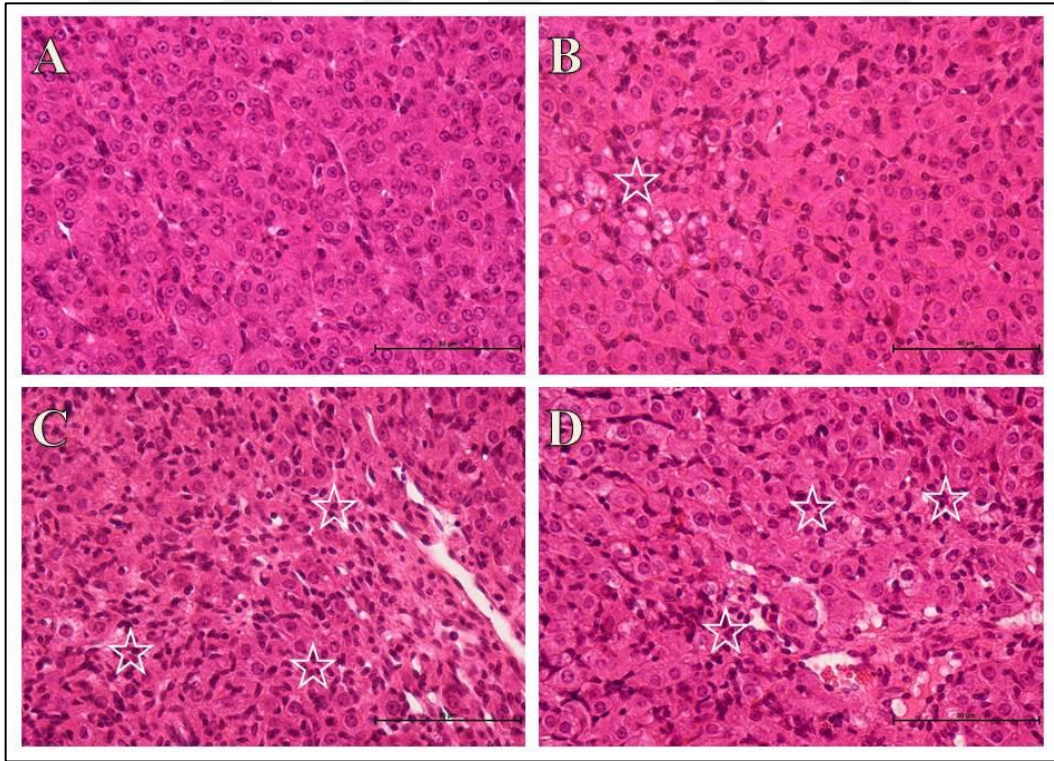
Şekil 4.20: Korpus luteumda konjesyon

A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. Beyaz ok: konjesyon alanları. HE, 40x.



Şekil 4.21: Korpus luteum inflamasyonu

A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. Yıldız: inflamasyon alanları. HE, 20x.



Şekil 4.22: Korpus luteum inflamasyonu

A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. Yıldız: inflamasyon alanları. HE, 40x.

4.2.4. İmmünohistokimyasal ve İmmunoflorasan Bulgular

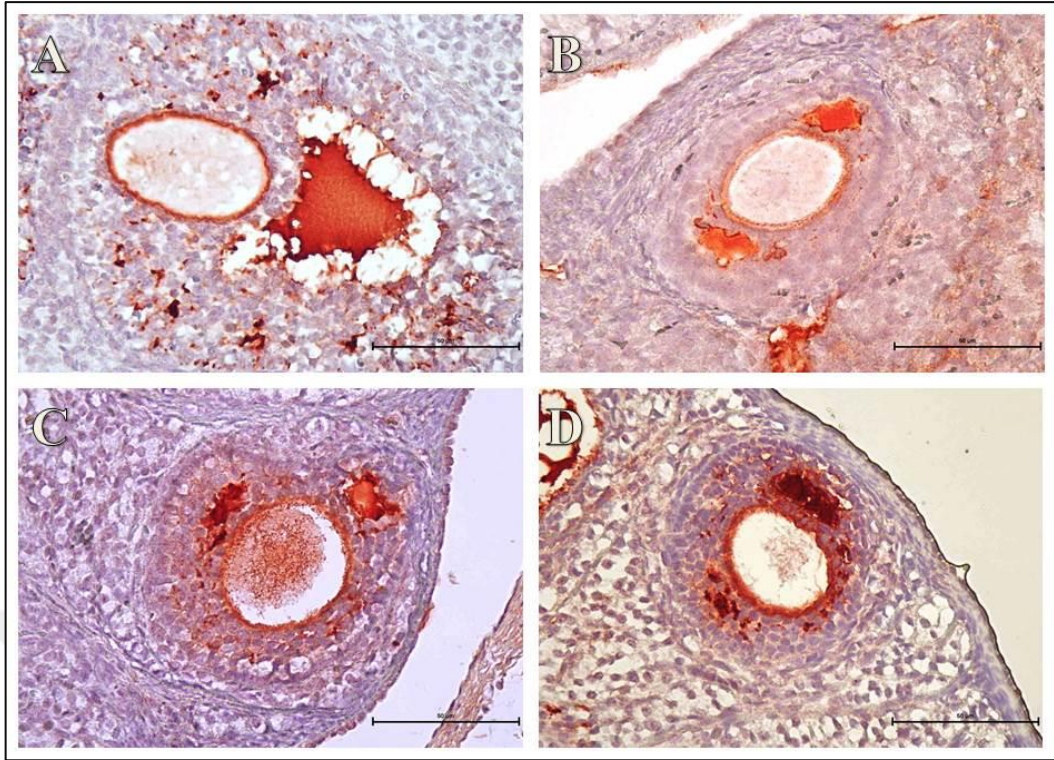
İmmünohistokimyasal olarak Zp1, Zp2, Zp3, BMP15, GDF9, Foxo3a, GAS2 ve Caspase 3 proteinleri, immünoflorasan olarak da Zp2 ve Zp3 proteinleri çalışılarak tüm proteinler için immünreaktivite düzeyleri skorlandı.

Zp1 skorlamasına göre gruplar arası anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 4.18) (Şekil 4.23, 4.24). Zp2 skorlamasına göre karbonhidrat grubu diğer gruplara göre anlamlı derecede ($p<0.05$) düşük iken yağ, protein ve kontrol grupları arasında fark görülmedi (Tablo 4.18) (Şekil 4.25, 4.26, 4.27, 4.28). Zp3 ekspresyonu açısından ise protein grubu kontrole göre anlamlı derecede ($p<0.05$) yüksek iken diğer gruplar arasında fark bulunmadı (Tablo 4.18) (Şekil 4.29, 4.30, 4.31, 4.32). Zp1, Zp2, Zp3 toplam skorlamasına bakıldığında ise, karbonhidrat grubu kontrole göre anlamlı derecede düşük ($p<0.05$) bulunurken yağ ve protein grupları birbirine ve kontrol grubuna benzer düzeyde tespit edildi.

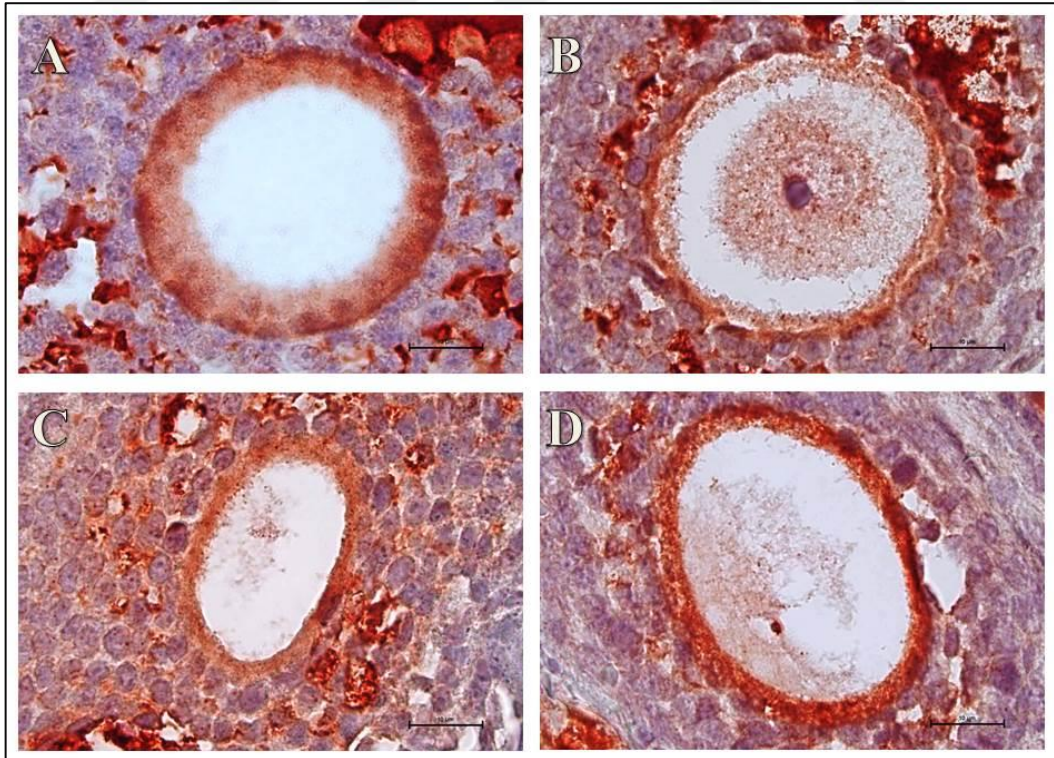
Tablo 4.18: ZP1, ZP2, Zp3 IHC skorlamaları

Parametre	Grup	N	Median	Minimum	Maximum	p
ZP1	Kontrol	4	2.05	1.95	2.33	0.111
	Karbonhidrat	4	1.77	1.33	1.86	
	Yağ	4	2.21	1.82	2.80	
	Protein	4	2.24	1.83	2.38	
ZP2	Kontrol	4	1.94 ^a	1.53	2.50	0.038
	Karbonhidrat	4	1.36 ^b	.63	1.56	
	Yağ	4	2.02 ^a	1.90	2.22	
	Protein	4	2.26 ^a	1.79	2.44	
ZP3	Kontrol	4	2.19 ^{a,b}	1.60	2.43	0.023
	Karbonhidrat	4	1.69 ^a	1.50	1.75	
	Yağ	4	2.21 ^{b,c}	2.13	2.50	
	Protein	4	2.53 ^c	2.17	2.80	
Toplam	Kontrol	4	6.15 ^a	5.13	7.26	0.017
	Karbonhidrat	4	4.83 ^b	3.69	4.92	
	Yağ	4	6.47 ^a	6.22	7.10	
	Protein	4	6.89 ^a	6.33	7.37	

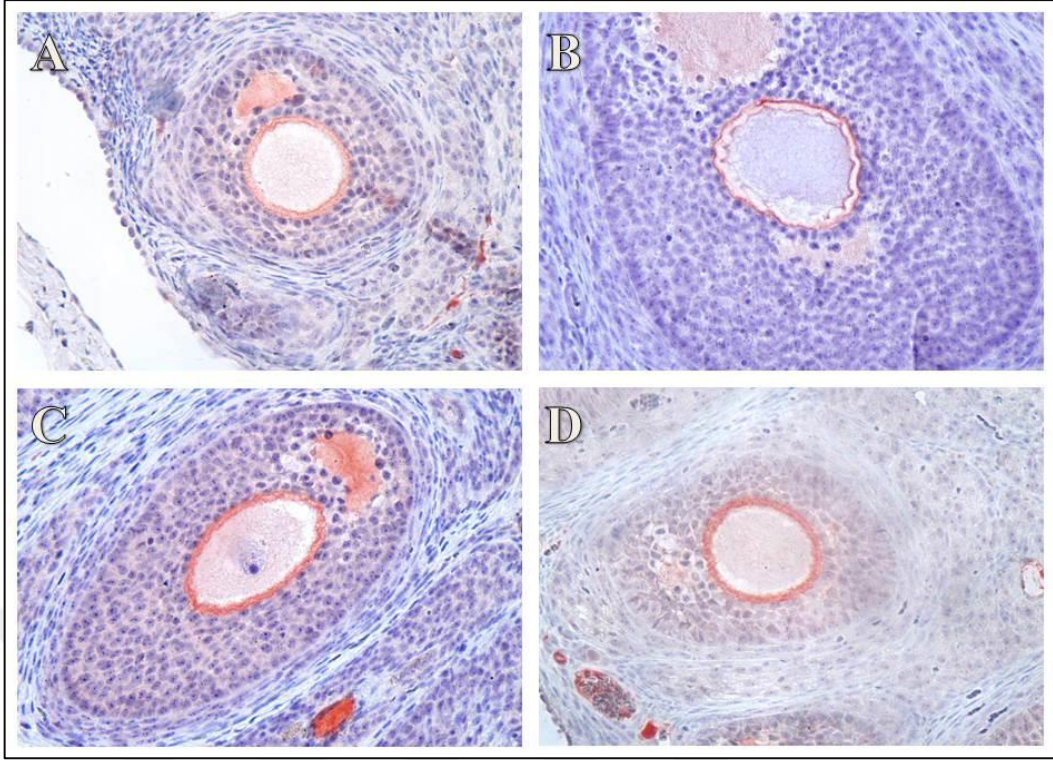
*Aynı harfler benzerliği, farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.



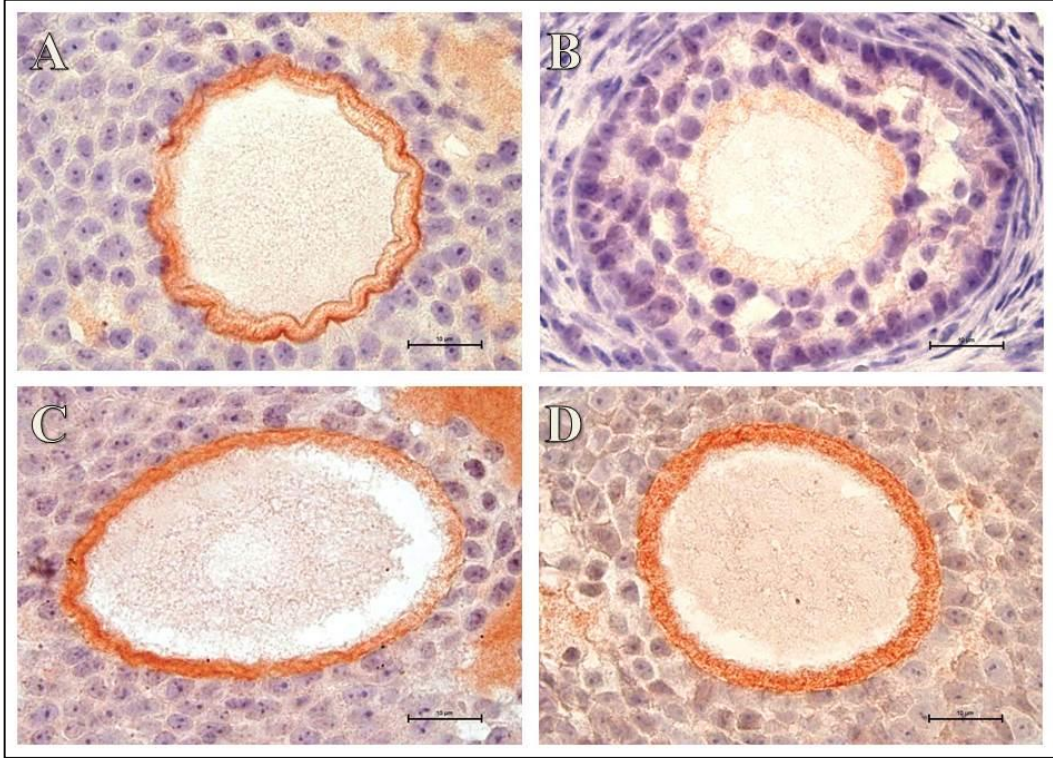
Şekil 4.23: Zona Pellusida 1 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 40x.



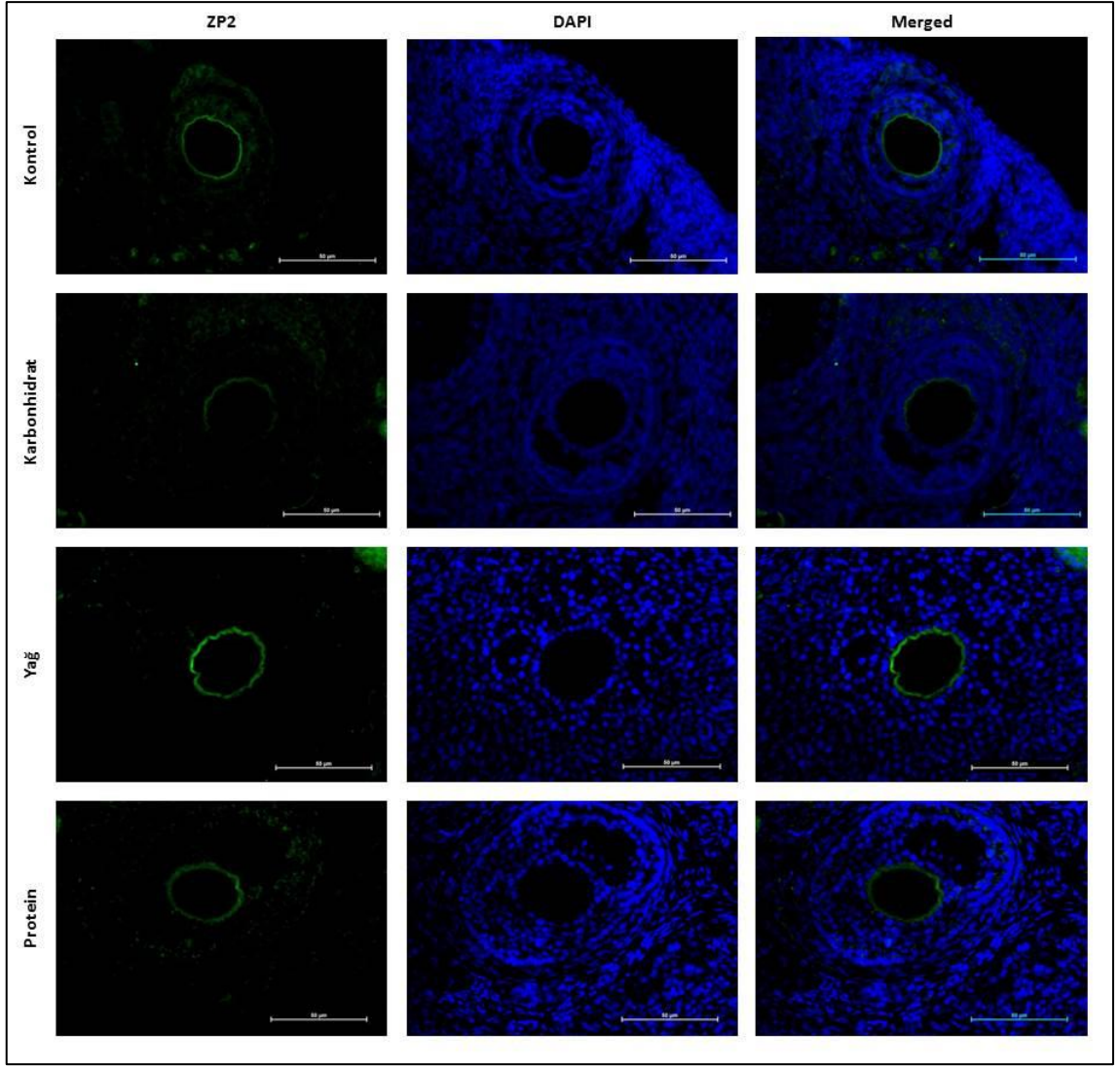
Şekil 4.24: Zona Pellusida 1 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 100x.



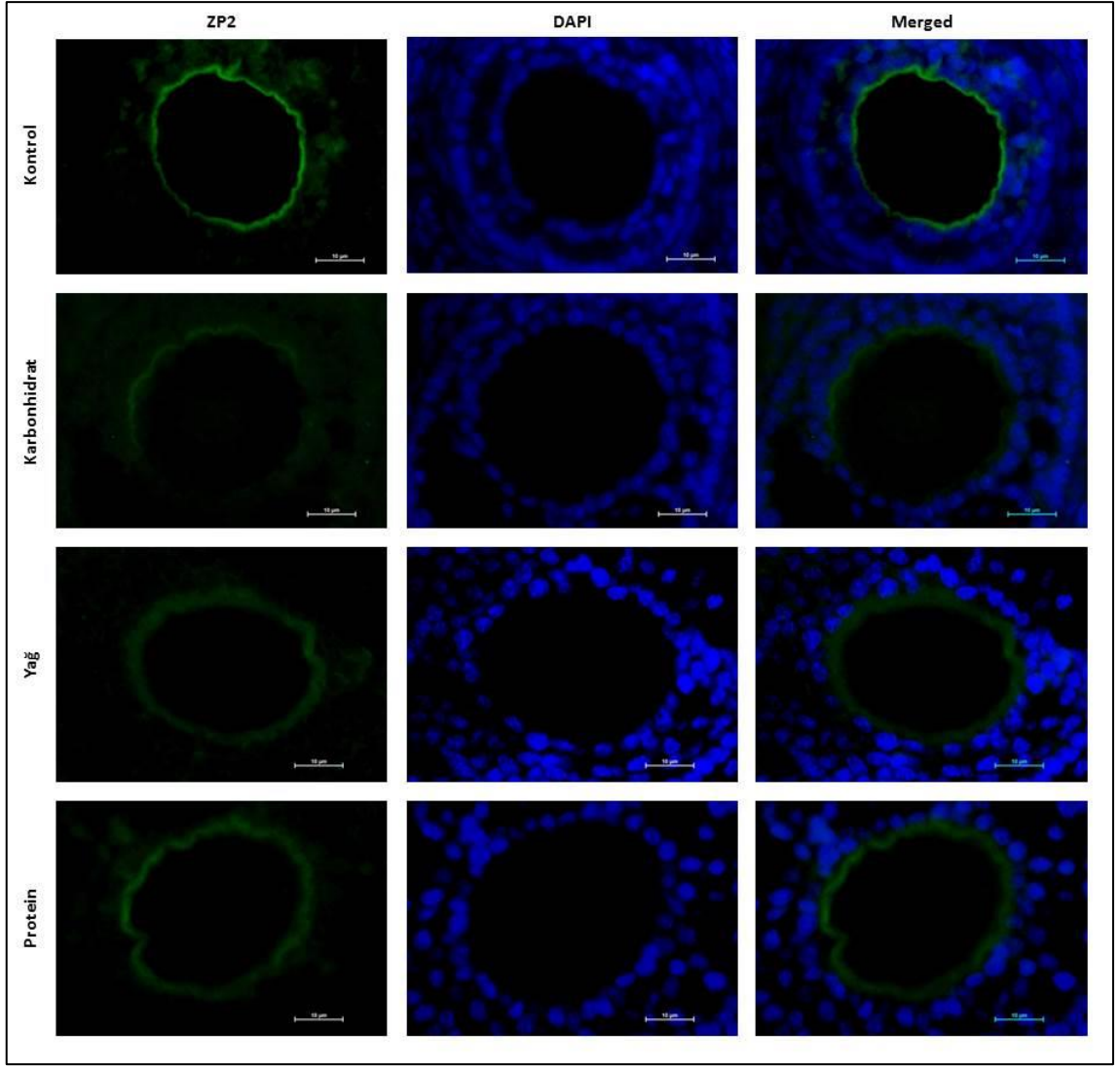
Şekil 4.25: Zona Pellusida 2 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 40x.



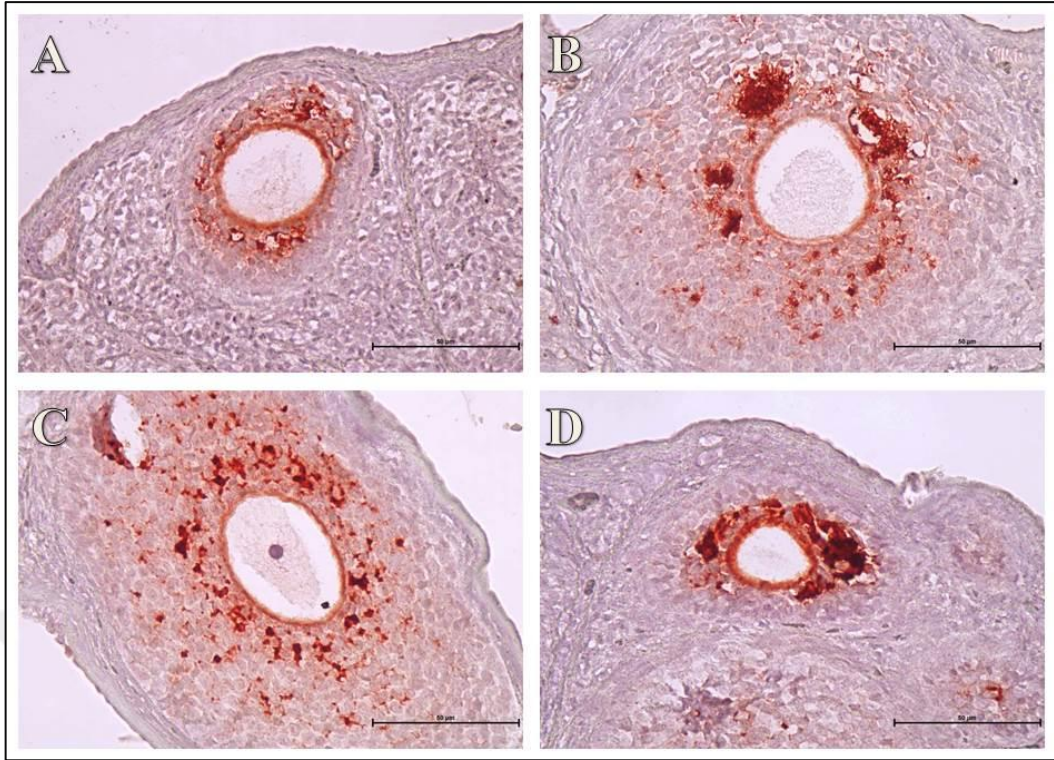
Şekil 4.26: Zona Pellusida 2 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 100x.



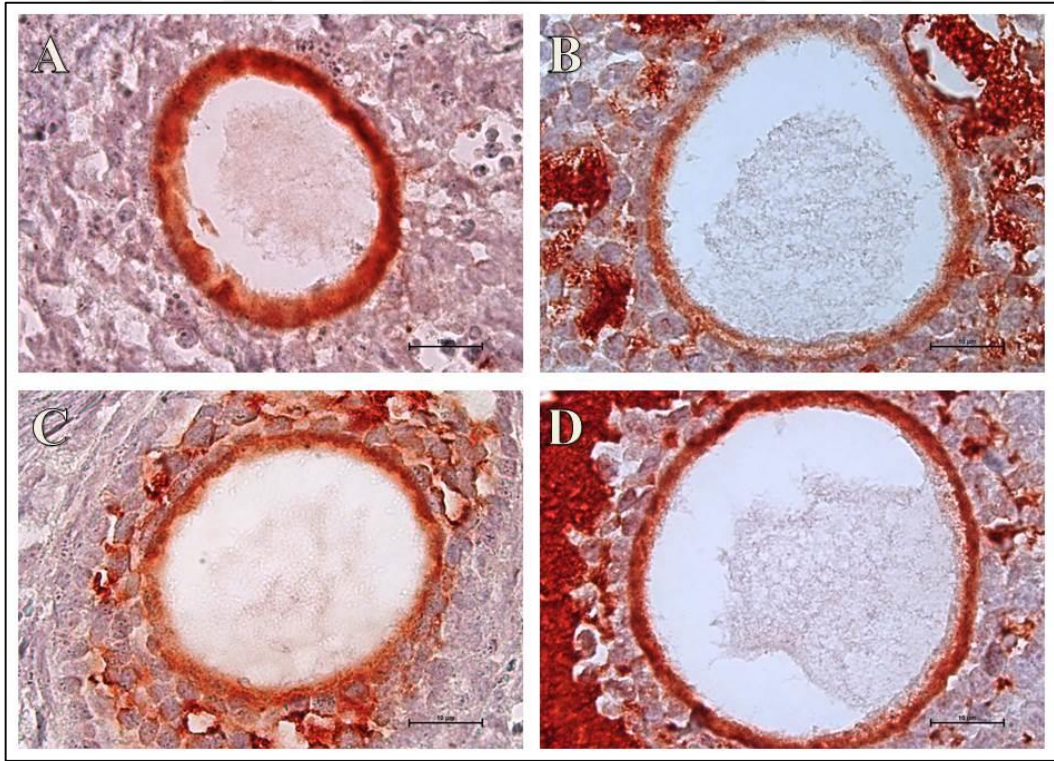
Şekil 4.27: Zona Pellusida 2 ekspresyonu
IF, 40x.



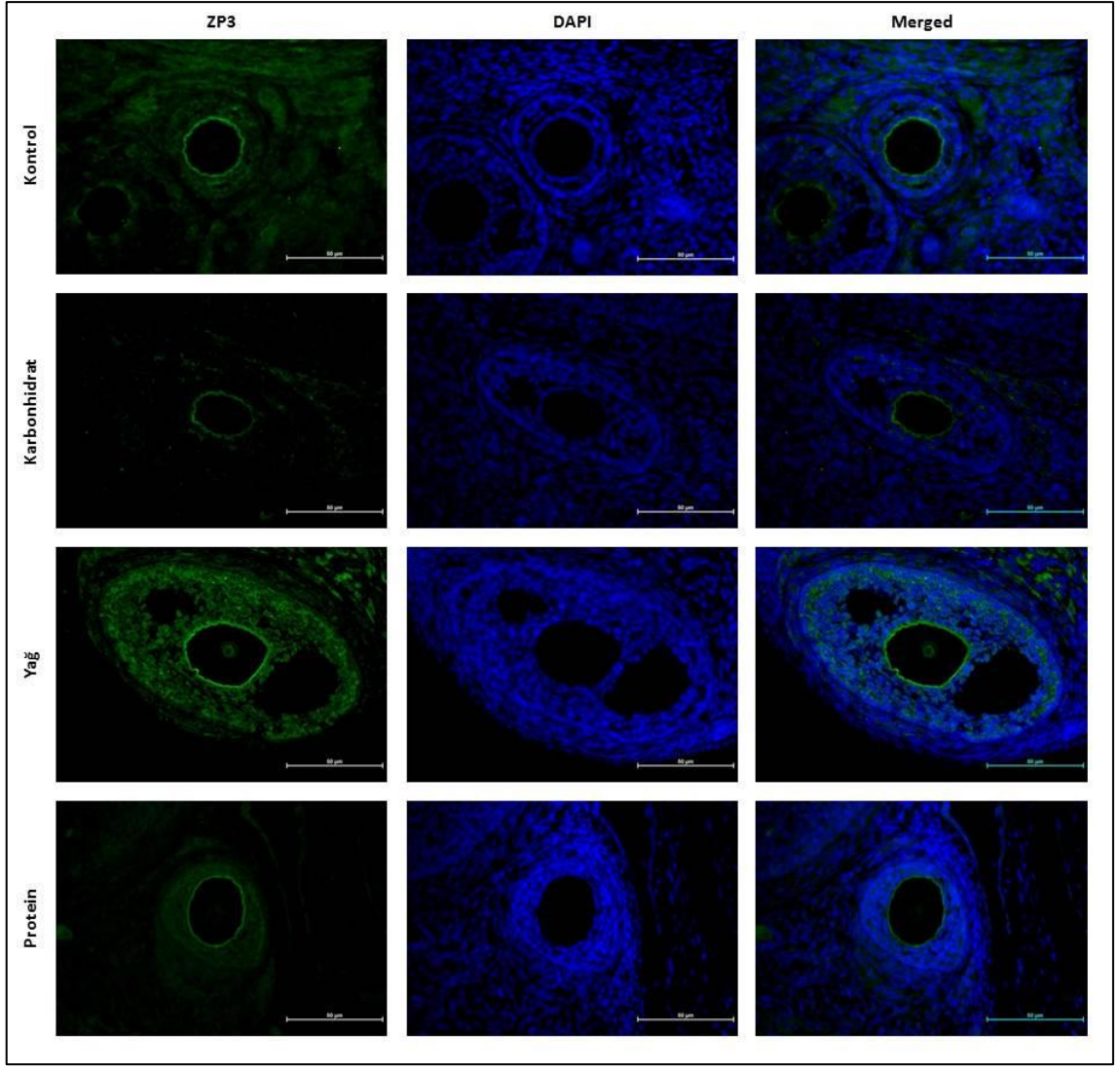
Şekil 4.28: Zona Pellusida 2 ekspresyonu
IF, 100x.



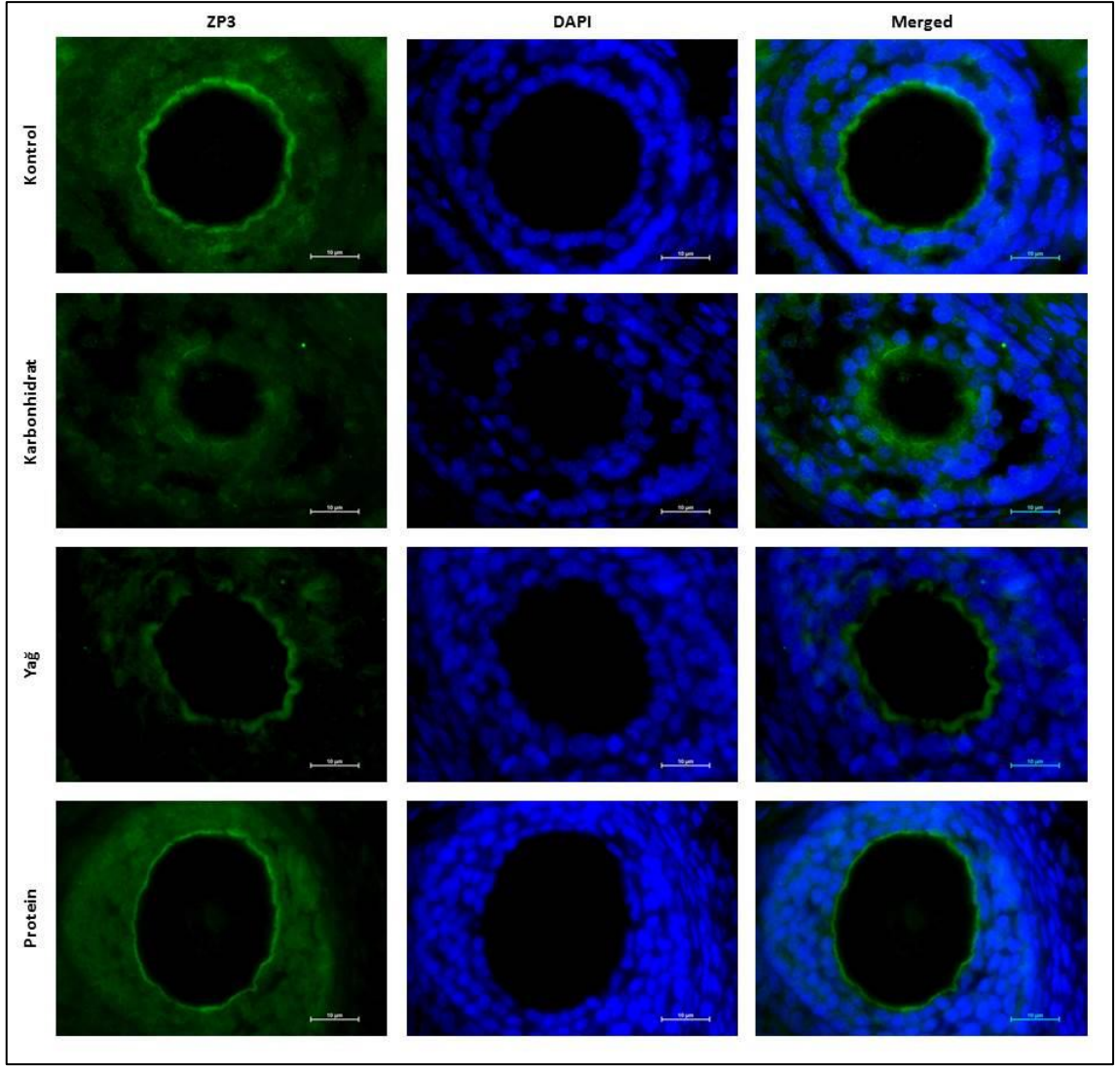
Şekil 4.29: Zona Pellusida 3 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 40x.



Şekil 4.30: Zona Pellusida 3 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 100x.



Şekil 4.31: Zona Pellusida 3 ekspresyon
IF, 40x.



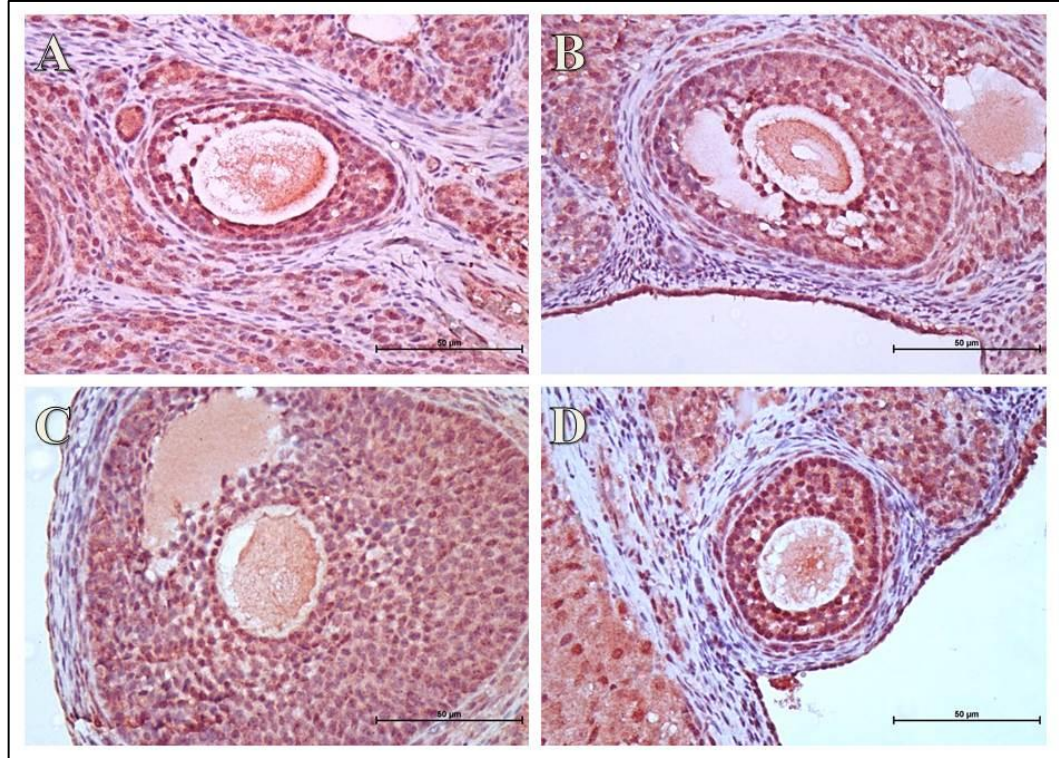
Şekil 4.32: Zona Pellusida 3 ekspresyonu
IF, 100x.

BMP15 ve GDF9 ekspresyon seviyeleri immünohistokimyasal olarak skorlandırıldığında, BMP15 ekspresyonu açısından gruplar arası fark bulunmazken (Tablo 4.19) (Şekil 4.33, 4.34), GDF9 ekspresyonu protein ve kontrol grubunda benzer olup karbonhidrat ve yağ grupları kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Tablo 4.19) (Şekil 4.35, 4.36)

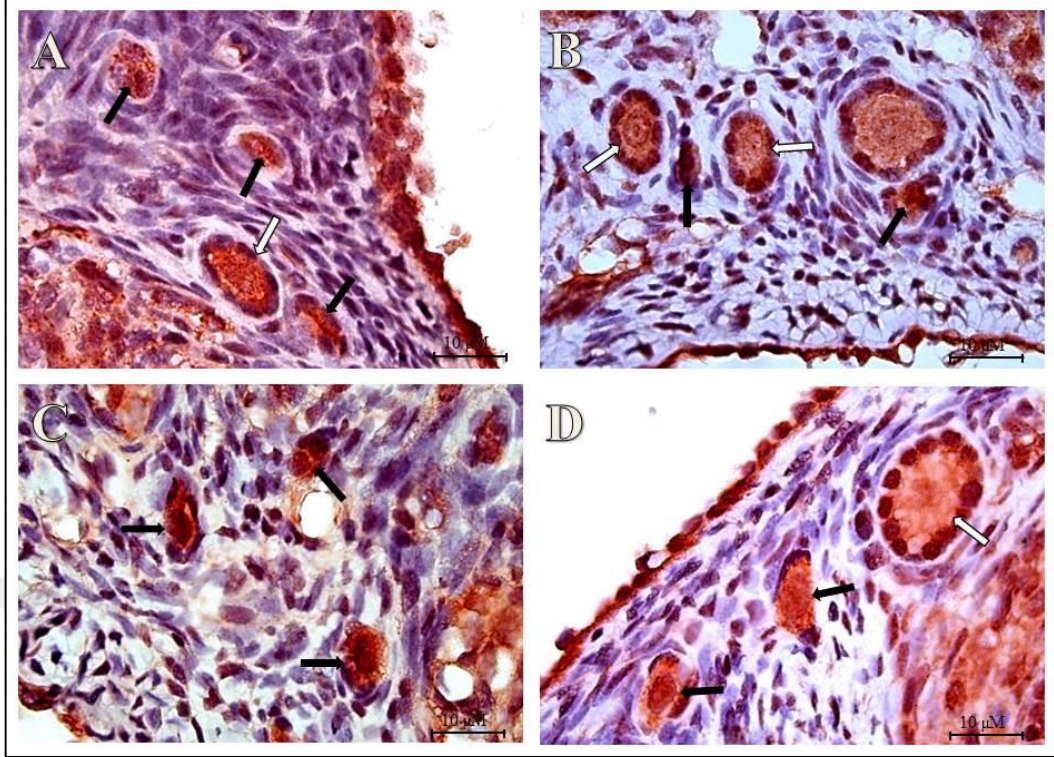
Tablo 4.19: BMP15 ve GDF9 IHC skorları

Parametre	Grup	N	Median	Minimum	Maximum	p
BMP15	Kontrol	4	2.6	2.1	2.75	0.401
	Karbonhidrat	4	2.65	2.3	2.7	
	Yağ	4	2.4	1.7	2.8	
	Protein	4	2.7	2.7	2.8	
GDF9	Kontrol	4	2.4 ^a	2.4	2.5	0.006
	Karbonhidrat	4	2.6 ^b	2.5	2.6	
	Yağ	4	2.7 ^c	2.6	2.8	
	Protein	4	2.35 ^a	2.25	2.5	

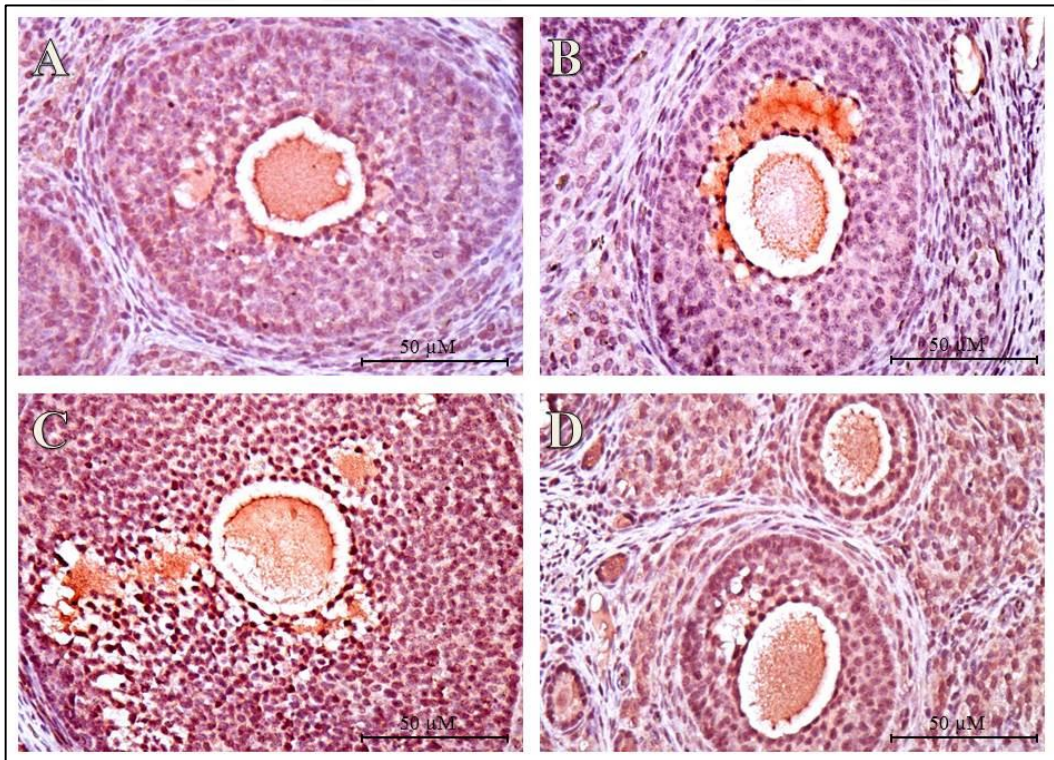
*Aynı harfler benzerliği, farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.



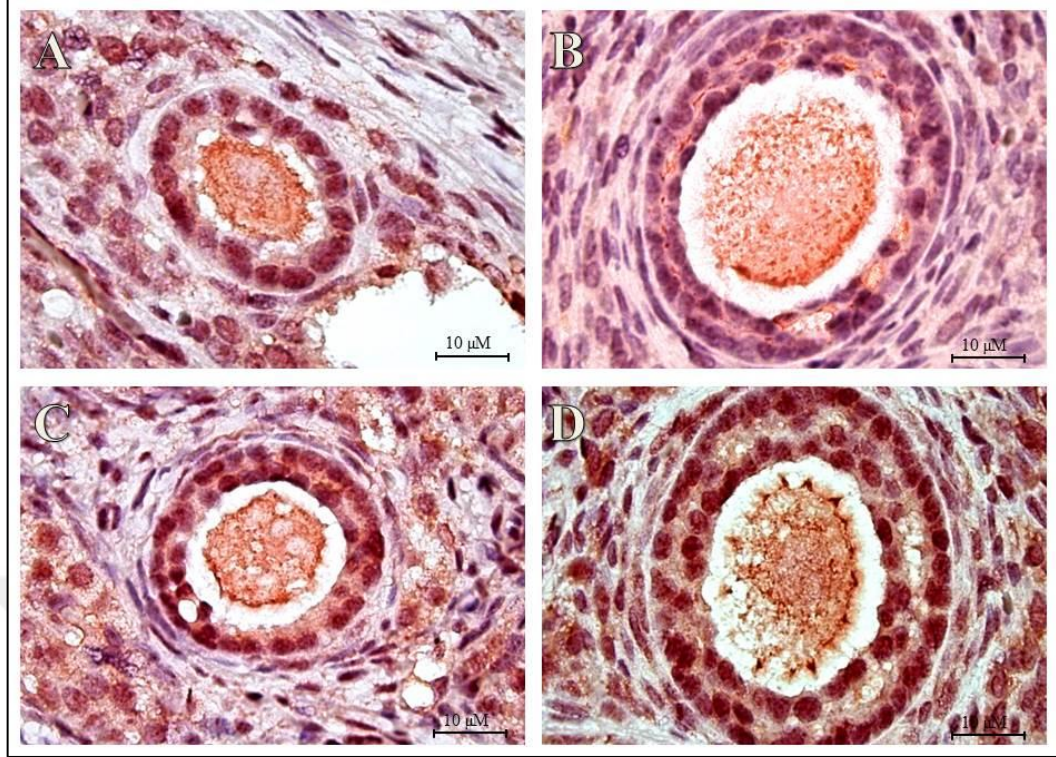
Şekil 4.33: BMP15 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 40x.



Şekil 4.34: BMP15 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 100x.



Şekil 4.35: GDF9 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 40x.

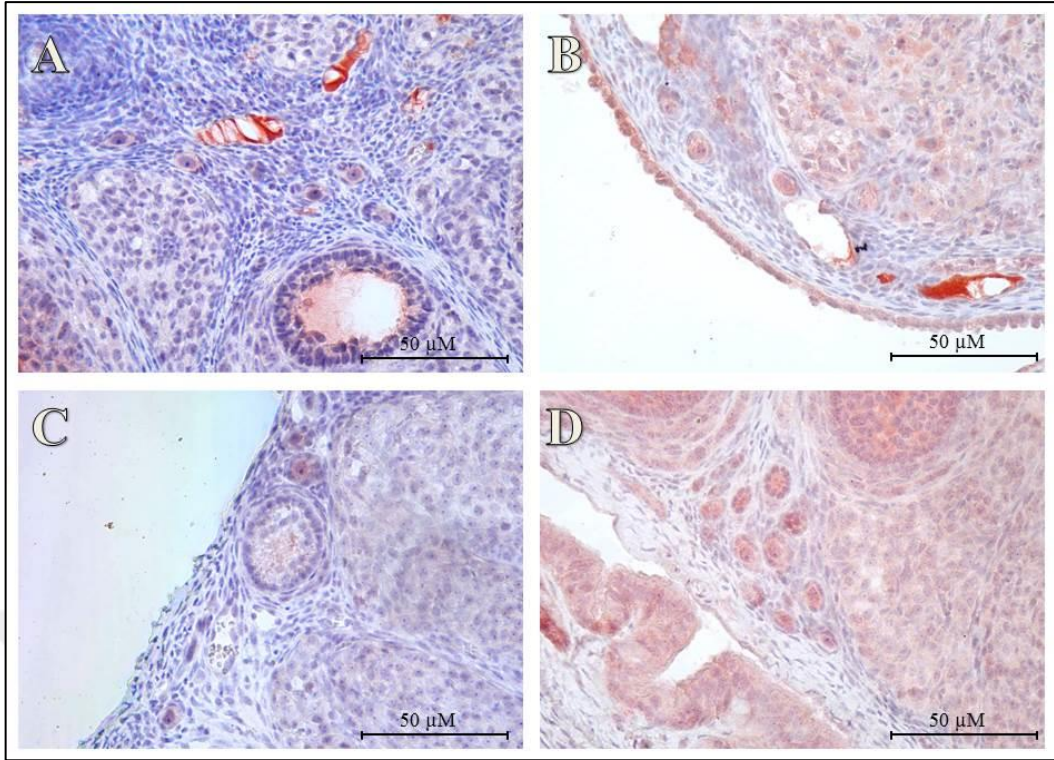


Şekil 4.36: GDF9 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 100x.

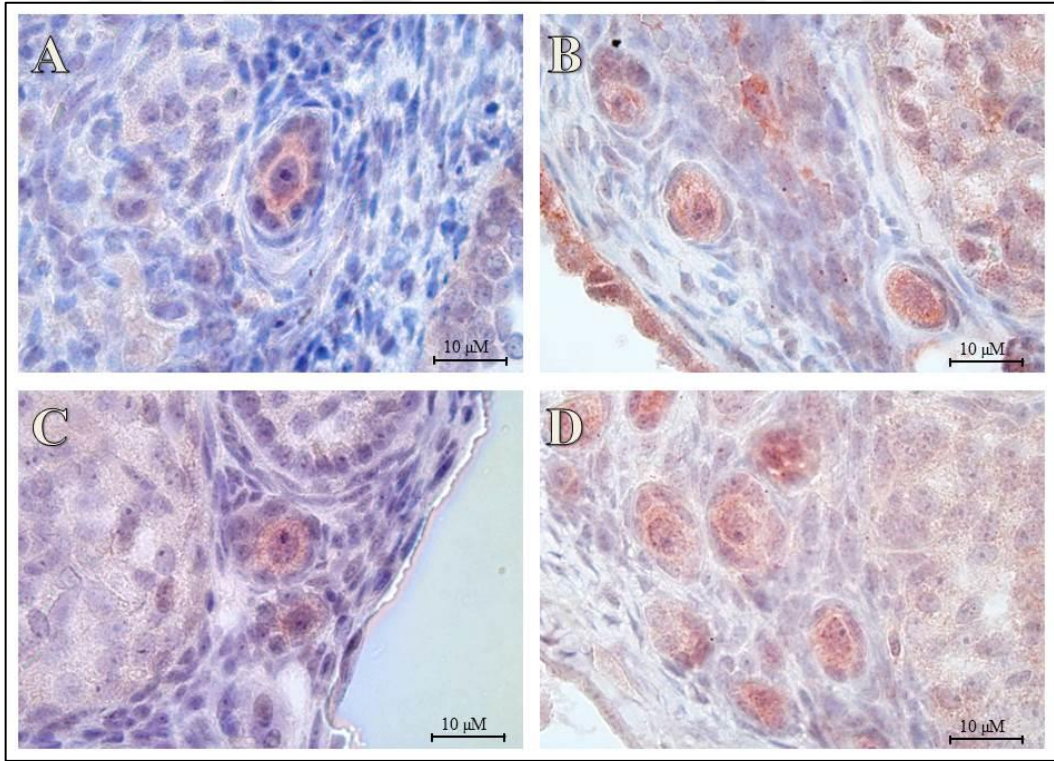
Foxo3a+ (pozitif) olan primordiyal foliküllerin yüzdeleri karşılaştırıldığında, özellikle karbonhidrat ve yağ gruplarında kontrole göre azalma olmakla birlikte istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.20) (Şekil 4.37, 4.38).

Tablo 4.20: Foxo3a IHC skorlamaları

Parametre	Grup	N	Median	Minimum	Maximum	p
Foxo3a+ Primordiyal Folikül (%)	Kontrol	4	75	65	100	0.3
	Karbonhidrat	4	50.5	33	91	
	Yağ	4	56	17	83	
	Protein	4	74	67	78	



Şekil 4.37: Foxo3a ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 40x.



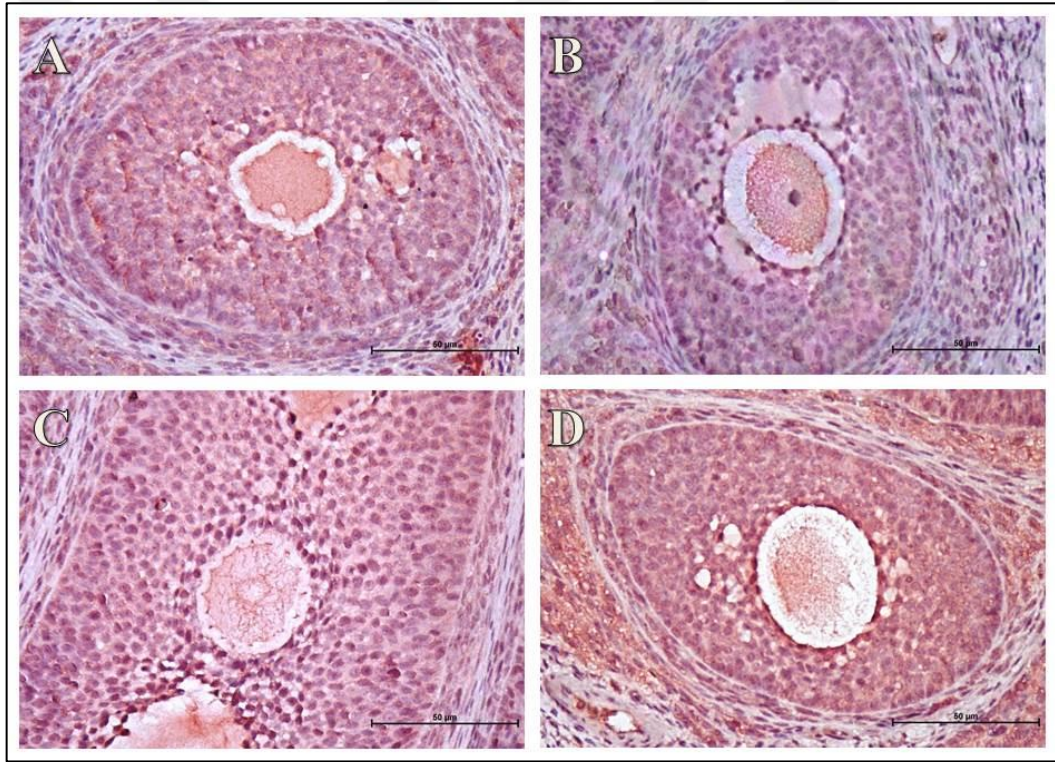
Şekil 4.38: Foxo3a ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 100x.

GAS2 protein ekspresyonu immünohistokimyasal değerlendirmede karbonhidrat grubu kontrole benzer bulunurken, yağ ve protein grupları kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p < 0.05$) düşük bulundu (Tablo 4.21.) (Şekil 4.39, 4.40).

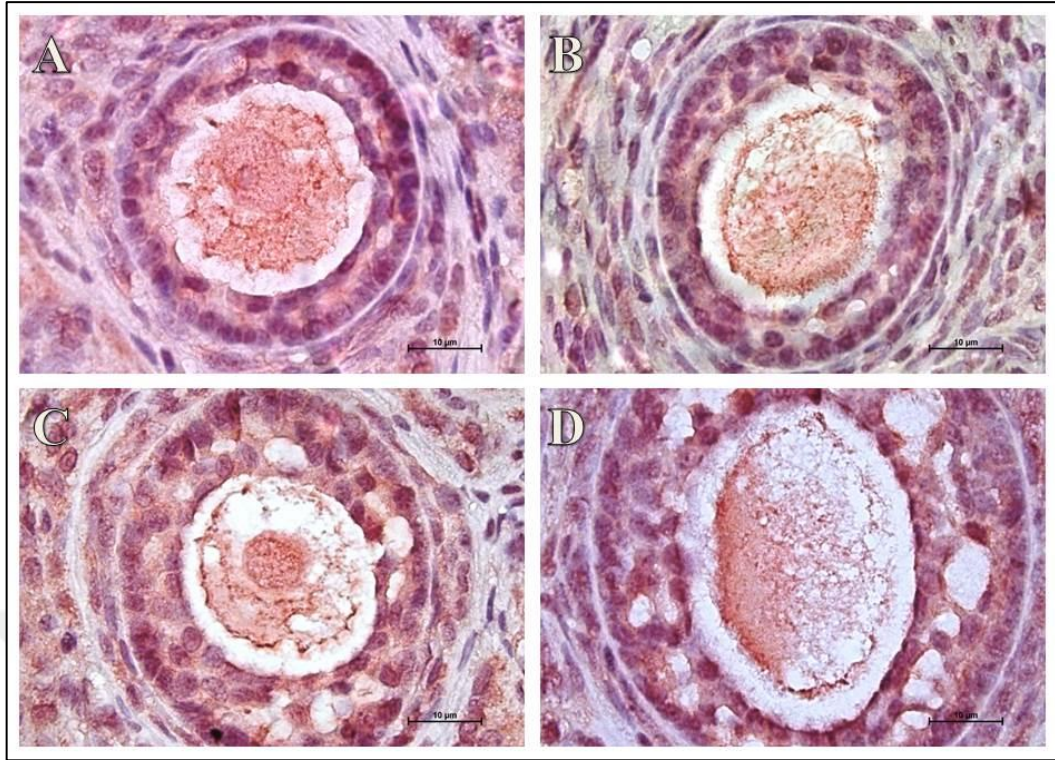
Tablo 4.21: GAS2 IHC skorlamaları

Parametre	Grup	N	Median	Minimum	Maximum	p
GAS2	Kontrol	4	2.46 ^a	2.2	2.67	0.040
	Karbonhidrat	4	2.43 ^a	2.33	2.62	
	Yağ	4	2.17 ^b	1.71	2.71	
	Protein	4	1.78 ^b	1.5	2.07	

*Aynı harfler benzerliği, farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.



Şekil 4.39: GAS2 ekspresyonu
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 40x.



Şekil 4.40: GAS2 ekspresyonu

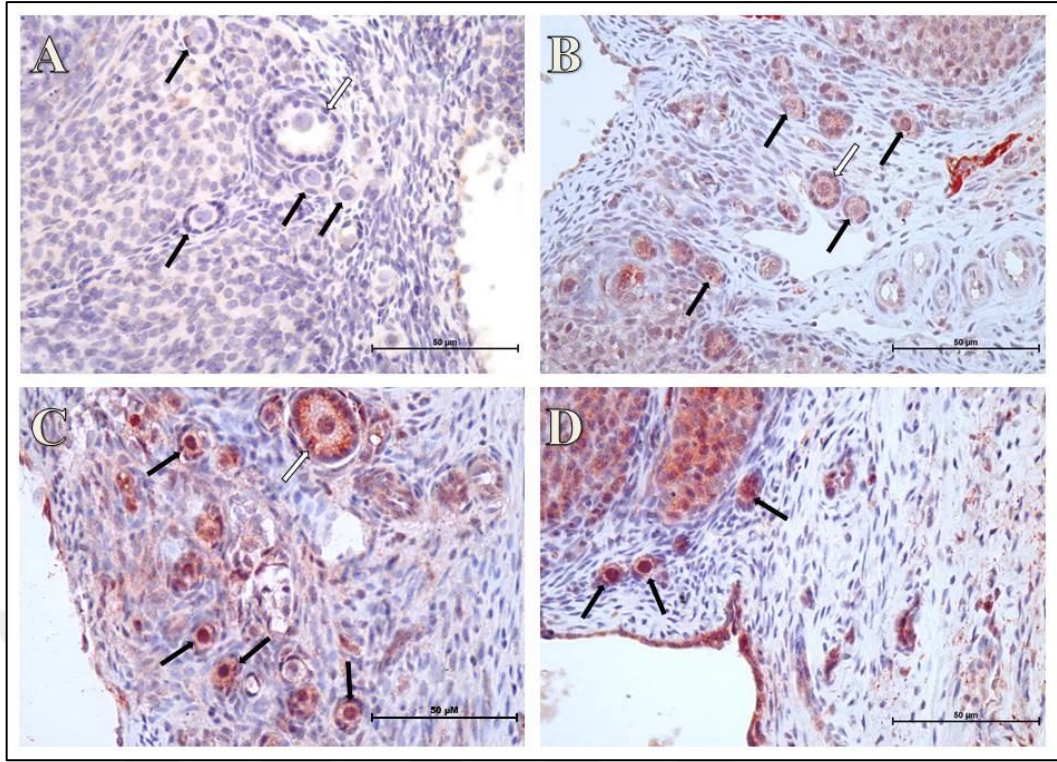
A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 100x.

Caspase 3 immünreaktivitesi oositlerde ve folikül hücrelerinde ayrı ayrı skorlandı. Oosit caspase 3 immünreaktivitesinin değerlendirmesinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Folikül hücreleri caspase 3 immünreaktiviteşiddeti ise karbonhidrat ve yağ gruplarında kontrol grubuna göre anlamlı derecede ($p<0.05$) yüksek bulunurken, protein grubunda kontrole göre yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi (Tablo 4.22) (Şekil 4.41, 4.42).

Tablo 4. 22: Caspase 3 IHC skorlamaları

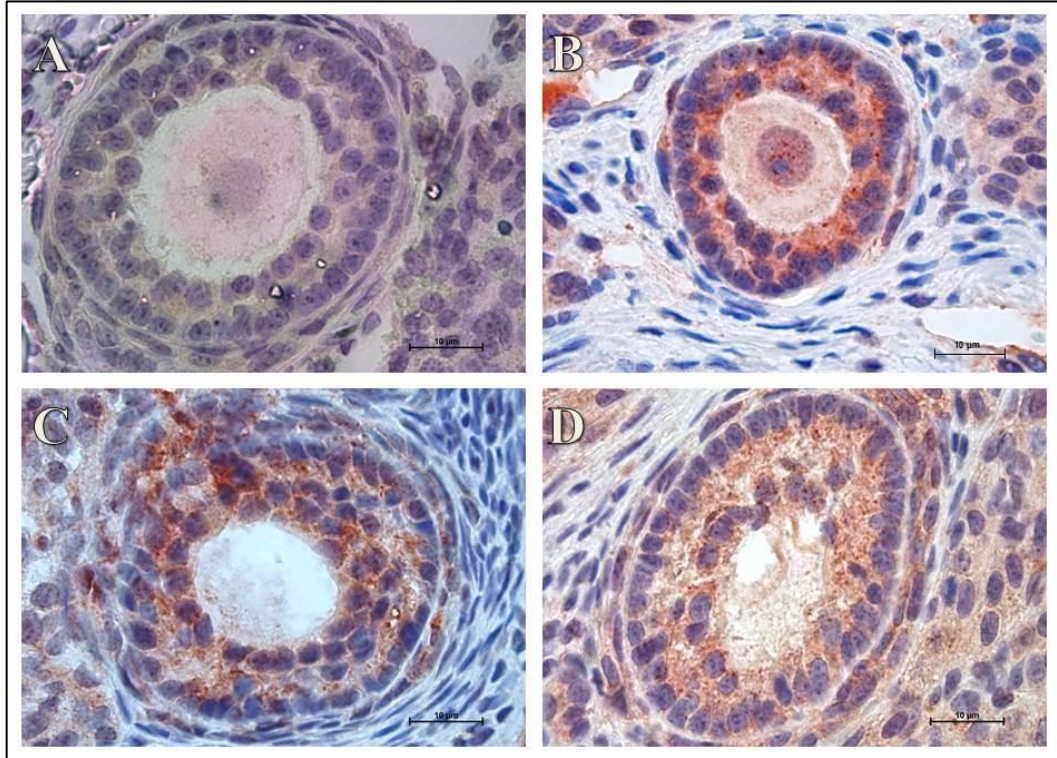
Caspase 3	Grup	N	Median	Minimum	Maximum	p
Oosit	Kontrol	4	0.33	0.26	0.45	0.067
	Karbonhidrat	4	0.48	0.27	1.15	
	Yağ	4	1.05	0.81	1.69	
	Protein	4	0.84	0.3	1.14	
Folikül hücreleri	Kontrol	4	1.33 ^a	0.86	1.45	0.018
	Karbonhidrat	4	5.17 ^{b,c}	3.95	6.91	
	Yağ	4	6.04 ^b	5.12	6.48	
	Protein	4	3.51 ^{a,c}	1.13	5.33	

*Aynı harfler benzerliği, farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.



Şekil 4.41: Caspase 3 ekspresyonu

A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. Siyah ok: primordiyal folikül, beyaz ok: primer folikül. IHC, 40x.



Şekil 4.42: Caspase 3 ekspresyonu

A: kontrol, B: karbonhidrat, C: yağ, D: protein. IHC, 100x.

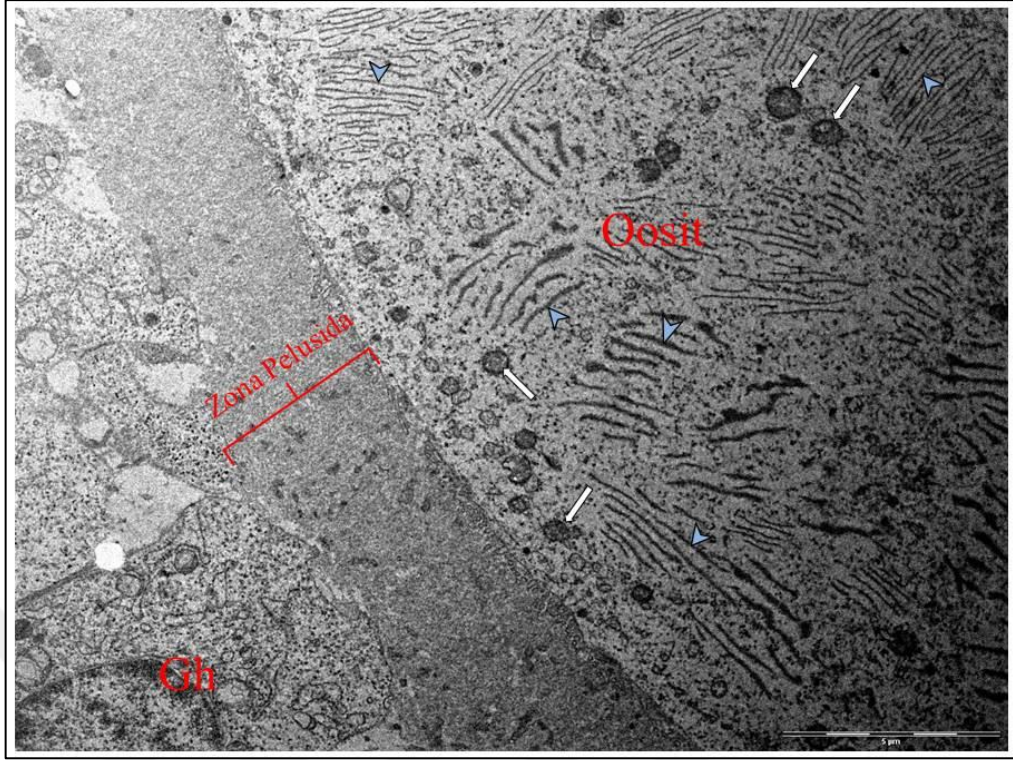
4.2.5. Elektron Mikroskopik Bulgular

Yapılan elektron mikroskopik incelemelerde tüm gruplarda oosit, zona pellusida, granuloza hücreleri ve korpus luteum ultrastrüktürel olarak değerlendirildi.

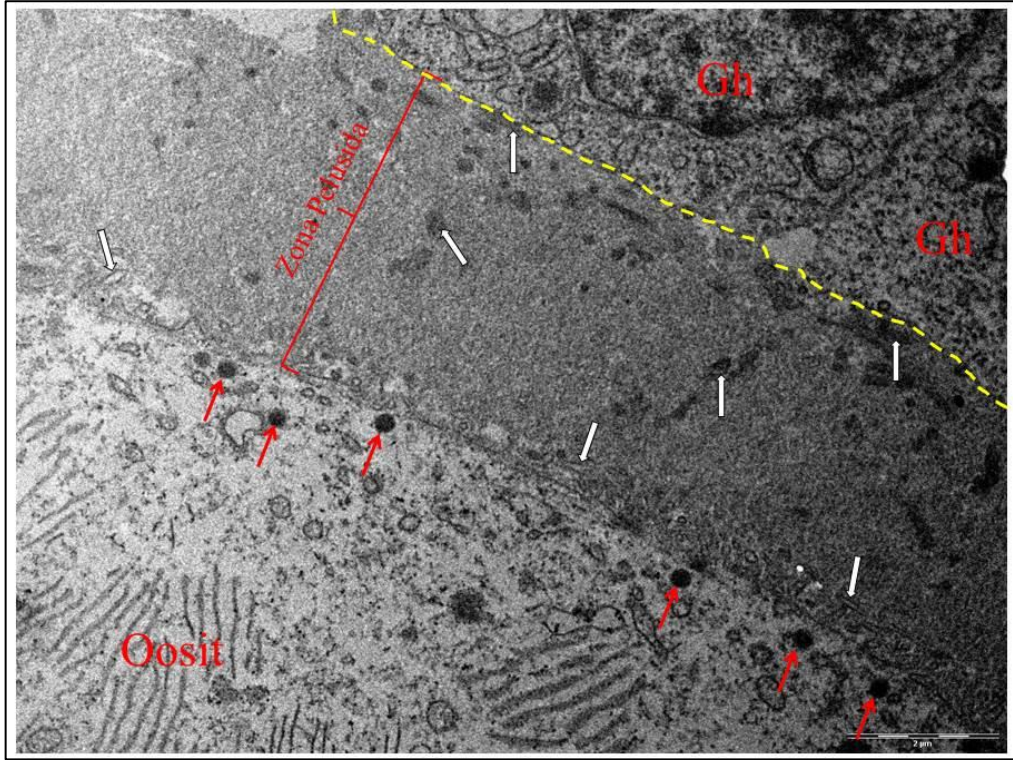
Kontrol grubu oosit sitoplazmasında perinükleer alandan oolemmaya kadar yayılım gösteren granüllü endoplazmik retikulum ve mitokondriyonlar normal ultrastrüktürel yapıda izlendi (Şekil 4.43). Oosite spesifik olan kortikal granüller oosit periferel sitoplazmasında, oolemma altında elektron yoğun granüller şeklinde dizili olarak izlendi ve normal yapıda değerlendirildi (Şekil 4.44, 4.45). Zona pellusida, hem oosit tarafında hem granuloza hücreleri tarafında düzenli bir sınıra sahipti. Hem oosit tarafından hem de granuloza hücreleri tarafından zona pellusidaya uzanan transzonal bağlantılar yoğun olarak gözlemlendi (Şekil 4.44, 4.45). Zona pellusida-granuloza hücre bileşkesi normal ultrastrüktürel yapıda izlendi. Zona pellusida içerisinde de transzonal bağlantılar elektron yoğun alanlar şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.44). Zona pellusida etrafında bulunan granuloza hücreleri de normal ultrastrüktürel yapıda izlendi. (Şekil 4.43, 4.44).

Kontrol grubu granuloza hücreleri poligonal şekilli, orta derecede ökromatik nükleuslu hücreler olarak gözlemlendi. Organel içeriği, sitoplazmik yoğunluk ve nükleus yapısı açısından genel olarak granuloza hücreleri normal ultrastrüktürel yapıda izlendi. Bazı hücrelerin sitoplazmasında düşük elektron yoğunluklu küçük vakuoller görüldü. İleri evre granuloza hücreleri arasındaki interselüler alanlarda yer yer genişlemeler mevcut olmakla birlikte hücreler arası bağlantılar normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi. (Şekil 4.46).

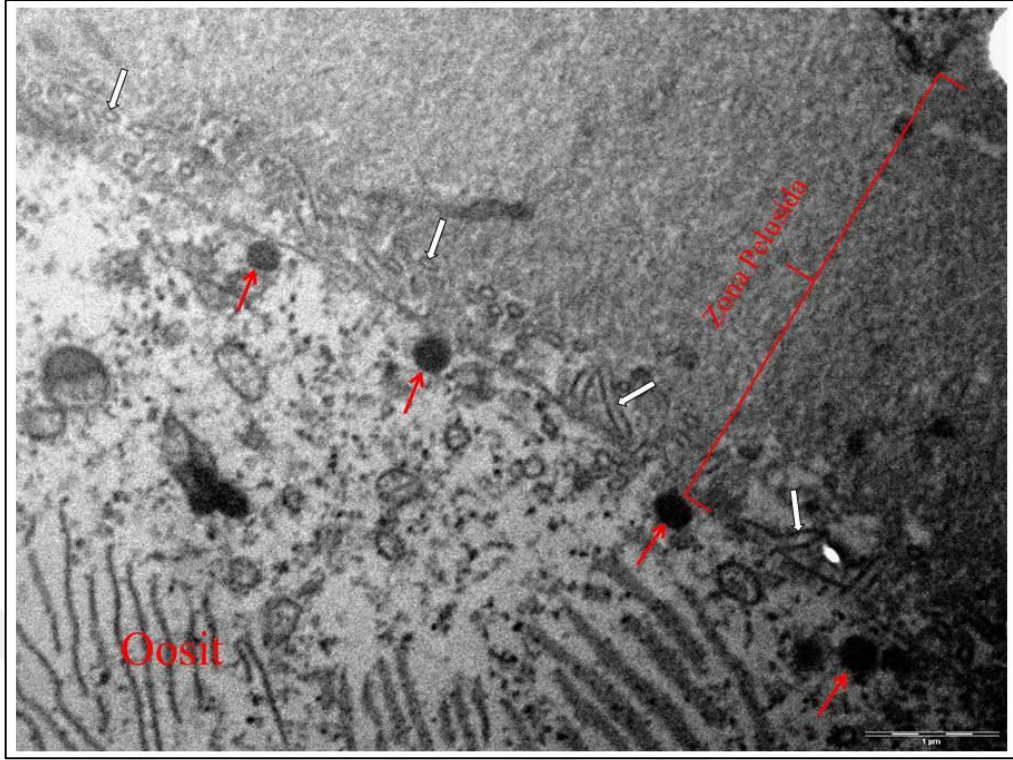
Korpus luteum granuloza lutein hücrelerinin sitoplazmasında çok sayıda, farklı büyüklüklerde düşük elektron yoğunluğa sahip vakuoller gözlemlendi. Nükleus yuvarlak şekilli ve ökromatik görünümde, düzgün konturlu olarak normal yapıda izlendi. Granuloza lutein hücreleri arası bağlantılar kesintisiz ve düzenli yapıda görüldü. Bu hücre grubu da nükleus yapısı, sitoplazmik yoğunluk ve organel içeriği açısından normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi (Şekil 4.47).



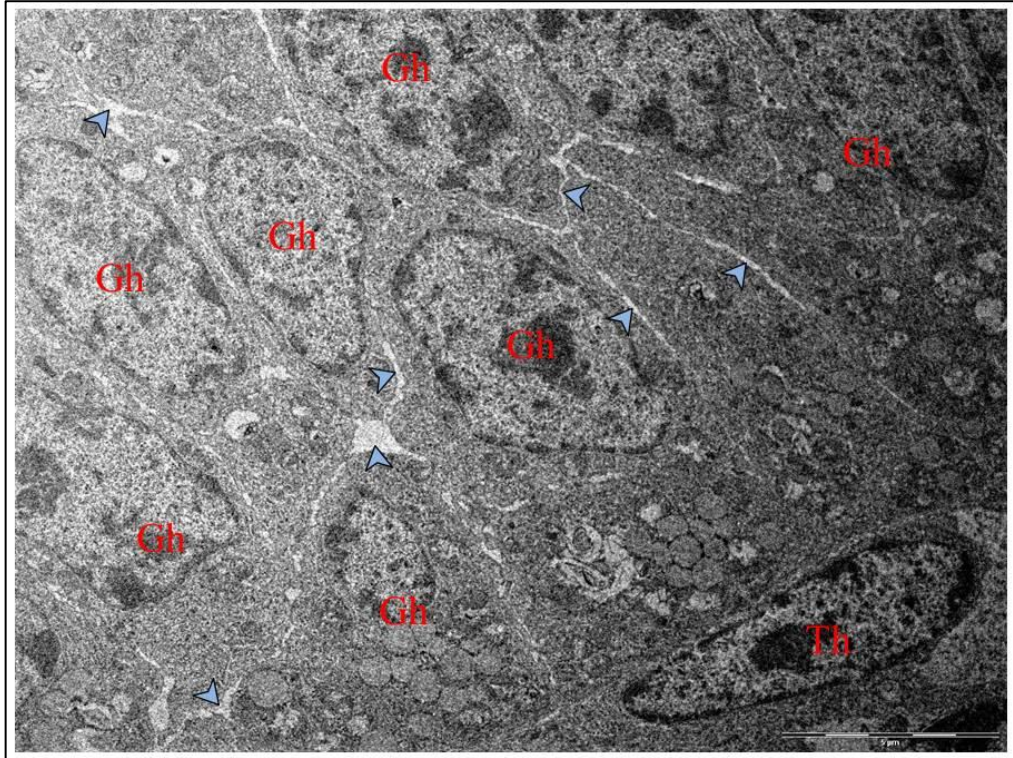
Şekil 4.43: Kontrol grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri
Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: mitokondri, ok başı: granüllü ER. TEM, x4000.



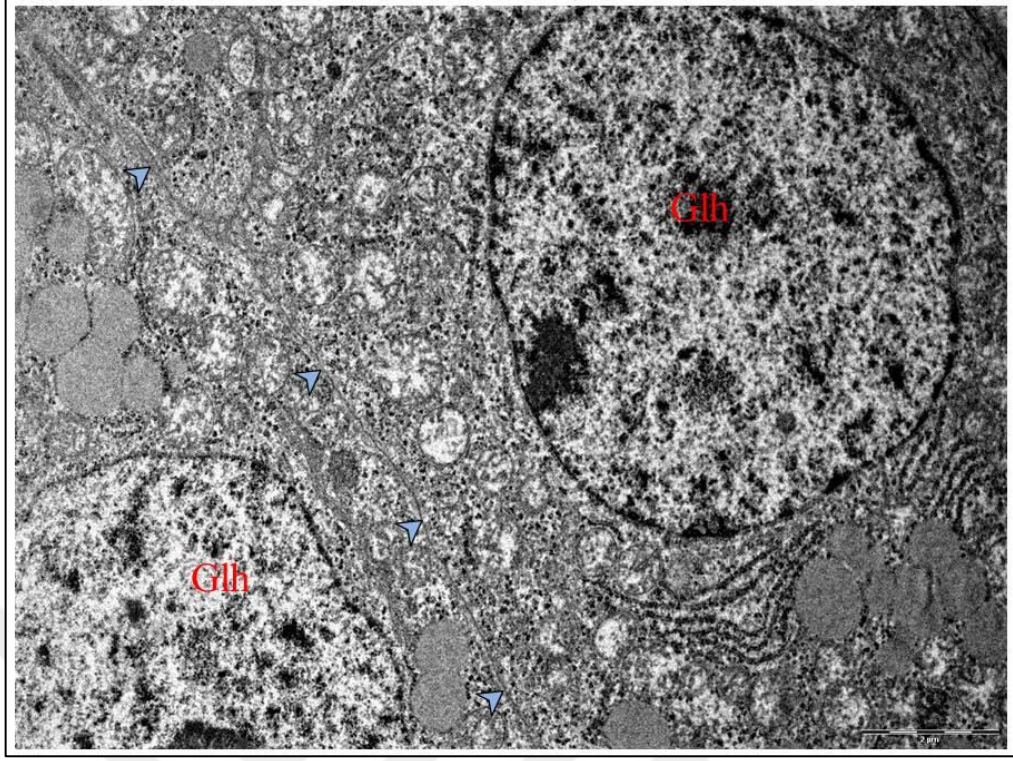
Şekil 4.44: Kontrol grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri
Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: transzonal bağlantılar, kırmızı ok: kor. granüller, sarı şerit: Gh-ZP sınırı.
TEM, x6999



Şekil 4.45: Kontrol grubu oosit ve zona pellusida
Beyaz ok: transzonal bağlantılar, kırmızı ok: kortikal granüller. TEM, x12500



Şekil 4.46: Kontrol grubu granuloza hücreleri
Gh: granuloza hücreleri, ok başı: Gh hücreler arası bağlantı bölgeleri. TEM, x4000



Şekil 4.47: Kontrol grubu granuloza lutein hücreleri
Glh: granuloza lutein hücre, ok başı: Glh hücreler arası bağlantı bölgeleri. TEM, x6300.

Karbonhidrat grubuna ait kesitlerde izlenen oositlerin sitoplazmasında kontrol grubuna kıyasla granüllü endoplazmik retikulumlar daha seyrek ve daha düşük elektron yoğunlukta olduğu izlendi. Oositlerin sitoplazmalarında uzamış şekilli mitokondriyonlar ve yer yer kabalaşmış, sisternal alanları elektron yoğun materyalle dolu granüler endoplazmik retikulum yapıları izlendi. Zona pellusida hattı boyunca yapılan taramada oolemma altında kortikal granüllerin kontrol grubundakine göre daha seyrek olduğu ve çaplarının heterojenite gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.48).

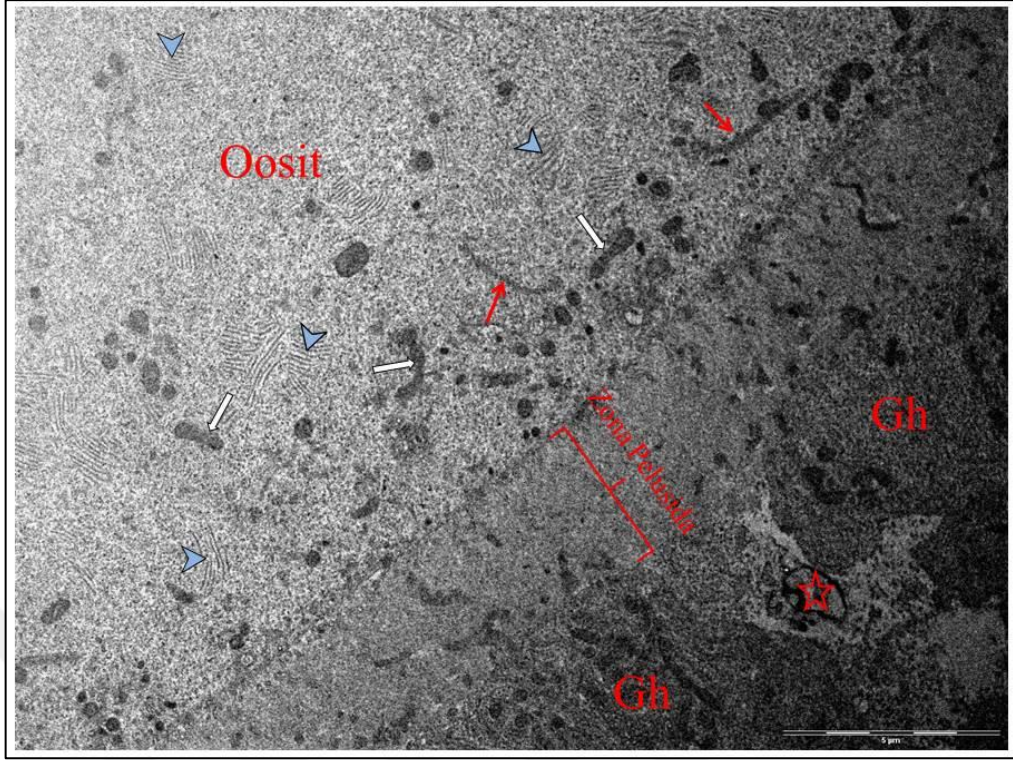
Zona pellusidanın granuloza hücre sınırlarında yapısal deformasyon ve düzensizlik izlendi. Ayrıca, zona pellusida içerisinde de yer yer farklı büyüklüklerde düzensiz boşluklar saptandı (Şekil 4.49, 4.50). Zona pellusida içerisindeki transzonal bağlantıların kontrole göre daha geniş, dilate yapıda olduğu ve periferlerinde boşluklar dikkati çekti (Şekil 4.50). Zona pellusida etrafındaki granuloza hücrelerinin bazı mitokondriyonlarında matriks içerisinde miyelin figürlerin şekillenerek mitokondriyonların dejenerasyon olduğu saptandı (Şekil 4.48, 4.50).

Karbonhidrat grubuna ait kesitlerin incelenmesinde erken evre foliküllerde, folikül hücrelerinde ve oositlerde dejenerasyon saptandı. Bu foliküllerde folikül hücrelerinde nükleus kromatininde periferik yoğunlaşma, nükleus konturlarında

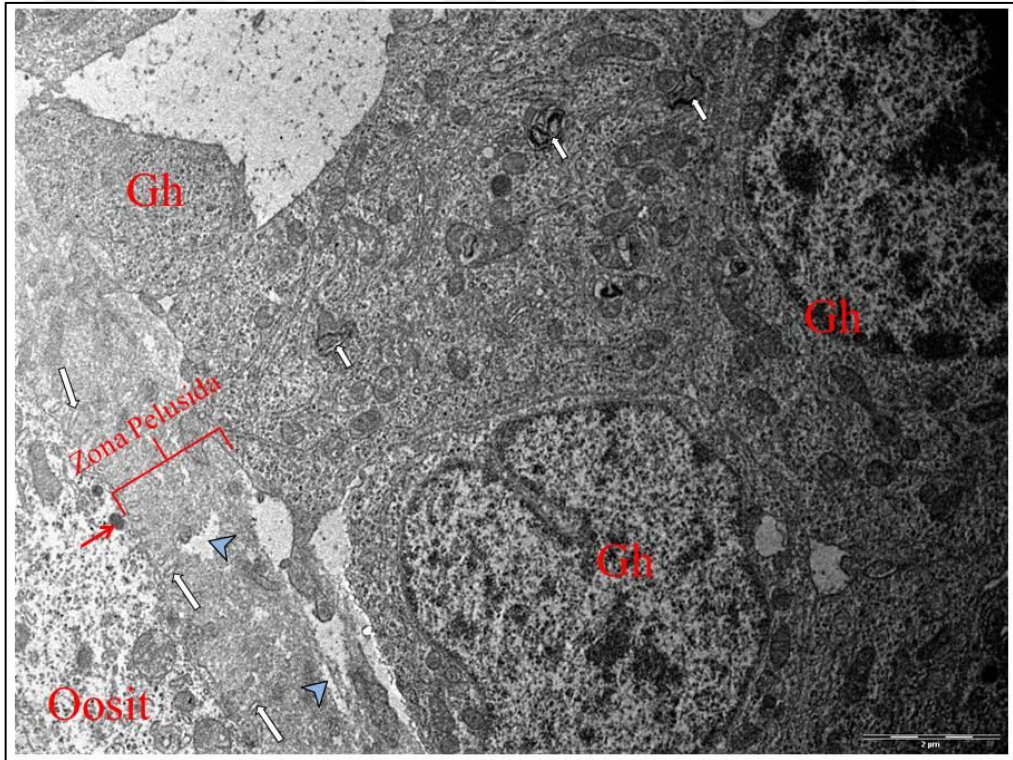
düzensizlik, perinükleer alanda ödematöz dilatasyon, intrasitoplazmik vakuol oluşumları ve organel hasarı-dejenerasyonu saptandı. Oosit nükleusunda heterokromatik yoğunlaşma, nükleus konturlarında düzensizlik ve intrasitoplazmik vakuolizasyon, organel hasarı-dejenerasyonu ile karakterize apoptotik hücre görünümde izlendi. Oosit ile folikül hücreleri arasında ve folikül ile stromal doku arasında geniş ödematöz boşluklar görüldü (Şekil 4.51).

Karbonhidrat grubuna ait kesitlerde izlenen granuloza hücreleri oval-yuvarlak şekilli, orta derecede ökromatik nükleuslu olarak gözlendi. Bazı hücrelerin sitoplazmalarında organel hasarı ve kaybı olduğu saptandı. Mitokondriyonlarda ödematöz dilatasyon, krista hasarı ve dejenerasyonu izlendi. Komşu granuloza hücreleri arasında oluşan antral boşluklar içerisinde membranöz ve granüler dejenere organel artıkları görüldü (Şekil 4.48, 4.52).

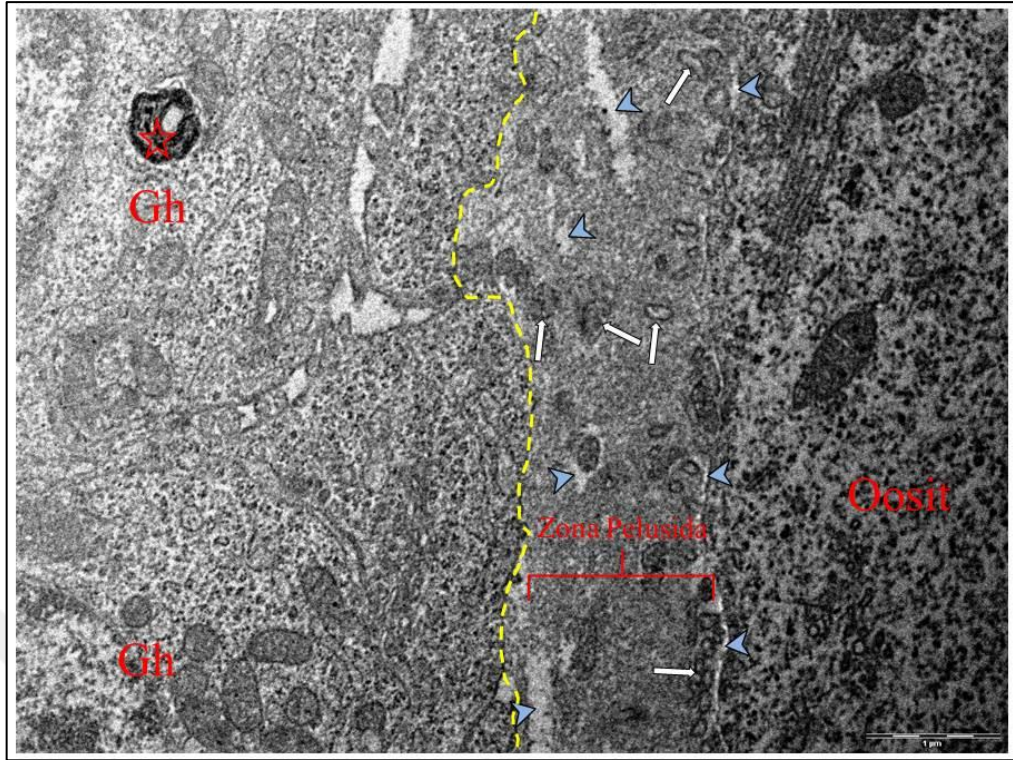
Bu grupta korpus luteum granuloza lutein hücrelerinde nükleus yuvarlak şekilli ve ökromatik yapıda, sitoplazma ise düşük elektron yoğunluklu vakuollerden zengin olarak izlendi. Ayrıca sitoplazmada yer yer organel hasarı görüldü. Sitoplazma içerisinde elektron yoğun görünümde, piknotik mitokondriyonlar dikkati çekti. Granuloza lutein hücreleri arasındaki interselüler bağlantıların kesintili ve interselüler alanın genişlemiş olduğu izlendi (Şekil 4.53).



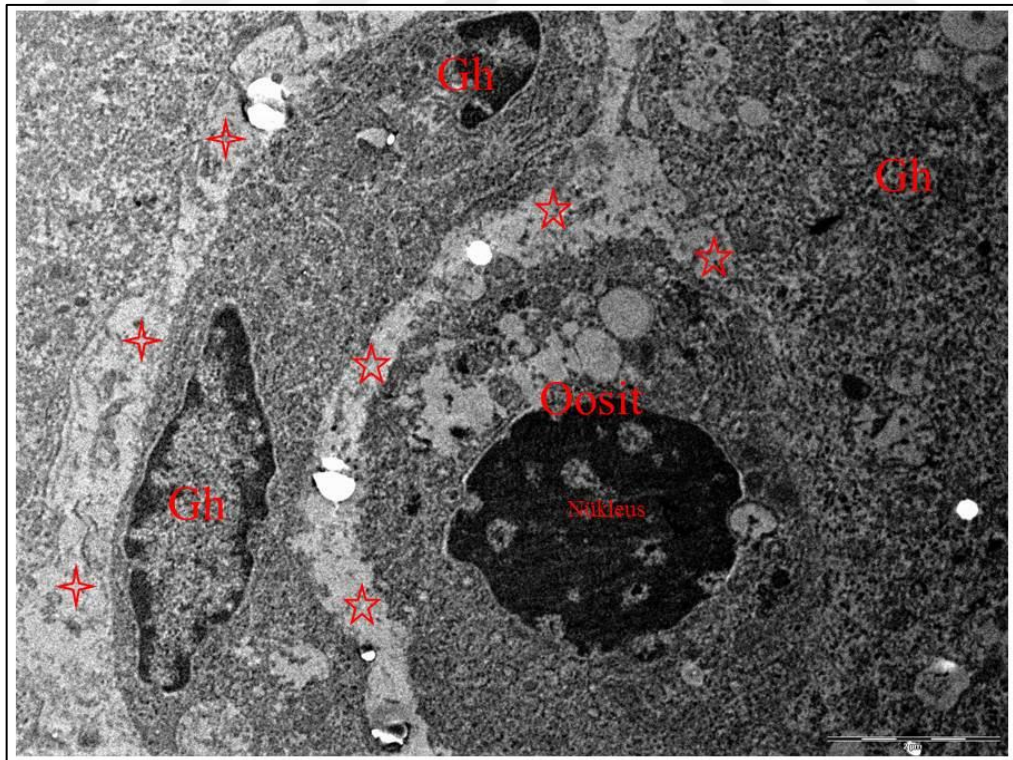
Şekil 4.48: Karbonhidrat grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri
 Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: uzamış mitokondri, kırmızı ok: genişlemiş gER, ok başı: granüllü ER, yıldız: dejenere organel artığı. TEM, x4000.



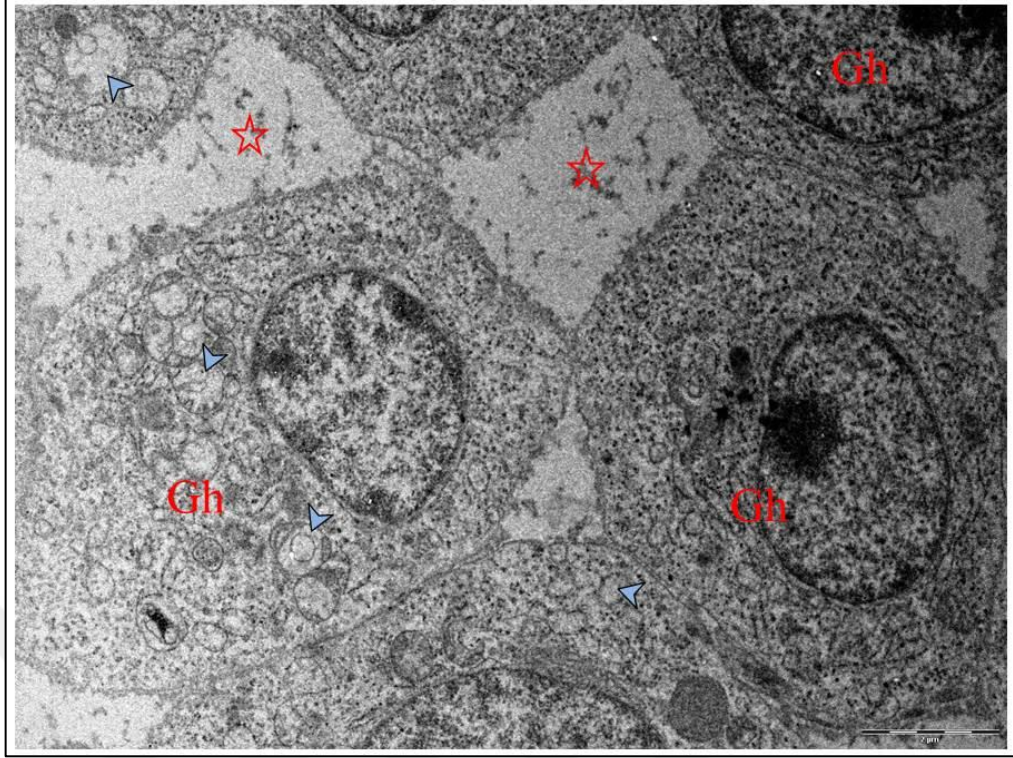
Şekil 4.49: Karbonhidrat grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri
 Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: transzonal bağlantı, kısa ok; mitokondri kaybı, kırmızı ok: kortikal granül, ok başı: yapısal deformasyon. TEM, x6300.



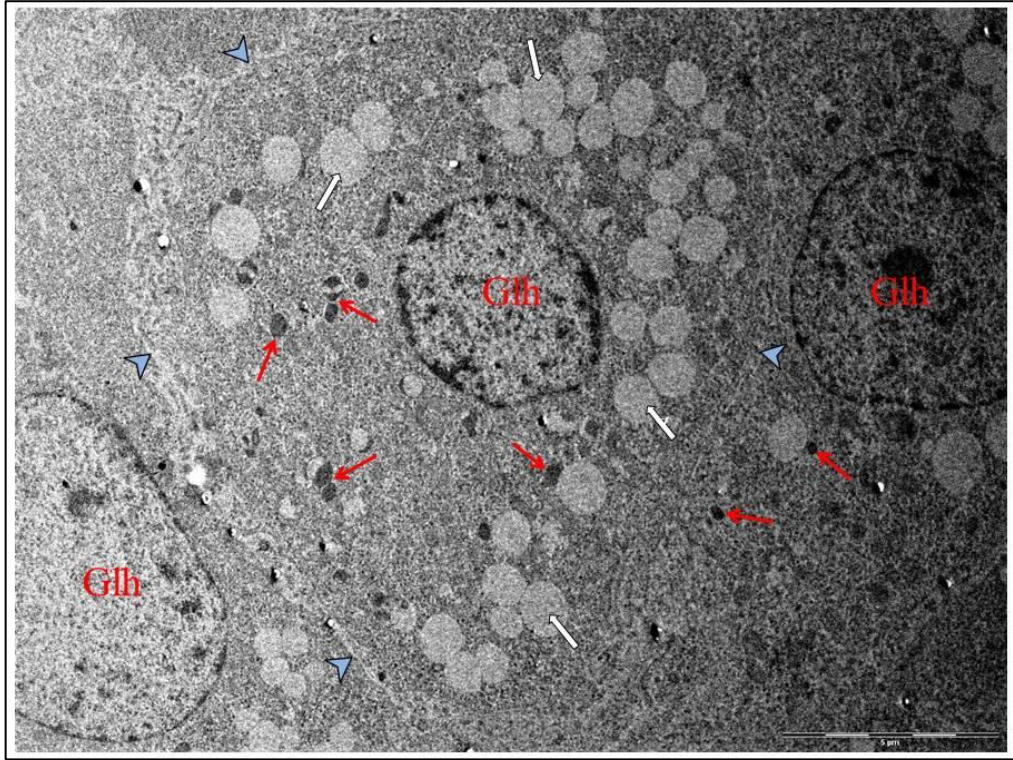
Şekil 4.50: Karbonhidrat grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri
Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: transzonal bağlantı, ok başı: deformasyon ve dilatasyon, sarı şerit: Gh-ZP sınırı, yıldız: miyelin figür. TEM, x12500.



Şekil 4.51: Karbonhidrat grubu atretik folikül
Gh: granuloza hücresi, yıldız: dilatasyon. TEM, x8000.



Şekil 4.52: Karbonhidrat grubu granuloza hücreleri
Gh: granuloza hücresi, yıldız: antrum, ok başı: organel kaybı. TEM, x6300.



Şekil 4.53: Karbonhidrat grubu granuloza lutein hücreleri
Glh: granuloza lutein hücre, beyaz ok: lipid vakuölü, kırmızı ok: piknotik mitokondriyon, ok başı: Glh hücreler arası bağlantı bölgelerinde dilatasyon TEM, x4000.

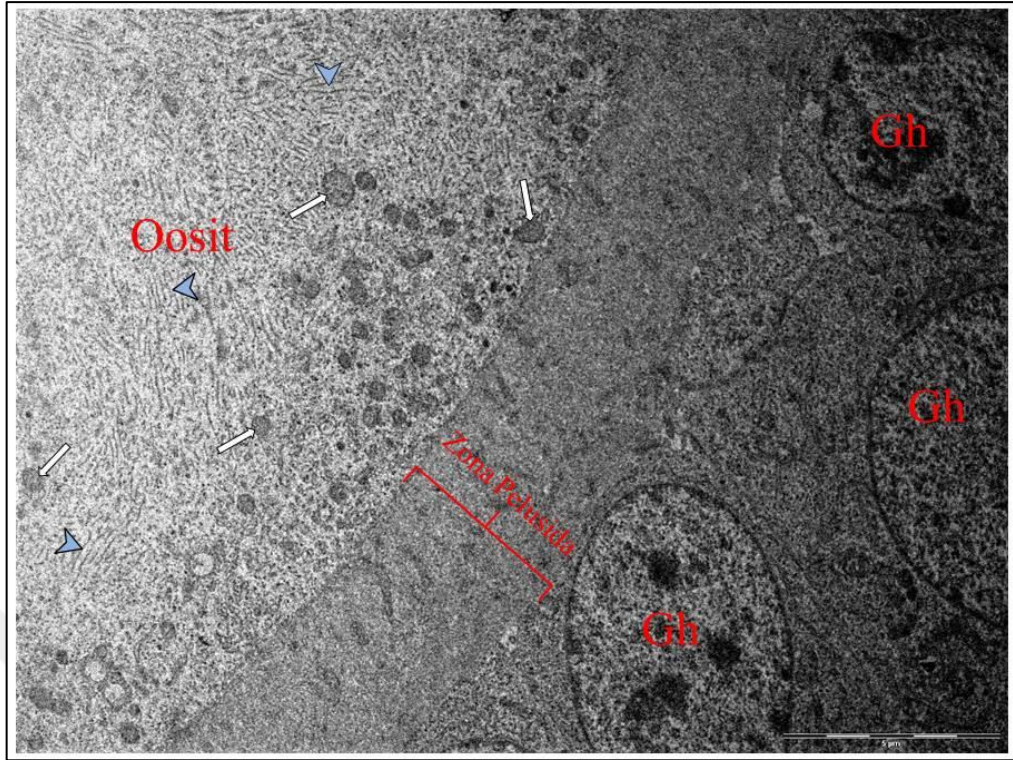
Yağ grubu oosit sitoplazmasında granüllü endoplazmik retikulumlar ve mitokondriyonlar normal yapı ve yoğunlukta izlendi. Kortikal granüller oosit periferel sitoplazmasında, oolemma altında elektron yoğun granüller şeklinde izlenmekte olup normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi. Ancak, kortikal granüller kontrol grubuna göre daha seyrek olarak görüldü (Şekil 4.54).

Zona pellusida etrafını saran granuloza hücreleri ökromatik nükleusları ve sitoplazmalarıyla normal ultrastrüktürel yapıda değerlendirildi (Şekil 4.54, 4.55). Zona pellusidanın hem oosit yönünde hem de granuloza hücreleri yönünde düzenli sınırlara sahip olduğu izlendi (Şekil 4.56). Oosit ve granuloza hücreleri tarafından zona pellusidaya uzanan ve zona pellusida içerisindeki transzonal bağlantı yapıları olağan yoğunlukta gözlemlendi. (Şekil 4.55, 4.56).

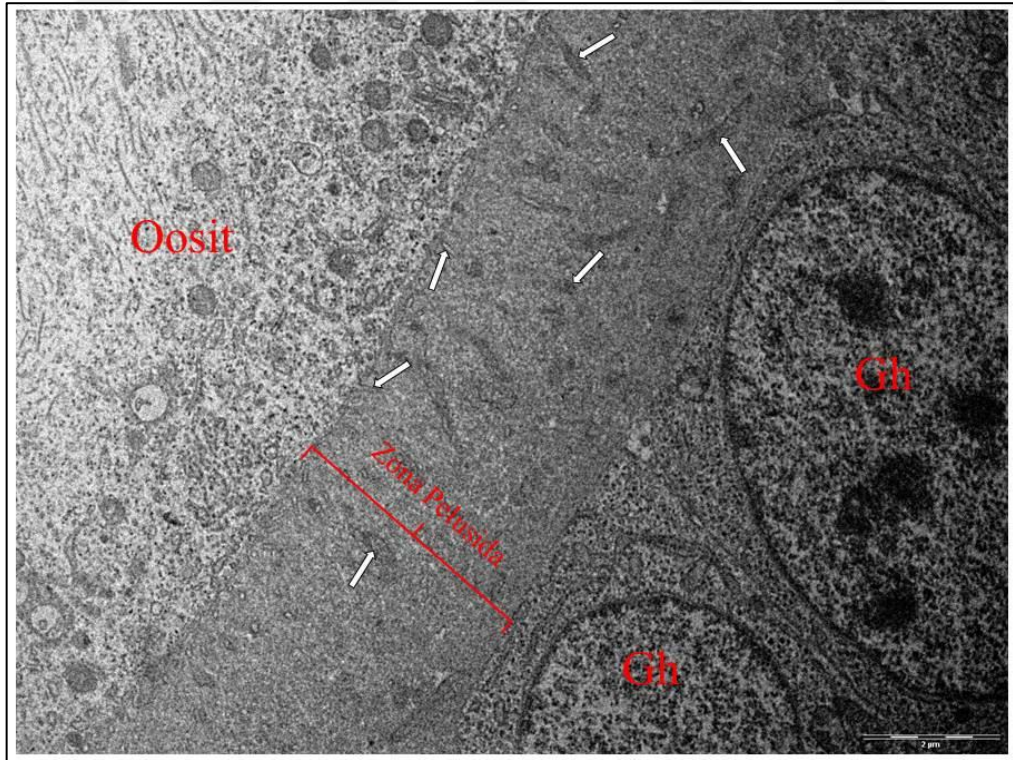
Yağ grubuna ait kesitlerin elektron mikroskopik incelenmesinde karbonhidrat grubundakine benzer şekilde yer yer erken evre atretik foliküllere rastlandı. Bu foliküllerde oosit nükleusunda heterokromatik yoğunlaşma, perinükleer alanda boşluk şeklinde dilatasyon ve intrasitoplazmik vakuoller görüldü (Şekil 4.57).

Yağ grubuna ait kesitlerde granuloza hücrelerinin genellikle nükleus sınırları düzensiz, perinükleer alanları dilate, yoğun kromatinli olduğu ve çok sayıda değişik büyüklüklerde intrasitoplazmik vakuol içerdiği görüldü. Granuloza hücreleri arasındaki interselüler alanların düzensiz olduğu ve yer yer hücre plazma membranlarında hasarlı alanlar saptandı (Şekil 4.58). Bazı granuloza hücrelerinde geniş, değişik elektron yoğunlukta materyaller içeren ofofagozomlara ve sekonder lizozom yapılarına rastlandı (Şekil 4.59).

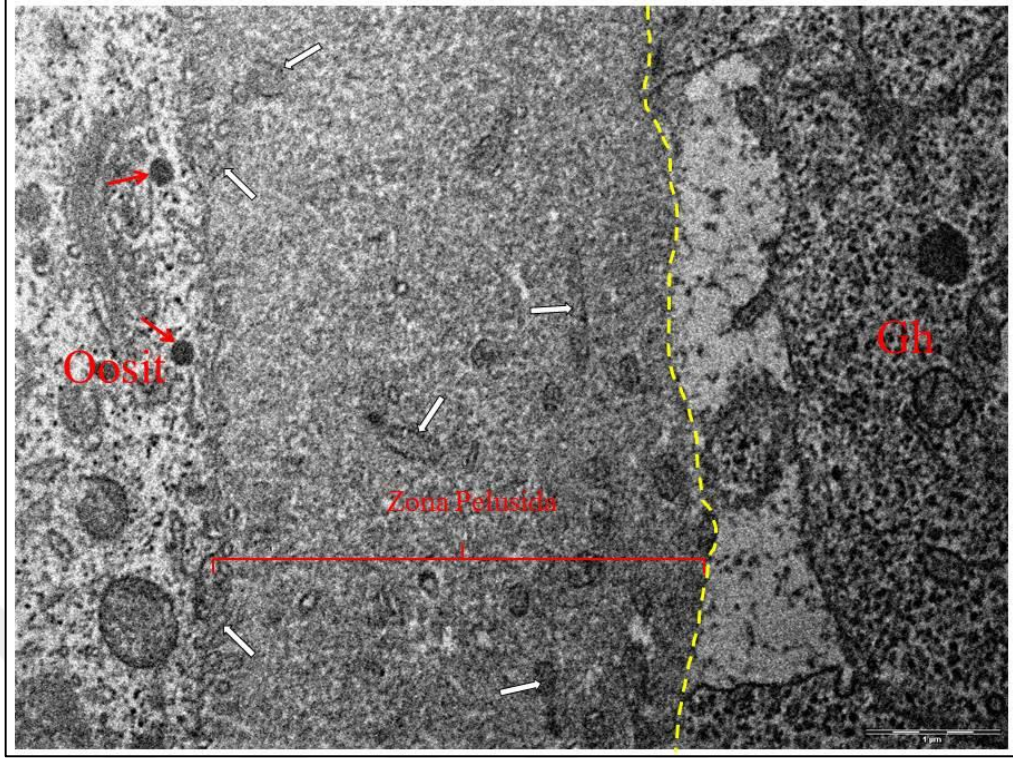
Yine bu grupta korpus luteum hücrelerinden granuloza lutein hücrelerinde perinükleer kromatin yoğunlaşması, nükleus sınırlarında düzensizlik, intrasitoplazmik düşük elektron yoğunlukta materyal içeren vakuoller izlendi. Vakuol içeriği periferinde halo şeklinde şeffaf alanlar dikkati çekti. Bazı granuloza lutein hücrelerinde mitokondriyal matriks yoğunlaşması ve piknotik görünümlü mitokondriyonlar ile lizozomlar yapıları görüldü. Granuloza lutein hücreleri arasındaki interselüler alanlar dilate ve bağlantılar kesintili izlendi (Şekil 4.60, 4.61).



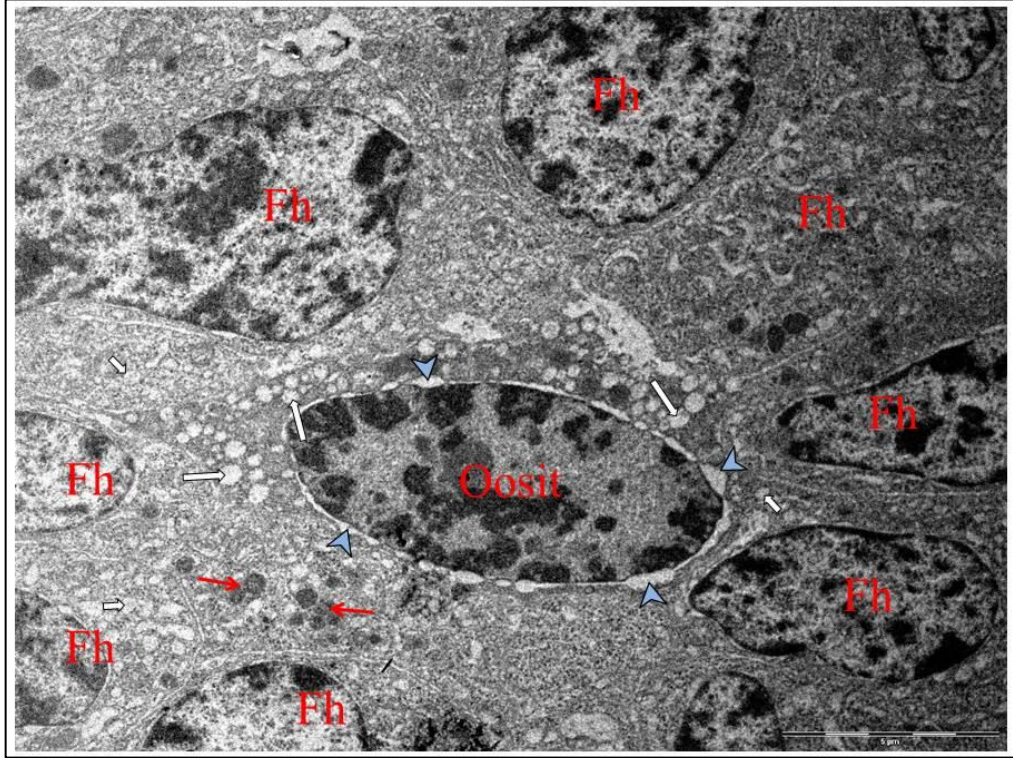
Şekil 4.54: Yağ grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri
Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: mitokondri, ok başı: granüllü ER. TEM, x4000.



Şekil 4.55: Yağ grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri
Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: transzonal bağlantı. TEM, x6300.

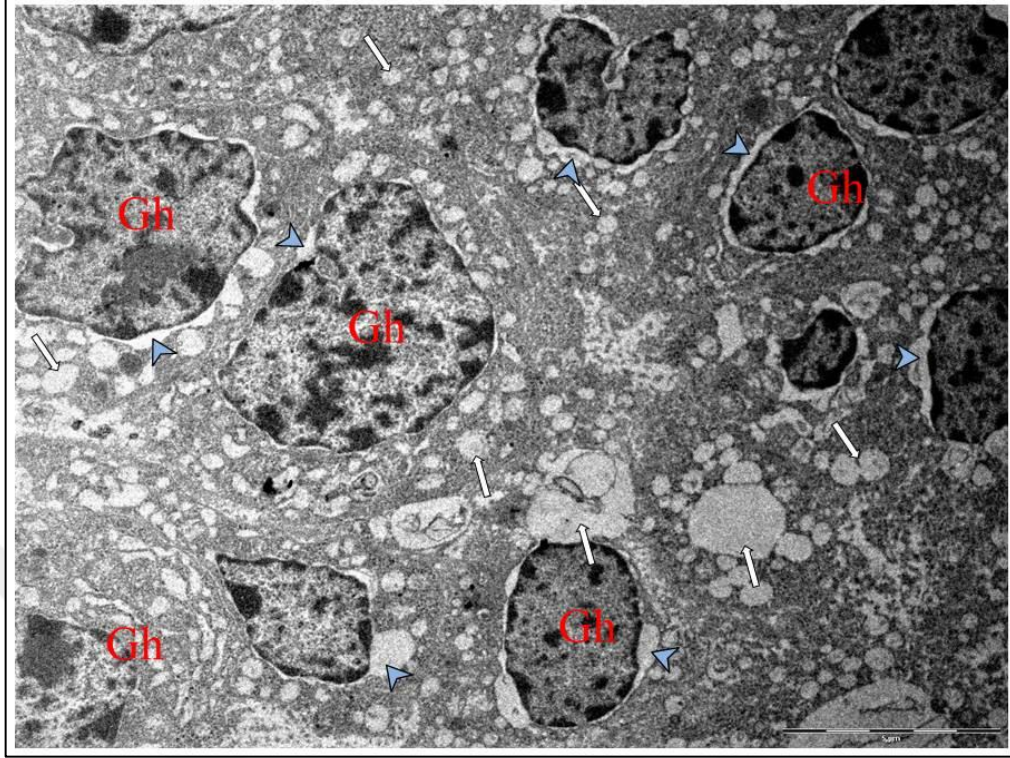


Şekil 4.56: Yağ grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri
 Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: transzonal bağlantı, kırmızı ok; kortikal granül,
 sarı şerit: Gh-ZP sınırı. TEM, x12500.



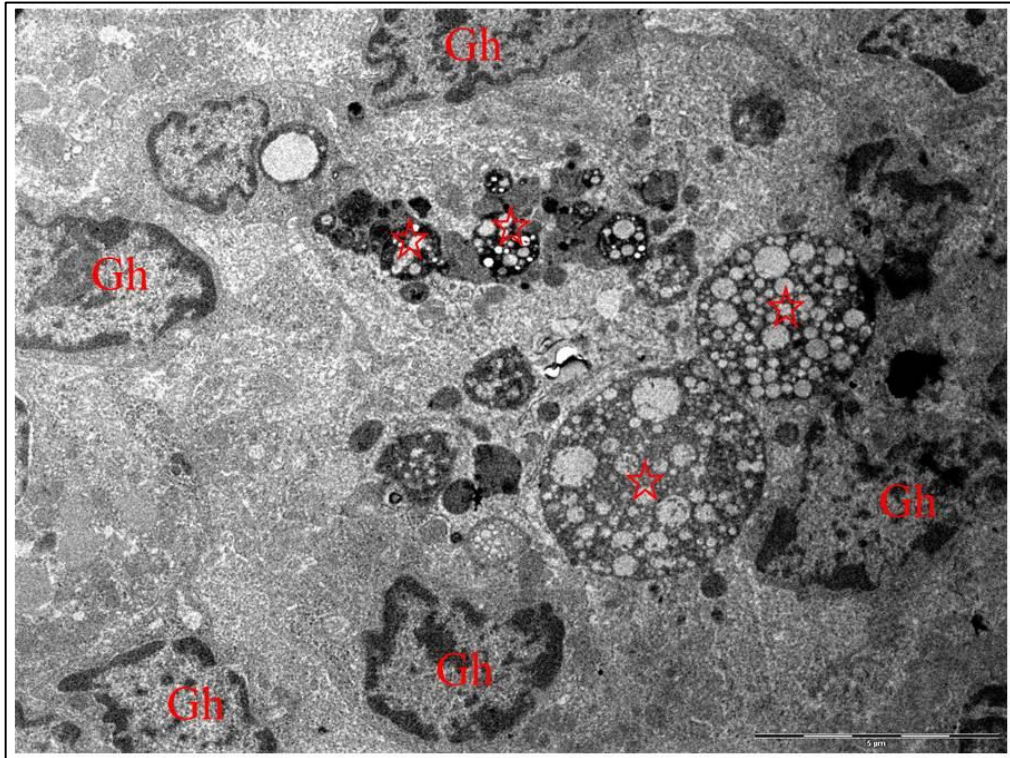
Şekil 4.57: Yağ grubu atretik folikül

Fh: folikül hücresi, uzun beyaz ok: oosit sitoplazmasında vakuol, kısa beyaz ok: Fh sitoplazmasında vakuol, kırmızı ok: organel kaybı, ok başı: dilatasyon. TEM, x4000.



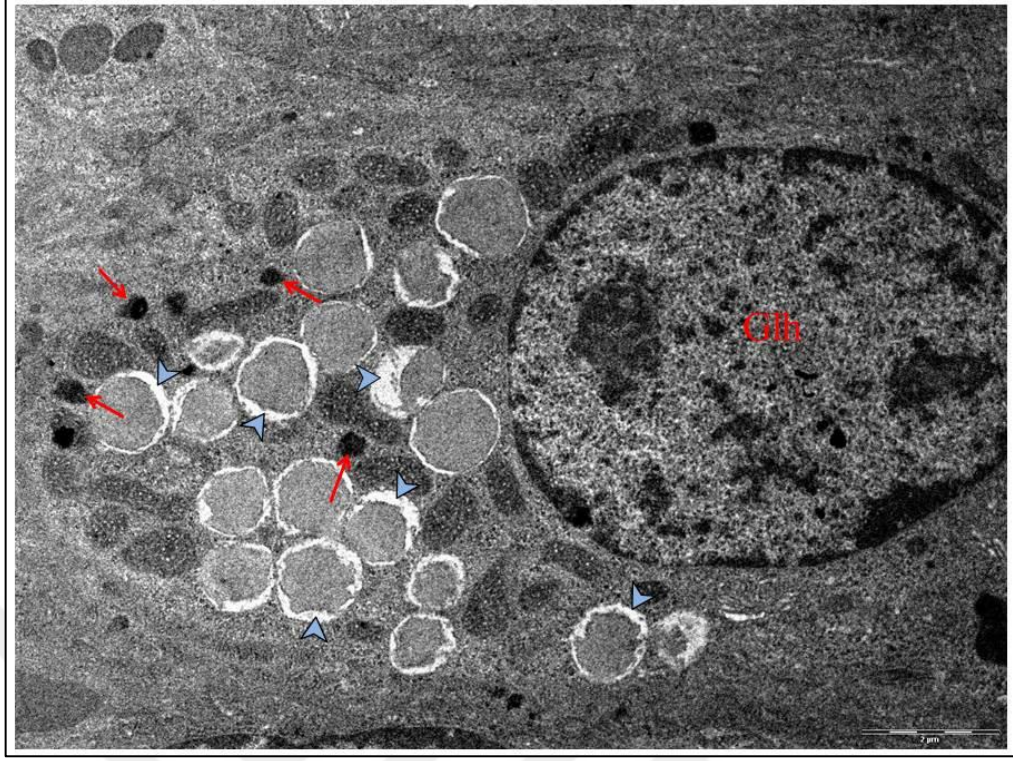
Şekil 4.58: Yağ grubu granuloza hücreleri

Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: vakuol, ok başı: perinükleer dilatasyon. TEM, x4000.



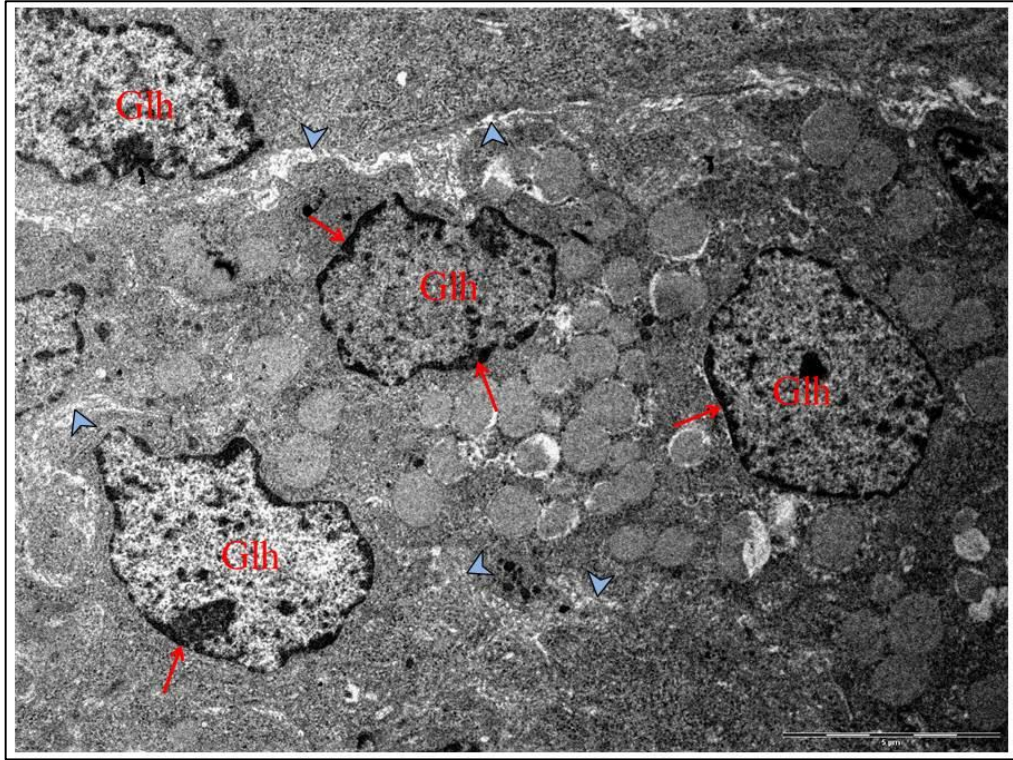
Şekil 4.59: Yağ grubu granuloza hücreleri

Gh: granuloza hücresi, kırmızı yıldız: otofagozom. TEM, x4503.



Şekil 4.60: Yağ grubu granuloza lutein hücresi

Glh: granuloza lutein hücre, kırmızı ok: sekonder lizozom, ok başı: dilatasyon TEM, x6300.



Şekil 4.61: Yağ grubu granuloza lutein hücreleri

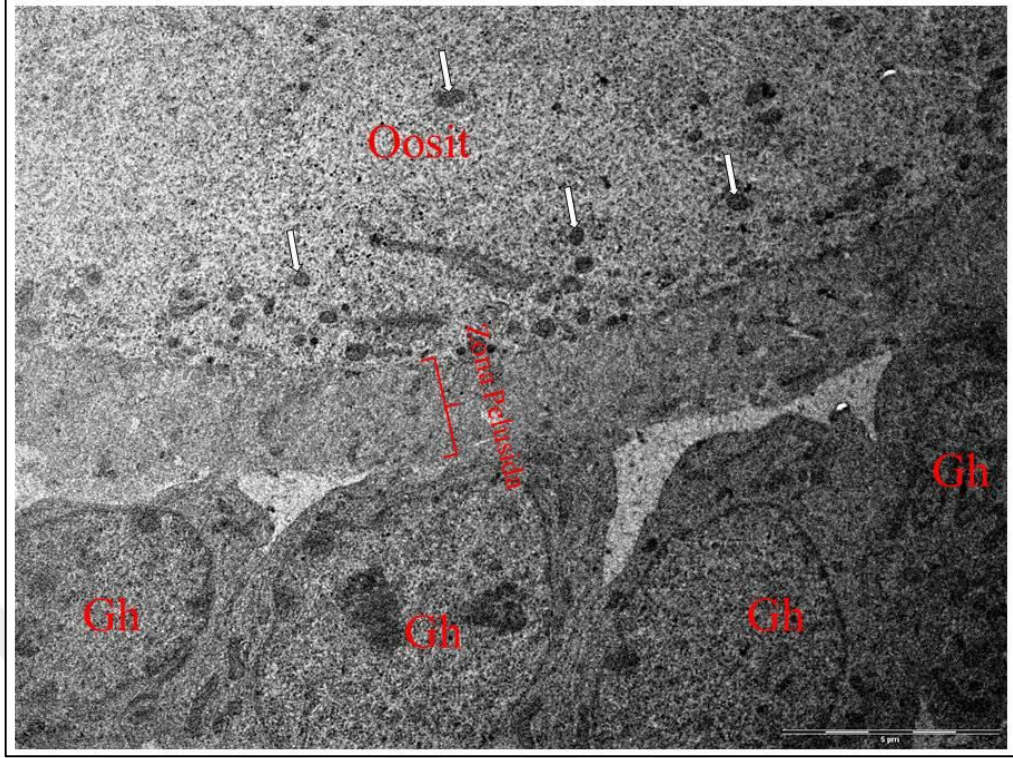
Glh: granuloza lutein hücre, kırmızı ok: perinükleer kromatin yoğunlaşması, ok başı: Glh gücreler arası dilatasyon. TEM, x4000.

Protein grubu oosit sitoplazmasında granüllü endoplazmik retikulumlar kontrole göre daha az ve daha düşük elektron yoğunlukta izlendi. Yer yer granüler endoplazmik sarnıçlarında orta derecede elektron yoğun materyal birikimine bağlı kabalaşma saptandı. Mitokondriyonlar normal yapıda değerlendirildi. Zona pellusida hattı boyunca oolemma altında izlenen kortikal granüllerin karbonhidrat ve yağ gruplarındakine benzer şekilde bu grupta da oldukça seyrek olduğu gözlemlendi (Şekil 4.62).

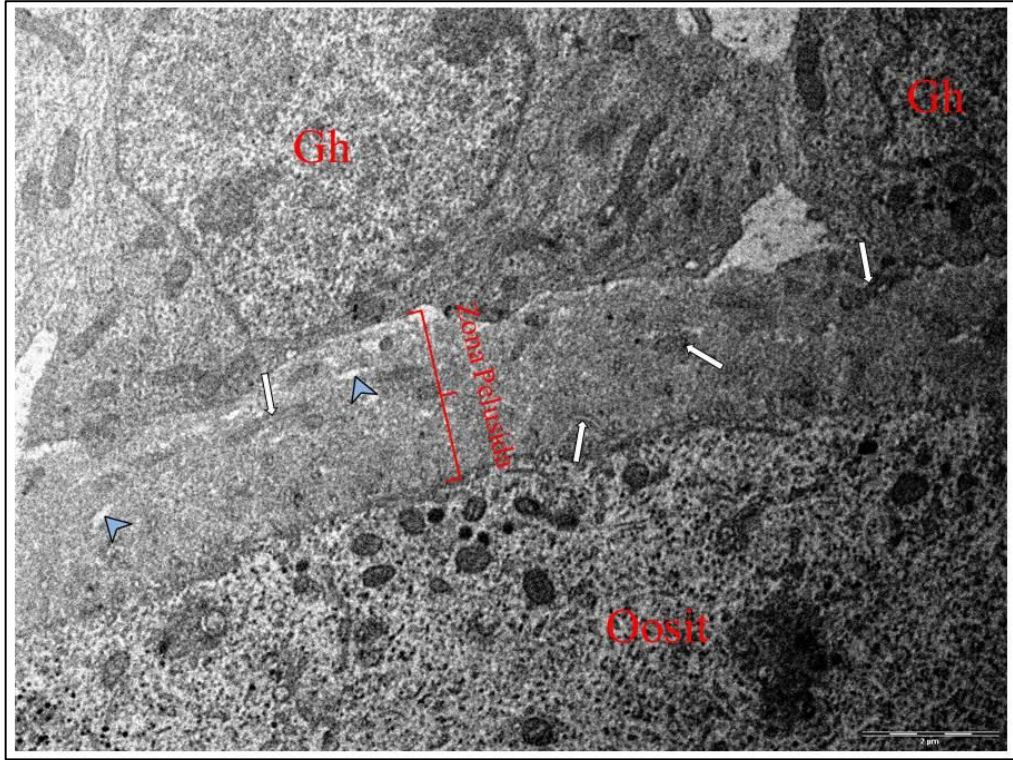
Zona pellusida etrafını saran granuloza hücreleri ökromatik nükleusları ve sitoplazmalarıyla normal ultrastrüktürel yapıda görüldü (Şekil 4.62, 4.63). Bu hücrelerde yer yer uzamış şekilli mitokondriyonlar dikkati çekti. Zona pellusidanın oosit yönünde düzenli, granuloza hücreleri yönünde ise daha düzensiz olduğu izlendi (Şekil 4.64). Oosit ve granuloza hücreleri tarafından zona pellusidaya uzanan transzonal bağlantılar normal yapı ve yoğunlukta gözlemlendi. Karbonhidrat grubundakine benzer şekilde zona pellusida içinde yer yer düzensiz boşluklar şeklinde yapısal deformasyonlar görüldü (Şekil 4.64).

Protein grubuna ait kesitlerde granuloza hücrelerinde perinükleer alanda minimal düzeyde dilatasyon, nükleus sınırlarında düzensizlik izlendi. Bazı granuloza hücrelerinde organel yapıları ve vakuoller içeren büyük intrasitoplazmik otofagozomlar ve sekonder lizozomlar tespit edildi. Bazı hücrelerde perinükleer alanda endoplazmik retikulum dilatasyonu dikkati çekti (Şekil 4.65, 4.66).

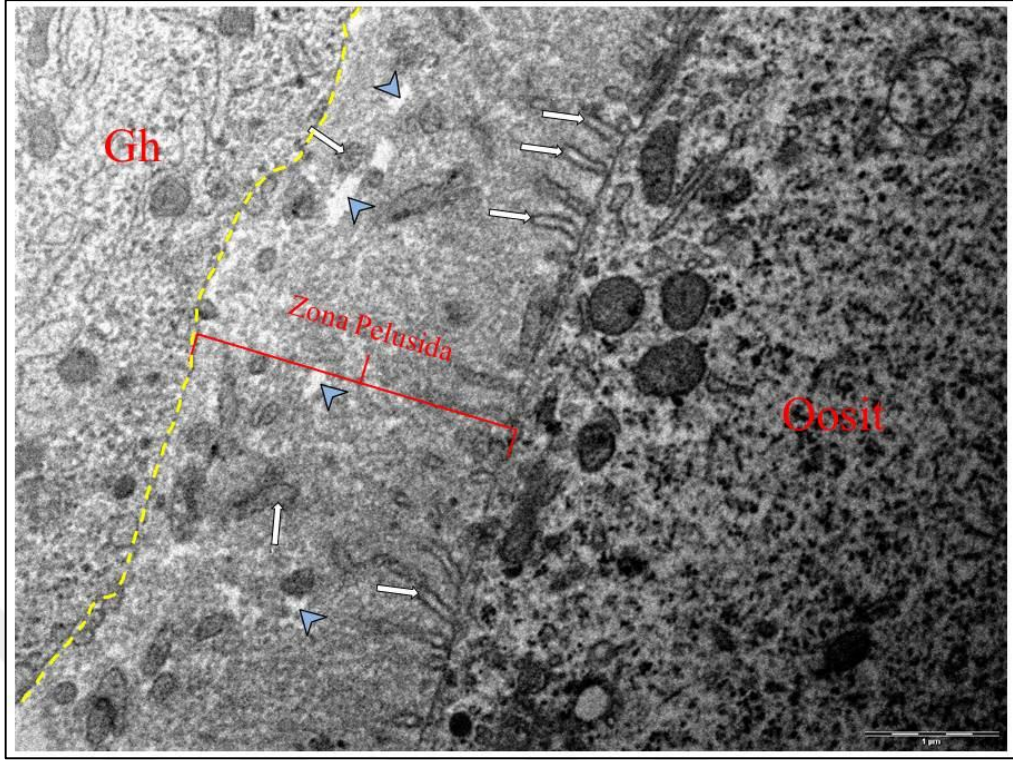
Korpus luteum hücrelerinden granuloza lutein hücrelerinde nükleusların ökromatik görünümde ancak nükleus konturlarının düzensiz olduğu görüldü. Ayrıca perinükleer alanda minimal düzeyde dilatasyon gözlemlendi. Granuloza lutein hücreleri arasındaki interselüler alanlar dilate ve bağlantılar kesintili izlendi. (Şekil 4.67).



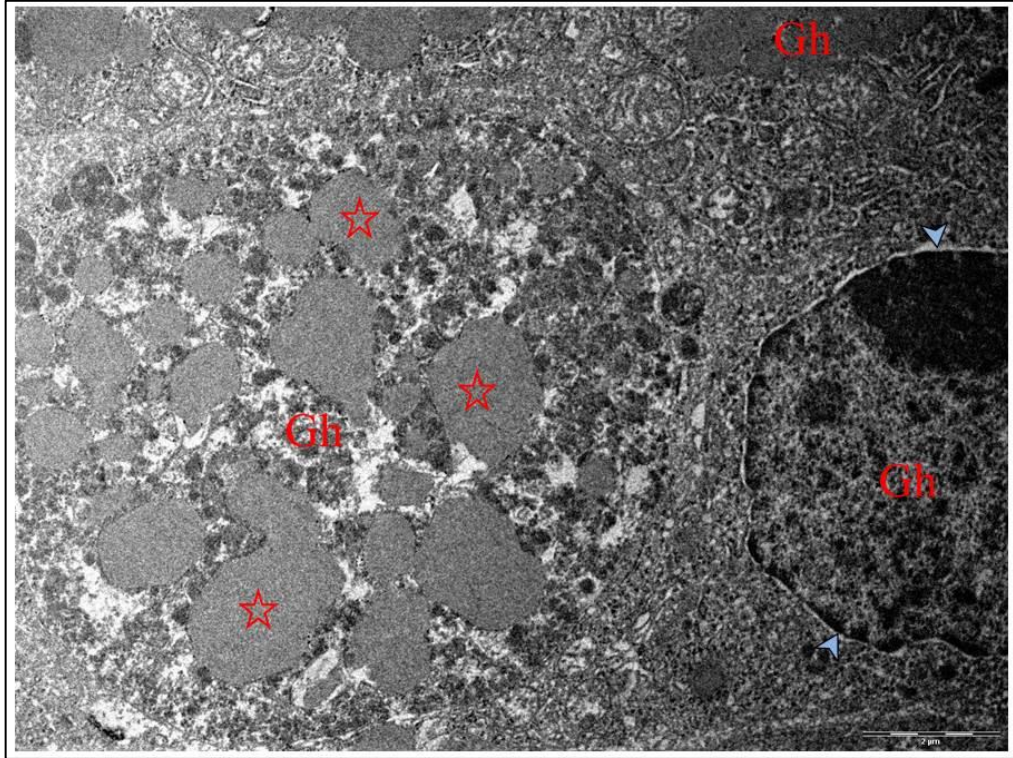
Şekil 4.62: Protein grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri
Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: mitokondri. TEM, x4000.



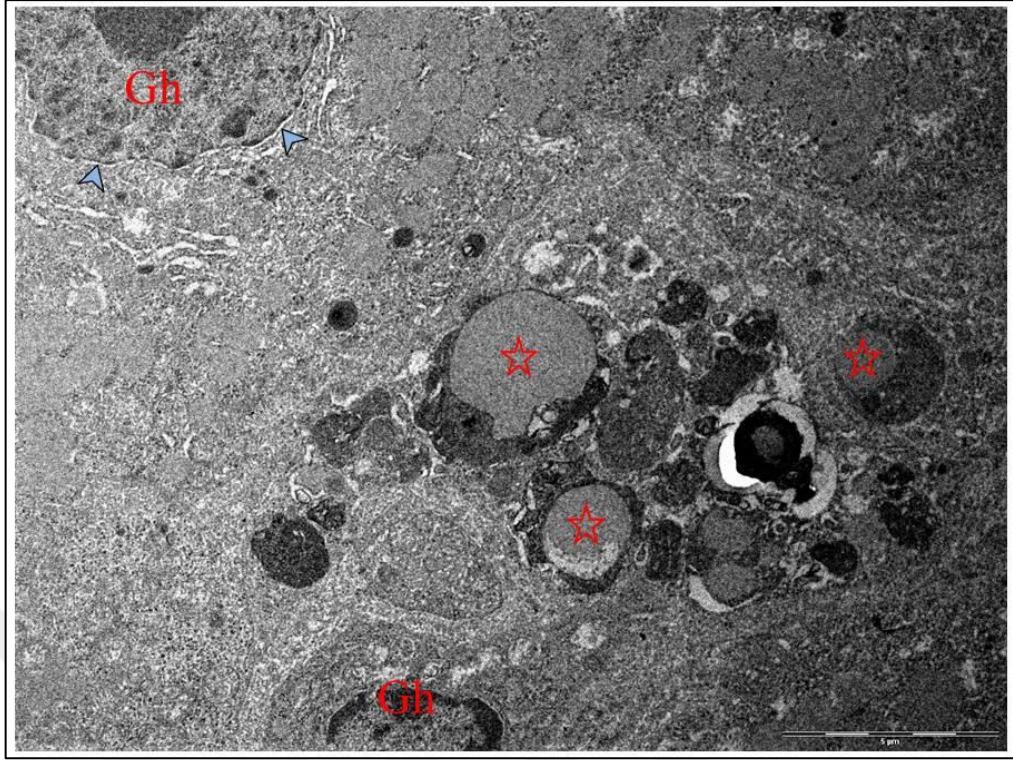
Şekil 4.63: Protein grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücreleri
Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: transzonal bağlantı, ok başı: yapısal deformasyonlar. TEM, x6300.



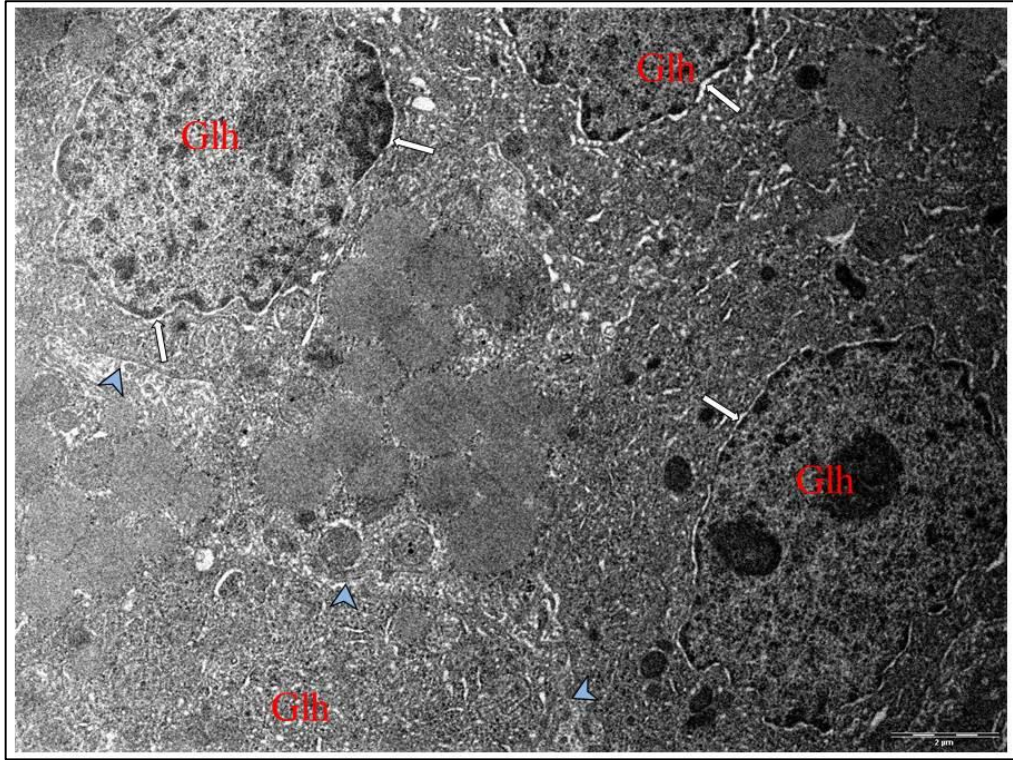
Şekil 4.64: Protein grubu oosit, zona pellusida ve granuloza hücresi
 Gh: granuloza hücresi, beyaz ok: transzonal bağlantı, sarı şerit: Gh-ZP sınırı, ok başı: yapısal deformasyonlar. TEM, x12500.



Şekil 4.65: Protein grubu granuloza hücreleri
 Gh: granuloza hücresi, yıldız: otofagozom, ok başı: perinükleer dilatasyon.
 TEM, x4000. TEM, x6300.



Şekil 4.66: Protein grubu granuloza hücreleri
Gh: granuloza hücresi, yıldız: otofagozom, ok başı: perinükleer dilatasyon. TEM, x4000.



Şekil 4.67: Protein grubu granuloza lutein hücreleri
Glh: granuloza lutein hücre, beyaz ok: perinükleer dilatasyon, ok başı: Glh hücreler arası dilatasyon. TEM, x5000.

4.4. Biyokimya Analizleri

4.4.1. Hipofizyal Hormon Analizleri

Hipofizden salgılanan folikülogenez üzerinde doğrudan rol oynayan FSH ve LH hormon düzeyleri belirlendi. Hem FSH hem de LH düzeyleri karbonhidrat, yağ ve protein gruplarında sırasıyla artan oranlarda ve kontrol grubuna kıyasla anlamlı derece yüksek ($p < 0.001$) bulundu (Tablo 4.23).

Tablo 4.23: FSH ve LH düzeyleri

Grup	FSH		LH	
	Ortalama	S. Sapma	Ortalama	S. Sapma
Kontrol	10.53 ^a	0.26	29.17 ^a	0.67
Karbonhidrat	11.67 ^b	0.37	31.06 ^b	0.63
Yağ	13.10 ^c	0.34	33.41 ^c	0.68
Protein	14.23 ^d	0.62	36.20 ^d	0.90
p-değeri	<0.001		<0.001	

*Aynı harfler benzerliği, farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.

4.4.2. Ovaryan Hormon Analizleri

Ovaryum hücrelerinden salgılanan ve folikülogenezde rol oynayan hormonlardan progesteron ve östrojen hormonlarının düzeyleri belirlendi. Her iki hormonun düzeyleri karbonhidrat, yağ ve protein gruplarında kontrole göre anlamlı derecede yüksek ($p < 0.001$) bulundu. En yüksek FSH ve LH düzeyleri yağ grubunda tespit edildi (Tablo 4.24).

Tablo 4.24: Progesteron ve Östrojen düzeyleri

Grup	Progesteron (ng/mL)	E2 (ng/L)
	Ortalama \pm S. Sapma	Ortalama \pm S. Sapma
Kontrol	2.53 \pm 0.03 ^a	141.45 \pm 3.31 ^a
Karbonhidrat	4.39 \pm 0.26 ^b	153.12 \pm 5.01 ^b
Yağ	7.45 \pm 0.36 ^c	174.20 \pm 2.52 ^c
Protein	5.15 \pm 0.07 ^d	159.57 \pm 2.08 ^d
p	<0.001	

*Aynı harfler benzerliği, farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.

4.4.3. Yağ Doku Hormon Analizleri

Baslenme tipine bağlı olarak değişebilen ve dolaylı yoldan folikülogeneze etki eden yağ doku hormonlarından adiponektin, resistin ve leptin düzeyleri belirlendi. Adiponektin seviyesi kontrole göre karbonhidrat grubunda anlamlı derecede azalmış ($p<0.001$), yağ grubunda anlamlı derecede yüksek ($p<0.001$), protein grubunda ise benzer bulundu. Resistin hormon seviyeleri karşılaştırıldığında, yağ grubu kontrole göre anlamlı derecede düşük ($p<0.001$), protein ve karbonhidrat gruplarında anlamlı derece yüksek bulundu ($p<0.001$). Leptin hormonu açısından ise, yağ ve kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunmazken karbonhidrat ve protein grupları kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0.001$) (Tablo 4.25).

Tablo 4.25: Adiponektin, Resistin ve Leptin düzeyleri

Grup	Adiponektin ($\mu\text{g/L}$)	Resistin ($\mu\text{g/L}$)	Leptin ($\mu\text{g/L}$)
	Ortalama \pm S. Sapma	Ortalama \pm S. Sapma	Ortalama \pm S. Sapma
Kontrol	4.22 \pm 0.81 ^a	5.66 \pm 0.16 ^a	2.06 \pm 0.14 ^a
Karbonhidrat	2.45 \pm 0.33 ^b	8.53 \pm 0.33 ^b	4.16 \pm 0.13 ^b
Yağ	9.68 \pm 0.87 ^c	5.08 \pm 0.36 ^d	2.08 \pm 0.07 ^a
Protein	3.60 \pm 0.25 ^a	7.38 \pm 0.38 ^c	3.35 \pm 0.37 ^c
p	<0.001	<0.001	<0.001

*Aynı harfler benzerliği, farklı harfler istatistiksel farklılığı ifade etmektedir.

4.5. Moleküler Analizler

4.5.1. Real Time PCR Analizi

Real time PCR sonuçlarına göre ZP1, ZP2, ZP3, BMP15, GDF9, FOXO3a ve GAS2 genlerinin ortalama Ct, $2^{-\Delta\text{Ct}}$ değerleri Tablo 4.26 ve Tablo 4.27’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre hesaplanan gen ekspresyon ortalama kat sayı değişiklikleri Tablo 4.28’de yer almaktadır. Tüm genler için ekspresyon seviyeleri, standart sapmaları ile birlikte Şekil 4.68’de histogram olarak gösterilmiştir. Çalışılan tüm genler için ‘house keeping’ geni olan ATCB geni referans alınarak ve birbirine eşitlenerek hesaplama yapılmıştır.

Tablo 4.26: Real Time PCR sonuçlarına göre ortalama delta CT değerleri

Position	Gene Symbol	AVG ΔC_T			
		Control Group	Group 1	Group 2	Group 3
1	Beta Actin	0.00	0.00	0.00	0.00
2	ZP1	1.51	7.77	1.63	-0.43
3	ZP2	2.07	3.67	2.24	1.70
4	ZP3	1.68	2.65	0.97	0.64
5	BMP15	1.84	2.09	1.76	0.82
6	GDF9	2.37	0.83	0.95	0.08
7	FOXO3A	0.72	1.12	1.95	2.81
8	GAS2	1.49	0.45	2.58	2.75

Control group: kontrol grubu, group 1: karbonhidrat grubu, group 3: yağ grubu, group 4: protein grubu.

Tablo 4.27: Real Time PCR sonuçlarına göre ortalama delta $2^{-\Delta C_T}$ değerleri

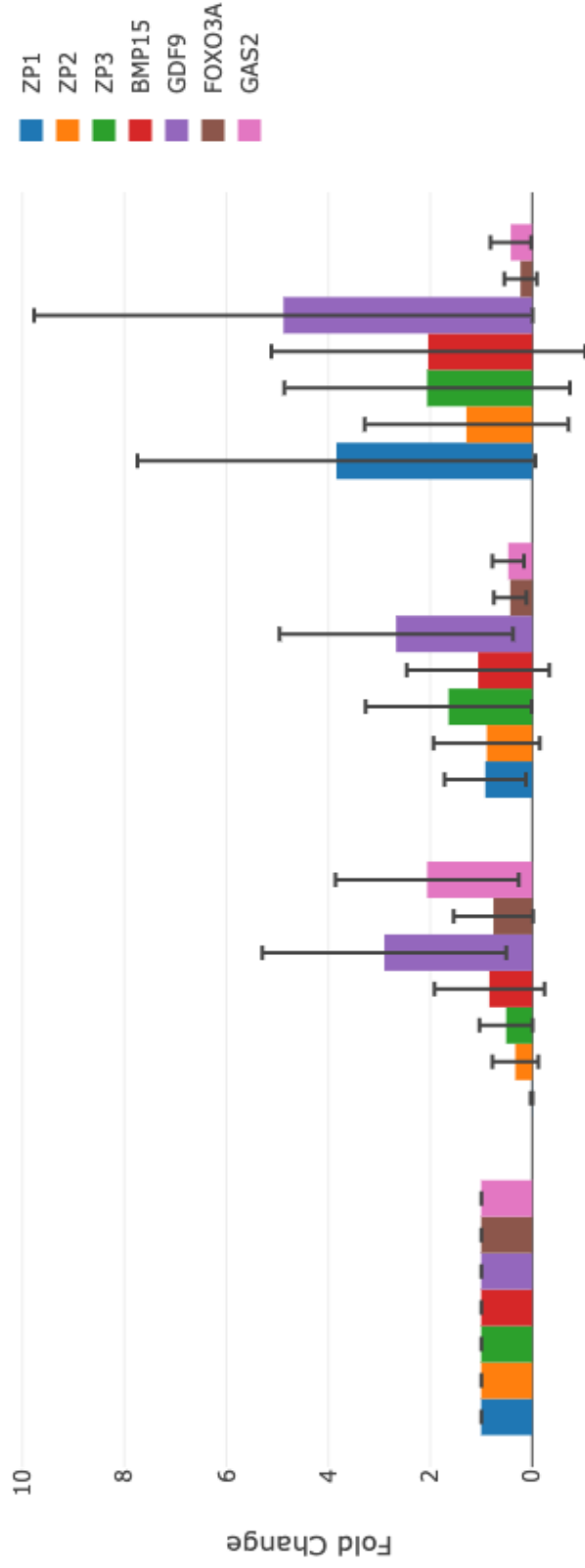
Position	Gene Symbol	$2^{-\Delta C_T}$			
		Control Group	Group 1	Group 2	Group 3
1	Beta Actin	1.000000	1.000000	1.000000	1.000000
2	ZP1	0.352086	0.004581	0.322641	1.350974
3	ZP2	0.237830	0.078781	0.212274	0.306934
4	ZP3	0.311219	0.158879	0.509093	0.639936
5	BMP15	0.278548	0.234230	0.294839	0.568015
6	GDF9	0.193446	0.560972	0.516199	0.943438
7	FOXO3A	0.607097	0.460094	0.258816	0.142201
8	GAS2	0.355519	0.731029	0.167009	0.148239

Control group: kontrol grubu, group 1: karbonhidrat grubu, group 3: yağ grubu, group 4: protein grubu.

Tablo 4.28: Real Time PCR sonuçlarına göre gen ekspresyon artış katsayıları

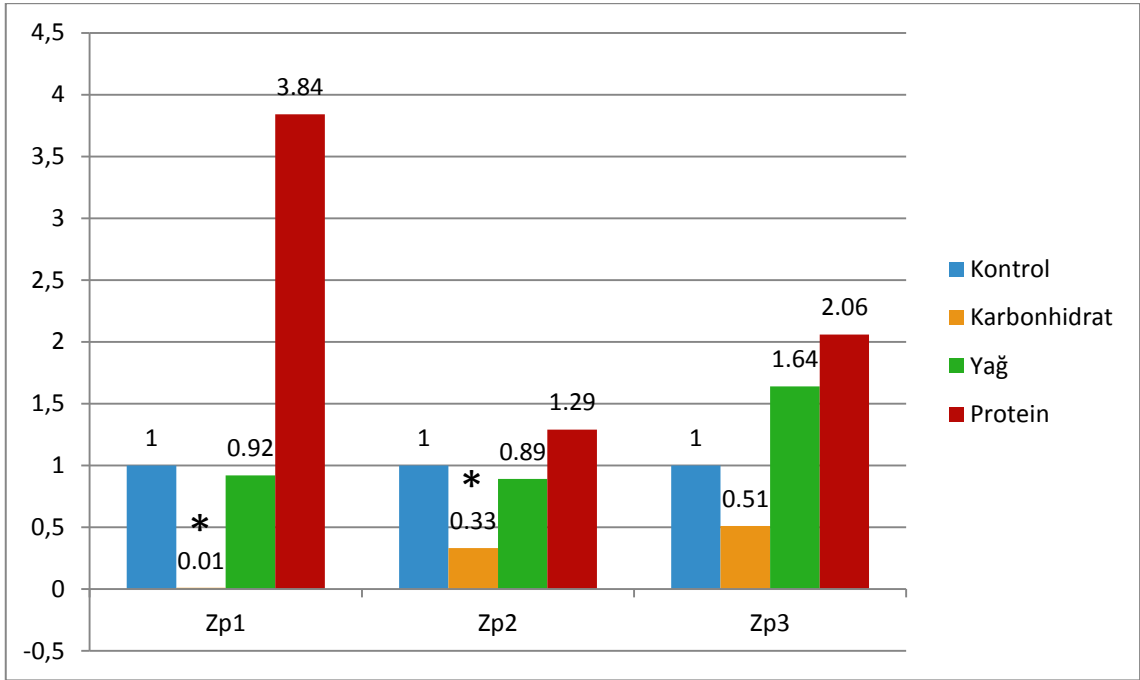
Position	Gene Symbol	Fold Change (comparing to control group)								
		Group 1			Group 2			Group 3		
		Fold Change	p-Value	Comments	Fold Change	p-Value	Comments	Fold Change	p-Value	Cor
1	Beta Actin	1.00	nan		1.00	nan		1.00	nan	
2	ZP1	0.01	0.005615		0.92	0.758584		3.84	0.112650	
3	ZP2	0.33	0.040916		0.89	0.280547		1.29	0.570404	
4	ZP3	0.51	0.171147		1.64	0.583523		2.06	0.368854	
5	BMP15	0.84	0.200508		1.06	0.543474		2.04	0.297665	
6	GDF9	2.90	0.014327		2.67	0.031187		4.88	0.038502	
7	FOXO3A	0.76	0.658407		0.43	0.050476		0.23	0.182623	
8	GAS2	2.06	0.166349		0.47	0.034955		0.42	0.159168	

*Group 1: karbonhidrat grubu, group 2: yağ grubu, group 3: protein grubu.



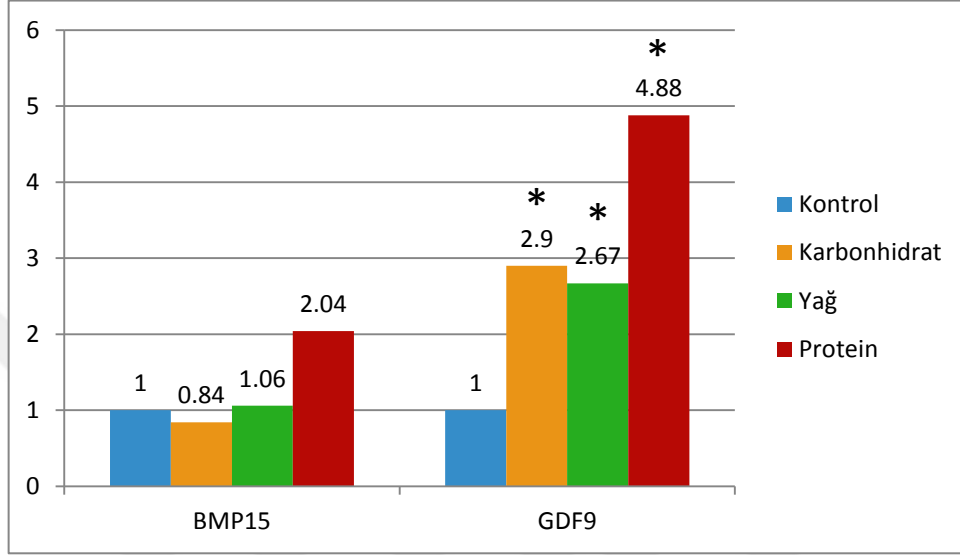
Şekil 4.68: Gruplar arası gen ekspresyonlarının karşılaştırılması

Zp1 RNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında, karbonhidrat grubunda kontrole kıyasla anlamlı derecede ($p<0.05$) azalma olduğu, protein grubunda ise anlamlı olmasa da yaklaşık dört katlık bir artış olduğu görüldü. Zp2 RNA seviyeleri açısından, karbonhidrat grubunda kontrole kıyasla yine anlamlı derecede azalma ($p<0.05$) görülürken yağ ve protein grupları kontrol grubundakine benzer bulundu. Zp3 RNA ekspresyonu değerlendirildiğinde ise kontrole göre karbonhidrat grubunda azalma, yağ ve protein gruplarında ise istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte artış tespit edildi (Şekil 4.69).



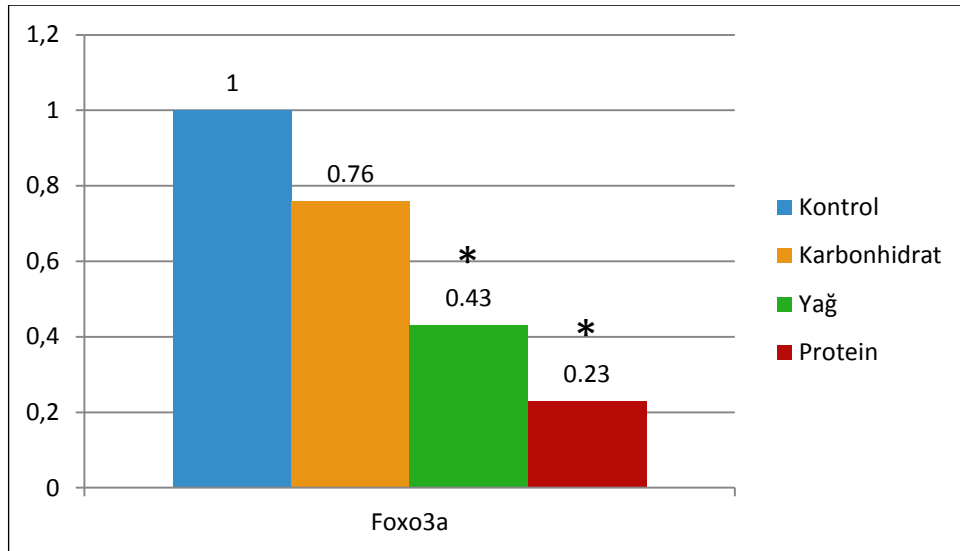
Şekil 4.69: Gruplar arası ZP1, Zp2, ve Zp3 RNA ekspresyonu

BMP15 RNA analizlerinde karbonhidrat ve yağ grubunda kontrole yakın değerler bulunurken protein grubunda kontrole göre anlamlı olmasa da yaklaşık iki katlık bir artış gözlemlendi. GDF9 RNA ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldığında ise karbonhidrat, yağ ve protein gruplarında kontrole göre anlamlı derecede ($p < 0.05$) artış olduğu görüldü (Şekil 4.70).



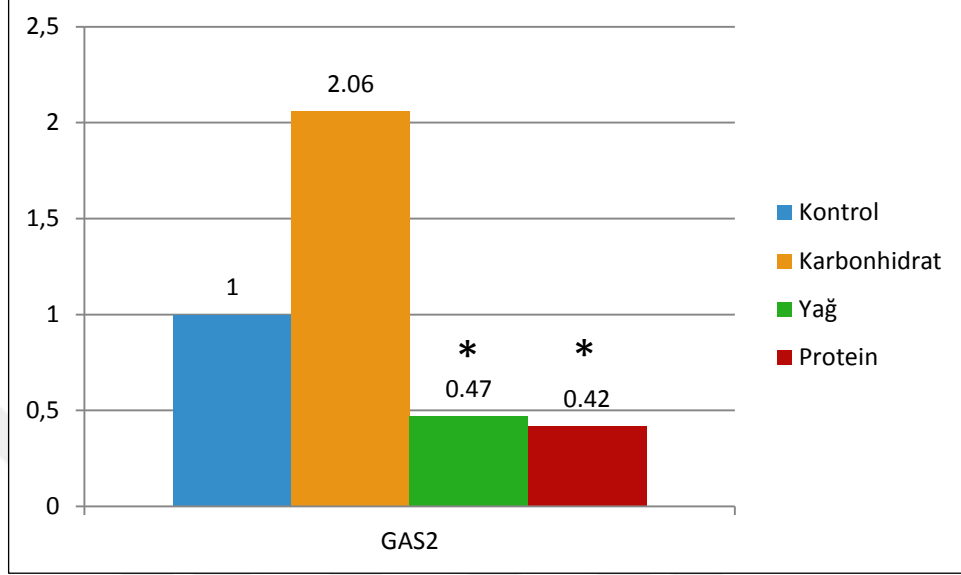
Şekil 4.70: Gruplar arası BMP15 ve GDF9 RNA ekspresyonu

Foxo3a RNA analizlerinde karbonhidrat grubu kontrole benzer bulunurken, yağ ve protein grubunda kontrole göre anlamlı derece ($p < 0.005$) azalma tespit edildi. (Şekil 4.71).



Şekil 4.71: Gruplar arası Foxo3a RNA ekspresyonu

GAS2 RNA analizlerinde ise karbonhidrat grubunda kontrole kıyasla anlamlı olmasa da yaklaşık iki kat artış görülürken, yağ ve protein grubunda kontrole göre anlamlı derece ($p < 0.005$) azalma görüldü (Şekil 4.72).



Şekil 4.72: Gruplar arası GAS2 RNA ekspresyonu

5. TARTIŞMA

Epidemiyolojik ve deneysel çalışmalardan elde edilen kanıtlar göstermektedir ki beslenme de dâhil olmak üzere erken dönem çevresel koşullar ilerleyen zamanda organizmanın gelişimini doğrudan etkilemektedir. Üreme sistemi de, çevresel faktörlere karşı son derece hassas olan bir sistemdir. Bu nedenle birçok canlı üreme için mevsim ve beslenme koşullarının en ideal olduğu zaman dilimlerini tercih ederler. Gün ışığı, iklim ve besin kaynakları gibi çevresel etmenler canlıların üremesi ve yavruların sağlıklı bir şekilde yaşamalarına devam edebilmeleri için oldukça önemlidir (57, 58).

Gelişmekte olan ülkelerde yetersiz beslenme; hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerde ise obezite ve beslenme bozuklukları insan sağlığı açısından büyük bir sorundur ve bu durum giderek daha yaygın hale gelmektedir. Özellikle gelişmiş ülkelerde beslenme bozuklukları ve obezite giderek yaygınlaşmakta ve tıbbi müdahaleyi gerektirebilmektedir (58). Beslenme alışkanlıkları normal vücut metabolizması ve fizyolojisi üzerinde doğrudan etkiye sahip olduğundan, neslin ve sağlıklı popülasyonların devamlılığını sağlayan üreme fonksiyonu ve üreme sistemi üzerine etkileri de ayrı bir öneme sahiptir.

Dişilerde üreme fonksiyonu erkeklere göre çok daha fazla enerji tüketimine ihtiyaç duyar. Yetersiz ve düzensiz beslenmeye karşı koruyucu bir mekanizma olarak hipotalamo-hipofizyal-ovaryal üreme eksenini beslenme durumuna göre kordineli fonksiyon gösterir. Dişilerde yetişkinliğe geçiş, gebelik ve laktasyon dönemleri hayat boyunca gereksinim duydukları enerji harcamasının en yüksek olduğu dönemlerdir. Bu nedenle düzensiz, dengesiz ve yetersiz beslenme durumlarının olumsuz etkilerine karşı dişi üreme sistemi erkeklerdekinden daha hassastır (58). Kilo kaybına yol açan yetersiz ve düzensiz beslenme bozuklukları ovulasyonun azalmasına veya kesintiye uğramasına neden olabilir. Vücuttaki enerji dengesinin sağlanmasıyla kilo kaybından sonra vücut ağırlığının tekrar normale dönmeye başlamasıyla ovulasyon da normale dönebilir. Bununla birlikte düzensiz beslenme kaynaklı kilo alımı ve obezite ise infertilite için daha büyük bir risk faktörüdür (58).

Yiyecekler, vücuttaki çeşitli temel fonksiyonların gerçekleşmesi için organizmalar tarafından enerji kaynakları ve yapısal moleküller olarak kullanılmaktadır. Yoksunluk zamanlarında hayatta kalmak için elzem olan bazı fonksiyonların (vücut ısısını muhafaza etmek gibi) devamı için oksitlenebilir substratların bulunması

gerekmektedir (58, 59). Bu nedenle normal bir beslenme sürecinde ihtiyaç fazlası olan enerji vücutta yağ olarak depolanır ve besin yetersizliğinde ihtiyacı karşılamak üzere enerjiye çevrilir. Uzun süreli enerji yoksunluğu veya fazlalığı ise birçok sistemi olduğu gibi üreme sistemini de doğrudan etkilemektedir. Üreme fonksiyonları üzerine enerji dengesinin önemli etkisi olduğundan (58) düzensiz ve dengesiz beslenme infertilite üzerinde doğrudan rol oynayabilir.

Beslenme ve infertilite üzerine yapılan çalışmalarda genellikle obezite veya açlık durumlarında dişi üreme sistemindeki fonksiyonel değişiklikler gözlenmiş ve bu konuda birçok veri sunulmuştur. Çalışmamızda ise organizmalar tarafından tüketilen, tüm yiyeceklerin temelini oluşturan ve makro-besinler olarak sınıflandırılan karbonhidrat, protein ve yağ ile zenginleştirilmiş diyetlerin dişi üreme sistemi ve infertilite üzerine etkileri araştırıldı.

Beslenme ve vücut ağırlığı ilişkisi

Beslenme tarzı ile vücut ağırlığı arasında doğrudan bir ilişki vardır. Beslenme tipine, besin alım miktarı ve sıklığına bağlı olarak vücuda alınan enerji miktarı harcanan enerji miktarından fazla ise kilo alımına, az ise kilo kaybına neden olmaktadır. Alınan toplam enerjinin miktarını da tüketilen besinlerin içeriği belirlemektedir. Karbonhidrat ağırlıklı beslenmelerde ihtiyaçtan fazla olan karbonhidratlar yağ olarak depolanmaktadır ki bu da kilo alımına ve ilerleyen dönemlerde obeziteye neden olabilmektedir (43). Yağ içerikli besinler ise zaten yüksek kalori sağladıklarından kısa sürede kilo alımına ve obeziteye neden olabilmektedir. Bu nedenle de birçok deneysel uygulamada da obezite modeli oluşturmak için deneklere yüksek yağ diyetleri uygulanmaktadır (60, 61). Uzun süreli protein diyetleri ise normal şartlar altında kilo kaybına neden olmaktadır (62, 63).

Çalışmamızda kullanılan denekler, süttten yeni kesilmiş yavru dişi sıçanlar olup normal gelişim aşamasında olduklarından tüm gruplarda deney sonunda deney başlangıcına göre kilo alımı tespit edildi. Deney başlangıcında her grubun ağırlık ortalaması farklı olduğundan deney sonu ile deney başlangıcı arasındaki ağırlık farkları karşılaştırıldı. Kontrol grubuna kıyasla en fazla kilo alımı yağ grubunda gözlenirken, karbonhidrat ve protein gruplarında kontrole benzer şekilde daha az kilo alımı saptandı. Vücut kitle indeksi oranları karşılaştırıldığında da gruplar arası istatistiksel fark bulunmadı. Toplam kilo alımı ve VKİ karşılaştırmalarında gruplar arası fark görülmemesinin temel nedeninin, sıçanların deney başlangıcında prepuberte evresinde olmaları, dolayısıyla alınan kalorilerin normal vücut gelişimine ve büyümeye harcanmış olduğu düşünülmektedir. Çünkü literatürde besin diyetleri ile yapılan çalışmalarda

genellikle yetişkin sıçanlar kullanıldığından kilo alımı açısından gruplar arası fark kısa sürede daha belirgin bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Yapılan çalışmalarda en az on haftalık yüksek yağlı diyetle yetişkin farelerde VKİ'nin obezite değerlerine ulaştığı bildirilmektedir (64). Çalışmamızda ise yavru sıçanların yüksek yağ diyeti sonucu diğer gruplara kıyasla daha fazla kilo aldıkları görüldü. Bununla birlikte yağ grubundaki sıçanlarda diğer gruplardakine kıyasla daha fazla kilo alımı olmasına rağmen VKİ ölçümleri obezite değerlerine ulaşmamıştır. Prepubertal evreden başlayan 80 günlük deney süresince sıçanlar gelişim dönemlerinde oldukları için ve bu dönemde yüksek enerji gerektiren hızlı metabolizmaları nedeniyle VKİ'lerinin obezite değerlerine ulaşmadığı düşünülmektedir. Vücut ağırlıklarına benzer şekilde gruplar arası ovaryum ağırlıkları karşılaştırıldığında da anlamlı bir fark tespit edilmedi (Tablo 4.3). Grup içi toplam tüketilen yem miktarları kıyaslandığında ise en fazla yem tüketimi karbonhidrat grubunda gözlenirken en az yem tüketiminin ise yağ grubunda olduğu gözlemlendi. Makrobesinlerin enerji içerikleri artan sıraya göre karbonhidrat, protein ve yağ şeklindedir (65, 66). Bu nedenle gram başına düşen kalori miktarı karbonhidrat grubunda en az olduğundan ve karbonhidrat diyeti yağ ve protein açısından zayıf olduğundan gelişim aşamasındaki enerji ihtiyacını karşılamak için bu grupta ağırlık olarak daha fazla yem tüketildiği tespit edildi. Diğer besin öğelerine göre yağların her bir gramında daha fazla kalori bulunduğundan yağ grubunda en az yem tüketiminin olduğu belirlendi. Besin tüketim miktarı açısından protein grubunun kontrol grubuna en yakın olan grup olduğu görüldü.

Beslenme ve Menstrual Siklus Düzeni

Puberte, dişilerde üreme fonksiyonun biyolojik olarak ilk gerçekleşmesinin mümkün olduğu zamanı ifade etmektedir (67, 68). Birçok araştırmacı tarafından pubertel gelişimi etkileyen en önemli faktörlerin başında çocukluk ve prepubertal dönemdeki yeterli ve dengeli beslenmenin olduğu belirtilmektedir (67). Beslenmenin pubertal gelişime etkisi hayvanlar üzerinde yapılan farklı besin diyeti uygulamalarıyla gösterilmiştir (67). Sıçanlarda puberte yaşının yaklaşık olarak 5-6 hafta olduğu ve yüksek yağ diyet uygulamalarında puberte yaşının kısaldığı bildirilmektedir (67). Çalışmamızda her üç diyet grubunda da puberteye ulaşma süresinin aynı oranda kısaldığı tespit edildi. Kontrol grubunda puberte yaşı ortalaması 37.9 gün olarak bulunurken diğer üç grupta 37.4 olarak belirlendi. Benzer şekilde, Kirtley D. ve ark. tarafından Osborne-Mendel cinsi sıçanlar üzerinde yapılan yüksek yağ diyeti uygulamasında (32.8 gün), düşük yağ diyetine göre (39.7 gün) puberte yaşında anlamlı

derecede düşüş olduğu gözlenmiştir (69). Yapılan birçok obezite çalışmalarında da yüksek yağ diyetinin erken puberteye neden olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızda, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da yağ diyetiyle birlikte karbonhidrat ve protein diyetlerinde de puberte yaşının azaldığı görülmüştür.

Dişilerde enerji alımının çok düşük olması durumunda, menstrual düzensizlikler de dahil olmak üzere üreme sistemi ile alakalı ciddi sağlık problemleri ortaya çıkabilmektedir (70, 71). Makrobesin öğelerinin yeterli düzeyde alınmaması menstrual düzensizliklere bağlı olarak infertilite gibi ciddi sağlık problemlerine neden olabilir (72). Bu nedenle dengeli beslenme menstrual döngü düzeni ve buna bağlı sağlıklı üreme fonksiyonu için oldukça önemlidir. Mandl ve ark. tarafından yapılan çalışmada sıçanlarda normal menstrual döngü uzunluğu 4.4 gün olarak hesaplanmıştır. Çalışmamızda da kontrol grubunda menstrual siklus uzunluk ortalaması 4.4 gün olarak bulundu. Kontrol grubuna göre karbonhidrat grubunda kısalmış (4.3 gün), protein (5.0 gün) ve yağ grubunda (4.6 gün) uzamış menstrual döngü tespit edildi. Deneysel uygulama boyunca gruplardaki toplam menstrual siklus sayıları karşılaştırıldığında dört günlük normal siklus sayısının protein ve yağ gruplarında anlamlı derecede azaldığı gözlemlendi (Tablo 4.4, açık yeşil alanlar). Dolayısıyla uzamış ve anormal menstrual siklus sayıları da protein ve yağ gruplarında daha yüksek bulundu (Tablo 4.4, koyu yeşil ve kırmızı alanlar). Bu bulgularımıza benzer şekilde, Lilia BS ve ark. tarafından insanlar üzerinde yapılan kapsamlı bir çalışmada obez kadınların %18.3'ünde oligomenore, (uzamış menstrual siklus döngüsü) ve %11.7'inde amenore (kısalmış menarş evresi) geliştiği gösterilmiştir (73). Yine aynı çalışmada tip 2 diyabet ve glukoz intoleransının oligomenore ve amenoreye sebep olduğu gösterilmiştir. Karbonhidratlar hızlı bir şekilde kan glikoz seviyesini yükseltirken yağ ve proteinler daha uzun sürede glikoza dönüşüp kan glikoz seviyesini yükseltebilirler (61, 74-77). Yağ ve protein diyeti ile beslenen gruplarımızda sıçanlar uzun süre bu diyetlerle beslendiklerinden bu grupların kan glukoz düzeylerinin yüksek olması nedeniyle, glukoz intoleransına bağlı olarak menstrual siklusun bu iki grupta uzamış olabileceği düşünülmektedir.

Menstrual siklus evreleri (P, E, M, D) kendi içerisinde değerlendirildiğinde menstrual siklusun uzadığı gruplarda, yani protein ve yağ gruplarında proestrous evresi kısalırken, diestrous evresinin uzadığı görüldü (Tablo 4.8). Proestrousun kısalması protein ve yağ ağırlıklı beslenmenin amenoreye sebep olduğunu, diestrousun uzaması ise protein ve yağ ağırlıklı beslenmenin oligomenoreye sebep olduğunu göstermektedir. Zheng T ve ark. tarafından yapılan çalışmada yüksek protein ve yağ içerikli diyetlerin

immün sistemi zayıflattığı ve Non-Hodgkin's Lymphoma riskini arttırdığını gösterilmiştir (78). Diestrous, uterus endometriyumunun kendisini yenileme evresi olduğundan bu evrenin kontrole göre anlamlı derecede uzamasının, protein ve yağ ağırlıklı beslenmeye bağlı immün sistemdeki zayıflamayla ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Beslenme ve Folikül Sayıları

Üreme sisteminin gelişimi ve olgunlaşması diğer sistemlerde olduğu gibi erken dönem beslenme koşullarından doğrudan etkilenir. Bu son derece normal ve beklenen bir durumdur çünkü primordiyal folikül havuzu hayatın erken dönemlerinde olgunlaşır ve çevresel etmenlere karşı oldukça hassastır. Klinik ve deneysel çalışmalar göstermektedir ki erken dönem beslenme problemleri folikül rezervinde azalmaya, ovulasyon oranlarında değişime ve puberte yaşına erişmede farklılıklara neden olmaktadır (79). Çalışmamızda da farklı beslenme tiplerine bağlı olarak primordiyal folikül rezervinden preovulatuvar folikül sayısına kadar kontrol grubuna kıyasla önemli değişiklikler tespit edildi. Gruplar arası primordiyal folikül rezervi karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede olmasa da kontrole kıyasla tüm gruplarda azalma gözlemlendi (Tablo 4.9, Şekil 4.7-4.12). En az folikül rezervinden en fazla folikül rezerv miktarları sırasıyla protein, yağ, karbonhidrat ve kontrol grubu olarak sıralandı. Primer folikülden preovulatuvar foliküle kadar normal gelişim aşamalarındaki tüm folikül tiplerinde özellikle yağ ve protein gruplarında kontrol grubuna kıyasla azalma, atretik folikül sayısı açısından ise artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.13). Genel anlamda, yüksek oranda karbonhidrat, protein ve yağ diyetlerinin hem folikül rezervini hem de folikülogenezi olumsuz yönde etkilediği tespit edildi. Bununla birlikte atretik folikül sayısındaki artış da özel diyet gruplarında gelişmekte olan foliküllerin gelişimini tamamlamadan atreziye uğradıklarını düşündürmektedir. Caspase-3 immünreaktivite skorunun bu gruplarda yüksek bulunması bu durumu desteklemektedir. Yapılan bazı çalışmalarda, yüksek protein ve yağ diyetlerinin kan glikoz seviyelerini yükselttiği ve bunun da daha yüksek enerji sağlayarak folikülogenezin indüklenmesine neden olduğu belirtilmiştir. Teleni ve ark. glikoz da dahil olmak üzere bazı enerji maddelerinin intravenöz yolla koyunlara verilmesi sonucunda artan enerji kaynağı nedeniyle ovulasyon oranlarında artış olduğu sonucuna varmışlardır. Bu nedenle glikoz ihtiyacının %35'ini amino asitlerden karşılayan sığırlarda, protein diyetinin kan glikoz seviyesini arttırmasına ve buna bağlı yüksek enerji nedeniyle ovulasyonun artmasına neden olduğunu belirtmektedirler (77). Bununla birlikte Irene S ve ark. tarafından insanlar

üzerinde yapılan bir çalışmada yüksek protein diyetinin antral folikül sayısında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (80). Yani bazı çalışmalar yüksek protein diyetinin folikülogenezi indüklediğini, bazı çalışmalar ise folikülogenezi indüklemekle birlikte folikülogenez sürecinin tamamlanamamasına neden olduğunu göstermektedir. Ayrıca yüksek yağ diyeti ile yapılan birçok çalışmada, yüksek yağ diyetinin de folikül rezervinin azalmasına neden olduğu gösterilmiştir (81, 82). Gerek protein diyetleri gerekse de yağ diyetleri ile beslenme sonucu ovulasyon oranındaki bu artış daha fazla folikülogenez gerçekleştiğini ve doğal olarak da folikül rezervinin daha kısa sürede azalmasına neden olduğunu göstermektedir. Literatür bilgilerine benzer olarak, çalışmamızda özel diyet gruplarında, özellikle de protein ve yağ gruplarında primordiyal folikül rezervinin azalması folikülogenezin ileri düzey indüklenmesine bağlı olabilir. Ancak sağlıklı preovulatuvar folikül sayılarındaki azalma, atretik folikül sayılarındaki ve Caspase-3 immünreaktivitesindeki artış ise indüklenen folikülogenez sürecinin sağlıklı tamamlanamadığını göstermektedir. Folikül gelişiminin indüklenmesine rağmen, normal foliküler gelişimin sağlıklı bir şekilde preovulatuvar folikül aşamasına erişememesinin nedenlerinin ve bu süreçteki mekanizmaların aydınlatılması için de daha spesifik ve kapsamlı çalışmalar gerekmektedir.

Natalie M ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada yüksek yağ diyeti ile beslenmenin obezite gelişmesine bile gelişmekte olan ovaryan foliküllerin sayısının azalmasına neden olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte korpus luteum sayısının ise yüksek yağ diyeti grubunda kontrol grubundakine kıyasla daha yüksek olduğu gözlenmiştir (61). Benzer şekilde çalışmamızda da karbonhidrat, protein ve yağ gruplarında, tersiyer ve preovulatuvar folikül sayıları kontrol grubundakine oranla daha düşük bulunmasına rağmen, ovulasyondan sonra gelişen korpus luteum sayıları kontrol grubundaki ile istatistiksel olarak benzer bulundu. Bu durum, ovulasyondan belirli bir süre sonra dejenere olan korpus luteumların her üç diyet grubunda da kontrole göre daha uzun süre fonksiyonlarını sürdürmekte olduklarını düşündürmektedir. Nitekim çalışmamızda yapılan ovaryan hormon analizlerine göre her üç diyet grubunda progesteron seviyelerinin kontrol grubundakine göre anlamlı derecede yüksek bulunması, aktif korpus luteumların karbonhidrat, yağ ve protein gruplarında daha fazla sayıda bulduklarını göstermektedir. Hem literatürde hem de çalışmamızda elde edilen bu verilere göre ovulasyon öncesi foliküler evre olan antral foliküllerin sayısının az olmasına rağmen ovulasyon sonrası gelişen korpus luteum sayılarının kontrole benzer

olmasının altında yatan sebeplerin detaylı olarak aydınlatılması, kapsamlı ve daha ileri düzey araştırmalar gerektiren ayrı bir konu olarak ortaya çıkmaktadır.

Yüksek protein ve yağ diyetlerinin folikülogenezi indüklemesine rağmen normal folikülogenez sürecini olumsuz yönde etkilediğinin en belirgin kanıtı atretik folikül sayısıdır. Wang Na ve ark. tarafından obez fareler üzerinde yapılan bir çalışmada yüksek yağ diyetinin folikülogenez için indüklenen folikül sayısını arttırmakla birlikte atretik folikül sayısını da kontrole göre anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir (83). Benzer şekilde, çalışmamızda da atretik folikül sayısı yağ ve protein gruplarında kontrol ve karbonhidrat gruplarına göre daha yüksek bulundu. Bu bulgular göstermektedir ki primer folikülden preovulatuvar foliküle kadar foliküler gelişimin tüm evrelerinde normal fizyolojik şartlar altında da gerçekleşen folikül atrezisi, yağ ve protein ağırlıklı beslenme sonucu daha da artarak ovulasyon aşamasına ulaşan folikül sayısının azalmasına neden olmaktadır.

Morfometrik Ölçümler

Bir oositin kalitesini gösteren önemli kriterler; oosit hacmi, oosit şekli, sitoplazmik içerik ve zona pellusida yapısı olarak bilinmektedir. Oosit hacmi, oosit maturasyonunun önemli bir göstergesidir. Gelişimini tamamlayamayan ve gerekli hacme ulaşamayan oositlerin fertilizasyon kapasiteleri de düşüktür. Akbariasbagh F ve ark. tarafından insanlardan elde edilen oositler üzerinde yapılan bir çalışmada düşük hacimli oositlerin fertilizasyon oranının, normal hacimdeki oositlerin fertilizasyon oranına göre anlamlı derecede düşük olduğu gösterilmiştir (84). Begona A ve ark. tarafından keçiler üzerinde in vitro ortamda yapılan başka bir çalışmada, 110 µm çaptan daha küçük oositlerin fertilizasyonu sonucunda sağlıklı embriyo oluşmadığı, 125-135 µm aralığında çapa sahip oositlerin fertilizasyonu sonucu ise optimum düzeyde embriyo gelişimi bildirilmiştir (85). Aynı çalışmada, aşırı büyük (>135 µm) oosit hacminin de sağlıklı gelişen embriyo sayısında azalmaya neden olduğu ve embriyo gelişimini olumsuz etkilediği rapor edilmiştir. Foliküler gelişimde oosit hacminin fertilizasyon kapasitesi ve embriyo gelişimi için önemi nedeniyle çalışmamızda oosit ve folikül çapları ölçülerek gruplar arası karşılaştırma yapılmıştır. Hacimsel gelişim primer folikülden itibaren başladığı için primordiyal folikül çapları ölçülmemiştir. Primer evre oosit çapları açısından sadece protein grubunda diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede artış saptandı. Sekonder folikül evresindeki oosit çapları açısından yağ ve protein gruplarında kontrol grubundakine göre anlamlı derecede azalma, folikül çapları

açısından ise sadece protein grubunda kontrol grubundakine göre anlamlı derecede azalma tespit edildi. Tersiyer evre foliküllerdeki oosit çapının karbonhidrat grubunda kontrol grubuna göre anlamlı derecede azaldığı belirlendi. Protein grubunda ise hem oosit çapında hem de folikül çapında kontrol grubundakine göre anlamlı derecede artmış olduğu tespit edildi. Ovulasyona en yakın evre olan preovulatuvar evre foliküllerdeki oosit çapları karşılaştırıldığında karbonhidrat ve yağ gruplarında kontrol grubundakine göre anlamlı derecede azaldığı saptandı. Protein grubunda ise preovulatuvar evre foliküllerdeki oosit çapının istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da kontrol grubundakine kıyasla daha düşük, yağ grubundakine yakın olduğu tespit edildi. En düşük çapa sahip olan karbonhidrat grubunda, Zp1, Zp2 ve Zp3 RNA ekspresyon düzeylerinin diğer gruplardakine kıyasla düşük olması, zona pellusidanın fertilizasyondaki fonksiyonunun yanı sıra normal oosit gelişimi ve oosit hacminin belirlenmesinde de önemini ortaya koymaktadır.

Histopatolojik Hasar Skorları

Folikülogenezde normal folikül gelişimi için folikül mikro çevresi önemli rol oynadığından çalışmamızda stromal dokudaki konjesyon ve inflamasyon bulguları skorlanmıştır. Ayrıca salgıladığı hormonlar üzerinden, dolaylı olarak folikülogenezi etkileyen korpus luteumlarda da konjesyon ve inflamasyon parametreleri değerlendirildi.

Normal folikülogenez ve ovulasyon için inflamasyon gerekli bir süreç olmakla birlikte, obezite, polikistik over sendromu (PCOS), yetersiz beslenme ve düşük fiziksel aktivite gibi nedenlerle ortaya çıkan kronik inflamasyon, folikülogenez ve üreme fonksiyonu dinamiklerini bozar (86). Trans-yağlar, hayvansal protein içerikli, glisemik indeksi yüksek ve lif içeriği zayıf olan besinler proinflamatuvar gıdalar olarak kabul edilmekte ve infertiliteye neden oldukları bildirilmektedir (86). Çalışmamızda ovaryum bağ dokusunda; her üç diyet grubunda da kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede olmasa da inflamasyon skorlarında artış olduğu gözlenirken, konjesyon açısından yağ ve protein gruplarında kontrol grubundakine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede artış gözlemlendi. Korpus luteumlarda ise, hem inflamasyon hem de konjesyon skorları karbonhidrat, yağ ve protein gruplarının üçünde de kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Literatürde belirtilen bilgiler de göz önünde bulundurulduğunda, özellikle yağ ve protein gruplarındaki folikül sayılarındaki azalmanın altında yatan patofizyolojik

sebeplerden birisinin de bu gruplarda gözlenen yüksek orandaki konjesyon ve kronik inflamasyonun olabileceğini düşündürmektedir.

Folikülogenez ve Oosit Spesifik Protein Ekspresyon Düzeyleri

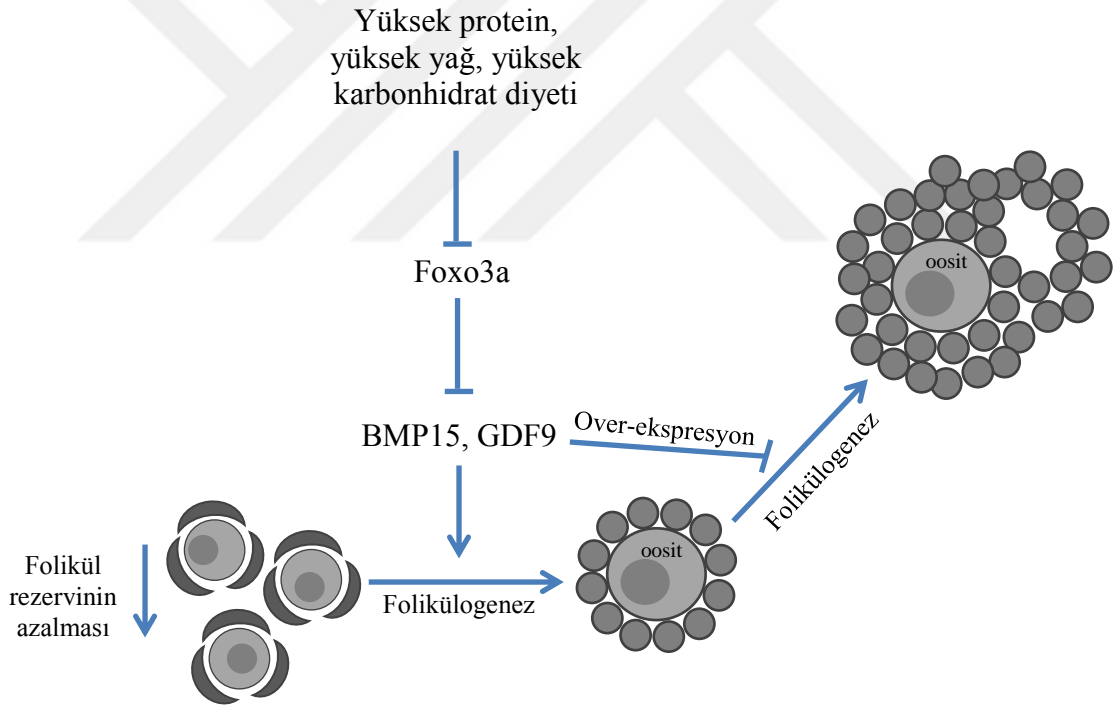
Tüm hücrel fonksiyonlarda ve farklılaşmalarda olduğu gibi folikülogenez ve oosit gelişiminde de çok sayıda spesifik molekül rol oynamaktadır (18). Bu moleküllerin düzeylerinin normalden az veya çok olması folikül ve oosit gelişimini doğrudan etkilemektedir. Çalışmamızda, folikülogenez sürecinde rol oynayan bazı önemli gen ve proteinlerin ekspresyon seviyeleri immunohistokimyasal olarak protein düzeyinde, real-time PCR metodu ile RNA düzeyinde çalışılarak beslenme tipine bağlı değişiklikleri tespit edildi.

BMP15 ve GDF9 folikül gelişiminin ilk ve ileri evrelerinde granuloza hücrelerinin büyüme ve çoğalmalarında, ovulasyona uğrayacak oositlerin sayısının belirlenmesinde ve granuloza hücrelerinin apoptoza uğramasının engellenmesinde, oositin büyümesinde ve canlılığını devam ettirmesinde koordineli rol oynayan ve birlikte etki gösteren düzenleyici proteinlerdir (26, 27, 31). Çalışmamızda BMP15 proteini için immünreaktivite düzeyleri açısından gruplar arasında fark bulunmadı. GDF9 proteini immünreaktivitesi ise karbonhidrat ve yağ gruplarında kontrol grubundakine göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu. Yapılan RNA analizlerine göre, BMP15 ekspresyonu sadece protein grubunda kontrole kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunurken, GDF9 ekspresyonu her üç grupta da kontrole göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Özellikle protein grubunda GDF9 ekspresyonu kontrol grubundakine göre yaklaşık beş kat, karbonhidrat ve yağ gruplarına göre yaklaşık iki kat yüksek bulundu. BMP15 ve GDF9 proteinlerinin belirli bir düzeyde ekspresyonu normal folikül ve oosit gelişimi için kritik önem taşır. Bununla birlikte gereğinden fazla ekspresyonları da folikül gelişimini olumsuz etkileyebilmektedir. ZJ Lan ve ark. tarafından fareler üzerinde yapılan bir çalışmada BMP15 ve GDF9 genlerinin aşırı ekspresyonlarının yavru sayısının azalması ve menstrual siklus süresinin uzaması ile hipofertiliteye neden olduğu gösterilmiştir (87). Yine Y Peng ve ark. tarafından farelerde yapılan başka bir çalışmada da BMP15 ve GDF9 proteinlerinin heterodimerik olarak birlikte rol oynadığı ve normal oosit gelişimi için çok spesifik bir düzeyde ekspresyonun gerekli olduğu gösterilmiştir (31, 88). Bu çalışmalar göstermektedir ki, bu iki proteinin ekspresyon seviyelerinin azalması gibi, normalin üstünde olması da folikül ve oosit gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Çalışmamızdaki veriler değerlendirildiğinde BMP15 ve GDF9 ekspresyon miktarları ile

ileri evre folikül sayıları ve oosit çapı arasında ters orantı olduğu görülmektedir. BMP15 geni RNA düzeyinin protein grubunda, GDF9 geni RNA düzeyinin ise her üç diyet grubunda kontroldekine göre anlamlı derecede yüksek olmasına rağmen, bu gruplarda folikül sayılarının kontrole göre azalmış olduğu görüldü. Özellikle de protein grubuna dikkat edilecek olursa, hem BMP15 hem de GDF9 RNA düzeyleri diğer gruplara göre daha yüksek iken, sekonder folikül hariç olmak üzere folikül sayısı açısından bu grupta diğer tüm folikül tiplerinin en az sayıda olduğu görülmektedir. Bu da göstermektedir ki, BMP15 ve GDF9 proteinlerinin normalin üstündeki ekspresyon miktarları, ters orantılı olarak folikül sayısında azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca JZ Lan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, bu proteinlerin aşırı ekspresyonlarının menstrual siklus uzunluklarının da artmasına neden olduğu belirtilmektedir (87). Elde ettiğimiz menstrual siklus verileri incelendiğinde de en uzun siklus süresinin yağ ve protein gruplarında, yani BMP15 ve GDF9 RNA düzeylerinin yüksek olduğu gruplarda olduğu görülmektedir. Yani, BMP15 ve GDF9 proteinleri yağ ve protein diyeti sonucu ileri düzeyde ekspres edilmekte, buna bağlı olarak da gerek folikül sayısının azalmasına ve gerekse de menstrual siklus süresinin uzamasına neden olarak normal oosit gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir.

Folikülogenezde rol oynayan ve çalışmamızda araştırdığımız proteinlerden birisi de Foxo3a proteindir. Memeli ovaryumunda Foxo3a proteini granüloza hücrelerinin apoptozunu indükleyerek folikül atrezisini ve folikül büyümesini düzenler (38). Bununla birlikte Foxo3a proteini, rezerv foliküller olan primordiyal foliküllerin aşırı aktivasyonunu baskılayarak folikül rezervini koruyup dişi üreme periyodunun düzenlenmesinde önemli rol oynar (38, 40). Foxo3a'nın etki mekanizmasına bakıldığında, primordiyal foliküllerde BMP proteinlerini baskıladığı ve bu mekanizma üzerinden folikül gelişimini düzenlediği görülmektedir (Şekil 2.7) (39). Çalışmamızda immünohistokimyasal olarak Foxo3a+ primordiyal foliküller sayılarak toplam primordiyal foliküller içindeki yüzdeleri hesaplandı. İmmünohistokimya skorlama sonuçlarına göre Foxo3a+ primordiyal folikül yüzdesi karbonhidrat ve yağ gruplarında kontrol grubundakine kıyasla azalmış olduğu görülmekle birlikte gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede farklılık saptanmadı. Foxo3a RNA ekspresyon düzeylerine bakıldığında ise kontrole göre yağ ve protein gruplarında anlamlı derecede, karbonhidrat grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da azalma tespit edildi. Elde edilen verilere göre, Foxo3a etki mekanizması da düşünüldüğünde, Foxo3a ekspresyonunun yağ ve protein gruplarında azalması, BMP15 ve GDF9'un

ekspresyonunun artması, dolayısıyla da rezerv durumundaki primordiyal foliküllerin foliküler gelişim için indüklenmesiyle sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, özellikle yağ ve protein gruplarında folikül rezervlerindeki azalmanın altında yatan temel moleküler sebebin, azalan Foxo3a proteini sonucu BMP ve GDF9'un ekspresyonunun artması olduğu düşünülmektedir (Şekil 5.1). Ancak daha önce de belirtildiği gibi, BMP15 ve GDF9'un aşırı ekspresyonu ise ileri düzey folikül gelişimini olumsuz etkilediğinden, dengesiz beslenmeye bağlı Foxo3a ekspresyon düzeyindeki azalma, buna bağlı olarak da BMP15 ve GDF9'daki artış, ovaryumda hem rezerv folikül sayısının hızlı bir şekilde azalmasına, hem de sağlıklı folikül gelişiminin engellenmesine neden olarak infertiliteyle sonuçlanabileceğini göstermektedir (Şekil 5.1). Karbonhidrat, yağ ve protein makrobeseinlerinin hangi mekanizma ile Foxo3a'yı baskıladı ve Foxo3a'dan bağımsız olarak BMP15 ve GDF9'u doğrudan etkileyip etkilemedikleri ise bu noktada aydınlatılması gereken bir durumdur.



Şekil 5.1: Besin diyetlerinin folikülojeniz üzerine etki şeması

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz diğer bir protein ise GAS2 proteindir. GAS2 proteini birçok hücrede sentezlenmekle birlikte ovaryum stromal hücrelerinde daha belirgin olmak üzere oosit ve folikül hücrelerinde de sentezlenir ve normal folikül gelişimi için gerekli bir proteindir (42). Drosophila ve domuzlarda yapılan çalışmalarda GAS2 mutasyonunun kısırılık ile sonuçlandığı gösterilmiştir (42, 89). GAS2 mutant

farelerle yapılan başka bir çalışmada da, GAS2 eksikliğinde farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerin etrafındaki bazal lamina yapısının bozulduğu ve toplam folikül sayılarında büyük oranda azalma olduğu gözlenmiştir (42). Çalışmamızda GAS2 immünreaktivitesi açısından karbonhidrat grubu kontrol grubundaki ile benzer bulundu. Protein grubu GAS2 immünreaktivitesinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede azalmış, yağ grubunda ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da yine azalmış olduğu tespit edildi. Çalışmamızda karbonhidrat grubunda GAS2 RNA ekspresyon düzeyinin kontrole göre anlamlı derecede arttığı, protein ve yağ gruplarında ise anlamlı derecede azaldığı tespit edilmiştir. GAS2 ekspresyonundaki bu azalma, yağ ve protein gruplarındaki toplam folikül sayılarındaki azalmanın altında yatan diğer bir faktör olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, GAS2'nin folikülogenezdeki etkisi yeni tanımlandığından etki mekanizmasına dair henüz yeterli bilgi bulunmamaktadır (42).

Zp1, Zp2 ve Zp3 proteinleri oositin etrafını saran zona pellusidayı oluşturarak oosit gelişimde ve fertilizasyonda büyük öneme sahiptirler (20) (90). Zp3 proteini tür-spesifik sperm bağlanmasında (91) rol oynarken Zp2 de ileri düzey sperm bağlanmasında rol oynar. Zp1 proteini ise Zp2 ile Zp3 proteinlerini çapraz olarak birbirine bağlayarak normal zona pellusidanın oluşmasında rol oynar (21). Eksik ZP1 ekspresyonu Zp3'ün sitoplazmada çökmesine ve zona pellusidanın oluşmamasına neden olur (22). Çalışmamızda, IHC skorlamalarına göre karbonhidrat grubunda Zp2 immünreaktivite düzeyinin kontrol grubundakine kıyasla anlamlı derecede, Zp1 ve Zp3 immünreaktivite düzeylerinin ise istatistiksel olarak anlamlı olmasa da azaldığı görüldü. Karbonhidrat grubunda Zp1 ve Zp2 RNA ekspresyon düzeylerinin anlamlı derecede; Zp3 açısından ise istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa da azaldığı görüldü. Yapılan morfometrik ölçümlerde de karbonhidrat grubunda tersiyer ve preovulatuvar evre foliküllerdeki oosit çapı tüm gruplara göre daha düşük bulundu. Oosit çapındaki bu azalmanın, karbonhidrat grubunda Zp1, Zp2 ve Zp3 ekspresyonundaki azalma ilgili olduğu düşünülmektedir. Ayrıca zona pellusida üzerine yaptığımız elektron mikroskopik incelemelerde de karbonhidrat grubundaki oositlerin zona pellusidalarında yoğun yapısal deformasyonlar saptandı. Yağ grubunda Zp1, Zp2 ve Zp3 immünreaktivite ve RNA ekspresyon düzeyleri kontrol grubundakine benzer bulundu. Nitekim elektron mikroskopik incelemede de yağ grubunda zona pellusidanın normal ultrastrüktürel yapıda olduğu görüldü. Protein grubunda ise, Zp1 ve Zp2 immünreaktivite düzeyi kontrol grubundakiyle benzer, Zp3 immünreaktivite düzeyi ise anlamlı derecede yüksek saptandı. Protein grubu RNA analizlerinde ise Zp2 kontrol

grubundaki ile benzer bulunurken, istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte, Zp1 RNA ekspresyon düzeyinin bu grupta kontrol grubundakine göre yaklaşık dört kat, Zp3 RNA düzeyinin ise yaklaşık iki kat artmış olduğu tespit edildi. Protein grubundaki Zp1 ve Zp3 genlerinin ekspresyon düzeyindeki artışla oosit hacmi arasındaki ilişkiye baktığımızda, protein grubunda primer folikülden preovulatuvar folikül evresine kadar kadar oosit çapının anormal seyrettiği görülmektedir. Yani Zp genlerinin aşırı ekspresyonu oosit hacminde anomalilere neden olmaktadır. Ayrıca protein grubuna ait elektron mikroskopik kesitlerde incelenen zona pellusida yapılarında karbonhidrat grubuna benzer şekilde yoğun yapısal deformasyonlara saptandı. Zona pellusidanın oosit sınırlarını belirleyerek, fertilizasyonda önemli bir etkiye sahip olan oosit hacminin belirlenmesinde rol oynaması, fertilizasyon esnasında sperm bağlanmasındaki rolü ve polisperminin önlenmesindeki fonksiyonları gibi nedenlerle, beslenme tipine bağlı Zp proteinlerinin ekspresyon profillerindeki değişikliklerin de fertilitiyi olumsuz yönde etkileyebileceğini düşündürmektedir.

Hormon Analizleri

FSH ve LH hormonları, ovaryan foliküllerin gelişim için indüklenmesi, foliküllerin olgunlaşması, oositin ovulasyonu ve ovaryum steroidlerinin üretimi için gereklidirler (92). Çalışmamızda FSH ve LH hormon düzeylerinde kontrol grubundakine göre karbonhidrat, yağ ve protein gruplarında sırasıyla artış olduğu ve her üç diyet grubunun da kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu saptandı. Primordiyal folikül sayılarında ise kontrol grubundakine göre karbonhidrat, yağ ve protein gruplarında sırasıyla azalma olduğu görülmektedir. Folikül rezervindeki azalmaya ters orantılı olarak FSH ve LH hormon düzeylerinin sırasıyla karbonhidrat, yağ ve protein gruplarında artış göstermesi, rezerv foliküllerin azalmasının altında yatan faktörlerden birisinin de bu hormon düzeylerindeki artışa bağlı olarak daha fazla sayıda primordiyal folikülün gelişim için indüklenmesi olduğunu düşündürmektedir.

Östrojen (E2) hormonu kadınlarda menstrüel döngünün düzenlenmesinde ve cinsiyet karakterlerin gelişiminde rol oynayan bir hormondur (93). Progesteron (P4) ise menstrual döngü, gebelik ve embriyogeneze rol oynayan endojen bir eşey hormonudur (94). Chisato Nagata ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada yüksek yağ alımının östrojen düzeyini arttırdığı gösterilmiştir (95). Akamine EH ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada da yüksek yağ diyetinin progesteron seviyesini yükselttiği belirtilmiştir (96). Çalışmamızda da, östrojen değerleri yağ grubunda en yüksek olmak üzere üç diyet grubunda da kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Çalışmamızda

elde edilen menstrual döngü bulguları ve östrojen hormonunun menstrual döngünün düzenlenmesindeki rolü göz önünde bulundurulduğunda, özellikle yağ ve protein gruplarında gözlenen menstrual düzensizliklerin ve yüksek anormal menstrual döngü sayılarının östrojen hormonun özellikle bu gruplarda ileri düzey sentezi sonucu olduğu düşünülmektedir. Nitekim yapılan çalışmalarda progesteron ve östrojen artışının menstrual döngü uzunluğunun artmasına ve menstrual döngü düzeninin bozulmasına neden olduğu gösterilmiştir (96).

Çalışmamızda ayrıca yağ doku hormonları olan adiponektin, resistin ve leptin hormonları çalışıldı. Yapılan çalışmalarda obez canlılarda adiponektin değerlerinin azaldığı, resistin ve leptin değerlerinin ise arttığı gösterilmiştir (97). Çalışmamızda ise yağ diyeti grubunda sıçanlar henüz ileri kilolu veya obezite değerlerine ulaşmadıklarından, kontrole göre adiponektin düzeyi yüksek, resistin düzeyi düşük ve leptin düzeyi ise benzer bulundu. Yapılan çalışmalarda değişen yağ doku hormon seviyelerinin menstrual döngü düzeni, oosit gelişimi ve ovulasyon gibi süreçlerde dolaylı olarak rol oynadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, yağ doku hormonlarının oosit gelişiminde önemli olan besin tüketimini nasıl etkilediğine dair yeterli bilgi bulunmamaktadır (97) ve daha kapsamlı deneysel çalışmalar gerektirmektedir.

Elektron Mikroskopik Analizler

Foliküller ve oositler geliştikçe, oositlerin ve folikül hücrelerinin yapılarında ve fizyolojilerinde de birçok değişiklik meydana gelir (98). Bu değişikliklerin normal şekilde seyretmesi olgun ve sağlıklı bir oosin gelişmesi için oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda primordiyal folikülden preovulatuvar folikül aşamasına kadar tüm foliküler evrelerde oosit, granuloza hücreleri ve zona pellusida ultrastrüktürel yapıları detaylı olarak incelenerek ortaya konmuştur (98, 99). Çalışmamızda da oosit sitolazması, granuloza hücreleri, granuloza lutein hücreleri ve zona pellusida elektron mikroskopik olarak incelenip mevcut literatür bilgileriyle karşılaştırıldı.

Kontrol grubu ovaryum kesitlerinde tersiyer evre foliküllerdeki oositler yaygın granüllü endoplazmik retikulum (gER), yuvarlak şekilli mitokondriyondan zengin, normal sitoplazmik yapılar ile kortikal granül sayısı ve miktarı açısından literatürde belirtilen özelliklerde (98) görüldü. WFA Marei ve ark. tarafından fareler üzerinde yapılan yüksek yağ diyeti çalışmasında, oositlerdeki yuvarlak şekilli mitokondriyonların sayısında azalma ve uzamış mitokondriyon sayısında artış olduğu bildirilmektedir (100). Yine aynı çalışmada, yüksek yağ diyetinin oositlerde endoplazmik retikulumlarda genişlemeye neden olduğu gösterilmiştir (100).

Çalışmamızda yağ ve protein gruplarında mitokondriyonlar genellikle yuvarlak şekilli izlenirken, karbonhidrat grubunda uzamış şekilli mitokondriyonların yaygın olduğu saptandı. Oosit granüllü endoplazmik retikulumları ise özellikle protein grubunda olmak üzere karbonhidrat ve yağ gruplarında kontrole göre daha seyrek dağılımlı ve daha düşük elektron yoğunluklu olarak izlendi. Karbonhidrat grubunda yer yer genişlemiş endoplazmik retikulum sisternalarına rastlandı. Ayrıca çalışmamızda karbonhidrat, yağ ve protein gruplarında kortikal granül miktarının ve büyüklüklerinin kontrol grubundakine göre daha seyrek dağılımlı olduğu görüldü. Granuloza hücrelerinde her üç deneysel grupta kontrol grubuna kıyasla sitoplazmik organeller açısından farklı ultrastrüktürel deformasyonlara rastlandı.

Normal bir fertilizasyon için, gelişmekte olan oositte yoğun protein sentezi, komşu granuloza hücreleri ile düzenli madde alışverişi, yoğun kortikal granül dağılımı ve zona pellusida önemli rol oynamaktadır. Ancak çalışmamızdaki özel diyet gruplarında gER yaygınlığının azalması, transzonal bağlantıların bozulması, kortikal granüllerin azalması ve zona pellusidadaki yapısal deformasyonlar gibi değişiklikler oositin fertilizasyon kapasitesinin azalmasına neden olabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada karbonhidrat, yağ ve protein diyetlerinin sıçanlarda folikülogenez ve oosit gelişimi üzerine etkileri araştırıldı. Elde edilen bulgulara göre, prepubertal dönemde özellikle yağ ve protein ağırlıklı beslenme, menstrual siklusta düzensizliklere, ovaryumda vasküler konjesyona, folikülogenez spesifik gen ve proteinlerin ekspresyonlarında anormal düzeyde artma veya azalmaya, oosit gelişimi üzerine doğrudan etkili olan hipofizyal ve ovaryan hormonların seviyelerinde değişikliklere neden olmaktadır. Bu değişiklikler sonucu, primordiyal folikül ve oosit rezervinin hızla azalması, folikül gelişiminin baskılanması ve oosit kalitesinin düşmesi üreme periyodunun kısılmasına ve fertilizasyon potansiyelinin azalmasına neden olabilir. Ayrıca, karbonhidrat ağırlıklı beslenme, yağ ve protein ağırlıklı beslenme kadar olmasa da benzer bulgularla ve özellikle de zona pellusidada yapısal bozukluklara neden olarak fertilizasyonun gerçekleşmesini olumsuz yönde etkileyebilir.

Tüketilen besinlerin ana bileşenleri olan bu makro-besinlerin yaşamsal fonksiyonların ve normal üreme sistemi fizyolojisinin devamı için yeterli ve dengeli düzeyde alınması gerekmektedir. Bireylerin, özellikle uzun süreli yüksek yağ ve protein diyetlerinden kaçınmaları sağlıklı üreme fonksiyonlarının sürdürülmesi için gerekli ve önemlidir. Bu nedenle, çalışmamızda elde edilen bulgular da göz önünde bulundurularak, bireylerin normal yaşamlarında ve özellikle de gebelik düşünen veya infertilite tedavisi alan kadınların tedavi öncesi ve süresince hekim ve uzman diyetisyenlerin de tavsiyeleriyle, literatüre uygun dengeli ve düzenli diyet programı uygulamaları tavsiye edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Fontana R, Torre S. The deep correlation between energy metabolism and reproduction: a view on the effects of nutrition for women fertility. *Nutrients* 2016. 8(2): 87.
2. Inhorn MC, Patrizio P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum Reprod Update* 2015. 21(4): 411-26.
3. Ombelet W, Cooke I, Dyer S, Serour G, Devroey P. Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod Update* 2008. 14(6): 605-21.
4. Templeton A. Infertility and the establishment of pregnancy—overview. *Br Med Bull* 2000. 56(3): 577-87.
5. Chavarro JE, Rich-Edwards JW, Rosner BA, Willett WC. Diet and lifestyle in the prevention of ovulatory disorder infertility. *Obstet Gynecol* 2007. 110(5): 1050-8.
6. Hassan MA, Killick SR. Negative lifestyle is associated with a significant reduction in fecundity. *Fertil Steril* 2004. 81(2): 384-92.
7. Della Torre S, Benedusi V, Fontana R, Maggi A. Energy metabolism and fertility - a balance preserved for female health. *Nat Rev Endocrinol* 2014. 10(1): 13.
8. Mircea CN, Lujan ME, Pierson RA. Metabolic fuel and clinical implications for female reproduction. *J Obstet Gynaecol Can* 2007. 29(11): 887-902.
9. Singh I. *Textbook of human histology:(with colour atlas & practical guide)*, 6th ed. New Delhi, Jaypee Brothers Medical Publishers, 2011: 312-5.
10. Sqabita M, Neelam V. *Inderbir Singh's Textbook of Human Histology: With Colour Atlas and Practical Guide*, 7th ed. New Delhi, Jaypee Brothers Medical Publishers, 2014: 343-61.
11. Ross MH, Pawlina W. *Histology a text and atlas*, 6th ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, 2011: 830-63.
12. Moore KL, Persaud T, *Klinik yönleri ile insan embriyolojisi*. Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H (Çeviren). 1. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 2002: 243-83.
13. Sadler T. *Langman's Medical Embryology*, 14th ed. Baltimore, Williams&Wilkins, 2006: 256-83.
14. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji*, 2. Baskı. İstanbul, Gezegen Basım, 2016: 291-309.

15. Ross MH, Pawlina W. *Histoloji / Konu Anlatımı ve Atlas, İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile*. Baykal B (Çeviren). 6. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2014: 830-63.
16. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *Reproduction* 1968, 17(3): 555-7.
17. Junqueira L, Carneiro J. *Temel Histoloji*. Aytekin Y, Solakoğlu S (Çeviren). 10. Baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2009: 135.
18. Pelosi E, Forabosco A, Schlessinger D. Genetics of the ovarian reserve. *Front Genet* 2015. 6: 308.
19. Dun MD, Mitchell LA, Aitken RJ, Nixon B. Sperm–zona pellucida interaction: molecular mechanisms and the potential for contraceptive intervention. *Handb Exp Pharmacol* 2010. 198:139-78.
20. Gupta SK, Bhandari B, Shrestha A, Biswal BK, Palaniappan C, Malhotra SS, Gupta N. Mammalian zona pellucida glycoproteins: structure and function during fertilization. *Cell Tissue Res* 2012. 349(3): 665-78.
21. Gupta SK, Bansal P, Ganguly A, Bhandari B, Chakrabarti K. Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *J Reprod Immunol* 2009. 83(1-2): 50-5.
22. Huang H-L, Lv C, Zhao Y-C, Li W, He X-M, Li P, Sha A-G, Tian X, Papasian CJ, Deng H-W. Mutant ZP1 in familial infertility. *N Engl J Med* 2014. 370(13): 1220-6.
23. McNatty KP, Moore L, Hudson NL, Quirke L, Lawrence SB, Reader K, Hanrahan J, Smith P, Groome NP, Laitinen M. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. *Reproduction* 2004, 128(4): 379-86.
24. Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DF. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *J Assist Reprod Genet* 2018. 35(10): 1741-50.
25. Thomas FH, Vanderhyden BC. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol* 2006. 4(1): 1-8.
26. Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* 2011. 23(4): 609-20.

27. Persani L, Rossetti R, Di Pasquale E, Cacciatore C, Fabre S. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum Reprod Update* 2014. 20(6): 869-83.
28. McGrath SA, Esquela AF, Lee S-J. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol* 1995. 9(1): 131-6.
29. Otsuka F, McTavish KJ, Shimasaki S. Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Mol Reprod Dev* 2011. 78(1): 9-21.
30. Alam MH, Miyano T. Interaction between growing oocytes and granulosa cells in vitro. *Reprod Med Biol* 2020. 19(1): 13-23.
31. De Castro FC, Cruz MHC, Leal CLV. Role of growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and their importance in mammalian female fertility -a review. *Asian-Australas J Anim Sci* 2016. 29(8): 1065.
32. Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol* 1999. 13(6): 1035-48.
33. Zhao H, Qin Y, Kovanci E, Simpson JL, Chen Z-J, Rajkovic A. Analyses of GDF9 mutation in 100 Chinese women with premature ovarian failure. *Fertil Steril* 2007. 88(5): 1474-6.
34. Elvin JA, Yan C, Matzuk MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. *Proc Natl Acad Sci* 2000. 97(18): 10288-93.
35. Anderson MJ, Viars CS, Czekay S, Cavenee WK, Arden KC. Cloning and characterization of three human forkhead genes that comprise an FKHR-like gene subfamily. *Genomics* 1998. 47(2): 187-99.
36. Ekoff M, Kaufmann T, Engström M, Motoyama N, Villunger A, Jönsson J-I, Strasser A, Nilsson G. The BH3-only protein Puma plays an essential role in cytokine deprivation-induced apoptosis of mast cells. *Blood* 2007. 110(9): 3209-17.
37. Skurk C, Maatz H, Kim H-S, Yang J, Abid MR, Aird WC, Walsh K. The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP. *J Biol Chem* 200. 279(2): 1513-25.

38. Cui C, Han S, Yin H, Luo B, Shen X, Yang F, Liu Z, Zhu Q, Li D, Wang Y. FOXO3 Is Expressed in Ovarian Tissues and Acts as an Apoptosis Initiator in Granulosa Cells of Chickens. *Biomed Res Int* 2019. 2019(1): 1-9.
39. Cecconi S, Mauro A, Cellini V, Patacchiola F. The role of Akt signalling in the mammalian ovary. *Int J Dev Biol* 2013. 56(10-11-12): 809-17.
40. Pelosi E, Omari S, Michel M, Ding J, Amano T, Forabosco A, Schlessinger D, Ottolenghi C. Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice. *Nat Commun* 2013. 4(1): 1-7.
41. Collavin L, Buzzai M, Saccone S, Bernard L, Federico C, DellaValle G, Brancolini C, Schneider C. cDNA characterization and chromosome mapping of the human GAS2 gene. *Genomics* 1998. 48(2): 265-9.
42. York JP, Ren YA, Zeng J, Zhang B, Wang F, Chen R, Liu J, Xia X, Zhang P. Growth arrest specific 2 (GAS2) is a critical mediator of germ cell cyst breakdown and folliculogenesis in mice. *Sci Rep* 2016. 6(1): 1-12.
43. Gökdemir F, Eryilmaz G. Üreme çağındaki bireylerde prekonsepsiyonel beslenme. *Int PR J Nut Res* 2018. 14: 79-105.
44. Hanson MA, Bardsley A, De-Regil LM, Moore SE, Oken E, Poston L, Ma RC, McAuliffe FM, Maleta K, Purandare CN. The International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO) recommendations on adolescent, preconception, and maternal nutrition: "Think Nutrition First". *Int J Gynaecol Obstet* 2015. 131: 213-53.
45. Anonim. Türkiye beslenme rehberi. TÜBER 2015. *TC Sağlık Bakanlığı, Türkiye Halk Sağlığı Kurumu* 2016. 1031: 1-228.
46. Akalin H, Eryilmaz G. Beslenmenin üreme sağlığına etkisi. *Türkiye Klinikleri Doğum-Kadın Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği Özel Dergisi* 2017. 3(3): 185-92.
47. Besler HT, Rakicioğlu N, Ayaz A, Demirel, ZB, Özel HG, Samur GE. Türkiye'ye özgü besin ve beslenme rehberi. *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü* 2015. 7-91.
48. Pekcan AG. Kadının yaşam sürecinde makro ve mikro besin öğeleri. *Türkiye Klinikleri Nutrition and Dietetics-Special Topics* 2015. 1(1): 8-14.
49. Samur G. Gebelik ve laktasyon döneminde beslenme. *Türkiye Klinikleri Nutrition and Dietetics-Special Topics* 2015. 1(1): 20-5.

50. Gardiner PM, Nelson L, Shellhaas CS, Dunlop AL, Long R, Andrist S, Jack BW. The clinical content of preconception care: nutrition and dietary supplements. *Am J Obstet Gynecol* 2008. 199(6): 345-56.
51. Yiğiter AB, Arslan T. Gebelik takibinde güncel yaklaşımlar. *The Journal of Turkish Family Physician* 2012. 3(2): 1-13.
52. Jack BW, Atrash H, Coonrod DV, Moos M-K, O'Donnell J, Johnson K. The clinical content of preconception care: an overview and preparation of this supplement. *Am J Obstet Gynecol* 2008. 199(6): 266-79.
53. McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA. Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *JoVE* 2012. 67: e4389.
54. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicol Pathol* 2015. 43(6): 776-93.
55. Tilly JL. Ovarian follicle counts—not as simple as 1, 2, 3. *Reprod Biol Endocrinol* 2003. 1(1): 11.
56. Panina Y, Germond A, Masui S, Watanabe TM. Validation of common housekeeping genes as reference for qPCR gene expression analysis during iPS reprogramming process. *Sci Rep* 2018. 8(1): 1-8.
57. Martin G, Rodger J, Blache D. Nutritional and environmental effects on reproduction in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2004. 16(4): 491-501.
58. Crosignani P. Nutrition and reproduction in women. *Hum Reprod Update* 2006. 12(3): 193-207.
59. Bronson FH. *Mammalian reproductive biology*, 1st ed. Chicago, University of Chicago Press, 1989: 7-90.
60. Hohos NM, Skaznik-Wikiel ME. High-Fat Diet and Female Fertility. *Endocrinology* 2017. 158(8): 2407-19.
61. Hohos NM, Cho KJ, Swindle DC, Skaznik-Wikiel ME. High-fat diet exposure, regardless of induction of obesity, is associated with altered expression of genes critical to normal ovulatory function. *Mol Cell Endocrinol* 2018. 470:199-207.
62. Sacks FM, Bray GA, Carey VJ, Smith SR, Ryan DH, Anton SD, McManus K, Champagne CM, Bishop LM, Laranjo N. Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N Engl J Med* 2009. 360(9): 859-73.



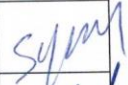

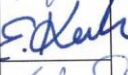



63. Shai I, Schwarzfuchs D, Henkin Y, Shahar DR, Witkow S, Greenberg I, Golan R, Fraser D, Bolotin A, Vardi H. Weight loss with a low-carbohydrate, Mediterranean, or low-fat diet. *N Engl J Med* 2008. 359(3): 229-41.
64. Fan Y, Liu Y, Xue K, Gu G, Fan W, Xu Y, Ding Z. Diet-induced obesity in male C57BL/6 mice decreases fertility as a consequence of disrupted blood-testis barrier. *PLoS one* 2015. 10(4): e0120775.
65. Trivedi B. The calorie delusion. *New Sci* 2009. 203(2717): 30-3.
66. Southgate D. The relationship between food composition and available energy, <http://www.fao.org/3/M2847E/M2847E00.htm> Son erişim tarihi:12 Temmuz 2020.
67. Kirkwood R, Cumming D, Aherne F. Nutrition and puberty in the female. *Proc Nutr Soc* 1987. 46(2): 177-92.
68. Asdell SA. *Patterns of mammalian reproduction*, 1st ed. New York, Comstock Publishing, 1946: 437.
69. Kirtley D, Maher R. Effect of an isocaloric high fat diet on initiation of puberty in Osborne-Mendel rats. *Biol Reprod* 1979. 21(2): 331-8.
70. Warren MP. Health issues for women athletes: exercise-induced amenorrhea. *J Clin Endocrinol Metab* 1999. 84(6): 1892-6.
71. Manore MM. Chronic dieting in active women: What are the health consequences? *Women's Health Issues* 1996, 6(6): 332-41.
72. Manore MM. Dietary recommendations and athletic menstrual dysfunction. *Sports Me* 2002. 32(14): 887-901.
73. Castillo-Martínez L, López-Alvarenga JC, Villa AR, González-Barranco J. Menstrual cycle length disorders in 18-to 40-y-old obese women. *Nutrition* 2003. 19(4): 317-20.
74. Donath MY, Shoelson SE. Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* 2011. 11(2): 98-107.
75. Virta Health. <https://www.virtahealth.com/reverseddiabetes#:~:text=Nutritional%20ketosis%20can%20sustainably%20reverse,blood%20cell%20count%20and%20CRP>). Son erişim tarihi: 16 Ekim 2020.
76. Winship AL, Gazzard SE, Cullen-McEwen LA, Bertram JF, Hutt KJ. Maternal low-protein diet programmes low ovarian reserve in offspring. *Reproduction* 2018. 156(4): 299-311.

77. Teleni E, Rowe J, Croker K, Murray P, King W. Lupins and energy-yielding nutrients in ewes. II. Responses in ovulation rate in ewes to increased availability of glucose, acetate and amino acids. *Reprod Fertil Dev* 1989. 1(2): 117-25.
78. Zheng T, Holford TR, Leaderer B, Zhang Y, Zahm SH, Flynn S, Tallini G, Zhang B, Zhou K, Owens PH. Diet and nutrient intakes and risk of non-Hodgkin's lymphoma in Connecticut women. *Am J Epidemiol* 2004. 159(5): 454-66.
79. Chan K, Tsoulis M, Sloboda D. Early-life nutritional effects on the female reproductive system. *J Endocrinol* 2015. 224(2): 45-62.
80. Souter I, Chiu YH, Batsis M, Afeiche MC, Williams PL, Hauser R, Chavarro JE, Team ES. The association of protein intake (amount and type) with ovarian antral follicle counts among infertile women: results from the EARTH prospective study cohort. *BJOG* 2017. 124(10): 1547-55.
81. Sohrabi M, Roushandeh AM, Alizadeh Z, Vahidinia A, Vahabian M, Hosseini M. Effect of a high fat diet on ovary morphology, in vitro development, in vitro fertilisation rate and oocyte quality in mice. *Singapore Med J* 2015. 56(10): 573.
82. Hilal G, Fatma T, Ferruh Y, Sabire G, Yüksel A. Effect of high-fat diet on the various morphological parameters of the ovary. *Anat Cell Biol* 2020. 53(1): 58.
83. Wang N, Luo L-L, Xu J-J, Xu M-Y, Zhang X-M, Zhou X-L, Liu W-J, Fu Y-C. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. *Metabolism* 2014. 63(1): 94-103.
84. Akbariasbagh F, Lorzadeh N, Azmoodeh A, Ghaseminejad A, Mohamadpoor J, Kazemirad S. Association among diameter and volume of follicles, oocyte maturity, and competence in intracytoplasmic sperm injection cycles. *Minerva Ginecol* 2015. 67(5): 397-403.
85. Anguita B, Jimenez-Macedo AR, Izquierdo D, Mogas T, Paramio M-T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology* 2007. 67(3): 526-36.
86. Boots CE, Jungheim ES. Inflammation and human ovarian follicular dynamics. *Semin Reprod Med* 2015. 33(4):270-5.
87. Lan ZJ, Gu P, Xu X, Jackson KJ, DeMayo FJ, O'Malley BW, Cooney AJ. GDNF-dependent repression of BMP-15 and GDF-9 mediates gamete regulation of female fertility. *EMBO J* 2003. 22(16): 4070-81.

88. Peng J, Li Q, Wigglesworth K, Rangarajan A, Kattamuri C, Peterson RT, Eppig JJ, Thompson TB, Matzuk MM. Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proc Natl Acad Sci* 2013. 110(8): 776-85.
89. Pines MK, Housden BE, Bernard F, Bray SJ, Röper K. The cytolinker Pigs is a direct target and a negative regulator of Notch signalling. *Development* 2010. 137(6): 913-22.
90. Wassarman PM. Mammalian fertilization: molecular aspects of gamete adhesion, exocytosis, and fusion. *Cell* 1999. 96(2): 175-83.
91. Hartmann JF, Gwatkin RB, Hutchison CF. Early contact interactions between mammalian gametes in vitro: evidence that the vitellus influences adherence between sperm and zona pellucida. *Proc Natl Acad Sci* 1972. 69(10): 2767-9.
92. Fevold H. Synergism of the follicle stimulating and luteinizing hormones in producing oogen secretion. *Endocrinology* 1941. 28(1): 33-6.
93. Ryan KJ. Biochemistry of aromatase: significance to female reproductive physiology. *Cancer Res* 1982. 42(8): 3342-4.
94. King TL, Brucker MC. *Pharmacology for women's health*, 1st ed. United States, Jones & Bartlett Publishers, 2010.
95. Nagata C, Nagao Y, Shibuya C, Kashiki Y, Shimizu H. Fat intake is associated with serum estrogen and androgen concentrations in postmenopausal Japanese women. *J Nutr* 2005. 135(12): 2862-5.
96. Akamine EH, Marçal AC, Camporez JP, Hoshida MS, Caperuto LC, Bevilacqua E, Carvalho CR. Obesity induced by high-fat diet promotes insulin resistance in the ovary. *J Endocrinol* 2010. 206(1): 65.
97. Mitchell M, Armstrong D, Robker R, Norman R. Adipokines: implications for female fertility and obesity. *Reproduction* 2005. 130(5): 583-97.
98. Paulini F, Silva RC, de Paula Rôlo JL, Lucci CM. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *J Ovarian Res* 2014. 7(1): 1-12.
99. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res* 2009. 2(1):1-7.
100. Marei WF, Smits A, Mohey-Elsaeed O, Pintelon I, Ginneberge D, Bols PE, Moerloose K, Leroy JL. Differential effects of high fat diet-induced obesity on oocyte mitochondrial functions in inbred and outbred mice. *Sci Rep* 2020. 10(1): 1-14.

EKLER

EK-1: Etik kurul belgesi

T.C. İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURUL (HADYEK) BAŞKANLIĞI			
TOPLANTI TARİHİ	KARAR SAYISI	HADYEK NO	BAŞVURU SAHİBİ
17.12.2020	2020/17-6	2017/A-57	Prof. Dr. Mehmet GÜL
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Türü	: Sıçan	Araştırmacılar	
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Soy	: <i>Wistar Albino</i>	1. Prof. Dr. Nigar VARDI	
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Cinsiyeti	: Dişi	2. Arş. Gör. Semir GÜL	
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Sayısı	: 40	3. Arş. Gör. Emrah ZAYMAN	
Deneyde Kullanılacak Hayvanın Yaşı ve Ağırlığı	: 21 Günlük		
KARAR: "Farklı Beslenme Tiplerinin Folikülogenez ve Oosit Gelişimi Üzerine Etkileri" başlıklı çalışma kapsamında kullanılacak deney hayvanlarında yapılacak girişimlerde araştırmacılar tarafından "hayvan kullanım etiği ilkelerine" uyulacağı beyan edilmiştir. Bu çerçevede, söz konusu araştırmanın Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazetede yayımlanan "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmelik" hükümleri göz önüne alındığında çalışmanın etik açıdan uygun olduğuna; oy birliği ile karar verildi.			
BAŞKAN	Doç. Dr. Suat TEKİN		
ÜYELER			
Doç. Dr. Elif TAŞLIDERE Başkan Vekili		Prof. Dr. Şengül YÜKSEL Üye	
Dr. Öğr. Üyesi Onural ÖZHAN Üye		Veteriner Hekim Engin KORKMAZ Üye	
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa CANBOLAT Üye		Öğretmen Kaan Akın ÖZ Sivil Üye	
Avukat Mustafa Umut YALÇIN Sivil Üye			
İnönü Üniversitesi, Merkez Kampüsü 44280/MALATYA Tel: 0 422 3410660/ 1219			