T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN

KRONİK FİZYOLOJİK STRES UYGULAMASININ SIÇAN OVARYUMLARINDA FOLİKÜLER GELİŞİM VE OOSİT REZERVİ ÜZERİNE ETKİLERİ: IGF1, AMH VE BCL-2'NİN ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Deniz MURATOĞLU

Referans no: 101073659

EDİRNE – 2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MORFOLOJİ ANABİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Tez Yöneticisi
Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN

KRONİK FİZYOLOJİK STRES UYGULAMASININ SIÇAN OVARYUMLARINDA FOLİKÜLER GELİŞİM VE OOSİT REZERVİ ÜZERİNE ETKİLERİ: IGF1, AMH VE BCL-2'NİN ROLÜ

(Yüksek Lisans Tezi)

Deniz MURATOĞLU

Destekleyen Kurum : TÜBAP-2016/79

Tez No :

EDİRNE – 2017

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji yüksek lisans programı çerçevesinde ve Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'in danışmanlığında, yüksek lisans öğrencisi Deniz MURATOĞLU tarafından tez başlığı "Kronik Fizyolojik Stres Uygulamasının Sıçan Ovaryumlarında Foliküler Gelişim Ve Oosit Rezervi Üzerine Etkileri: IGF1, AMH Ve Bcl-2'nin Rolü" olarak teslim edilen bu tezin, tez savunma sınavı **20/12/2017** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza
JÜRİ BAŞKANI
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

İmza
ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY

İmza
ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğü

O N A Y

Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Morfoloji Anabilim Dalı, Histoloji ve Embriyoloji yüksek lisans programı çerçevesinde ve Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN'in danışmanlığında, yüksek lisans öğrencisi Deniz MURATOĞLU tarafından tez başlığı "Kronik Fizyolojik Stres Uygulamasının Sıçan Ovaryumlarında Foliküler Gelişim Ve Oosit Rezervi Üzerine Etkileri: IGF1, AMH Ve Bcl-2'nin Rolü" olarak teslim edilen bu tezin, tez savunma sınavı **20/12/2017** tarihinde yapılarak aşağıdaki jüri üyeleri tarafından **"Yüksek Lisans Tezi"** olarak kabul edilmiştir.

İmza

JÜRİ BAŞKANI
Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN

İmza
ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Fatma Bahar SUNAY

İmza
ÜYE
Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tammam SİPAHİ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yetişmemde çok büyük emeği olan ve benden hiçbir fedakarlığı esirgemeyen değerli aileme minnettarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşan, tezimin hazırlanmasında büyük desteğini gördüğüm ve öğrencisi olmaktan mutlu olduğum, başta değerli danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Melike SAPMAZ METİN olmak üzere, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Gülnur KIZILAY ÖZFİDAN, Sayın Doç. Dr. Yeşim Hülya UZ, Sayın Doç. Dr. Yeter TOPÇU TARLADAÇALIŞIR'a ve Trakya Üniversitesi Histoloji Embriyoloji Bölümündeki tüm arkadaşlarıma katkılarından dolayı sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca davranış testleri uygulama esnasında yardımlarını esirgemeyen Tıbbi Farmakoloji A.D. öğretim üyesi Ruhan Deniz TOPUZ'a , Uzm. Kübra AYDEMİR'e ve mali destek sağlayan TÜBAP birimine teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ 1
GENEL BİLGİLER 3
OOGENEZ 3
ATREZİ SÜRECİ 9
OVARYUMDA IGF-1, AMH ve BCL-2'NİN ROLÜ 10
STRES 13
KEMİRGENLERDE ÖSTRUS SİKLUSU 17
DENEY HAYVANLARINDA DAVRANIŞ TESTLERİ 19
GEREÇ VE YÖNTEMLER 21
BULGULAR 28
TARTIŞMA 70
SONUÇLAR 77
ÖZET 79
SUMMARY 81
KAYNAKLAR 83
ŞEKİLLER LİSTESİ 92
ÖZGEÇMİŞ 96
EKLER

SİMGE VE KISALTMALAR

ACTH : Adrenocorticotropic hormone

AMH : Anti-Müllerian Hormon

AVP : Arjinin vazopressin

Bax : Bcl-2-associated X protein

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

bFGF : Basic fibroblast growth factor

BLIMP 1 : B lymphocyte-induced maturation protein-1

BMPs : Bone morphogenetic proteins

CRH : Corticotropin-releasing hormone

EGF : Epidermal growth factor

FSH : Folikül stimülan hormon

GDF9 : Growth differentiation factor 9

GH : Growth hormone

H+E : Hematoksilen + Eozin

HPA : Hipotalamus-pitüiter-adrenal eksen

HPG : Hipotalamus-pitüiter-gonadal eksen

IGF-1 : Insulin-Like Growth Factor-1

IL-1 : İnterlökin-1

KL : Korpus luteum

LH : Luteinizan Hormon

Ngf : Nerve growth factor

OCT4 : Octamer-binding transcription factor 4

OMI : Oosit maturasyon inhibitörü

PAB : Primary Antibody

PBS : Phosphate Buffer Saline

PGH : Primordiyal germ hücresi

POY : Prematür over yetersizliği

PVN :Paraventriküler nükleus

PCOS : Polycystic ovary syndrome

SCF : Stem cell factor

Sohlh 1 *:* Spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix 1

TNF- α : Tümör nekroz faktör alfa

TGF- β : Transforming growth factor beta

ZP : Zona pellusida

Wt1 : Wilms tümör 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Modern toplumların ve 21.yy'ın en önemli sağlık problemlerinden bir tanesi strestir (1). Stres (zorlanma), canlıda var olan dengeyi bozmaya yönelik etkilerin tamamı (2,3) ya da homeostazdan sapma olarak tanımlanabilir (4). Strese sebep olan her bir faktör ise stressör (stres etkeni) olarak isimlendirilir. Stresörler, niteliklerine ve kişinin duyarlılığına bağlı olarak bireyler üzerinde farklı etkiler gösterirler (5). Stresin merkezi sinir sistemi, sindirim sistemi, kardiyovasküler sistem, nöroendokrin sistem ve üreme sistemi fonksiyonlarını etkilediği bilinmektedir (6).

Stres faktörleri temel olarak; fizyolojik stres faktörleri, fizyolojik bozukluklara neden olan ve homeostatik mekanizmaları yok eden faktörler ve psikolojik stres faktörleri, canlının içinde bulunduğu durumu tehdit eden istenmeyen çevresel uyarımlar (7,8) olarak kategorize edilir. Canlılar yaşamlarının farklı periyotlarında (prenatal ya da postnatal dönemlerinde) kısa süre (akut) veya uzun süre (kronik) strese maruz kalabilirler (9). Kronik stres; hastalıklar, çeşitli psikolojik rahatsızlıklar ve bilişsel değişimlerin artmasına neden olan riskleri içerir (10).

Kadınlarda yapılan çalışmalar, stres faktörlerinin infertiliteye de neden olduğunu göstermiştir. İnfertilite oluşumunda sırasıyla kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH), adrenokortikotropik hormon (ACTH) ve kortizolün salınmasında etkili olan hipotalamus-pituiter-adrenal eksenin (HPA) rolü belirtilmiştir (11). CRH önemli bir stres aracısı hormondur ve stresle ilişkili proteinler ailesinin bir üyesidir. CRH ve ilişkili proteinler üreme, büyüme, davranış ve diğer önemli çevresel adaptasyonlarda rol alır. Strese maruziyet sonrasında oluşan psikolojik ve fizyolojik yanıtların, cinsiyete bağlı olarak değişiklikler gösterdiği ortaya konmuştur. Dişilerdeki stres yanıtının, menstrual siklus, gebelik ve menopoz gibi değişen

hormonal durumlar nedeniyle, erkeklerden daha farklı olduğu ileri sürülmektedir (12). Farklı menstrual siklus fazlarıyla ilişkili ovariyan hormon seviyeleri de stres sonrasında kortizol reaktivitesini etkilemektedir (13).

Stresin dişi üreme sistemi üzerine olan etkileri, deneysel çalışmalarla da ortaya konmuştur. Deneysel çalışmalar, stresin dişi infertilitesine olan etkilerini göstermek konusunda, farklı modelleme seçeneklerine imkan vermesi sebebi ile önemlidir. Böylelikle stres ve sağlık sorunları arasındaki bağlantıyı açıklayacak biyolojik yolakların araştırılması sağlanabilir (1). Yapılan deneylerde gebelik sırasında kısıtlama stresine maruz bırakılan fareler ve sıçanlarda, korpus luteumun işlevinin bozulduğu, gebelik oranlarının azaldığı ve yavru boyutlarının küçüldüğü gösterilmiştir (14). Başarılı bir çoğalma, ovaryum ve ovariyan foliküler rezervin esas rol oynadığı sayısız etkileşimin sonucudur (15).

Ovaryumda, folikül gelişimi ve seçimi esnasında atrezi/apoptoz nedeniyle ovaryum foliküllerinin büyük bir kısmı kaybolurken, az sayıda folikül gelişimini tamamlar ve ovulasyon olayı gerçekleşir. Ovaryum rezervinin (primordiyal folliküllerin) zamanından önce tüketilmesi; büyüyen foliküllerin sayısında hızlı azalma ve oosit kalitesinin düşmesi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır. Bu durum üreme çağındaki dişilerde infertiliteye neden olabilir (16).

Stres, prematür over yetersizliğinin (POY) yaygın ve önemli bir sebebi haline gelmiştir. Bu nedenle, stres kaynaklı POY mekanizmalarını ortaya koymak oldukça önemlidir (17). Bununla birlikte, folikülleri atreziden koruyan pek çok ovaryum içi faktör olduğu da bilinmektedir (18,19). Bu faktörlerden B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2); apoptoza uğrayan germ hücrelerinin sayısını azaltarak, follikül havuzunu koruyabilir (20). İnsülin-benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1); folikül büyümesini kontrol eder ve folliküller apoptotik süreçte yok olmaktan kurtarmak için, hayatta kalma faktörü olarak görev yapmaktadır (21). Anti-müllerian hormon (AMH); hem büyüyen folliküllerin sayısının düzenlenmesinde, hem de ovulasyon için seçilmesinde önemli bir role sahiptir (22).

Tüm üreme dönemi boyunca kullanılmak üzere, kısıtlı sayıda oosit havuzunu içeren ovaryumlarda stres, oosit sayısını ve/veya kalitesini etkileyen günümüzün önemli bir sorunudur ve hasar mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Kronik immobilizan stres modeli uyguladığımız bu çalışmada amacımız; ratlarda stresin serum kortizol ve davranış parametreleri, ovaryum morfolojisi ve ovariyan folikül gelişiminde rol oynayan IGF-1, AMH, Bcl-2 immünoreaktiviteleri üzerine etkileriyle birlikte, vajinal smear bulgularını da değerlendirerek, kronik stres-infertilite ilişkisine dair veriler ortaya koymaktır.

GENEL BİLGİLER

OOGENEZ

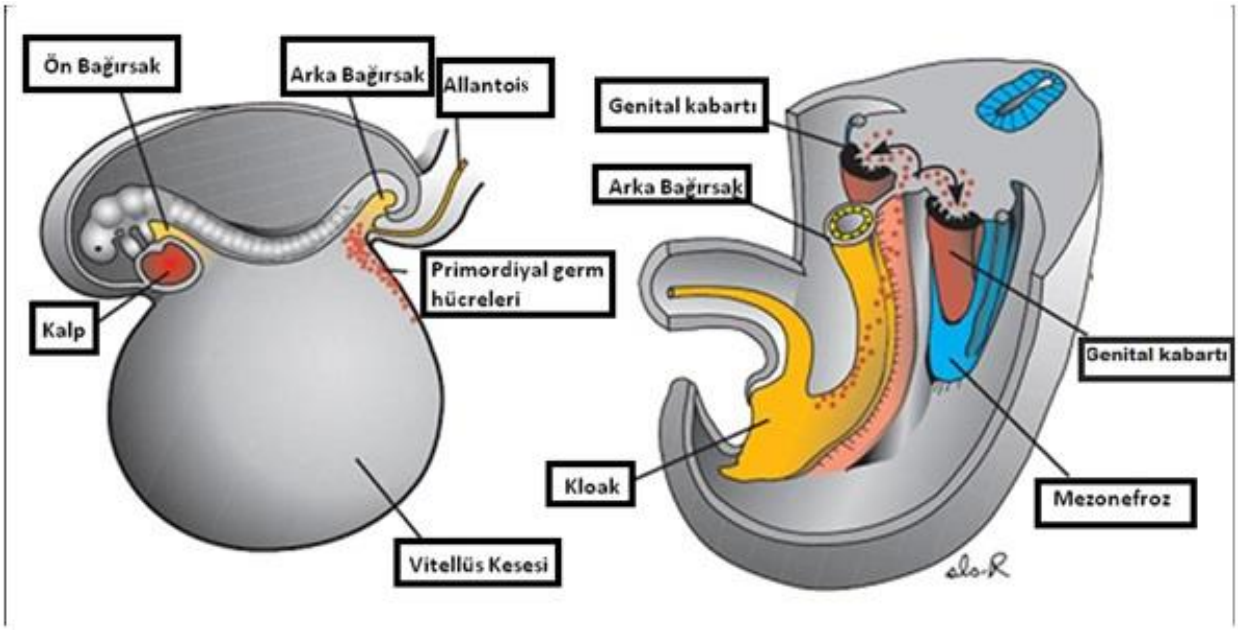
Ovaryum (over) sürekli değişen bir doku ve oldukça dinamik bir organdır. Dişilerde overlerin görevi: 1) gamet üretimi (oogenezis), 2) steroid yapılı hormonların sentezlenmesi ve salgılanmasıdır. Bu işlevlerin tümü oositlerden ve foliküler hücrelerden oluşan ovaryum foliküllerinin aktivitesine bağlıdır. Foliküllerin aktivitesi ve gelişimi ise hipotalamus-hipofiz ekseninden salgılanan gonadotropinler tarafından düzenlenmektedir (23). Olgun bir oositin overlerde oluşturulup buradan atılmasına ovulasyon adı verilir. Ovulasyon, genel olarak puberte döneminde başlayıp menopoza kadar devam eden bir süreçtir. Sağlıklı insanlarda genital siklusun 13-14. günlerinde gerçekleşmektedir. Her 28 günde bir overlerden bir oositin atılmasıyla tekrarlanan olaylar zinciri ise ovariyan siklusu ifade eder ve 3 fazda incelenir.

1- Foliküler faz : Foliküllerin büyümesi ve gelişimi görülür.
2- Ovulasyon : Olgun oosit atılır.
3- Luteal faz: Korpus luteum (KL) oluşur, durağan bir süreç izlenir (24).

Foliküler Faz

Folikülogenez; oositlerin ve oosit çevresini saran somatik hücre karakterindeki granüloza hücrelerinin beraber gelişip büyüdüğü devamlı bir gelişim sürecidir. Folikülogenez, fetal yaşamda başlar, sürekliliğini sağlayan mekanizmalar; oosit büyümesi, granüloza hücrelerinin bölünmesi ve teka tabakasının gelişmesidir (25). İnsanda, fetal yaşamın 3-4. haftalarında, yolk kesesinin dorsal duvarından, allantoisin başlangıç bölümüne yakın yerde, ileride oositleri oluşturacak olan primordiyal germ hücreleri (PGH) belirir. Embriyogenez sırasında embriyonun

katlanması ile yolk kesesine ait dorsal parça, embriyonun içine geçer ve buraya dahil olur. Eş zamanlarda (fertilizasyondan yaklaşık 6 hafta sonra) PGH'leri de arka bağırsağın dorsal mezenterinde bulunan gonadal kabartılara göç eder (Şekil 1) (26).



Şekil 1. Primordiyal germ hücrelerinin gonadal kabartılara göçü (26)

PGH'lerinin göçü sırasında cinsiyet tayini de başlamaktadır. Gelişmekte olan gonadlara PGH'lerinin göçü, proliferasyonu ve kolonizasyonu birçok faktör tarafından kontrol edilir. Büyüme ve farklılaşma faktörü 9 (GDF9), kemik morfogenetik proteinleri (BMPs), kök hücre faktörü (SCF), temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), transkripsiyon faktörü Wilms 'tümör 1 (Wtl) gibi faktörlerin yanı sıra (27), PGH proliferasyonu ve göçü için kritik olan B lenfosit kaynaklı olgunlaşma proteini-1 (BLIMP1), PGH'lerin hayatta kalması için oktamer bağlayıcı transkripsiyon faktörü 4 (OCT4) bunlardan bazılarıdır (28). Overlerin oluşması ve devamlılığının sağlanması için PGH'ler gereklidir, aksi takdirde over dokusu dejenere olur (29). Gonada ulaşan PGH, oogonium ismini alır ve gonadal kabartının mezenkminden köken alan somatik hücreler ile beraber hızlıca prolifere olur ve gelecekteki oosit popülasyonunu arttırır (26,27). Primordiyal folikülleri oluşturmak üzere oogonium adını alan germ hücreleri, tek tabaka somatik hücreler tarafından çevrelenir. Daha sonra oogoniumlar ilk mayoz bölünmeye giderek primer oosit ismini alırlar. Primer oositler, ovulasyon evresine ulaşana kadar mayoz bölünmenin diploten aşamasında uzun süre istirahat halinde beklerler (27). Primer oositler hızlı mitoz bölünmeler sonucunda 6. haftada 10.000, 8. haftada 600.000, 20. haftada da 6.000.000 civarına ulaşmaktadır. Eş zamanlı olarak ovaryumdaki oositlerin bir kısmı ölüp fagositik hücreler

tarafından imha edilen atrezi sürecine girer (30). Atrezi 20. haftada en yüksek seviyesine ulaşır. Bu dönemin sonrasında mitoz azalmaya başlar ve 28. haftada biter. 20. haftadan sonra azalmaya başlayan primer oosit sayısı, yenidoğanda 1.000.000, pubertede ise yaklaşık 300.000-400.000 kadardır. Bir dişinin üreme dönemi boyunca ovulatuar aşamaya yalnızca %1'i ulaşmaktadır (26). Çoğu ise atreziye uğrar ve menopoz sonrası dönemde yaklaşık bin kadarı overlerde kalır. Ovaryumda bulunan foliküller, gelişen oositler için bir mikroçevre sağlar. Foliküler fazda, ovaryum içinde gelişen foliküller sırası ile primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer (graaf) folikül olmak üzere 4 tipte incelenmektedir (30).

Primordiyal folikül

Fetal yaşamın 3. ayında 1. mayoz bölünmesine başlayan PGH'lerin çoğu gelişimin 7.ayında primer oosite dönüşümlerini tamamlar. Ovaryum foliküllerini oluşturmak için primer oositlerden her biri, yassı foliküler hücreler ile çevrelenip primordiyal folikülleri oluştururlar. Bu primordiyal foliküller ovaryumun yüzeyel korteksinde konumlanırlar (24). Primordiyal folikül aktivasyonu çok dinamik ve sıkı bir şekilde kontrol edilen bir süreçtir ve konuyla ilgili çok sayıda çalışma olmasına rağmen, pek çok moleküler mekanizma hala tam olarak anlaşılamamıştır (28).

Foliküler gelişim ve farklılaşma; endokrin hormonlar, ovaryum içi düzenleyiciler ve hücre-hücre etkileşimleri ile sıkı şekilde düzenlenen sıralı olaylardır. Primordiyal folikülün foliküler hücrelerinde gonadotropin ve folikül stimüle edici hormon (FSH) için reseptörlerin bulunmaması, primordiyal folikül büyümesinin FSH düzenlemesinden bağımsız olduğunu ortaya koymaktadır (27). Primordiyal foliküller oluşurken bir yandan da apoptoza maruz kalırlar. Bu süreçte apoptozu tümör nekroz faktör alfa (TNF-α) uyarırken, germ hücrelerinin korunmasını B-hücre lenfoma 2 (Bcl-2) sağlamaktadır. Apoptozu uyaran diğer bir faktör Bcl-2 ilişkili X (Bax) proteindir. Bax yetersizliğinde primordiyal folikül sayısının arttığı gözlenmiştir (31). TGF-β ailesine üye olan GDF9 proteininin, primordiyal foliküllerin oluşumlarına katkısı olmasa da oositlerin etrafında yer alan granüloza hücrelerinin büyümesinde, aynı zamanda farklılaşmasında etkili bir role sahip olduğu bildirilmiştir (32).

Doğumda ve puberteye kadar olan süreçte, primer oositlerin tümü birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde dinlenme halindedir. İstirahat halindeki primer oositlerin olgunlaşması, folikül hücrelerinde üretilen ve oositlerin olgunlaşmalarını inhibe eden oosit maturasyon inhibitörü (OMI) tarafından baskılanmaktadır (33). Primordiyal folikül içinde bulunan primer oositler, yuvarlak şekillidir ve çapları ortalama 30 μm'dir. Yapılarında geniş veziküler bir nükleus ve belirgin bir ya da daha fazla nükleolus bulundururlar. Elektron

mikroskobunda incelendiğinde, organelden zengin olan bu oositlerde yaygın endoplazmik retikulum, oldukça belirgin Golgi kompleksi, bol lizozom ve mitokondri gözlemlenir. Pubertenin başlaması ile birlikte hipofizden salgılanan FSH sayesinde, bir grup primordiyal folikül her ay gelişim sürecine katılır. Foliküllerin gelişimi hem oositin hem de etrafındaki yassı foliküler epitelin proliferasyonu ile devam etmektedir. Erken folikül gelişim evresi (primordiyal, primer) daha çok parakrin etkiler altındayken, multilaminar foliküllerden itibaren gonadotropin hormonlar folikül büyümesini kontrol eder (24).

Primer folikül

Bu süreçte oositte, foliküle komşu stromada, folikül hücrelerinde değişiklikler olmaya başlar. Öncelikle oosit büyür. Büyüyen oositin çapı yaklaşık 50-80 μm'dir. Oosit sitoplazmasında granüler endoplazmik retikulum, ribozomlar, küçük veziküller, mitokondriler, mikroveziküler cisimler, iyi gelişmiş Golgi kompleksi, lipokrom pigmenti ve lipid damlaları bulunur (30). Oosit kökenli Sohlh1 (spermatogenezis ve oogenezis spesifik temel helezon-halka-helezon 1) ve Nobox'dan (the oocyte-specific transcription factor) gelen iki transkripsiyon faktörünün erken ekspresyonu, primordial foliküllerin bir sonraki primer foliküler evreye ilerlemesi için belirleyici niteliktedir. Nobox'dan yoksun ovaryumda, foliküllerin çoğunluğu primordiyal aşamada takılı kalır, oositler dejenere olur ve tek tabakalı kübik primer foliküllerin ötesine gelişemez (28). Primer foliküle gelişim sırasında, oositin çevresindeki yassı foliküler hücreler zamanla kübik şekil alırlar. Artık bu tek katlı kübik hücrelerden oluşmuş foliküle ünilaminar primer folikül denilmektedir. Folikül hücreleri proliferasyon ile oositin çevresinde çok katlı hale gelir ve folikül, multilaminar primer folikül adını alır. Çok katlı folikül epiteline bu aşamada, granüloza tabakası ismi verilir (34). Granüloza tabakasındaki hücreler oluklu bağlantılar (gap junctionlar) ile iletişim kurmaktadır. Gap junctionlar, kandan foliküler sıvıya besinlerin ve küçük moleküllerin geçişine izin vererek hem oosit hem de folikül gelişimine katkı sağlamaktadır. Granüloza hücreleri folikülogenezde foliküllerin gelişimi ve büyümesi sırasında önemli role sahiptir. En iyi çalışan endokrin hücrelerden biridir (35). Oositin büyümesi sebebiyle salgılanan bazı özel proteinlerin birleşmesi sonucu, zona pellusida (ZP) adında 5-10 μm kalınlığında ekstraselüler bir örtü oluşur. ZP sentezine folikül hücrelerinin ve oositlerin katkı sağladığı düşünülmektedir. Bu örtü folikül hücreleri ve oositin arasında bulunur. Zona pellusida; ZP1, ZP2, ZP3 ve ZP4 olarak bilinen glikoproteinlerden meydana gelmektedir. ZP3 ve ZP4 hem spermatozoa bağlanma reseptörü olarak işlev görür hem de akrozom reaksiyonunu indüklemede rol oynar (30).

Gelişme sırasında, folikül içerisindeki değişikliklerin yanı sıra folikül etrafındaki bağ dokusu da değişmektedir. Stroma, folikül çevresinde sıkı bağ doku oluşturarak teka folikülü ismini almaktadır. Teka folikülü ile granüloza tabakası arasında bazal bir membran olan camsı membran bulunur. Teka folikülü kendi içinde iki kısıma ayrılır: İç tarafta fibroblastların, kollajen liflerin, steroid karakterde salgı yapan hücrelerin yer aldığı ve kan damarları bakımından oldukça zengin "teka interna", dış tarafta ise düz kas ve kollajen liflerden oluşmuş bir "teka eksterna" tabakası bulunur (24). Teka internadaki steroid salgı yapan hücreler Luteinize hormon (LH) reseptörü taşımaktadır. LH'ın uyarılmasına cevap olarak androjenleri salgılarlar. Androjenler östrojen öncülleri olarak bilinirler (30).

Sekonder folikül ve dominant folikül seçimi

Primer foliküller, granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile hacim olarak büyür ve ovaryum korteksi içerisinde daha derinlere hareket eder. Granüloza hücreleri yaklaşık 6-12 tabakalı hale geldiğinde hücrelerin arasında, içlerinde sıvı bulunan boşluklar meydana gelir (30). Granüloza hücreleri arasında biriken sıvıya foliküler sıvı veya likör folikuli adı verilmektedir. Foliküler sıvı; büyüme faktörleri, hyaluronik asit, bağlayıcı proteinler, plazminojen, östrojen, progesteron ve androstenedion bakımından oldukça zengindir. Bu aşamadaki foliküle de sekonder folikül denir. İleri aşamada sıvı dolu kaviteler birleşir ve hilal biçiminde bir bütün oluşturur. Oluşan bu büyük hilal biçimli kaviteye antrum ismi verilir. Folikül içindeki oosit ortalama 125 μm çapındadır ve eksantrik yerleşimlidir (24). Oosit büyümesi OMI tarafından inhibe edilir. OMI, granüloza hücrelerinden antral sıvı içerisine salınır, konsantrasyonu; küçük foliküllerde maksimum seviyede iken folikül olgunlaştıkça azalmaktadır (33).

Menstrual siklusun 5-7 günleri arasında dominant folikül seçimi olmaktadır. Belirli sayıdaki sekonder folikülden oluşmuş bir kohord, FSH'ın etkisi altında ileri aşamaya doğru büyümeye başlar. Daha sonra kohord içinde büyüyen foliküller, dominant folikül seçimi için yarışa girer. Büyüyen sekonder foliküllerin granüloza hücre tabakaları artmaya başladıkça, FSH ile aromataz aktivitesi uyarılır ve östrojen yapımı artar. Bunun ardından da inhibin B yapımı indüklenir. Bu havuz içinde gelişmekte olan foliküllerden bir tanesinin aromataz aktivitesi diğerlerine kıyasla en yüksektir. Aynı zamanda bu folikülün östrojenik ortamı da en idealdir. Bu özelikteki bir folikül "dominant folikül" olarak seçilir ve ovulasyona kadar ulaşır. Dominant folikül seçiminden sonra FSH, ovaryumda bulunan LH reseptörünün ekspresyonunu ve IGF-1 gibi çeşitli büyüme faktörlerinin üretimini arttırmaktadır. İnhibin B ve östrojenin kanda artması sebebiyle FSH salınımı baskılanır. Kohordda geriye kalan sekonder foliküller ise atreziye uğramaktadır (30,36).

Tersiyer (graaf) folikül

Seçilmiş olan dominant sekonder foliküldeki antrum geliştikçe, oosit etrafında bulunan granüloza hücreleri antrum içine doğru "kümülüs ooforus" adı verilen bir çıkıntı yapmaktadır. Oositin zona pellusidayı çevreleyen ve antruma bakan kısmındaki granüloza hücreleri ise özel olarak "korona radyata" ismini alır. Bu hücreler ovulasyon esnasında oosit ile beraber ovaryumu terk etmektedir. Bu yapıdaki folikül tersiyer, preovulatuar veya graaf folikülü ismini alır (24). Büyümeye devam eden bu folikülde, granüloza hücre proliferasyonu azalır. Antrum giderek genişler ve granüloza tabakası incelir. Teka interna ve eksterna tabakaları belirginleşir, teka internada bulunan hücrelerin sitoplazmasında lipid damlacıkları birikir. LH'ın teka internayı aktive etmesi ile buradan östrojen prekürsörü olarak bilinen androjenler salgılanır. Bazı androjenler granüloza hücrelerine taşınmaktadır. Granüloza hücrelerinde bulunan androjenler, FSH yanıtı olarak östrojene dönüştürülür. Böylece folikülün daha da büyümesi uyarılmış olur. Graaf folikülü büyük olmasından dolayı ovaryum yüzeyinde stigma adı verilen belirgin bir çıkıntı oluşturur (30).

Ovulasyon

Olgun hale gelmiş folikülden sekonder oositin atılmasıyla sonuçlanan olaya "ovulasyon" adı verilir. Seçilen dominant folikül, 28 günlük periyodda oluşan menstrual siklusun yaklaşık 14. gününde ovule olmaktadır. Ovulasyondan yaklaşık 24 saat önce ani LH artışı gözlenmektedir. Artıştan 12-24 saat sonra ise primer oosit istirahat halinden çıkarak, 1.mayoz bölünmesini tamamlayıp, 2. mayoz bölünmesine devam eder. Oluşan oosit artık sekonder oosit olarak isimlendirilir. Buna ek olarak birinci kutup cismi (polar cisim) de oluşur (37).

Luteal Faz

Ovulasyon olduktan sonra, geriye kalan granüloza hücreleri ve teka hücreleri tarafından oluşturulmuş folikül duvarı "korpus luteuma" dönüşür. İlk olarak teka interna tabakasındaki kan damarlarının rüptüre olmasıyla, folikül boşluğunda merkezi pıhtı içeren "korpus hemorajikum" gelişir. Bir müddet sonra bağ doku hücreleri folikül boşluğuna akın ederler. Bu evrede ki hücreler LH reseptörlerini içerirler. Derin kortekse yerleşmiş olan korpus luteum östrojen ve progesteron salgılar. LH reseptörlerinin uyarılması halinde korpus luteumun esas hormonu olan progesteron salgılanması artar (30).

Gebelik mevcut ise endometriyumu implantasyona hazırlamak amacı ile korpus luteum bir müddet devamlılığını sürdürür. Gebeliğin olmaması durumunda, korpus luteumun dejenerasyonu gözlemlenir. Zamanla "korpus albikans" adı verilen skar dokuya dönüşür (34).

ATREZİ SÜRECİ

Programlanmış hücre ölümü, düzenlenen ya da kontrol edilen hücre ölümünü ifade etmektedir. Böyle bir süreçte, organizmanın gelişimi esnasında fazlasıyla hasar gören hücrelerin yok edilmesi ya da yetişkin dokularda homeostazın sürdürülmesi sağlanmaktadır. Hücre ölümünün en çok bilinen 3 tipi apoptoz, nekroz ve otofajik hücre ölümüdür. Apoptoza uğramış bir hücrede, nükleer fragmantasyon ve yoğunlaşma ayrıca hücre hacminde de bir azalma gözlenmektedir. Nekroz, hücrede bulunan sitoplazmanın ve organellerin şişmesi, plazma membranının dejenerasyonu ile karakterizedir. Otofaji ise hücresel içeriğin lizozomlara iletildiği, hücre içi bozunma sistemi olarak bilinmektedir (38).

İlk olarak 1842 yılında Carl Vogt'un keşfettği apoptoz, ovaryumda her foliküler aşamada gözlenir ve memelilerde foliküler atrezinin temel mekanizmalardan birini oluşturur (26). Kemoterapi, radyasyon, endojen ve ekzojen stres faktörlerine maruz kalmanın bir sonucu olarak, primordiyal foliküller ovayum rezervinden kaybedilebilir. Aynı zamanda da atrezi, ovulasyona ilerleyemeyen foliküllerin uzaklaştırıldığı hücresel olayları kapsar ve korpus luteumun luteolizisinde rol oynar (39).

Ovaryumda atrezi, folikülde (50 hücreden az foliküller hariç) üçten fazla piknotik nükleuslu granüloza hücresi bulunması, oositin çevresindeki granüloza hücrelerinden ayrılması, granüloza ve teka hücre katmanları arasında belirgin sınır kaybı, oosit fragmantasyonu gibi bazı histolojik kriterlere göre skorlanır (40). Atrezi sürecinde, granüloza hücrelerindeki dejenerasyonu oositteki bozulmalar takip eder. Bununla birlikte, atrezinin başlangıcı foliküler hücre ya da oositten kaynaklanabilir. Kumulus ooforus kompleksinin incelmesi ve oosit dejenerasyonu da atretik folikül kriteleri içerisinde yer almaktadır (41).

Son dönemde yapılan çalışmalar, otofajinin stres koşullarına tepki olarak indüklendiğini ve dogmatik bilgi olan folikül atrezisinde apoptozun rolü olduğundan başka otofajinin de granüloza hücre ölümünde etkili olduğunu ortaya koymaktadır. Her iki hücre ölüm tipinin benzer şekilde Bcl-2 ailesi proteinlerini kullanması, geçmişte tam bir ayrım yapılmasına imkan vermemiş olabilir ancak günümüzde kullanılan teknikler bu ayrımın yapılmasını kolaylaştırmaktadır (42).

Yapılan in vitro çalışmalarda, atretik foliküllerden elde edilmiş oosit-kumulus komplekslerinden (COCs) oluşturulan embriyoların, blastosist aşamasına kadar ilerlemelerinin zayıf olduğu gösterilmiştir (43). Ovaryum foliküllerinin hem büyümesi hem de gelişmesinde gonadotropinler rol oynamaktadır. Ovulasyondan önce çeşitli nedenlerden dolayı gonadotropinlerin artışının engellenmesi veya serumda azalması, foliküllerin atreziye gitmesine

sebep olur. Gonadotropinlerin dışında foliküller için çok sayıda yaşamsal faktör bulunmaktadır. Bu faktörlerden bazıları; dönüştürücü büyüme faktörü (TGF), EGF, interlökin-1 (IL-1), büyüme hormonu (GH), bFGF, ayrıca pro apoptotik göreve sahip GnRH, fas ligand, TNF-α da sayılabilir (44). Bununla birlikte, granüloza hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyaran IGF-I, granüloza hücrelerinin apoptozunu ve foliküler atreziyi önlerken (45), AMH primordiyal foliküllerin büyümesinde inhibitör etkiye sahiptir (46).

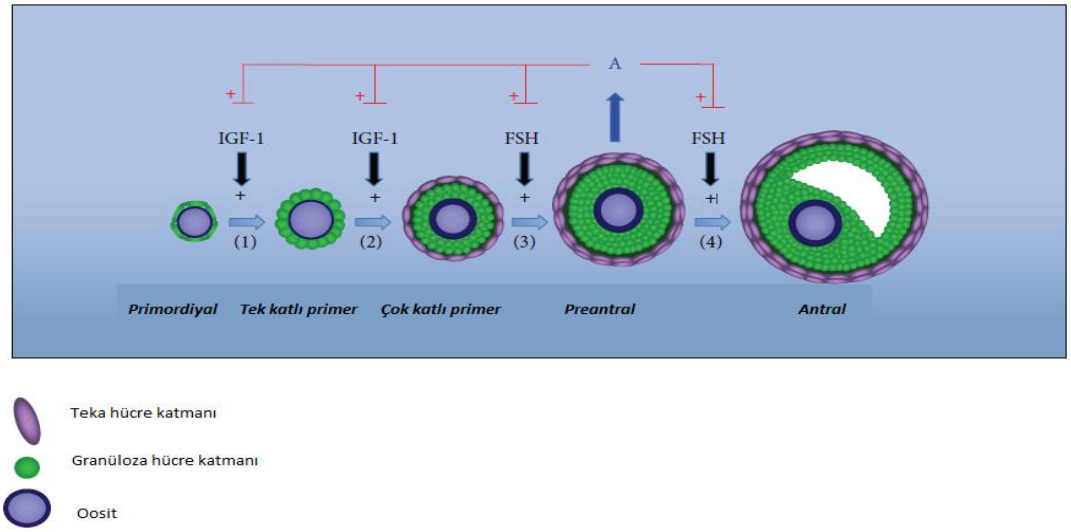
Apoptozun regülasyonunda özellikle Bcl-2 ailesi proteinleri, kaspazlar, p53 ve ilişki proteinler rol oynamaktadır. Hücre ölüm kararı verildiği zaman, apoptotik ölüm araçlarının koordinasyonuyla, çok sayıda alt program aktive edilir. Kaspaz ailesi ve Bcl-2 ailesi en önemli apoptotik regülatör faktörlerdir. Sağlıklı foliküllerde kaspaz-3 inaktif formda bulunur. Atretik foliküllerde ise aktif kaspaz-3 konsantrasyonu artmaktadır. Foliküler atrezi, oositten ya da foliküler hücrelerden başlayabilir (47).

OVARYUMDA IGF-1, AMH VE Bcl-2'NİN ROLÜ

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (IGF-1)

Ovaryumda foliküler atrezi mekanizmalarının tespiti yanında, folikülleri atreziden koruyan faktörlerin tespiti de önemlidir. IGF sistemi insanlar, kemirgenler ve evcil hayvan türlerinde folikül gelişimi ve granüloza hücre apoptozunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Bu sistem iki ligant (IGF-1, IGF-2), iki reseptör (IGF-1R, IGF-2R) ve altı tane IGF bağlayıcı proteini (IGFBPs) içermektedir. IGF' ler foliküler büyüme, seçilim, atrezi, hücresel farklılaşma, steroidogenezis ve oosit olgunlaşması gibi ovaryum içinde gerçekleşen birçok olayı düzenler. IGF-1, en önemli IGF ailesi üyesidir. Özellikle ovaryumdaki granüloza hücrelerinde ve oositlerde ifade edilir. IGF-1, granüloza hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyarırken, bu hücrelerdeki apoptozu ve foliküler atreziyi önlemektedir (48).

Ovaryumu hedef alan hormonlarla da etkileşime giren IGF-1, steroidogenezis ve foliküler olgunlaşmayı uyarmak için FSH ve LH ile çalışır (49), (Şekil 2). FSH ile birlikte, granüloza hücrelerinde östradiol-17β (E2) ve progesteron (P4) üretimini arttırır; LH ile birlikte, teka hücrelerinde androjen sekresyonunu uyarır (45).



Şekil 2. IGF-1 proteininin erken folikül gelişimi üzerindeki etkisinin şematik gösterimi (49).

İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 proteininin ifadesi, büyükbaş hayvanlarda granüloza ve teka hücrelerinde gözlemlenmiştir (23). IGF sistemi, üreme işlevlerinin düzenlenmesinde büyük öneme sahiptir. Hipotalamusta, hem somatotropik ekseni hem de üreme eksenini düzenler, böylece üreme ve büyümeyi koordine eder. IGF-1 çoğunlukla IGF-1R'ye düşük düzeyde de IGF-2R'ye bağlanmak için afinite göstermektedir. IGF-1 seviyesi folikülün atreziye yakalanmaması ya da olgunlaşmasında belirleyici etkiye sahiptir. Dominant foliküllerin, foliküler sıvısındaki IGF-1 konsantrasyonu yüksektir. IGF-1, Bax ve apoptotik Bcl-2 protein ekspresyonunu düzenlemesi sayesinde, hücre ölümünü engellemektedir (50).

Anti-Müllerian Hormon (AMH)

Fransız bir fizyolog olan Alfred Jost'un AMH'ı ilk keşfi, cinsel farklılaşma süreci ile ilgilendiği, yüzyılın ortalarına rastlamaktadır. AMH, dimerik glikoprotein yapısındadır. Büyüme ve farklılaşma faktörlerinden olan transforme edici büyüme faktörü β (TGF-β) ailesinin de bir üyesidir (51). AMH, çoğunlukla erkek cinsel farklılaşmasındaki rolü ile bilinmektedir. İlk olarak testislerde, Sertoli hücrelerinin gebeliğin 7. haftasına kadar, Müller kanalı gerilemesine neden olan AMH'ı ürettiğinin gösterilmesine karşın, ovaryumda gelişmekte olan folikül hücrelerinden de AMH üretilebildiği ortaya koyulmuştur (52). AMH'ın dişideki rolü, esas olarak AMH eksikliği olan fareler aracılığıyla tespit edilebilmiştir. AMH yokluğunda, primordial foliküllerin büyümeye başlamasında bir artış ve dinlenme halindeki primordiyal foliküllerde ise hızlı bir tükenme gözlenmiştir (53). Granüloza hücrelerinden postnatal dönemde salgılanan AMH'ın

serumdaki seviyesi, çocukluk ve ergenlik dönemlerinde artarken, 20'li yaşların ortasında pik yapar ve sonra menopoz dönemine kadar kademeli olarak azalır (54). Bu nedenle AMH, ovaryumun yaşlanma sürecinde bir belirteç olarak düşünülmüştür. AMH, aktive edilen primordiyal foliküllerin sayısı ile dinlenme havuzunda kalanlar arasında bir denge kurmak zorundadır (55).

AMH'ın folikülogenez üzerinde iki önemli anahtar rolü olduğu düşünülmektedir: Birincisi; primordial folikülden primer foliküle geçişi inhibe edici bir etki yaparak, primordiyal folikül havuzunu korumak. İkincisi; FSH bağımlı folikül büyümesini engellemek. AMH, gonadotropin bağımsız folikül büyümesi boyunca rol oynamaktadır (53).

Primordiyal foliküllerin pregranüloza hücrelerinin farklılaşmasından sonra, primer foliküllerin granüloza hücrelerinde AMH ekspresyonu başlar. İnsan ovaryumunda ilk önce primer foliküllerin granüloza hücrelerinde görülen AMH ekspresyonu, preantral ve küçük antral foliküllerde en yüksek seviyesine ulaşmaktadır. Büyük çaplı foliküllerde ise AMH ekspresyonu kaybolur ve büyük antral foliküllerde sadece kumulusun granüloza hücrelerinde zayıf boyanma gözlemlenir. Folikül büyümesinin, FSH-bağımlı evreleri sırasında ekspresyon gözlenmez (55).

İnsan modelinde, primer folikül büyümesinin başlatılması için AMH tedavisinin pozitif bir etki yarattığı bildirilmiştir (28). Tüm bunlara ek olarak AMH'ın polikistik over sendromunun (PCOS) teşhisinde ultrasonlu over morfolojisi kriterinin yerini alabileceği ve prematür over yetersizliğini teşhis etmek için ek bir parametre olabileceği ileri sürülmektedir (53).

B-Hücre Lenfoma 2 (Bcl-2)

Fetal ve yetişkin ovaryumlarında granüloza hücrelerinden Bcl-2 salgılanmaktadır ve ifadesi, çoğunlukla gelişen foliküllerde görülmektedir. Yapılan çalışmalarda, Bcl-2 eksik farelerde folikül sayısında azalma görülürken, Bcl-2'nin aşırı expresyonu sonucunda foliküler apoptozun ve atrezinin azaldığı kaydedilmiştir (56). Bcl-2 ile ilişkili ailenin üyeleri de dahil olmak üzere, çeşitli hücresel pro- ve anti-apoptotik proteinler, kaspaz aktivasyonunu düzenlemektedir. Özellikle Bcl-2 proteinleri, pro-apoptotik faktörlerin salınımını düzenler ve intrensek yolağı kullanarak, mitokondrilerden sitoplazmaya sitokrom c salınmasını sağlayıp etki ederler. Sitokrom c, kaspaz-9 aktivasyonu için oldukça önemlidir. Kaspaz-9'un inaktif kaspaz-3'ü aktifleştirmesi halinde, hücrede apoptoz başlamaktadır. Kaspaz-9 eksik fare ovaryumlarında, granüloza hücrelerindeki başarısız apoptoz sonucu çok sayıda gelişmekte olan folikül gözlenmiştir (47).

STRES

Stres, organizmaların dengesini bozan fiziksel ve psikolojik değişiklikler şeklinde tanımlanmaktadır. Aynı zamanda, birçok hastalığın da en önemli nedenlerinden biri olarak bilinir. İlk olarak 1930'lu yıllarda Hans Selye, stres üzerine araştırmalara başlamıştır ve stres ile insan sağlığı arasındaki ilişkinin anlaşılmasına yardımcı olmuştur (57). Stres, hayat kalitesini olumsuz etkileyen önemli bir faktördür. İnsanın stres seviyesi, depresyonun patogenezine de katkı sağlamaktadır. Stres tepkisinin en belirgin özelliği, otonom sinir sistemi ve HPA eksenin aktivasyonudur. Bu sayede bir tehdide karşı fizyolojik ve davranışsal tepki olan "savaş veya kaç" yanıtı ortaya çıkmaktadır (58).

Stres faktörleri genel olarak 4 gruptan oluşur:

1. Yaklaşan bir olumsuz durumun tehdidine karşı öğrenilmiş bir cevaba dayanan psikolojik stres faktörleri: Korku, endişe, yeni veya kontrol edilemeyen bir çevreye maruz kalma vb.
2. Fiziksel bir uyarandan oluşan ve güçlü bir psikolojik bileşeni olan stres faktörleri: Ağrı, ayak şoku, immobilizasyon modellemelerindeki gibi.
3. Kardiyovasküler homeostazı zorlayan stres faktörleri: Kanama, ortostatik stres, egzersiz, ısı maruziyeti vb.
4. Bireyler arasındaki etkileşimi bozan sosyal stres faktörleri: Eşin ölümü, boşanma, işsizlik vb. (57).

Vücut, başlangıçta farklı hormonların salınmasıyla homeostazı korumak için otonom sinir sisteminin tetiklenmesi de dahil olmak üzere, tüm olası yolları kullanarak stres ile baş etmeye çalışmaktadır. Farklı stres türlerine maruz kalma, çok uzun veya kritik hale geldiğinde ise stres tepkisine uyumsuzluk ortaya çıkmaktadır (59). Hayatın her alanında bulunan ve oldukça yıkıcı etkilere sahip olan stres, şiddetine ve uygulama süresine göre 4 kategoride incelenmektedir:

Akut Stres

Aniden karşılaşılan olaylar (örneğin bir saldırı gibi) ile birlikte gelişen stres tipidir. İlk dört haftada meydana gelir. Dikkate değer bir uyarılmışlık durumu mevcuttur (heyecan, korku).

Subakut Stres

Dönem içerisinde yaşanmış sıkıntılı durumlarda ve birbirini başlatan bir seri olumsuz olaylar zinciri sonucunda ortaya çıkan stres tipidir (yas tutma, depresyona girme, birini kaybetme).

Kronikleşme Sürecindeki Stres

Farklı zaman aralıklarıyla, sürekli olarak, olumsuz ve stresli durumlara maruz kalınan stres tipidir. Bu zaman aralıklarında stres faktörleri etkisini sürekli göstermektedir.

Kronik Stres

Aralıksız, sürekli bir zorlanmaya ve ağır şartlarda yaşamak zorunda kalmaya dayanan stres tipidir. Stresin uygulama süresi ne kadar fazla olursa kötü etkilerinin ortaya çıkma potansiyeli de o kadar fazla olmaktadır (60).

Deneysel modellerde hareketsizlik/immobilizasyon stresi, hareketin yanı sıra saldırganlığı da kısıtlayan, hem psikolojik (kaçış reaksiyonu) hem de fiziksel stres modellemesi için kolay ve kullanışlı bir yöntemdir (61). Organizma olumsuz koşullara maruz kalma, iç ortamın istikrarını savunma ve hayatta kalmayı artırmak için bir dizi tepki başlatır. Genellikle "stres tepkisi" olarak adlandırılan bu düzenlenmiş süreç, vücudun homeostatik meydan okuma taleplerini gidermek için gerekli, fizyolojik ve metabolik ayarlamaları yapan çeşitli mekanizmaları içerir. Bu tür değişiklikler fizyolojik (duygusal ve bilişsel), davranışsal ve biyolojik seviyede (değişmiş otonomik ve nöroendokrin fonksiyon) ortaya çıkabilir. Merkezi sinir sistemi (MSS), stres yanıtlarının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (57). Stres tepkisinde, vücut birçok olaya ya katekolaminler gibi kalp atış hızı ve kan basıncını artıran arabulucuları serbest bırakarak ya da bu arabulucuların kronik yükselmesi sonucu ateroskleroz gibi patofizyolojik değişikliklerle yanıt verir (58).

Stresin olumsuz üreme sonuçlarına yol açtığı mekanizmalar ve arabulucular tam olarak anlaşılmamıştır. Stresin üreme üzerindeki etkilerinin nedeni olarak kortizolün rolü hakkında geniş çaplı bir araştırma yapılmış olmasına rağmen, henüz bir netlik kazanmamıştır (62).

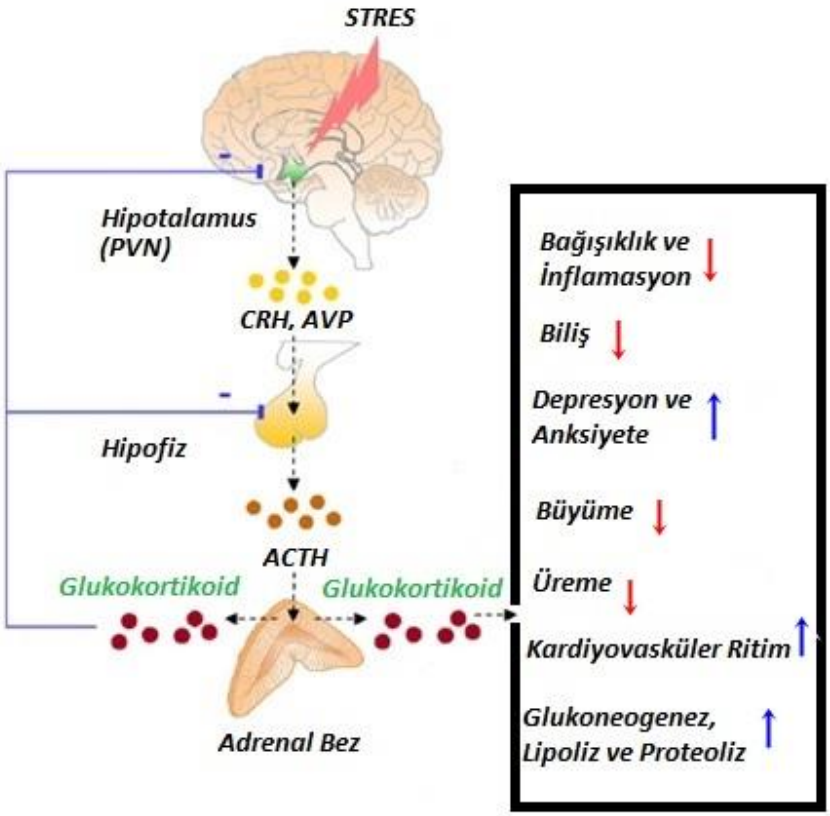
Dişilerde kronik stres, gonadotropik hormonların azalmasına yol açarak anovulasyona ve ardından infertiliteye sebep olur. Yüksek stres; erken menopoz başlangıcı, dismenore, erken doğum ve düşükler için etkili bir faktördür. İmmobilizasyon stresi, psikolojik ve fiziksel stresörlerin bir kombinasyonudur ve araştırmalarda sıklıkla kullanılmıştır. Kemiriciler, sığırlar ve koyunlar üzerinde yapılan araştırmalarda, immobilizasyon stresinin sağlıklı foliküllerin sayısının azalmasına, atretik foliküllerin de sayıca artmasına neden olduğu rapor edilmiştir (59). Stres faktörleri testis ve ovaryumun işlevlerini bozarak fertilitenin azalmasına neden olmaktadır (6). Yirmi bir günlük kronik kısıtlama stresinin, erkeklerde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu, dişilerde ise öğrenme görevinde, dişi sıçanların performansını arttırdığı veya etkilemediği rapor edilmiştir (63). Başka bir çalışmada, stresin dişi farelerde düzensiz östrus siklusuna, kortizol seviyesini arttırarak anovulasyona neden olduğu belirtilmiştir (64). Kısıtlama stresi uygulanmış dişi sıçanlarda ovulasyonda ve oosit gelişiminde azalma gözlenmiştir (65).

Kısıtlama stresi sonucunda fare serumundaki Bcl-2 ve IGF-1 seviyeleri azalırken kortizol ve progesteron seviyesi artmıştır (66). Stres için kullanılan hayvan modellerinde beynin etkilendiği ve bununla ilişkili olarak psikiyatrik hastalıkların ortaya çıktığı belirtilmiştir (67).

Psikososyal açıdan zayıf bir profile sahip veya hamileliği sırasında depresyonda olan kadınlarda prematüre bebek riski artmaktadır (68). Sıçanların kullanıldığı deneyde, gebeliğin ortalarında kısıtlama uygulanması luteolizise, fetüsün gelişiminde gecikmelere ve fetüs kayıplarına neden olmuştur (68). Memelilerdeki stresin üreme üzerine etkileri arasında oosit gelişim ve maturasyon bozukluklarının yanı sıra, laktasyon bozuklukları da bulunmaktadır (69). Ayrıca, kronik kısıtlama stresinin tümör oluşumuna katkı sağladığı da öne sürülmüştür (70).

Stresin Hormonal Kontrolü

Stresin olumsuz üreme sonuçlarına yol açtığı mekanizmalar ve aracıları iyi anlaşılamasa da stresin en belirgin özelliği, glukokortikoid seviyesinin artmasına bağlı olarak HPA ekseninin aktivasyonudur. Genel anlamda çoğu memeli türlerinde, stresin bir sonucu olarak, HPA ekseni aktive edildiğinde sentezlenen asıl glukokortikoid kortizol iken, kemirgenlerde kortikosterondur. Glukokortikoidlerin üreme işlevini inhibe edip etmediklerini belirlemek amacı ile detaylı araştırmalar yapılmaktadır (62). Farelerin kedi stresine maruz bırakılmaları sonucu, plazmada kortizol seviyesinin kontrol grubuna kıyasla arttığı gözlenmiştir (68). Stres kaynaklı glukokortikoid seviyesinin değişimi cinsiyete göre farklılıklar göstermektir. Erkeklerde, glukokortikoid dişilere göre stresi takiben daha yüksek seviyelere ulaşmaktadır. Stresli olaylar karşısında beyin dokusunda, glukokortikoidlerin yüksek seviyelere ulaşması, stres anında adrenal korteksten hormon salınımının güçlü kanıtıdır (71). Stres faktörleri aracılığıyla HPA ekseninin nöroendokrin aktivasyonu, hipotalamusta bulunan paraventriküler nükleus (PVN) tarafından, CRH ve arjinin vazopressin (AVP) adındaki iki nöropeptidin salgılanması ile gerçekleşir. Ardından da adrenal korteksten kortizol salınımı uyarılır. Hipofiz ön lobundaki kortikotrop hücreleri, CRH ve AVP nöropeptidleri ile uyarılır ve kortikotrop hücrelerinden ACTH genel dolaşıma salınır. Bu sayede adrenal korteks kortizol salgılar (72) (Şekil 3). Normal bireylerde, kortizol seviyeleri sabahın erken saatlerinde tipik bir sirkardiyen ritmi gösterir, ardından gün boyunca kademeli bir düşüşe gider (73).



Şekil 3. Stres sırasında kortizol salınımı ve etkileri (72).

Hipotalamus tarafından salgılanan CRH, HPA eksenin temel aktivatörü sayılmaktadır. Genel görevi strese karşı otonomik, endokrin ve davranışsal tepkileri yönetmektir. CRH, hipotalamus-pituiter-gonadal (HPG) ekseninin, stresli olaylar sırasında baskılanmasında da önemli bir rol oynamaktadır. Yeni bulgular, CRH' ın ovaryum stroma hücrelerinde, antral foliküllerde bulunan olgun oositlerde ve teka hücrelerinde lokalize olduğunu ayrıca, ovaryum tarafından da üretilebildiğini göstermiştir (74,75). Üreme sistemi HPG ekseninin kontrolü altındadır. Bu sistem de hipotalamustaki GnRH nöronlarına bağlıdır (72). Stres, dişilerde üremede rol oynayan GnRH/LH salınımını etkilemek kaydıyla, preovulatuar dalgalanmayı bloke ederek, ovulasyonun ortadan kaldırılmasına ya da ovulasyonun gecikmesine sebep olmaktadır. Sonuç olarak, döllenmenin gerçekleşme olasılığı düşmektedir. Çok sayıda çalışma, birçok stres faktörünün LH dalgalanmalarına müdahale ettiğini göstermiştir. Örneğin sıçanlarda kısıtlama stresi preovulatuar dalgalanmayı bloke edebilmektedir (62). Kısıtlama stresi sonucunda plazma kortizol seviyesinin artışının yanında, HPA ve HPG eksenleri etkilenerek oositlerin yeterlilikleri bozulmaktadır. Stres sırasında, HPA aktivasyonu ve buna bağlı olarak HPG ekseninin baskılanması iki eksenin arasındaki zıt ilişkiyi doğrulamaktadır. Araştırmalar, stresin GnRH'ın aksine LH atım frekansını düşürdüğünü göstermiştir (72).

KEMİRGENLERDE ÖSTRUS SİKLUSU

Sıçanların ömrü cinsiyetine, soyuna, genetik kökenine, hastalık veya sağlık durumuna bağlı olarak 2-3 yıl arasında değişmektedir. Dişi sıçanlar 2 aylık olduklarında, reprodüktif açıdan olgunlaşarak östrus siklusu ve ovulasyon gösterirler. İnsanlarda menstrual döngü 28 günde bir izlenirken, genç sıçanlarda östrus siklusu olarak bilinir ve 4-5 gün sürmektedir. Bu nedenle sıçanlar ile çalışmak, deney süresini oldukça kısaltacağı için avantajlı görülmektedir (76). Östrus siklusu sırasında hormonlara bağlı olarak vajinal epitelde meydana gelen değişiklikler, vajinal smear ile kolaylıkla gözlemlenebilir. Vajinal smearlarda bulunan hücrelerin mikroskobik olarak değerlendirilmesi sonucu sıçanlarda ve farelerde hem östrus siklusunun evreleri hem de hipotalamus-pituiter-gonadal ekseninin fonksiyonel durumu belirlenebilir. Yaşlanmaya bağlı olarak gerçekleşen ilk değişikliklerden biri östrus siklusu süresinin uzamasıdır. Fare ve sıçanlarda siklusun uzaması genellikle düzensiz siklus olarak kabul edilir. Sıçanlardaki östrus siklusu 4 evreden oluşmaktadır. Bu evreler sırasıyla proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrustur (77).

Proöstrus

Yaklaşık 12 saat sürmektedir. Bu evrenin baskın özelliği, nispeten tek tip görünüşte ve boyuttaki küçük, yuvarlak, nükleuslu epitel hücrelerinin varlığıdır. Genelde hücreler düzenli hücre sınırlarına sahiptir. Çoğu zaman birbirine bağlı kümeler halinde de görülürler. Tipik olarak nötrofil görülmemektedir. Ancak rodentlerde diöstrustan proöstrusa geçişte ya da erken proöstrusta nadiren nötrofillere, daha düşük sayıda büyük epitel hücrelerine ve nükleusu olmayan keratinize hücrelere rastlanır. Siklus östrusa yaklaştığında, keratinize hücreler sayıca artmaktadır (77). Evrenin başında östradiol seviyesi en düşük düzeydedir, sonuna doğru ise östradiol seviyesi yükselmeye başlar. LH maksimum seviyeye ulaşır. Endometriyumdaki yüzey epitelinin proliferasyon hızı azalır fakat yine de en yüksek proliferasyona sahiptir. Tek katlı prizmatik yüzey epitelinin hücre boyları artar ve yüksek prizmatik hücrelere dönüşüm gerçekleşir. Östrus evresine geçişte, östradiol seviyesinde azda olsa azalma gözlemlenirken, FSH artmaya başlamaktadır (78). Ovaryumdaki foliküller büyük ve içleri folikül sıvısı ile doludur. Foliküler hücrelerde mitoz bölünme oldukça az gözlemlenir (79).

Östrus

Özellikle nükleusu olmayan keratinize epitel hücrelerin varlığı ile karakterizedir. Nötrofil görülmez. Geç östrusta nötrofillerin ortaya çıkmasından önce nükleuslu epitel hücreleri, yüksek sayıda görülmeye başlar. Geç östrusun büyük, oval şekilli ve nükleuslu epitel hücreleri sıçanın metöstrusa hızla yaklaştığının bir işareti olarak görülür**.** 12-14 saat süren evrede uterusun

endometriyum tabakasındaki yüzey epitel hücrelerinde proliferasyon gözlenmez. Hücrelerin maksimum boyuta ulaşmasından dolayı yüzey epiteli kalınlaşır. Uterusun yüzey epitelinde gerçekleşen bu değişiklikler aslında blastosist implantasyonu içindir, ovulasyonun gerçekleştiği fazdır (80).

Metöstrus

Ovulasyondan sonraki fazdır. Erken metöstrusta nötrofiller ve epitel hücreleri yayılmış halde, bazen birbirleriyle sıkıca paketlenmiş olarak gözlemlenir. Çoğunlukla epitel hücreleri egemen olmakla birlikte nötrofiller ile eşit oranda da bulunabilmektedir. Metöstrus ilerledikçe nötrofiller, epitel hücrelerine göre çok yüksek sayılara ulaşır (81). Bu fazda serum progesteron ve östradiol seviyelerinin düşmesi ile birlikte, uterusun kanlanması azalmıştır. Metöstrus evresi ortalama 21 saat sürmektedir (78). Fazın başında erken korpus luteum mevcuttur, faz ilerledikçe korpus luteumlar büyümektedir. Çoğu folikül atreziye uğramıştır. Foliküler hücrelerde mitoz bölünme azalmıştır (79).

Diöstrus

Bu faz ortalama 60 ile 70 saat sürer. Ağırlıklı olarak lökosit, az sayıda nükluslu epitel hücresi gözlemlenir (82). Ovaryumda büyüyen foliküller mevcuttur. Endometriyumda rejenerasyon başlar. Düşük olan östradiol seviyesi fazın sonuna doğru giderek artar. Bu sürece FSH artışı eşlik etmektedir (79). Dişiler üzerinde yapılan çoğu çalışmada, özellikle hormonal işlevlerle ilişkili durumlarda, dişiler için menstrual siklusun hangi fazında oldukları önem taşımaktadır. Her bir faz farklı hormonlar ile kontrol edilir ve hormon konsantrasyonlarına ait değişimlerin en iyi şekilde tespit edildiği faz diöstrustur (83).

Smear örnekleri incelenirken Tablo 1'deki kriterler göz önünde tutularak fazlar belirlenmektedir.

Tablo 1. Östrus siklusuna ait fazların ve vajinal smearde bulunan hücre morfolojisinin sınıflandırılması (77).

Faz	Nötrofil	Küçük epitel hücreleri	Büyük epitel hücreleri	Nükleussuz keratinize epitel hücreleri	Hücre yoğunluğu
Proöstrus	0 / +	++ / +++	0 / +	0 / +	Düşük/Orta
Östrus					
Sıçan	0 / +	0 / ++	0 / ++	++ / +++	Orta/Yüksek
Fare	0 / +	0/ +	0 / +	++ / +++	Orta/Yüksek
Metöstrus					
Sıçan	+ / +++	+ / ++	+ / ++	+ / +++	Orta/Yüksek
Fare	+ / +++	0 / +	0 / +	++ / +++	Orta/Yüksek
Diöstrus	++/ +++	+ / ++	+ / ++	0 / +	Düşük/Orta

Hücrelerin yoğunluğu: 0 = yok, + = az, ++ = orta, +++ = yüksek

DENEY HAYVANLARINDA DAVRANIŞ TESTLERİ

Davranış testleri, genellikle deney hayvanlarında korkuyu, düşük sosyal etkileşimi, bilişsel bozuklukları, aşırı irkilmeyi ve buna benzer anksiyete davranışlarındaki değişimleri ölçmektedir.

Rota Rod Testi

Deney hayvanının koordineli hareketlerini, dengesini, performansını ve direnme gücünü ölçmek amacıyla kullanılmaktadır (84). Rota rod testinde temel prensip deney hayvanlarının, sabit hızda dönmekte olan bir çubuk üzerinde düşmeden kalma sürelerinin hesaplanmasıdır. Test genel olarak en az 5 cm çapa sahip ve bölmeler ile ayrılmış bir çubuk, çubuğu döndüren bir motor ve çubuğun altındaki bir ızgaradan oluşmaktadır. Her bölmede bulunan dijital saatler süreyi ölçmektedir. Deneğin çubuktan düşmesi ile süre durmaktadır. Test boyunca deney hayvanlarının dönmekte olan çubuk üzerinde düşmeden kalma süreleri düzenekteki sayaç ile kaydedilmektedir. Sağlıklı bir denek, normal şartlarda belli bir süre çubuk üzerinde düşmeden kalabilmektedir. Eğer deneklerde, motor koordinasyonla ilgili sistemlerde bir bozulma mevcut ise denek yürümeyi bırakır ve düşer (85).

Açık Alan Testi (Open Field Test)

Deney hayvanlarında, çeşitli işlemlerden önce veya sonra hayvanların duygusal durumunu belirlemek amacı ile en çok kullanılan testtir. Ayrıca anksiyeteye bağlı olarak gelişen

lokomotor aktivitelerin ve duyguların saptanmasında da kullanılır. Açık alan testi fare, sıçan, tavşan gibi kemirgen türlerine uygulanabilmektedir. Hayvan türlerine göre farklı boyutları olabilen, etrafı duvarlarla çevrilmiş, pleksiglastan yapılmış üstü açık, farklı geometrik şekillerde (kare, daire, dikdörtgen) olabilen bir kutudur. Deney belli bir ışık şiddetinde aydınlatılmış alanda yapılır. Hayvan açık alana bırakılır. Hayvanın kendi ortamından uzaklaştırılıp bilmediği bir ortama tek başına bırakılması ve agorofobi ismi verilen geniş alan korkusu, anksiyete davranışını tetikleyen iki faktördür (86).

Test süresi 2-20 dakika arasında değişebilmektedir. Test süresince hayvanın horizontal ve vertikal düzlemlerde yaptığı hareketler, defekasyon sayısı ve kaşınma davranışı tespit edilmektedir. Arka ekstremiteler üzerinde yükselme hareketi çevreyi keşfetme davranışı olarak kabul edilirken, otonom fonksiyonların göstergesi olarak defekasyon ve kaşınma sayısı sayılmaktadır (87). Açık alan düzeneğinde, hayvanın merkezde ya da kenarlarda mı fazla zaman geçirdiği oldukça önemlidir. Alıştığı ortamdan uzaklaştırılan hayvan düzenekteki alanın merkezine gitmekten kaçınacaktır ve daha az hareket edecektir (86).

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (Elevated Plus Maze Test)

Yerden belirli bir yükseklikte olan artı şeklinde iki kapalı ve iki açık kolu bulunan bir test düzeneğidir. Fare ve sıçanlar için kullanımı oldukça uygundur ve farklı boyutları bulunmaktadır. Hayvanların testteki performansı mevsimsel olarak değişiklik gösterebilir (88). Düzeneğin yüksek olması, deneklerde stres kaynaklı anksiyeteyi arttırmaktadır (89). Bu testin uygulandığı sıçanlar çoğunlukla (boyutları 110×110 cm ve yerden yüksekliği 30 cm) düzeneğin merkezine, yüzü açık kollardan bir tanesine bakacak şekilde bırakılırlar. Açık kola bırakılmasının nedeni ise sıçanların doğuştan hem yüksek yerlerden hem de açık alanlardan korkmalarıdır. Hayvanın kapalı kolda geçirdiği süre, açık kollara giriş sayılarında azalma, donakalma süresinde artma, iki ayak üzerinde havayı koklama sayısındaki artışlar, merkezi alanda bulunma süresinde azalmalar anksiyeteyi gösteren davranış belirtileridir (90).

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamızda Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Birimi'nde üretilmiş, aynı biyolojik ve fizyolojik özelliklere sahip Sprague Dawley dişi sıçanlar kullanıldı. Deney süresi boyunca, tüm deneklerimiz, optimum laboratuvar koşulları (22 ± 1^0C, 12 saat karanlık/aydınlık siklusunda) altında, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (Purina) beslendi. Çalışma için 26.02.2016 tarihinde, Trakya Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (karar no:2016.03.06) etik onayı alındı (Ek 1).

Sekiz – on iki haftalık 24 adet dişi sıçandan, kontrol ve deney olmak üzere iki grup oluşturuldu.

Gruplar;

1-Kontrol grubu: (n=12) Deney süresi boyunca vajinal smear örnekleri alınıp, deney sonunda metöstrus fazında davranış testleri uygulandı. Ertesi gün (Diöstrus fazında) sakrifiye edildi.

2-Stres grubu: (n=12) Sekiz hafta boyunca vajinal smear örnekleri alınıp, kısıtlama stresine maruz bırakıldı ve deney sonunda, metöstrus fazında davranış testleri uygulandı. Ertesi gün (Diöstrus fazında) sakrifiye edildi.

Kısıtlama stres prosedürü: Her gün saat 12.00 ile 16.00 arasında, her deneğe günde 1 saat, haftada 5 gün, toplam 8 hafta süresince 40 gün, özel kafesler (restrainer) içerisinde hareket kısıtlaması uygulandı (91).

Ayrıca tüm gruplara, stres uygulamasının davranış üzerine etkilerini incelemek için Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji A.D. laboratuvarında Rota rod, Açık alan ve Yükseltilmiş artı labirent testleri yapıldı. Davranış testleri uygulandıktan bir gün sonra, ketasol (Ricterpharma,

Viyana, Avusturya) ve basilazin (Rompun, İstanbul, Türkiye) anestezisi altında deney sonlandırılarak tüm grupların kan ve ovaryum doku örnekleri alındı.

DAVRANIŞ TESTLERİ

Her gruptan ikişer denek, östrus siklusları düzensiz olduğu için, deney dışı bırakılmıştır. Bu nedenle, her gruptan 10'ar deneğe ait veriler, istatistiksel analize dahil edildi.

Rota Rod

Deneklerin lokomotor aktivitelerinin sağlıklı olup olmadığını belirlemek amacıyla rota rod testi uygulandı. Test amacı ile yerden yüksekliği 25 cm, boyu 45 cm, eni 10 cm ve derinliği 30 cm olan, birbiri ile bitişik 4 kabini bulunan cihaz kullanıldı (Şekil 4). Denekler, silindirin döndüğü yönün tersi yönünde, aşağı düşmeden yürümeye çalıştı. Sabit hızda dönen bu silindir (10 devir/dakika) üzerinde, toplamda 3 dakika kalabilen denekler, normal kabul edildi (84).

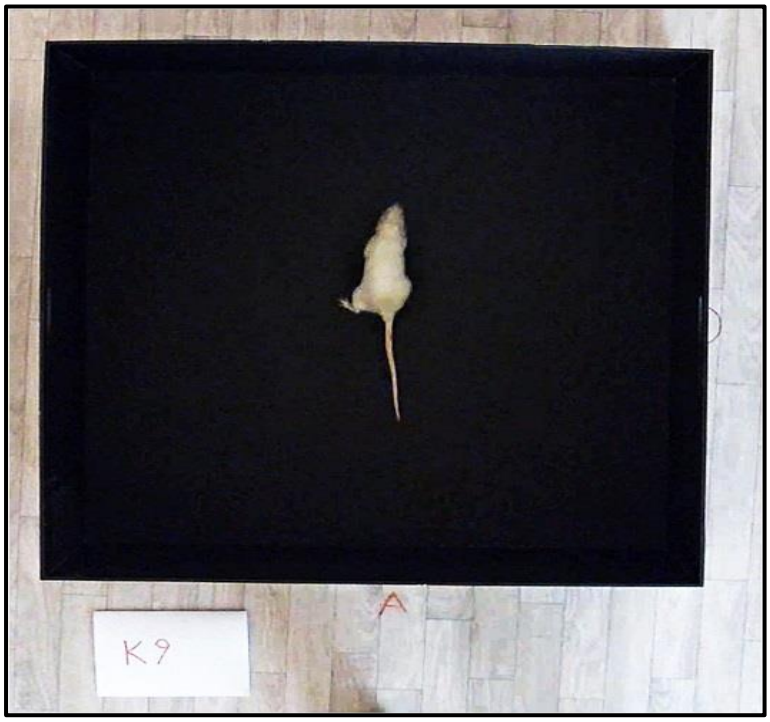


Şekil 4. Rota rod cihazı.

Açık Alan Testi (Open Field Test)

Açık alan testi uygulanan tüm denekler, 30 lux ışık ile aydınlatılmış karanlık bir odada, 80 × 80 cm boyutlarındaki üstü açık, kare şeklindeki test düzeneğinin merkezine bırakıldı (Şekil 5). Deneklerin düzeneğin merkezinde ve köşelerinde geçirdiği süreler, Etho Vision System

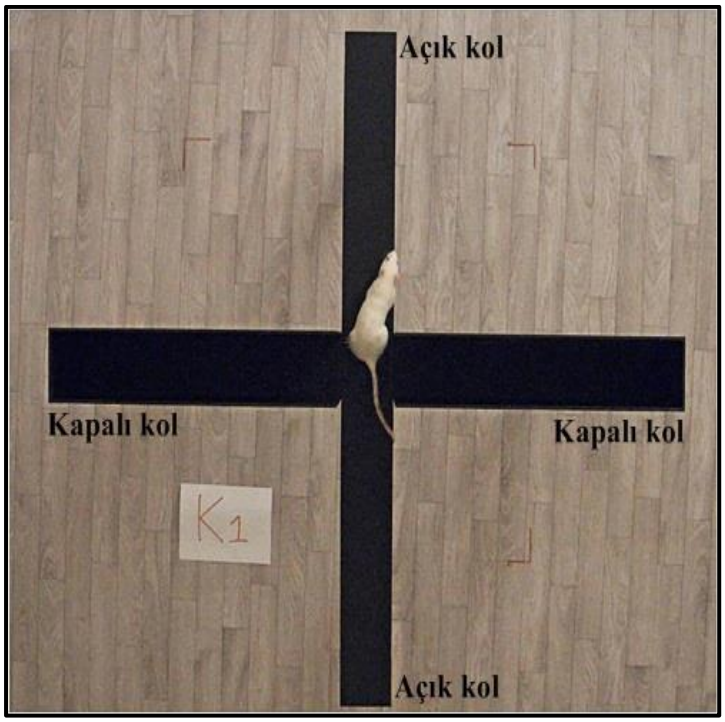
kamera yardımı ile 10 dakika boyunca gözlemlendi. Test uygulanan her denekten sonra, kare test alanı %70 alkol ile temizlenip, bir sonraki deneğin değerlendirilmesi için hazırlandı (87).



Şekil 5. Açık alan test düzeneği.

Yükseltilmiş Artı Labirent Testi (Elevated Plus Maze Test)

Yerden yüksekliği 30 cm olan, iki kolu açık, iki kolu kapalı artı biçimli labirent (110 × 110 cm, Şekil 6) üzerinde tüm denekler, bireysel olarak açık kollara bakacak şekilde düzeneğin merkezine yerleştirilip Etho Vision System kamera aracılığıyla 5 dakika boyunca gözlemlendi. Her denekten sonra test alanı %70 alkol ile temizlenip, kurulandı. Deneğin, kapalı ve açık kolda geçirdiği süreler, kola giriş sayısı ve kollarda kat ettikleri mesafe değerlendirmeye alındı (90).



Şekil 6. Yükseltilmiş artı labirent test düzeneği.

VAJİNAL SMEAR YÖNTEMİ

Deney süresince her sabah, günde bir kez olmak üzere, kontrol grubu ve stres grubu (stres uygulamasından önce) dişi sıçanlardan vajinal smearlar alındı. Bu işlem; steril çubukların pamukla kaplanmış uç kısımları serum fizyolojik ile nemlendirildikten sonra vajinadan nazikçe sürüntü alınıp, lam üzerine yayılması şeklinde uygulandı. Lamlar, oda sıcaklığında kuruyuncaya kadar beklendi. Kuruyan smear örneklerine ise Hematoksilen-eozin (Sigma Aldrich, Almanya) boyası uygulandı (92). Boyama sonrası oda sıcaklığında kuruyan preperatlar, ışık mikroskobu (Olympus BX51, Japan) altında incelenerek fotoğraflandırıldı.

Diöstrus İndeksi

Deneklerde bir siklusun östrus fazı ile ikinci siklusun östrus fazı arasında geçen süre "bir siklus süresi" olarak kabul edildi. Diöstrus indeksi ise her bir denek için, toplam diöstrus gün sayısının, deney süresine (gün) bölünmesi ve çıkan sonucun 100 ile çarpılmasıyla (diöstrus gün sayısı/deney süresi×100) bulundu (93).

Kortizol Analizi

Anestezi altındaki deneklerden, kardiak kan örnekleri alınarak elde edilen serumlar Trakya Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Hormon Analiz Laboratuvarı'na

gönderildi. Otoanalizör Ünitesi'nde Advia Centour XP cihazının kullanımıyla kortizol düzeyleri (ug/dL) ölçüldü.

OVARYUM DOKU TEMİNİ VE HAZIRLANMASI

Kontrol ve stres grubu deneklerden ovaryum doku örnekleri alındı. Her sıçandan alınan 2 adet ovaryum dokusundan biri %10 luk tamponlu nötral formaldehit (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Almanya) fiksatifinde, diğeri ise Bouin fiksatifinde 8'er saat tespit edildi. Dokular, histolojik ve immünohistokimyasal incelemeler için Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda işlemlendirildi.

Histolojik İnceleme

Bouin fiksasyonu sonrası, dokular bir gece %70 alkolde bekletildi. Ardından 1'er saat yükselen alkol (Merck Millipore, Darmstadt, Almanya) serilerinden geçirilerek (%90, %96, %100, %100, %100) dehidratasyon uygulandı. %10 luk tamponlu nötral formaldehit ile fikse edilen dokular ise bir gece akar suda yıkanarak tespit solüsyonundan arındırıldı. Yıkama işleminin ardından dokular yükselen alkol serilerinden geçirilerek (%70, %90, %96, %100, %100, birer saat) dehidratasyon gerçekleştirildi. Daha sonra saydamlaştırma için 3 kez 15'er dakika toluolde (Merck Millipore) bırakılan dokulara parafin (Merck Millipore) inklüzyonu uygulanarak, bloklar elde edildi.

Bouin fiksatörü uygulanan ovaryum bloklarından mikrotom (Leica RM-2245, ABD) ile 5 µm kalınlığındaki kesitler alındı. Genel histolojik yapının incelenmesi amacıyla Hematoksilen+Eozin (H+E) ve Masson Trikrom boyaları uygulandı. Hazırlanan preperatlar ışık mikroskobunda (Olympus BX 51, Japan) incelenerek, fotoğraflandırıldı.

Ovaryumun ışık mikroskobik incelenmesi sırasında foliküllerin sınıflandırılması aşağıdaki kriterlere göre yapılmıştır (94).

a. Oosit çevresinde az sayıda yassı foliküler hücreleri bulunan küçük çaplı folikül, primordiyal folikül.
b. Tek tabaka kübik foliküler hücrelere sahip küçük çaplı folikül, primer folikül.
c. Oosit etrafındaki granüloza hücre katmanının iki veya üç sıralı hale geldiği, folikülün dış kısmında teka tabakalarının görüldüğü, oosit ve granüloza hücresi arasında zona pellusida bulunan folikül, multilaminar primer folikül.
d. Foliküldeki granüloza hücreleri arasında boşluklar içeren büyük çaplı folikül, sekonder folikül.

e. Antrum adı verilen büyük ve tek boşluğa sahip, folikül sıvısı ile dolmuş anturumun etrafındaki granüloza hücrelerinin dikkate değer şekilde azaldığı, oositin ise bir grup granüloza hücresi (kümülüs hücre grubu) ile sarılarak antruma doğru çıkıntı yaptığı folikül, graaf folikülü olarak değerlendirilmiştir.

Morfometrik değerlendirmeler için, Masson Trikrom boyası uygulanmış ovaryum kesitleri kullanıldı. Görüntüleme analiz sistemi (Versiyon 2.11.5.1, Kameram, Argenit, Türkiye) ile her deneğe ait iki ovaryum kesiti üzerinde, rastgele seçilen beş farklı alanda, 10X büyütmede interstisyel alan ölçümleri yapıldı.

Hematoksilen+Eosin Boyası

Beş µm kalınlığındaki ovaryum doku kesitleri, parafinin giderilmesi için 30 dk toluol ile muamele edildi. Daha sonra kesitler, sırasıyla azalan alkol serilerinden (%100, %96, %90, %70'lik) geçirilerek suya indirildi ve Mayer's hematoksilen (Merck Millipore) boyası uygulandı. Morartma işlemi için akan çeşme suyu altında 10 dakika bekletilen kesitler, Eosin (Merck Millipore) boyası ile muamele edildi. Dehidratasyon için; sırasıyla yükselen derecelerdeki alkol serilerinden geçirilerek, toluol aşamasından geçen kesitler entellan (Merck Millipore) ile daimi preparat haline getirildiler.

IGF-1 AMH ve Bcl-2 İmmün Boyamaları

İmmünohistokimyasal boyamalar için; nötral formaldehit fiksasyonu uygulanan ovaryum blokları kullanıldı. Adheziv lamlar üzerine alınan 5 µm'lik kesitler 56 °C' de bir gece inkübe edildi. Kesitler, deparafinizasyon işleminden sonra, azalan alkol serilerinden geçirilerek suya indirildi. Antijen geri kazanımı için kesitler; sitrat tampon çözeltisi (pH 6.0, Thermo Scientific, AP-9003-500) içinde, 20 dakika süreyle, mikrodalgada (Vestel, 1550) inkübe edildi. Bu işlemin ardından oda ısısında 20 dk soğumaya bırakılan kesitler, fosfat tampon solüsyonu (PBS; pH:7.4,Life technologies, Frederik, ABD) ile 3 kez 5'er dakika yıkandı. Dokular, endojen peroksidaz aktivitesini bloke etmek için %3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) solüsyonu içinde 10 dakika bekletildi ve tekrar PBS ile yıkandı. Özgül olmayan antikor bağlanmalarını bloklamak üzere kesitlere %1 preimmün rabbit serum (Thermo Scientific, Ultra V Block, TA-125-UB, Kaliforniya, ABD) 20 dakika süreyle uygulandı. Primer antikor basamağında kesitler; Anti-IGF1 antikoru (LifeSpan LS-C388624) 1/100 dilüsyonda, Anti-müllerian hormon antikoru (Santa Cruz, MIS, sc- 6886) 1/100 dilüsyonda ve Anti-Bcl-2 antikoru ile (LifeSpan LS-B6548) 1/200 dilüsyonda, +4˚C'de, bir gece inkübe edildi. Dokuların primer antikor ile etkileşimleri sonunda

PBS ile yıkama işlemi yapılarak, biotinlenmiş sekonder antikor (Thermo Scientific, Biotinylated Goat anti-Polyvalent, TP-125-BN, Kaliforniya, ABD) ile oda ısısında 10 dakika inkübe edildi. Üç kez 5'er dakika PBS ile yıkama yapıldı. HRP-streptavidine (Thermo Scientific, Streptavidin perokxidase, TS-125-HR, Kaliforniya, ABD) 10 dakika maruz kalan kesitler PBS ile yıkanıp AEC kromojeni (Abcam ab64252) ile muamele edildi. Mayer's hematoksilende art alan boyaması yapılan dokular, su bazlı kapatma medyumu (ScyTek Laboratories, Aqueous–Mount, USA) ile kapatıldı.

Tüm immuhistokimyasal boyama işlemlerinin sonuçlarını değerlendirmek için histolojik skorlama (HSCORE) yöntemi kullanıldı. Değerlendirmeler; her grupta 8'er deneğe ait 3 ovaryum kesitinde, rastgele seçilen beş alanda, X20 objektif kullanılarak yapıldı. Boyanma derecesi: 0 (boyanma yok), 1+ (zayıf boyanma), 2+ (orta boyanma), 3+ (kuvvetli boyanma) olarak değerlendirildi. Skorlama, kesitlerde immünreaktivite gösteren hücrelerin yüzdesi ve boyanma derecesinin (i x P; i: boyanma derecesi, P: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi) ölçüt olarak alındığı, semikantitatif bir yöntemle gerçekleştirildi. Formül kısaca HSCORE = Σ*Pi* (*i* +l) şeklinde ifade edilmektedir (95).

İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analizler için; Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'nda SPSS 20.0 programı (Lisans no: 10240642) kullanıldı, sonuçlar ortalama ± standart sapma (SD) şeklinde verildi. P<0,05 değerleri anlamlı kabul edildi. Mann-Whitney U testi ile; kontrol ve stres grubuna ait deneklerin, vücut ağırlık farklarında, ovaryum ağırlıklarında, ovaryum ağırlığının vücut ağırlığına oranını hesaplamada, serum kortizol düzeylerinde, östrus siklusuna ait toplam siklus sayılarının toplam gün sayısına oranlarında, bir siklusun uzunluğunda ve diöstrus indeksinde farklılık olup olmadığı araştırıldı. Ayrıca, iki gruba ait interstisyel alanın toplam kesit alanına oranında ve HSCORE değerleri arasında fark olup olmadığı Student T testi ile değerlendirildi.

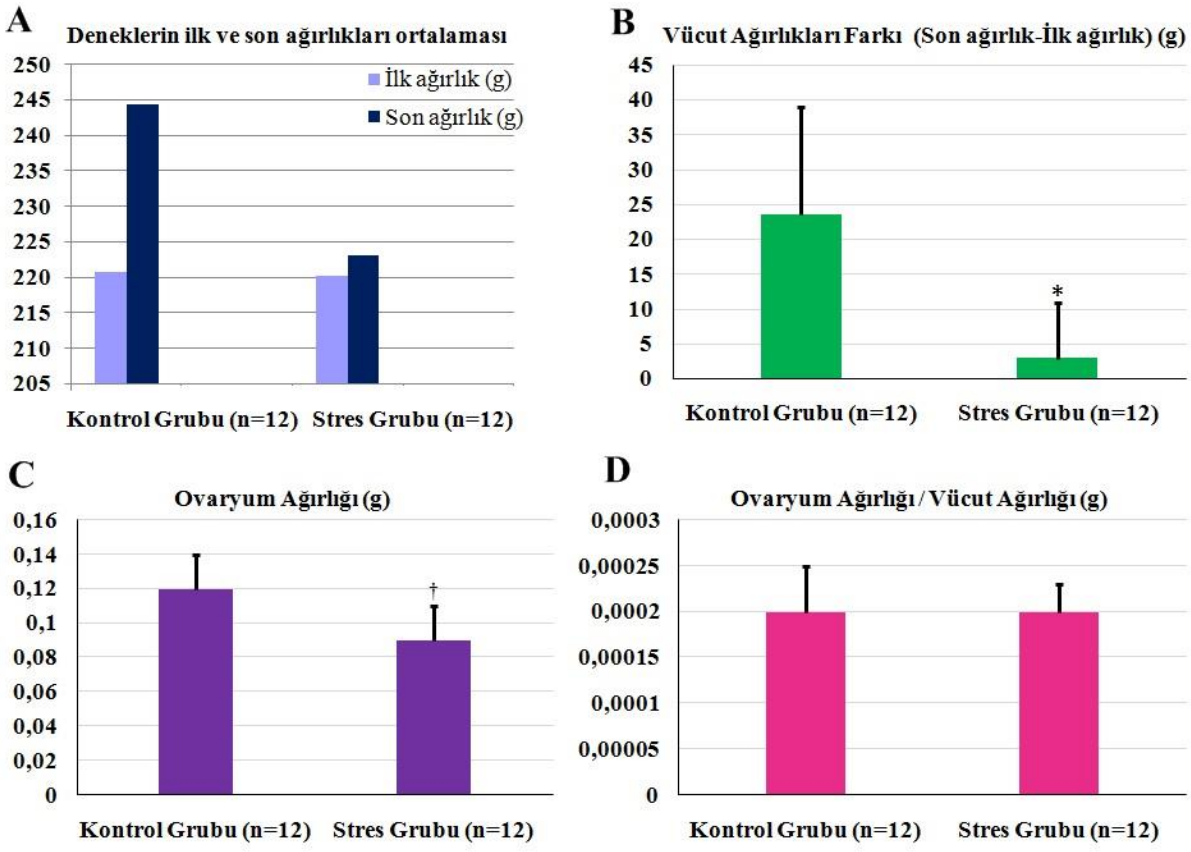
BULGULAR

AĞIRLIK BULGULARI

Çalışmamızda, kısıtlama stresine bağlı olarak, stres seviyesini değerlendirmede kullandığımız parametrelerden biri de ağırlık bulgularıdır. Bu nedenle, grupların deney başlangıç ve son vücut ağırlıkları farkı ile ovaryum ağırlığı/vücut ağırlığı oranları ölçülmüştür.

Kontrol grubunun tüm deneklerinde, deney sonu vücut ağırlıklarında belirgin bir artış (23,58g) gözlenmiştir. Bununla birlikte, stres grubunda bulunan sıçanların birçoğunda, ağırlık azalması ya da kilo alma oranlarının düşük olması nedeniyle, deney sonu ağırlığı ile ilk ağırlık arasındaki fark (2,92g), oldukça düşük tespit edilmiştir (Şekil 7A). İki grup arasında, son ağırlık–ilk ağırlık oranları kıyaslandığında ise stres grubu değerinin kontrolden anlamlı derecede düşük olduğu saptanmıştır ($p<0,0001$; Şekil 7B).

Grupların ovaryum ağırlıkları kıyaslandığında, stres grubu değerinin (0,09g) kontrolden (0,012g) anlamlı derecede düşük olduğu tespit edilmiştir ($p=0,013$; Şekil 7C). Bununla birlikte, ovaryum ağırlığı/vücut ağırlık oranlarında, kontrol ve stres grupları arasında istatistiksel fark bulunmamıştır ($p=0,065$; Şekil 7D).



Şekil 7. A-İlk ve son vücut ağırlık değerleri (g) B-Vücut ağırlıkları farkı (Son ağırlık-İlk ağırlık) (g). *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, p<0,001. C-Toplam ovaryum ağırlık değerleri (g). †:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, p=0,013. D-Ovaryum ağırlıklarının vücut ağırlıklarına oranı (g). Kontrol grubu ile stres grubu karşılaştırıldığında, istatistiksel fark bulunmamıştır (p =0,065).

DAVRANIŞ TESTLERİ BULGULARI

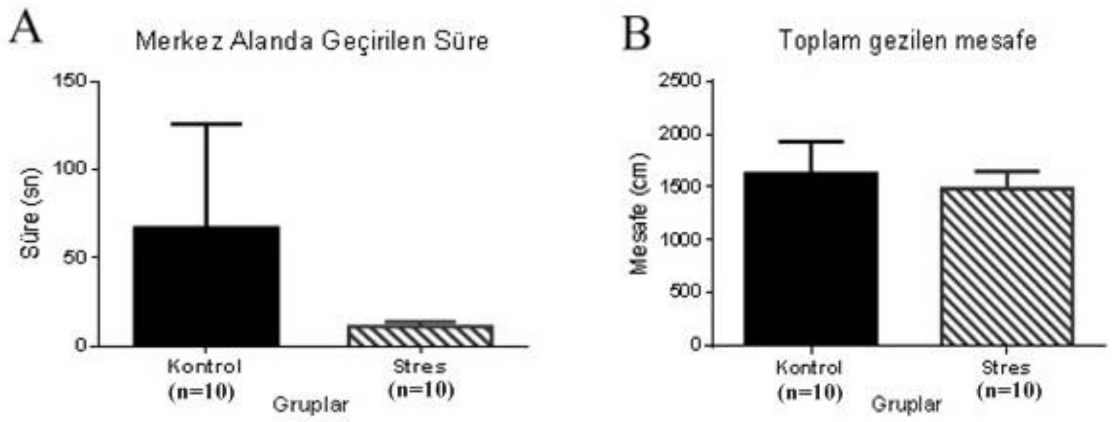
Çalışmamızda kullanılan deneklerin davranışları deney sonuna kadar takip edilerek, uygulanan kronik stres modelinin, denekler üzerinde etki yaratıp-yaratmadığı değerlendirilmiştir. İlk 2 hafta stres grubunda, bireysel kısıtlama kafeslerine koyulan deneklerin, kafese koyulmadan önce sırtlarını kabartarak kafesi reddettikleri tespit edilmiştir. Ayrıca, 1 saat immobilizasyon süresi boyunca yüksek ses çıkarttıkları ve kafesi kemirerek, ağızlarını kanattıkları dikkati çekmiştir. Üçüncü ila sekizinci haftalar arasında ise bireysel kısıtlama kafeslerine kendi istekleriyle girmeye başladıkları gözlemlenmiştir. Bu gözlemsel durum, deneklerin var olan stres koşuluna adapte olabileceği yönünde değerlendirilmiştir. Kesin yargıya varılabilmesi için hem kontrol hem de stres grubu deneklerine deney sonunda davranış tesleri uygulanmıştır.

Rota - Rod Testi Bulguları

Deneklerin motor aktivitelerinin normal olup olmadığının değerlendirildiği Rota rod testinde, tüm deneklerin döner silindirler üzerinde, 3 dk süre ile kalabildiği gözlenmiştir. Bu testi geçen denekler, Açık Alan ve Yükseltilmiş Artı Labirent testlerine tabi tutulmuşlardır.

Açık Alan Test Bulguları

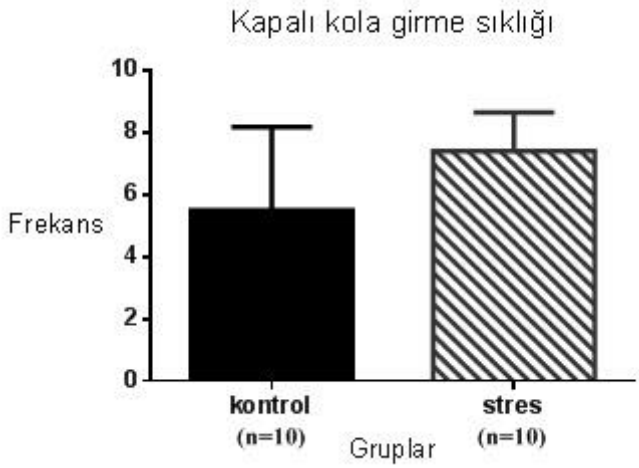
Anksiyete araştırmalarında sıklıkla kullanılan ve güvenilir kabul edilen açık alan testinde, deneklerin test düzeneği merkezinde geçirdikleri süreler ve alan içerisinde hareketli olduğu süreler göz önüne alınarak anksiyete seviyeleri değerlendirilmiştir. İki grup kıyaslandığında, stres grubundaki deneklerin, merkez alanda bulunma sürelerinin (11,140 saniye) ve düzenek içinde gezdikleri mesafenin (1487,12cm), kontrol grubu değerlerinden (sırsıyla; 67,259 saniye ve 1627,29 cm) daha az olduğu saptanmıştır (Şekil 8A,8B). Ancak iki gruba ait değerler kıyaslandığında istatistiksel olarak bir fark elde edilememiştir.



Şekil 8. A-Kontrol ve stres grubuna ait deneklerin, merkez alanda bulunma süresi (sn) ve B- test düzeneğinde gezdikleri toplam mesafe (cm).

Yükseltilmiş Artı Labirent Test Bulguları

Anksiyete araştırması için kullanılan yükseltilmiş artı labirent testinde, deneklerin her bir kapalı kolda geçirdikleri süreler baz alınıp değerlendirilmiştir. Stres grubunda kapalı kola girme sıklığı (7,4), kontrol grubuna (5,5) göre artış eğilimi göstermekle beraber, iki gruba ait değerler kıyaslandığında, istatistiksel fark elde edilmemiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Kontrol ve stres gruplarına ait artı labirent kapalı koluna girme sıklığı değerleri.

ÖSTRUS SİKLUSU BULGULARI

Deney süresince hafta içi her gün, saat 09:00 -10:00 arasında düzenli olarak, hem kontrol grubundan hem de stres grubundan vajinal smear örneği alınmıştır. Günlük olarak H+E boyasıyla boyanan smear preperatları, ışık mikroskobu altında incelenerek değerlendirilmiştir.

Östrus siklusunun takibi sonucunda, iki gruba ait siklus fazlarının süreleri ve tekrarlama oranları tespit edilmiştir. Bu parametreye ait veriler toplandığında, düzensiz sikluslar gösteren iki'şer denek, değerlendirme dışı bırakılmış ve böylelikle her grupta 10'ar hayvana ait vajinal smear sonuçları kullanılmıştır. Sekiz haftalık smear verileri; toplam siklus sayısı/toplam gün sayısı oranı, bir siklusun süresi ve diöstrus indeksi hesaplamalarında kullanılmıştır (Tablo 2). Sekiz haftalık deney süresince kontrol grubunda 11,7, stres grubunda ise 9 siklus tamamlandığı belirlenmiştir. İki gruba ait değerler kıyaslandığında, stres grubuna ait toplam siklus sayısı/toplam gün oranının kontrol grubundan anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür ($p<0,0001$). Kontrol grubunda, bir siklusun ortalama süresi 5,36 gün iken, stres grubunda 6,92 gün olarak hesaplanmıştır. Bu süreler kıyaslandığında ise stres grubunda gözlenen gün sayısı artışının istatistiksel anlamlılık taşıdığı tespit edilmiştir ($p<0,001$).

Yine vajinal smear incelemeleri sonucunda, stres grubunda siklus süresi uzamasının progestif faz sürelerinin uzamasıyla ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu veriye dayanarak, gruplara ait diöstrus indeksleri hesaplanmış ve stres grubu diöstrus indeksinin (28,7), kontrole kıyasla (23,4) anlamlı derecede yüksek olduğu gözlenmiştir ($p=0,011$).

Tablo 2. Gruplara ait 8 haftalık vajinal smear bulguları

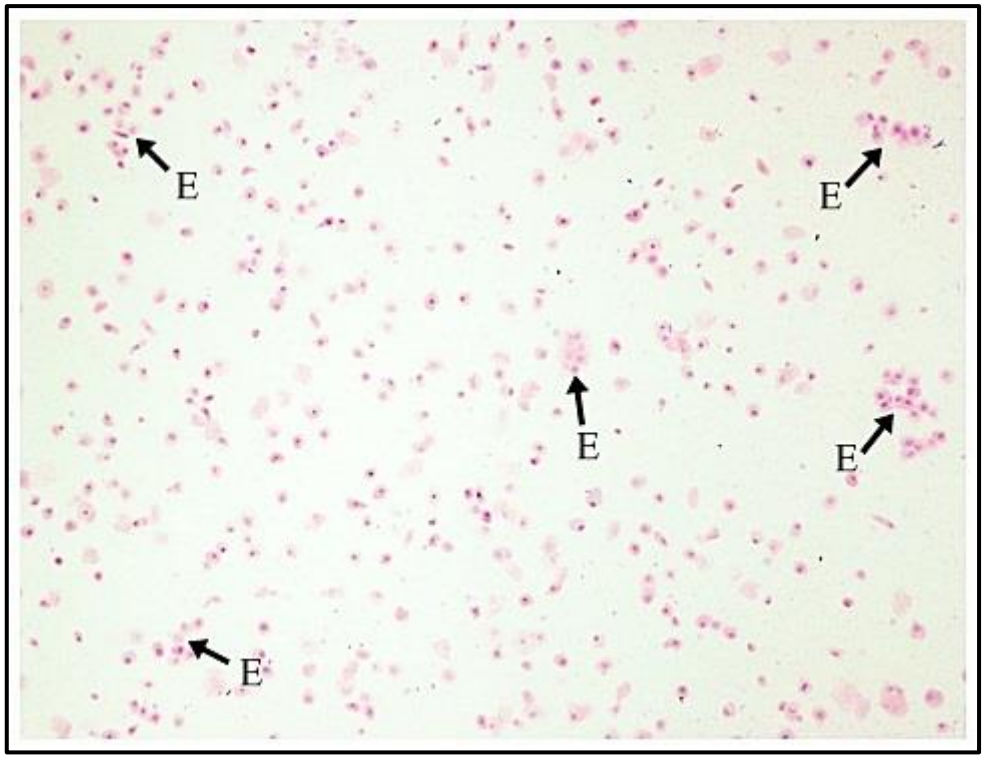
	Kontrol Grubu (n=10)	**Stres Grubu (n=10)**	**p**
Toplam siklus sayısı / Toplam gün sayısı	0,19 ± 0,02	0,15 ± 0,02	**<0,0001***
Bir siklus uzunluğu (gün)	5,36 ± 0,56	6,92 ± 1,17	**<0,001***
Diöstrus indeksi	23,40 ± 5,54	28,70 ± 4,45	**0,011***

***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, p<0,05 anlamlı kabul edilmiştir.**

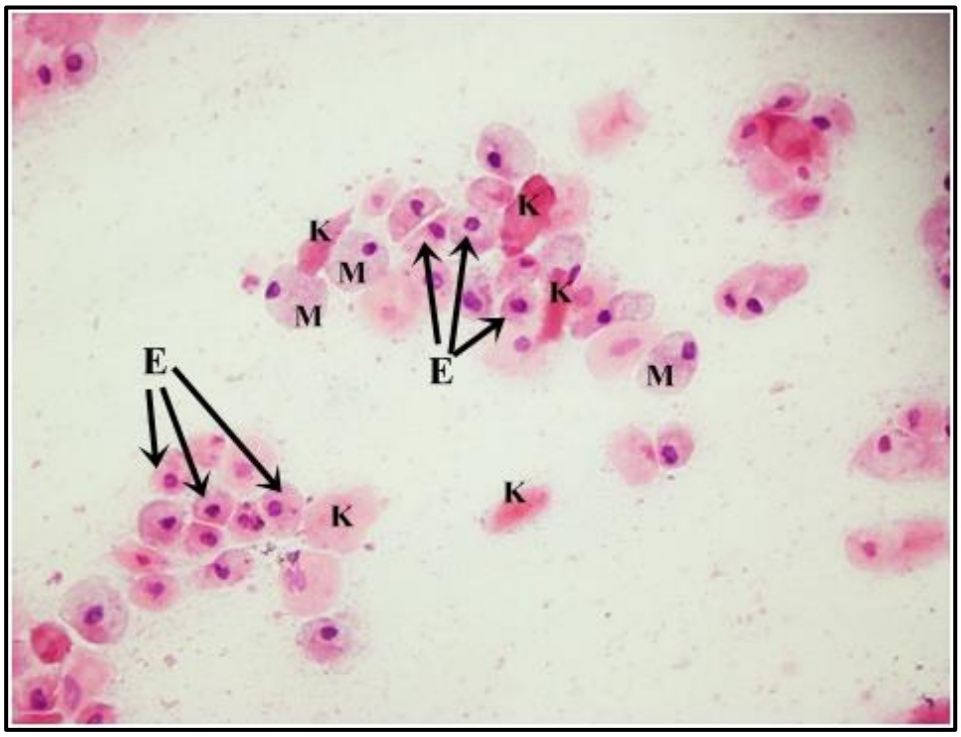
Vajinal smear preparatlarının ışık mikroskobik incelemelerinde, kontrol grubunda östrus siklusuna ait dört fazın da düzenli şekilde, kendine has hücresel özellikler sergilediği gözlemlenmiştir. Proöstrus fazındaki smearlerde, kümeler halinde, nükleuslu, yuvarlak epitel hücreleri mevcut iken (Şekil 10,11), proöstrustan sonra, sadece nükleussuz kornifiye hücrelerle karakteristik olan faz, östrus olarak kabul edilmiştir. (Şekil 12,13). Östrustan metöstrusa geçişte kümeler oluşturan kornifiye hücreleri ve bu hücre kümeleri arasında nötrofillerin bulunduğu gözlenmiştir. Metöstrusta alınan smear örneklerinde, nükleuslu, büyük hacimli epitel hücreleri ve nötrofillerin sayıca arttığı tespit edilmiştir (Şekil 14,15). Diöstrus fazına geçildiğinde ise nükleuslu epitel hücre sayısında ve nötrofil sayısında azalma gözlenmiştir. Bu fazın ilerlemesi sonucunda, smear örneklerinde az sayıda kornifiye hücre, daha küçük çaplı nükleuslu epitel hücreleri ve nötrofillerin olduğu saptanmıştır (Şekil 16,17).

Stres grubu smear örneklerinde, proöstrus fazı kontrol ile benzer hücre özellikleri taşımasına rağmen, yoğun kümeler oluşturan nükleuslu epitel hücrelerinin yanında, salgı hücre özelliğindeki musinöz hücrelerin de sayıca arttığı dikkati çekmiştir (Şekil 18). Ayrıca kontrol grubundan farklı olarak bu fazda, nötrofillerin varlığı da tespit edilmiştir. (Şekil 19). Stres grubunda östrus fazındaki nükleussuz kornifiye hücreler kontrol ile aynı hücresel morfolojide olup, smearde elde edilen hücre sayısı artışından dolayı, çoğu zaman yığınlar oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 20,21). Metöstrus fazına geçildiğinde, stres grubunda kontrole kıyasla hem nükleuslu epitel hücrelerinin hem de nötrofillerin sayıca daha fazla olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 22,23). Metöstrustan sonra gelen diöstrus fazında ise kontrole kıyasla nötrofil sayısı artışının stresle ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz (Şekil 24,25).

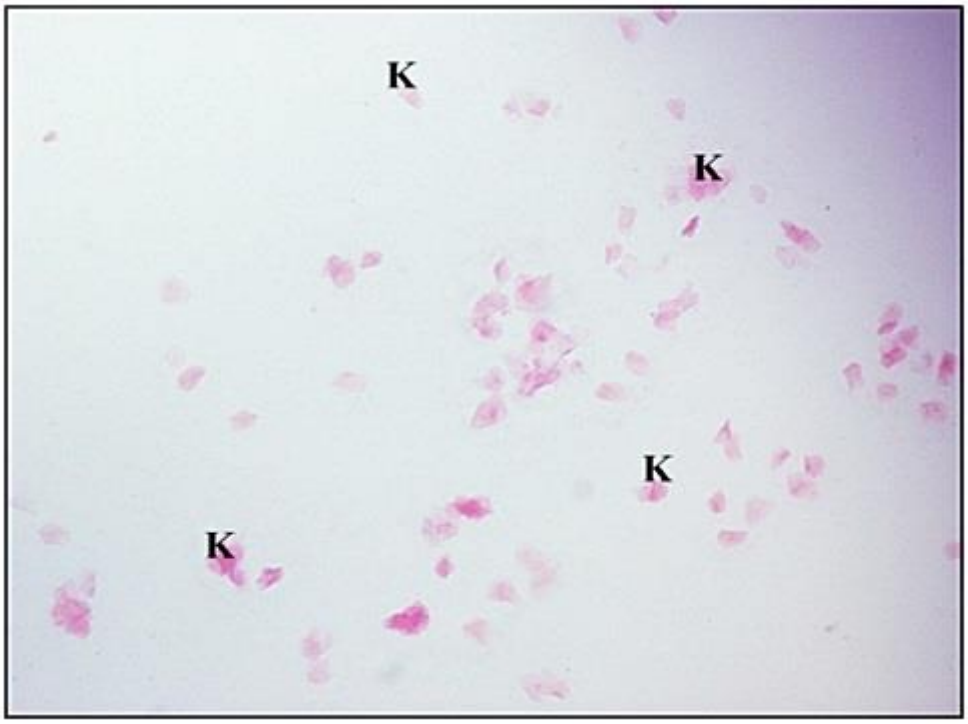
Kontrol Grubu Vajinal Smear Fotoğrafları



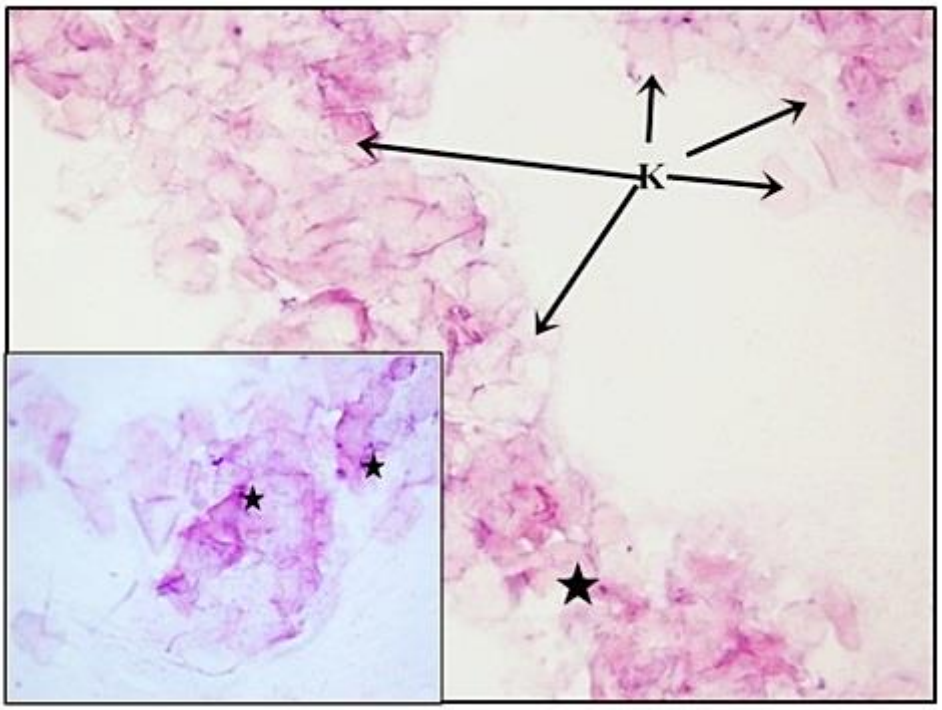
Şekil 10. Kontrol grubuna ait bu mikrografta, proöstrus fazında, kümeler oluşturmuş nükleuslu epitel hücreleri (E) izlenmektedir. H+E, X100.



Şekil 11. Proöstrus fazının ileri aşamasına ait olan bu mikrografta, nükleuslu epitel (E) ve müsinöz hücrelerin (M) yanı sıra kornifiye hücrelerde (K) gözlenmektedir. H+E, X400.



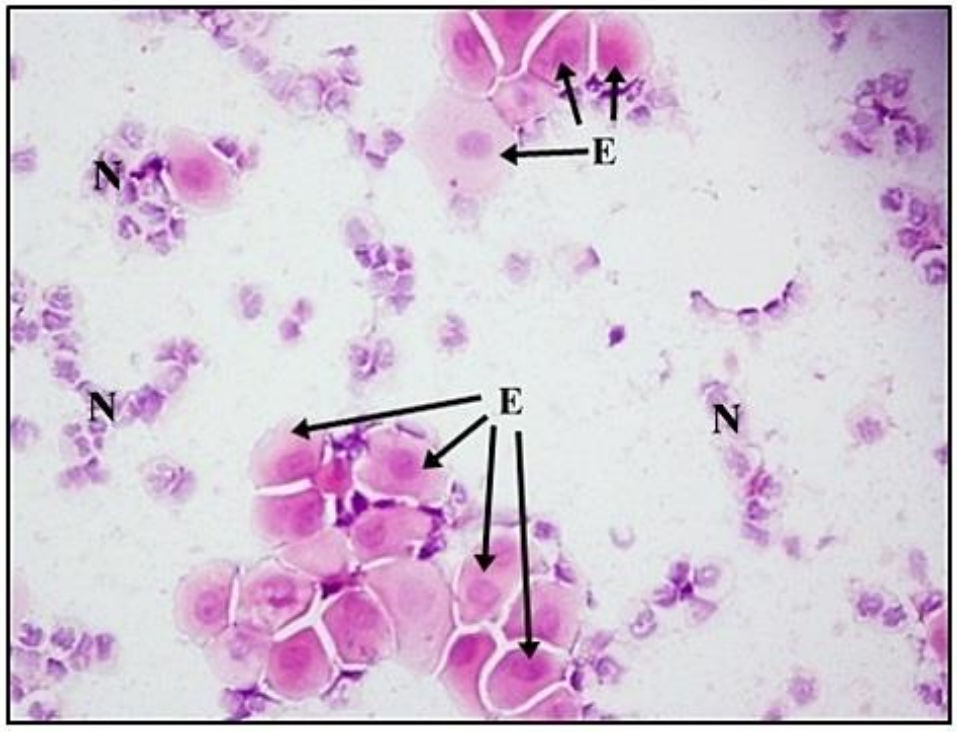
Şekil 12. Kontrol grubu östrus fazına ait smear örneğinde, kornifiye hücreler (K) gözlenmektedir. H+E, X100.



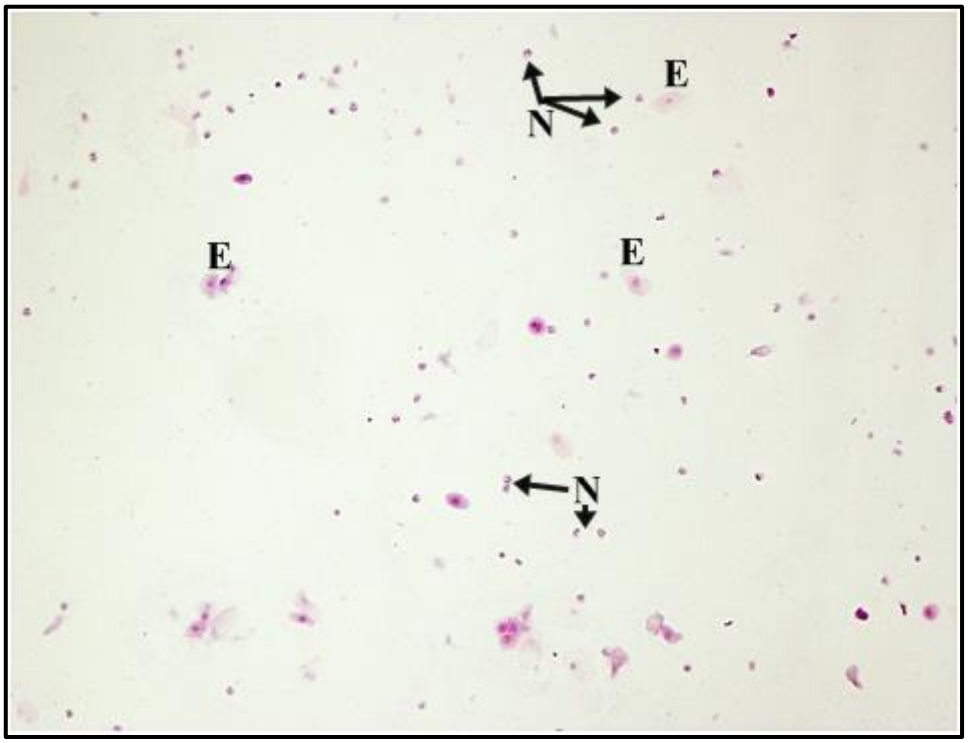
Şekil 13. Östrus fazında nükleus içermeyen kornifiye hücreler (K) genellikle yığınlar halinde (yıldız) gözlenmektedir. İçsel şekil: kornifiye hücre yığınları. H+E, X200.



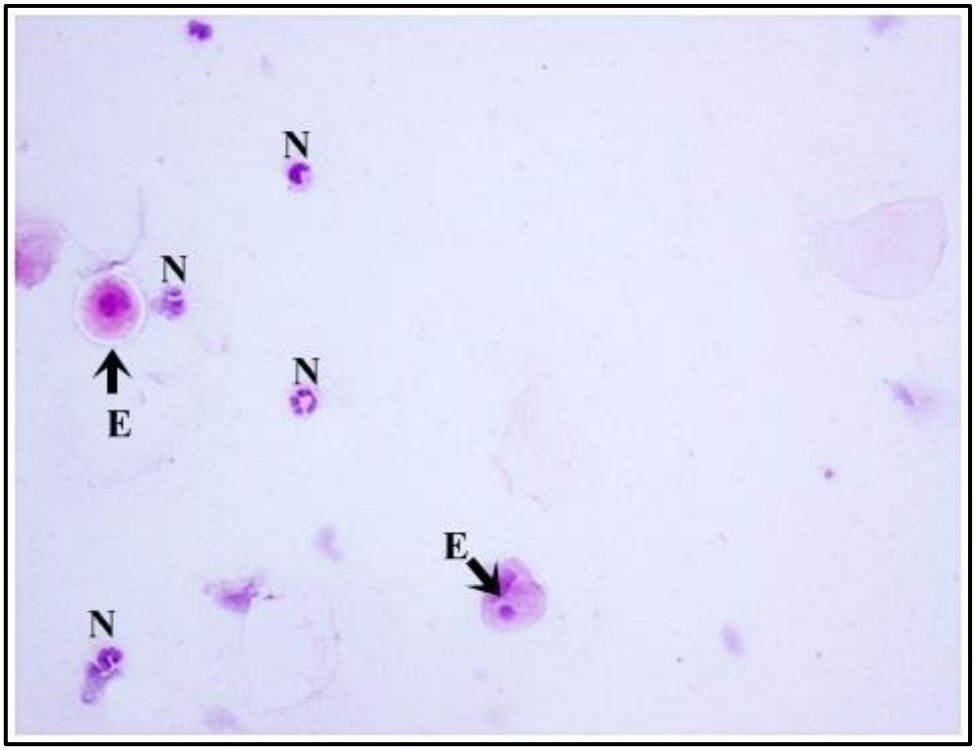
Şekil 14. Kontrol grubu smear örneklerinde, metöstrus fazında nükleusa sahip büyük hacimli epitel hücreleri (E) ve yoğun nötrofiller (N) görülmektedir. H+E, X100.



Şekil 15. Kontrol grubuna ait smear örneğinde, metöstrus fazında; nükleuslu, büyük hacimli epitel hücreleri (E) ve nötrofillerin (N) birlikte kümeler oluşturduğu izlenmektedir. H+E, X400.

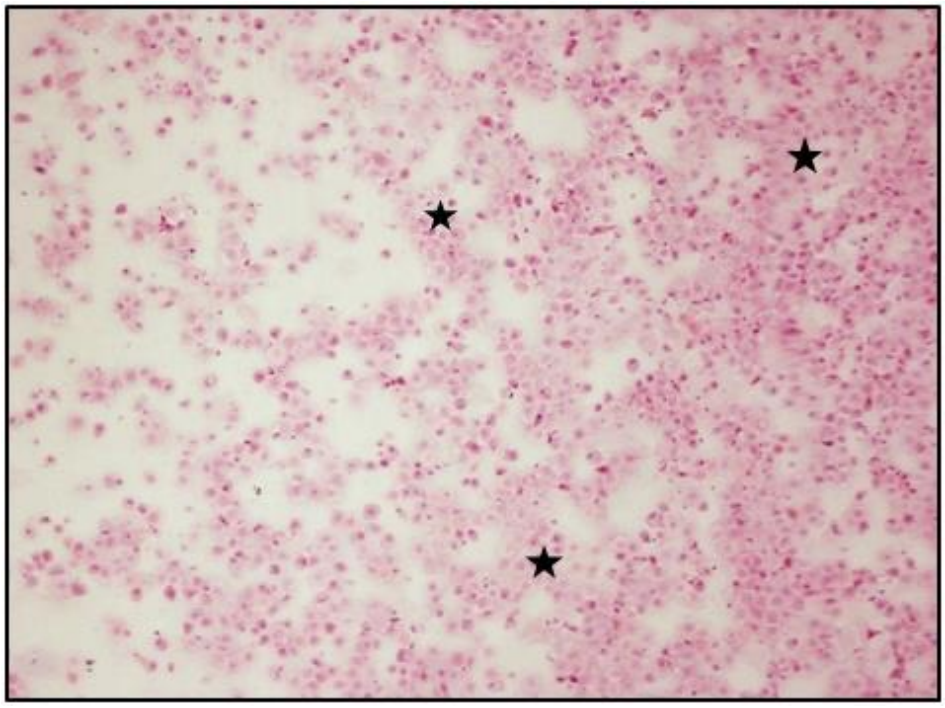


Şekil 16. Diöstrus fazının başlangıcında, nükleuslu küçük epitel hücreleri (E) ve az sayıda nötrofil (N) varlığı dikkati çekmektedir. H+E, X100.

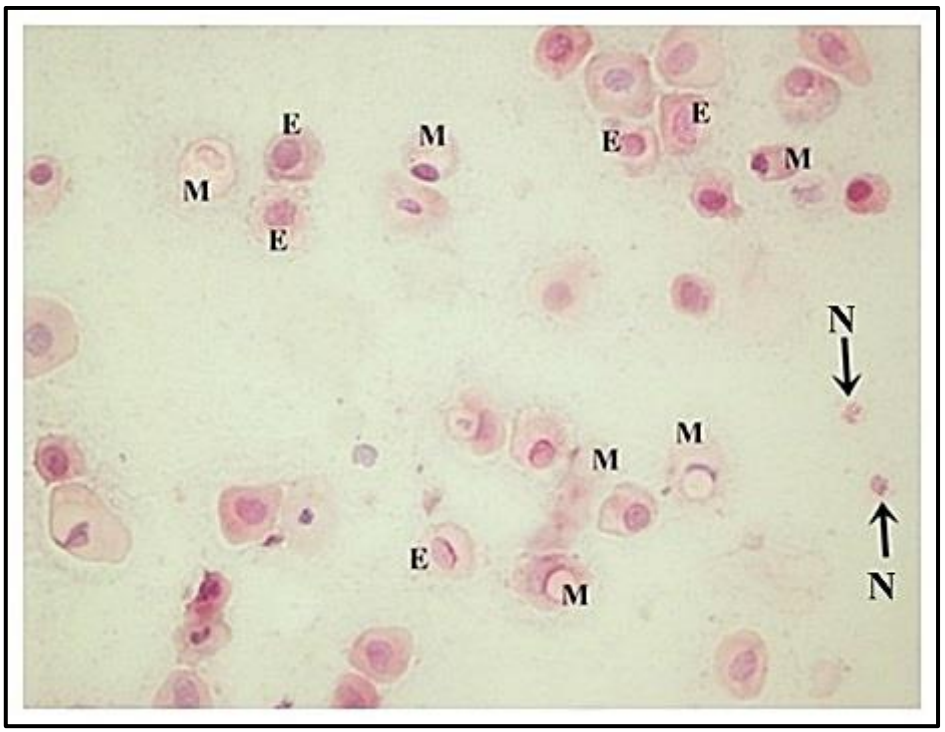


Şekil 17. Kontrol grubu diöstrus fazında, az sayıda nötrofil (N) ve nükeuslu epitel hücreleri (E) görülmektedir. H+E, X400.

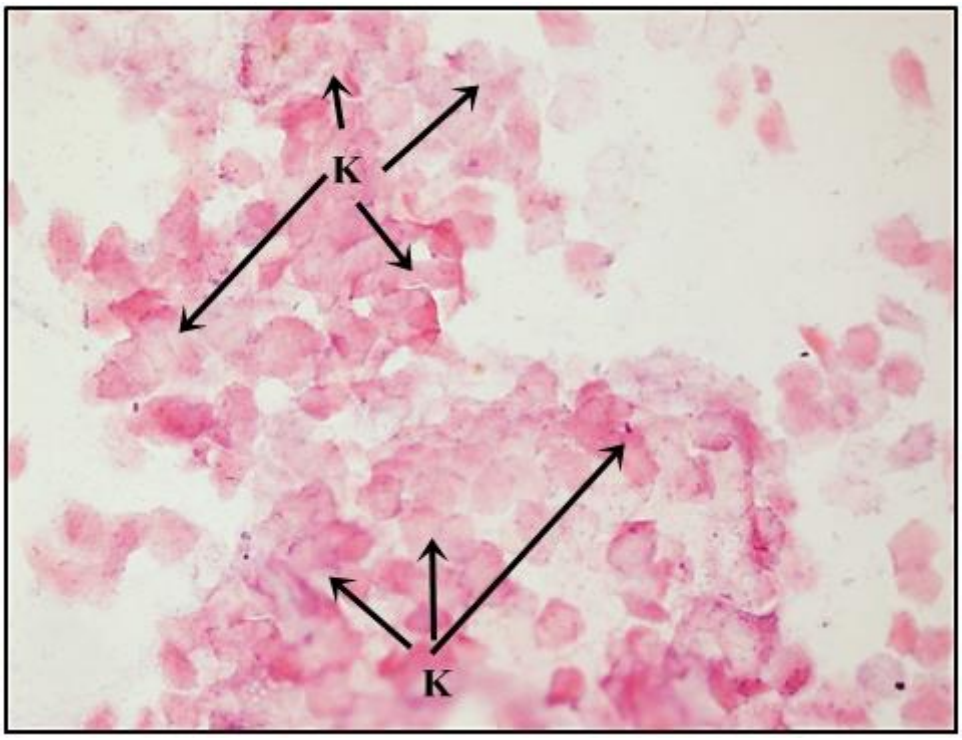
Stres Grubu Vajinal Smear Fotoğrafları



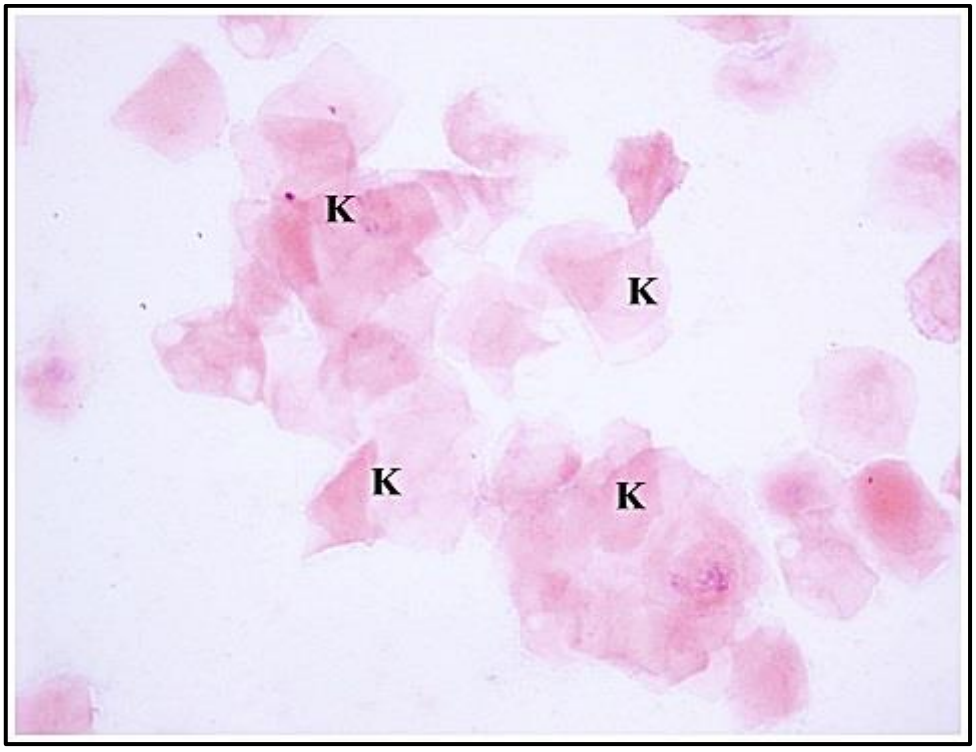
Şekil 18. Kronik kısıtlama stresi grubuna ait smear örneğinde, proöstrus fazındaki hücrelerin yoğun kümeler (yıldız) halinde bulunduğu gösterilmiştir. H+E, X100.



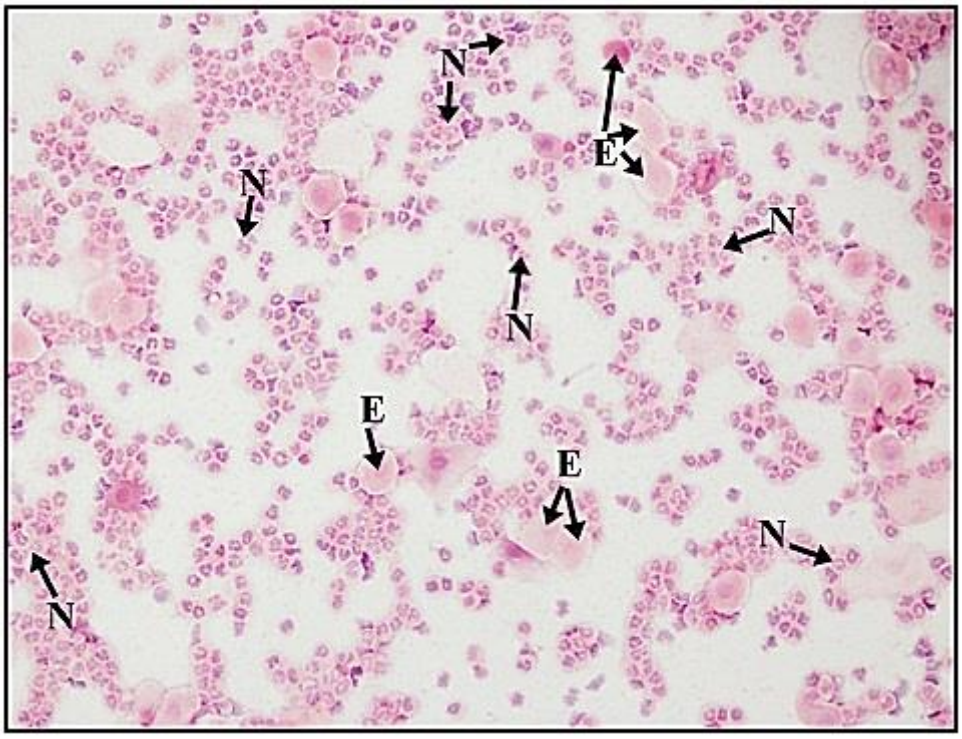
Şekil 19. Stres grubunda proöstrus fazında elde edilen smear örneğinde, kontrol grubundan farklı olarak, epitel (E) ve müsinöz hücrelerin (M) yanı sıra, nötrofillerin (N) varlığı izlenmektedir. H+E, X400.



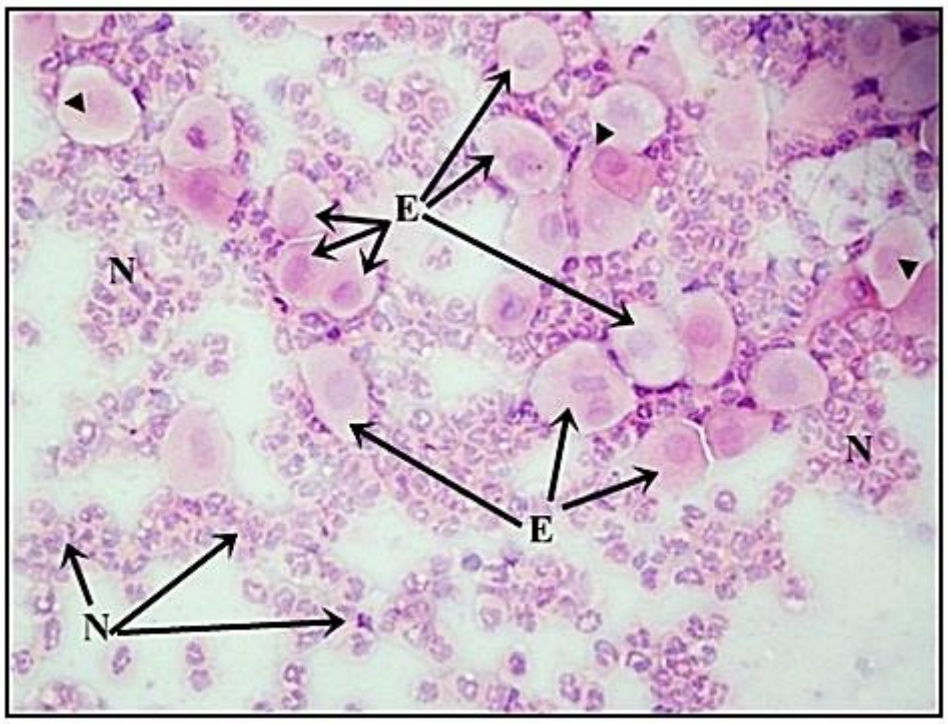
Şekil 20. Stres grubuna ait östrus fazında, kornifiye hücreler (K) yığınlar halinde görülmektedir. H+E, X200.



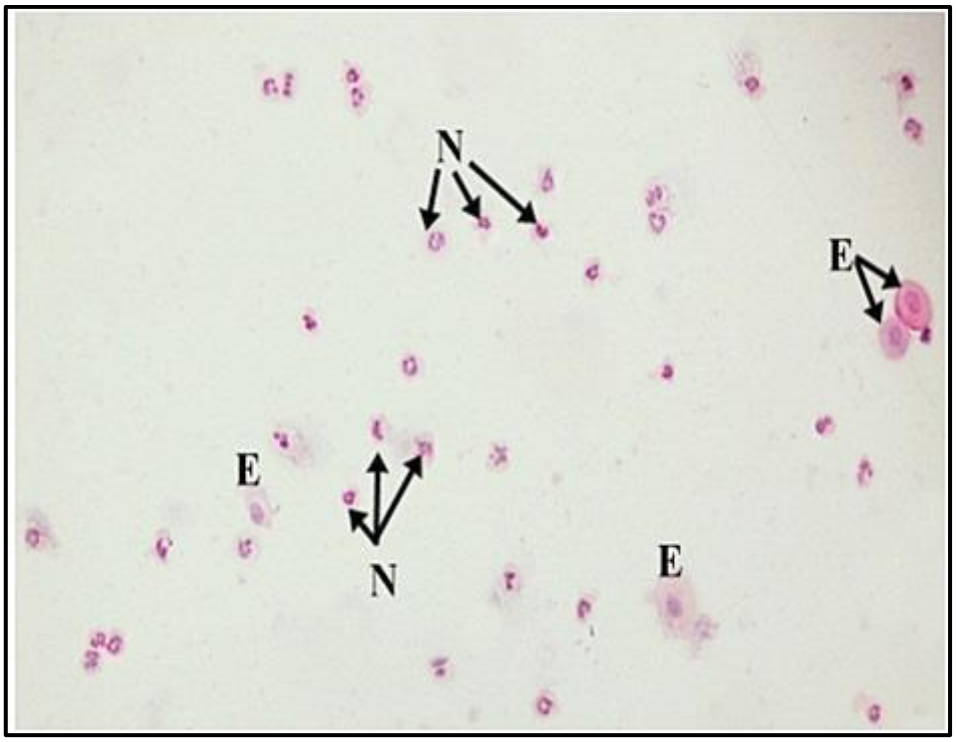
Şekil 21. Stres grubuna ait östrus fazı smear örneğinde, nükleus içermeyen kornifiye hücreler (K), gözlenmektedir. H+E, X400.



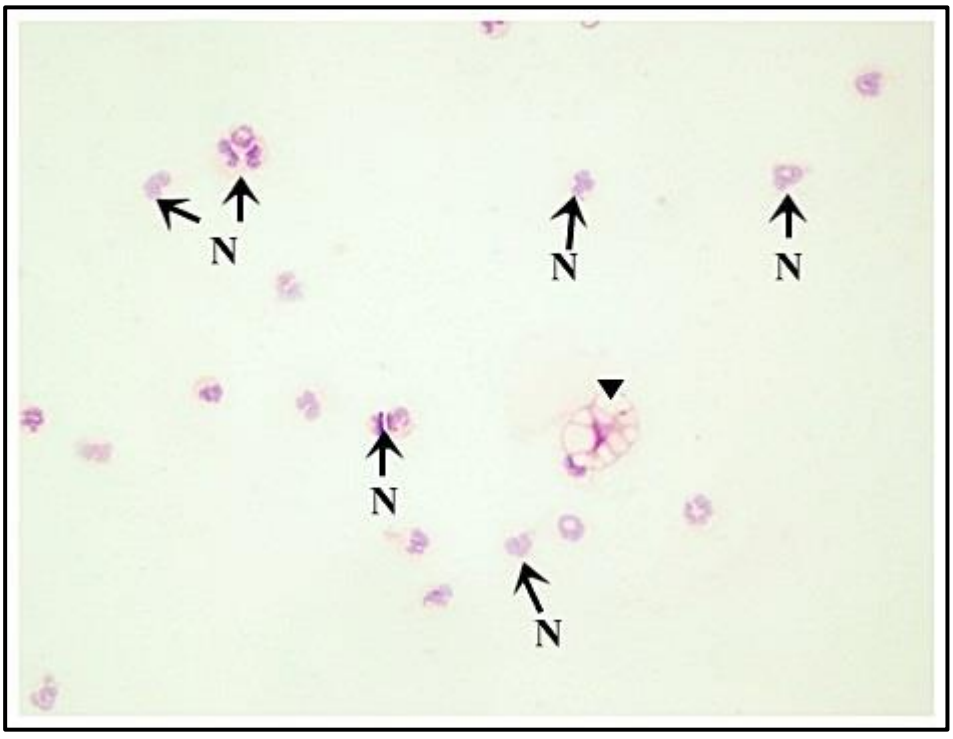
Şekil 22. Stres grubunun metöstrus fazına ait smear örneğinde, hem nükleuslu epitel hücrelerinin (E) hem de nötrofillerin (N) sayıca arttığı gözlemlenmiştir. H+E, X200.



Şekil 23. Metöstrus fazında, hem nükleuslu epitel hücreleri (E) hem de nötrofillerin (N) sayıca arttığı, çok sayıda sitoplazmik vakuol bulunduran nükleuslu epitel hücreleri de (ok başı) sıklıkla görülmektedir. H+E, X400.



Şekil 24. Stresin etkisine bağlı olarak bu fazda da nötrofillerde sayıca artış gözlenmştir. H+E, X200.



Şekil 25. Stres grubu diöstrus fazında, vakuolizasyon (ok başı) gösteren, yapısı bozulmakta olan epitel hücreleri ve çok sayıda nötrofil (N) izlenmektedir. H+E, X400.

SERUM KORTİZOL BULGULARI

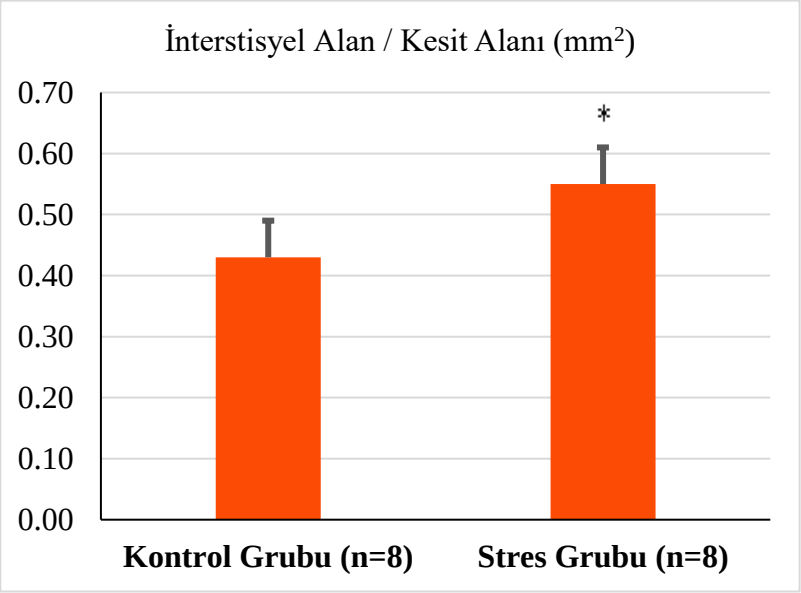
Deney sonunda, deneklerden alınan kan örneklerinden serumlar elde edilmiştir. Her bir deneğe ait serum kortizol değeri ölçüldüğünde, stres grubu (1,17 ug/dL) ve kontrol grubu (0,88 ug/dL) arasında anlamlı fark olmadığı tespit edilmiştir (p=0,384; Tablo 3).

Tablo 3. Kortizol seviyeleri (ug/dL)

	Kontrol Grubu (n=10)	**Stres Grubu (n=10)**	**p**
Kortizol seviyesi (ug/dL)	0,88 ± 0,18	1,17 ± 0,67	0,384

MORFOMETRİK BULGULAR

Stres ve kontrol grubu deneklerinin Masson Trikrom boyalı ovaryum kesitlerinde, ortalama 1,46 mm^2'lik kesit alanında, interstisyel alan ölçümleri yapılmıştır. Kısıtlama stresine maruz kalan deneklerde, interstisyel hücrelerde hipertofi ve interstisyel bezlerde artışa bağlı olarak, kontrol grubuna kıyasla, interstisyel alanlarda artış saptanmıştır (0,62 mm^2'ye karşı 0,80 mm^2). İki gruba ait ovaryumlarda, interstisyel alan/toplam kesit alanı oranları kıyaslandığında, stres grubunda bu değerin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (p<0,001; Şekil 26).



Şekil 26. Kontrol ve stres gruplarına ait ovaryum kesitlerinde, interstisyel alan/ toplam kesit alanı oranı (mm^2). *:Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, p <0,001.

OVARYUM HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

Işık mikroskobik değerlendirmelerde, kontrol ve stres gruplarına ait diöstrus fazındaki ovaryum doku örnekleri incelenmiştir. Ovaryum dokusuna özgü genel histolojik özellikler, H+E ve Masson Trikrom boyaları ile gösterilmiştir.

Diöstrus fazında, ovariyan kortekse hakim yapıların, primer ve sekonder foliküller olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu ovaryumlarına ait H+E ve Masson Trikrom boyanmış kesitler incelenerek, rat ovaryumunun korteks ve medulla bölgeleri tespit edilmiştir (Şekil 27,28). Ovaryum yüzeylerini, tek katlı yassıdan kübiğe doğru değişen germinal epitelin örttüğü gözlenmiştir (Şekil 29,30). Germinal epitelin altında, tunika albuginea ve onun da altında farklı gelişim aşamalarında, sağlıklı foliküller izlenmiştir (Şekil 29-32). Tüm foliküllerin merkezinde yuvarlak şekilli, asidofil karakterli oositler bulunmaktadır. Oositlerin nükleusu 1. mayoz bölünmenin profaz safhasında olduğundan, veziküler kromatin yerleşimi (germinal vezikül aşaması) sergilemektedir (Şekil 31-34). Korteks parankimi içerisinde az sayıda normal görünümlü interstisyel bezler de gözlemlenmiştir (Şekil 32).

Genellikle büyük çaplı foliküllerde, granüloza hücreleri arasında çok sayıda mitotik figür olduğu tespit edilmiştir (Şekil 31). Yine büyük çaplı foliküllerde, granüloza tabakası dışında ovaryum bağ dokusunun, teka folikülü şeklinde farklılaştığı izlenmektedir. Bu bölgede folikül beslenmesinden sorumlu kan damarları yer almaktadır (Şekil 33-35).

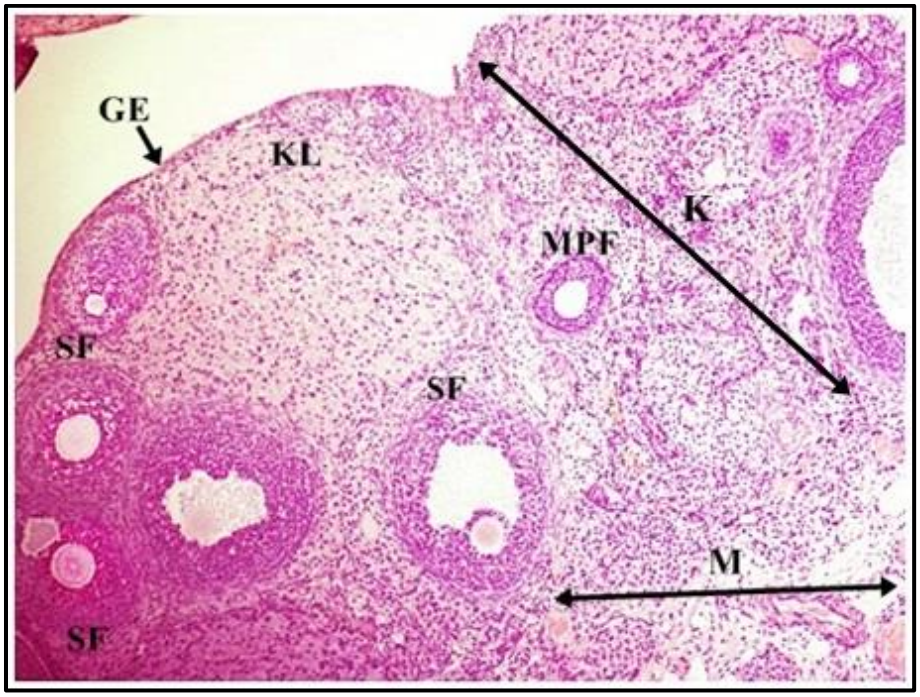
Ovaryumda folikül havuzunda atrezi, fizyolojik bir süreçtir. Bu yüzden, kontrol grubu ovaryum kesitlerinde de atretik foliküller gözlenmiştir (Şekil 35). Atretik foliküller çoğunlukla granüloza hücrelerindeki piknotik nükleuslar ve apoptotik cisimler ile tespit edilmiştir.

Rodent ovaryumlarına özgü olan, farklı sikluslara ait KL'lar da kesitler üzerinde dikkati çekmektedir. KL'da bulunan iki hücreden, lüteinize granüloza hücrelerinin hacmi büyük iken teka hücrelerinin hacmi çok daha küçük görünmektedir (Şekil 36).

Stres grubu ovaryum doku örnekleri incelendiğinde ise kontrol grubu ovaryumlarına benzer şekilde, ovaryumu saran germinal epitelin hemen altında tunika albuginea bulunmaktadır. Bununla birlikte, kontrole kıyasla daha az sayıda, sağlıklı ve gelişmekte olan foliküllere rastlanmıştır (Şekil 37,38). Bu grupta interstisyel bezlerde hipertrofi ve bezlerin sayısında artış dikkati çekmektedir. Bu yüzden ovaryum korteksine hakim yapıların interstisyel bezler olduğu gözlenmektedir (Şekil 37-40). Atreziye uğramış folikülden geriye kalan yapılar olan interstisyel bezler, parankima içerisinde farklı değişim aşamalarında yer almaktadır. Teka folikülünden kaynaklanan bu bezler, bir lümen etrafında yerleşmiş polihedral hücreler şeklinde izlenmektedir (Şekil 41,42).

Stres grubu ile kontrol grubunun ovaryum dokuları kıyaslandığında, atretik foliküllerin sayısında artış meydana geldiği görülmüştür. Bu grupta piknotik nükleuslu granüloza hücreleri ve apoptotik cisimler, atretik foliküllerde oldukça fazla sayıda bulunmaktadır (Şekil 43-45). Stres grubunda, atretik folikül oositlerinde, eozinofili artışı, fragmantasyon (Şekil 44) ve vakuolizasyon (Şekil 45) gözlenmiştir.

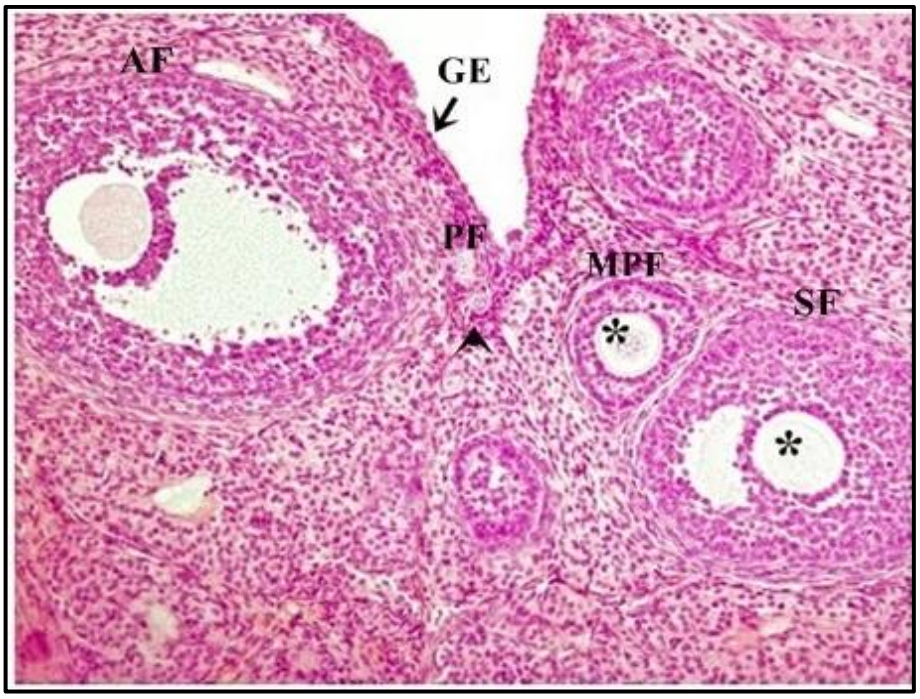
Kontrol Grubu Ovaryum Kesitleri



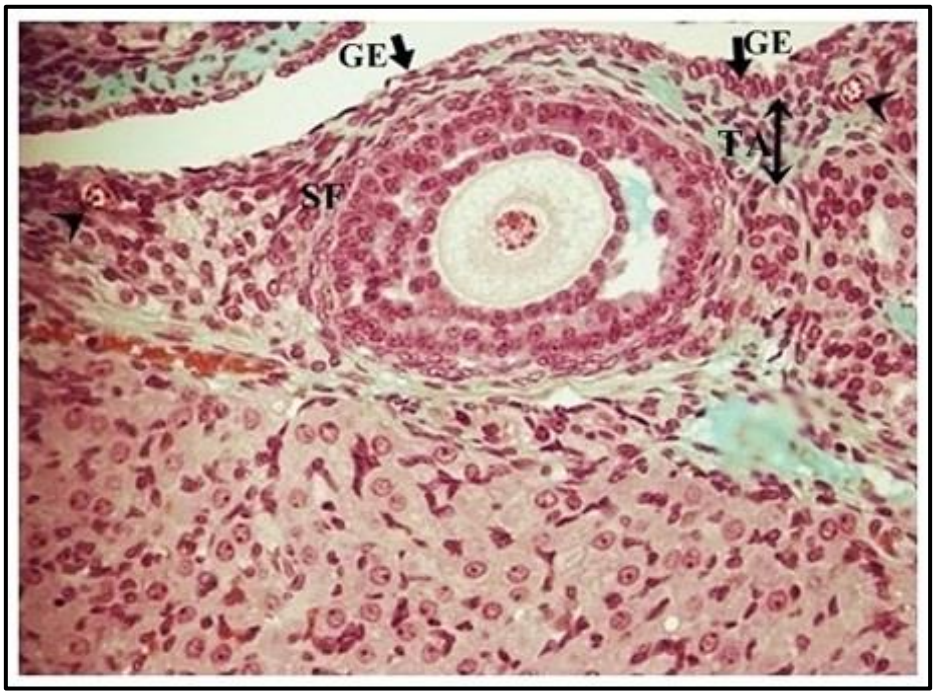
Şekil 27. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, gelişmekte olan sağlıklı multilaminar primer foliküller (MPF) ve sekonder foliküller (SF) gösterilmiştir. GE: germinal epitel, K: korteks, M: medulla. H+E, X100.



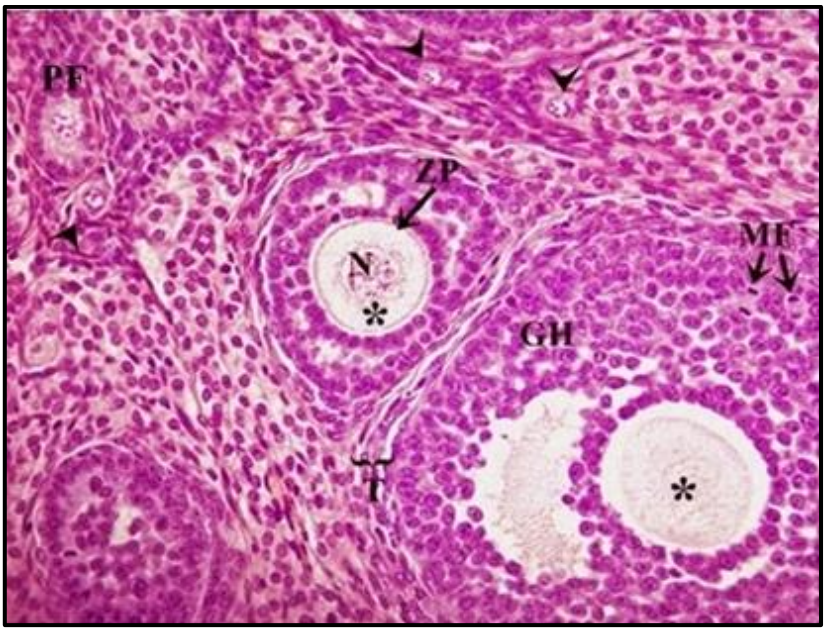
Şekil 28. Kontrol grubuna ait mikrografta germinal epitel (GE), altında tunika albuginea ve ovariyan korteks gözlenmektedir. Farklı gelişim aşamalarındaki foliküller ve korpus luteum korteks içerisinde izlenmektedir. GF: graaf folikülü, KL: korpus luteum, MPF: multilaminar primer folikül, SF: sekonder folikül. Masson Trikrom, X100.



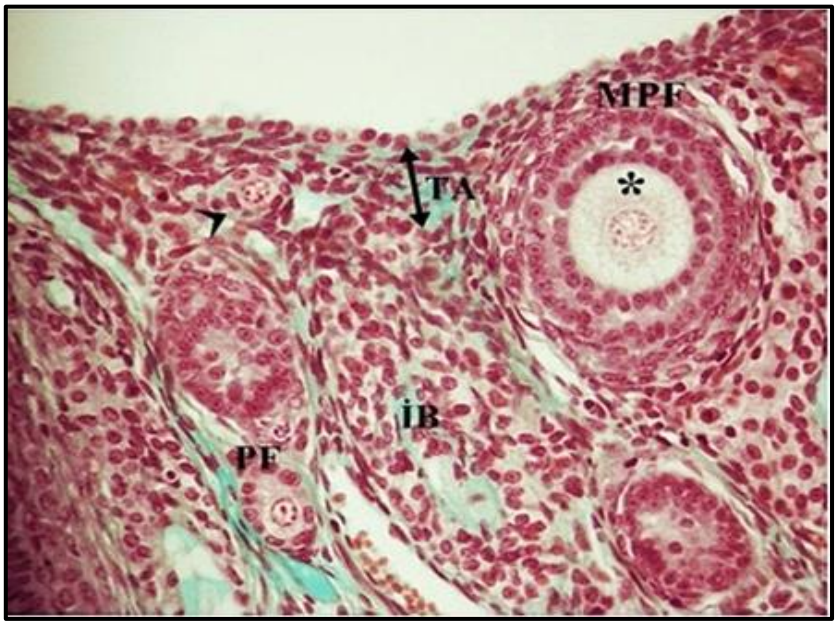
Şekil 29. Ovaryum korteksinden derinlere indikçe sağlıklı sekonder foliküller (SF) gözlenmektedir. AF: atretik folikül, GE:germnal epitel, MPF: multilaminar primer folikül, Ok başı: primordiyal folikül, *: oosit, PF: primer folikül. H+E, X200.



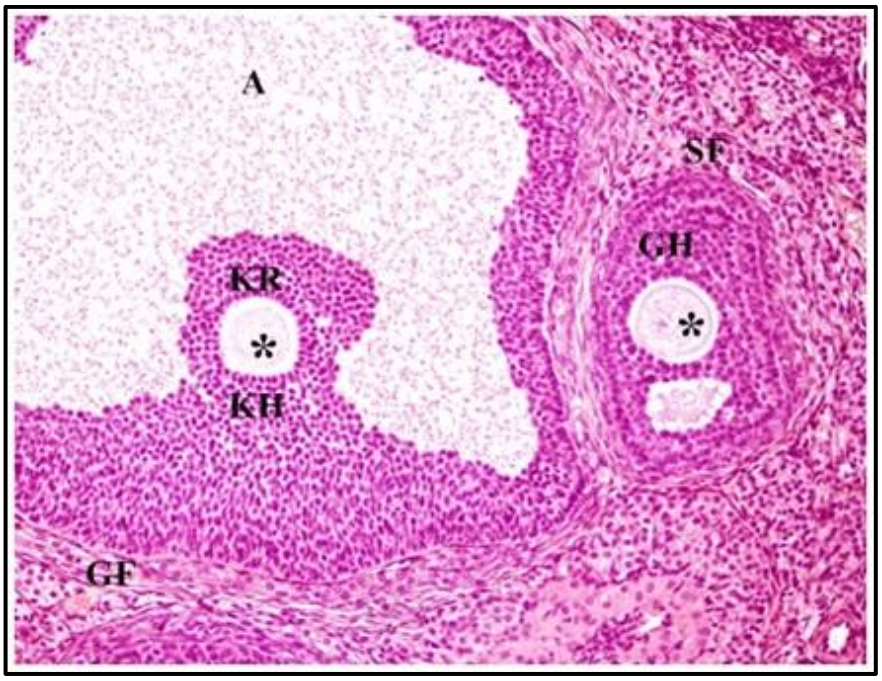
Şekil 30. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, germinal epitelin (GE) hemen altında tunika albuginea (TA) ve tek katlı yassı foliküler hücrelerle çevrelenmiş sağlıklı primordiyal foliküller (ok başı) gözlenmektedir. SF: sekonder folikül. Masson Trikrom, X400.



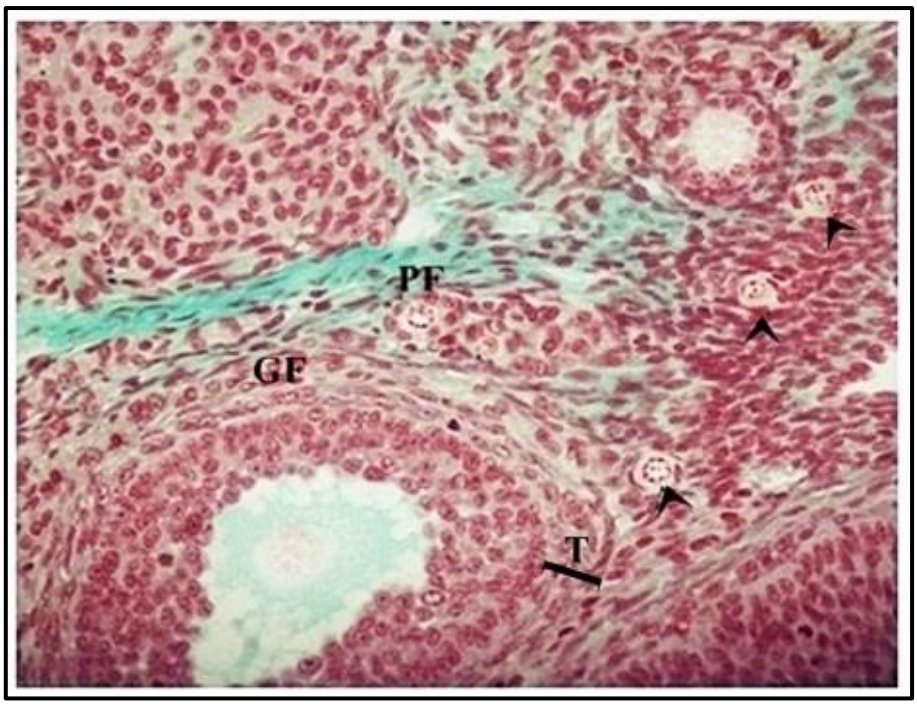
Şekil 31. Kontrol grubu ovaryum kesitinde, primordiyal folküller (ok başı) ve küçük çaplı primer folikül (PF) normal yapı sergilemektedir. Preantral folikülde oosit (*), oosit nükleusu (N), ve oosit ile granüloza hücreleri arasında bulunan sağlıklı zona pellusida (ZP) gösterilmiştir. Sekonder folikülün granüloza hücrelerinde (GH) ise çok sayıda mitotik figürlere (MF) rastlanmıştır. Sekonder folikülü saran teka tabakası (T) normal görünüm sergilemektedir. H+E, X400.



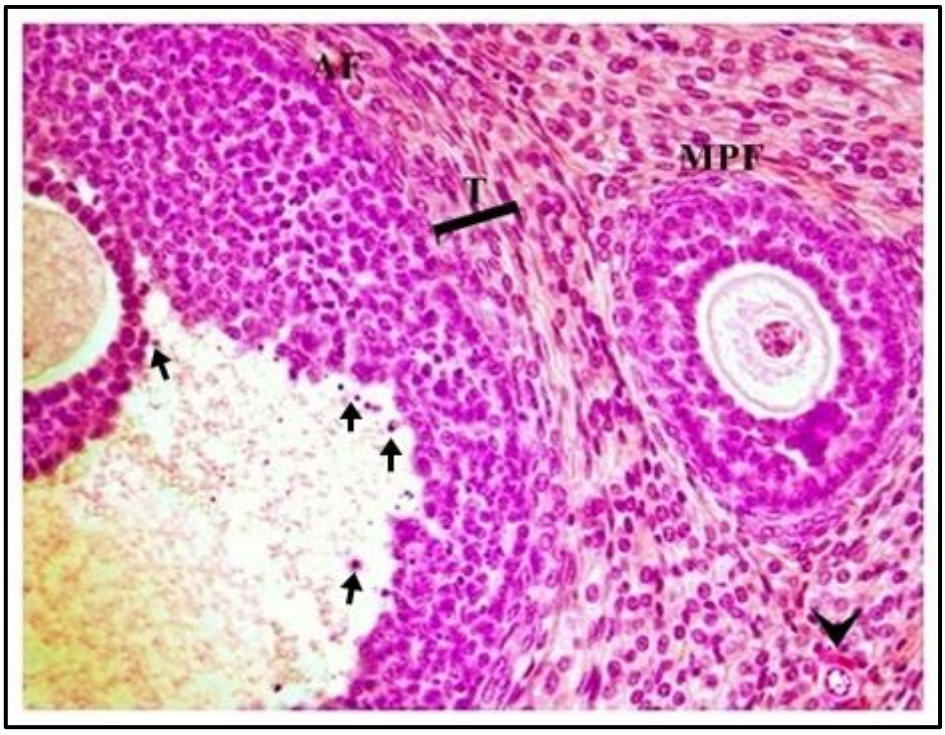
Şekil 32. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, ovaryumu saran germinal epitel altına yerleşmiş tunika albuginea (TA), ovariyan korteksten medullaya doğru gelişen primordiyal folikül (ok başı), küçük çaplı primer (PF), multilaminar primer folikül (MPF) ve interstisyel bezler (İB) gösterilmiştir.*: oosit. Masson Trikrom, X400.



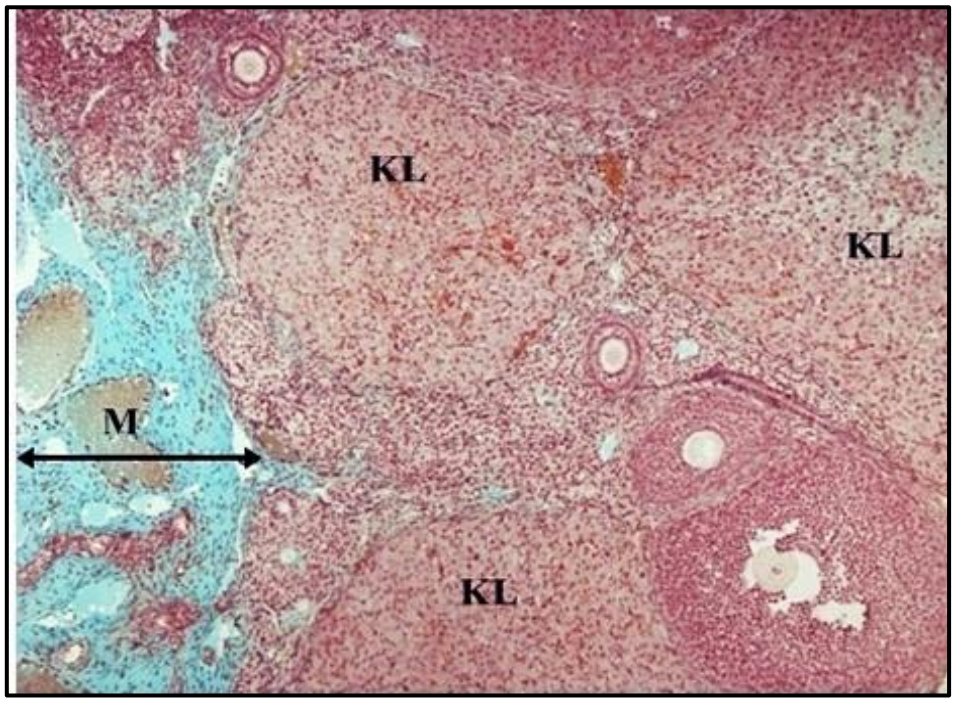
Şekil 33. Kontrol grubu ovaryum kesitinde, foliküler gelişimin son aşamasında olan graaf folikülünde (GF) büyük tek bir antrumun (A) şekillendiği, granüloza hücrelerinin (GH) periferde yerleştiği ve oosit (*) ile granüloza hücrelerinin antrumda oosit-kümülüs hücre kompleksini oluşturduğu izlenmektedir. KH: kümülüs hücreleri, KR:korona radiata. H+E, X200.



Şekil 34. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, çok sayıda primordiyal folikül (ok başı) ve farklı aşamalardaki sağlıklı foliküller izlenmektedir. PF: küçük çaplı primer folikül, MPF: multilaminar primer folikül ve GF: graaf folikülü, T: teka tabakası. Masson Trikrom, X400.

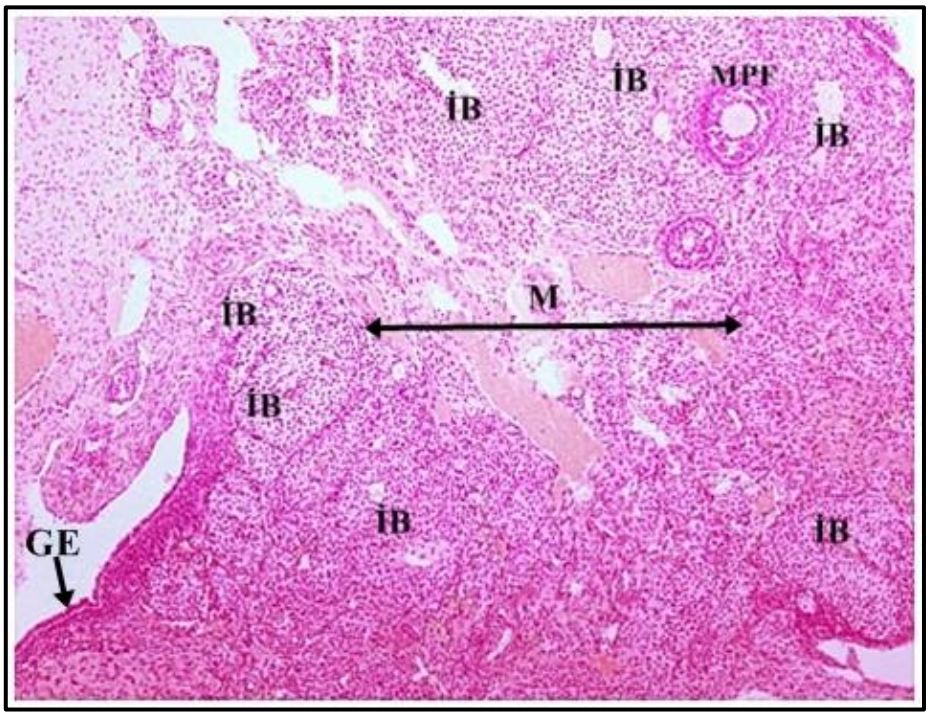


Şekil 35. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, sağlıklı foliküllerin yanında, apoptotik cisimlerle (ok) karakterize, atrezi aşamasındaki foliküllere de (AF) rastlanmıştır. Ok başı: primordiyal folikül. MPF: multilaminar primer folikül. T: teka tabakası H+E, X400.

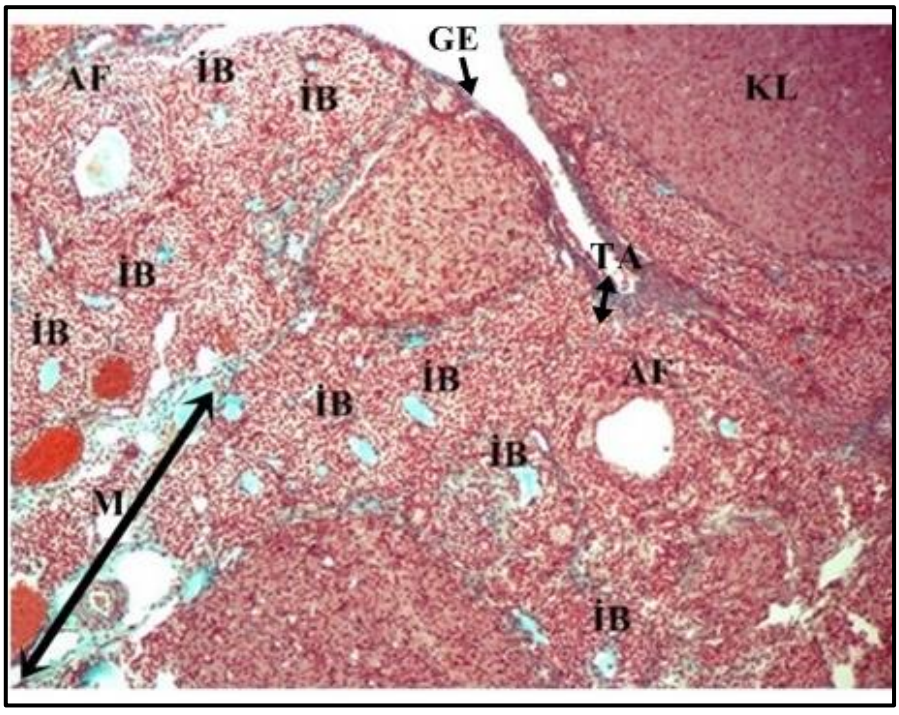


Şekil 36. Kontrol grubuna ait rat ovaryum kesitinde, foliküllerin arasında farklı sikluslara ait korpus luteumlar (KL) ve ovaryumun medullası (M) gösterilmiştir. Masson Trikrom, X100.

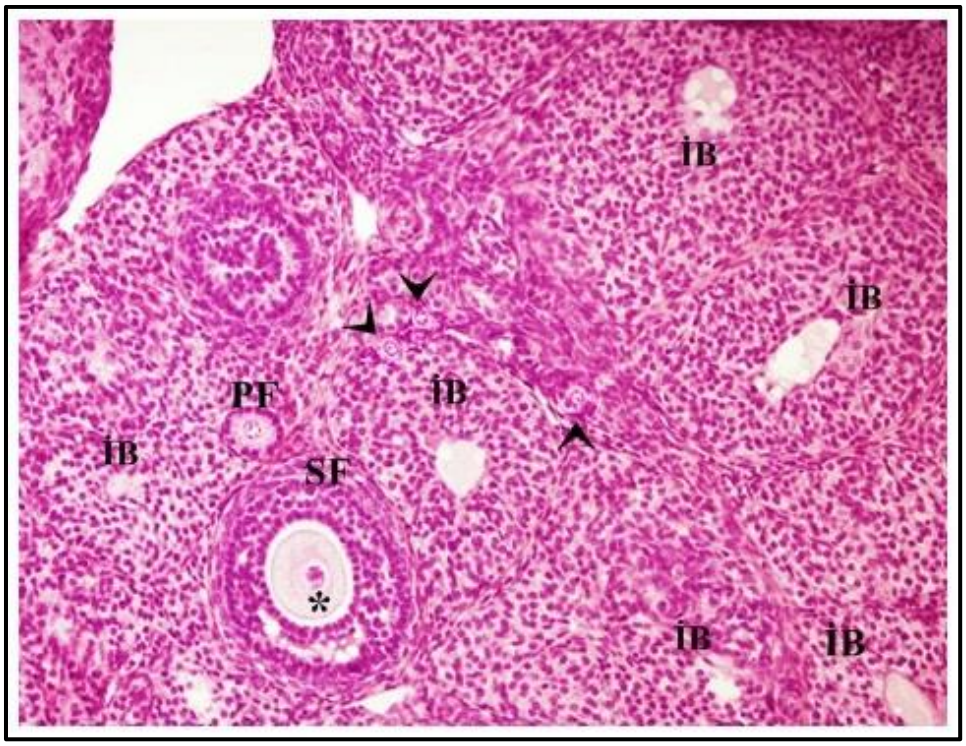
Stres Grubu Ovaryum Kesitleri



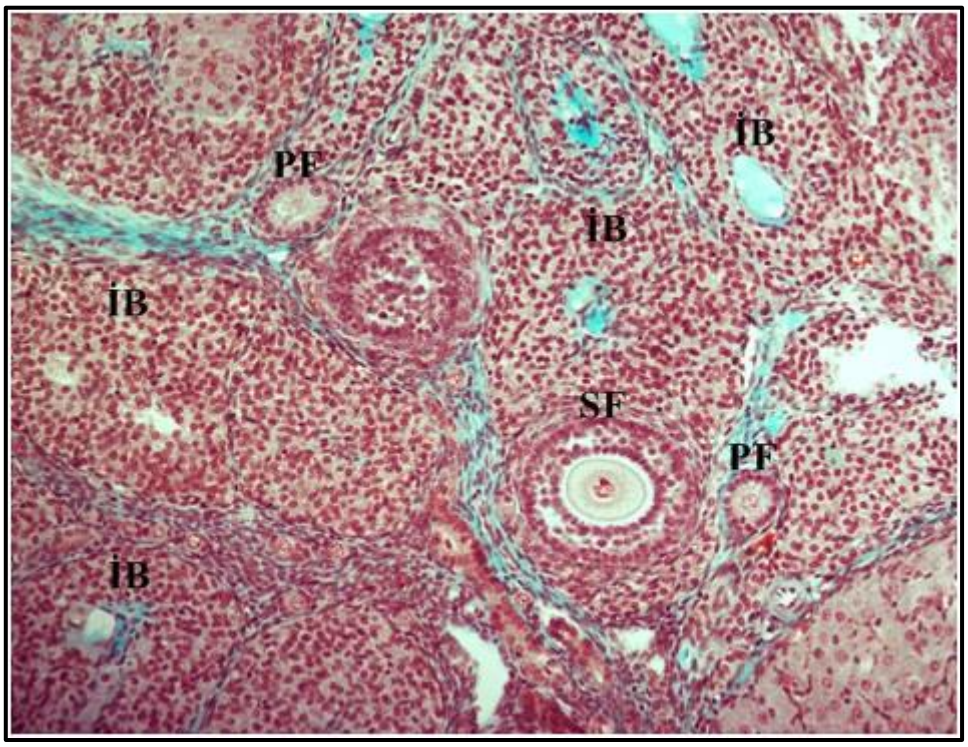
Şekil 37. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, az sayıda gelişen folikül, artan interstisyel bezler (İB) ve ovariyan korteksin altında bulunan medulla (M) gösterilmiştir. GE: germinal epitel. MPF: multilaminar primer folikül. H+E, X100.



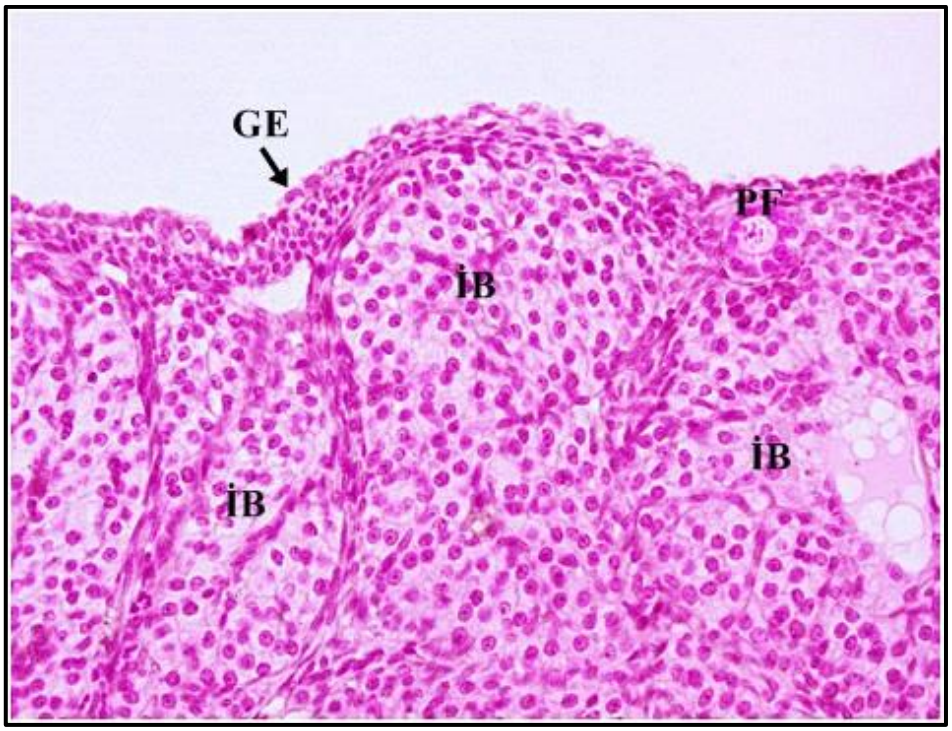
Şekil 38. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, ovaryumu dıştan saran germinal epitel (GE), hemen altında bağ doku özelliğinde tunika albuginea (TA), interstisyel bezlerde (İB) artış ve atretik foliküller (AF) gösterilmektedir. M: medulla. KL:korpus luteum. Masson Trikrom, X100.



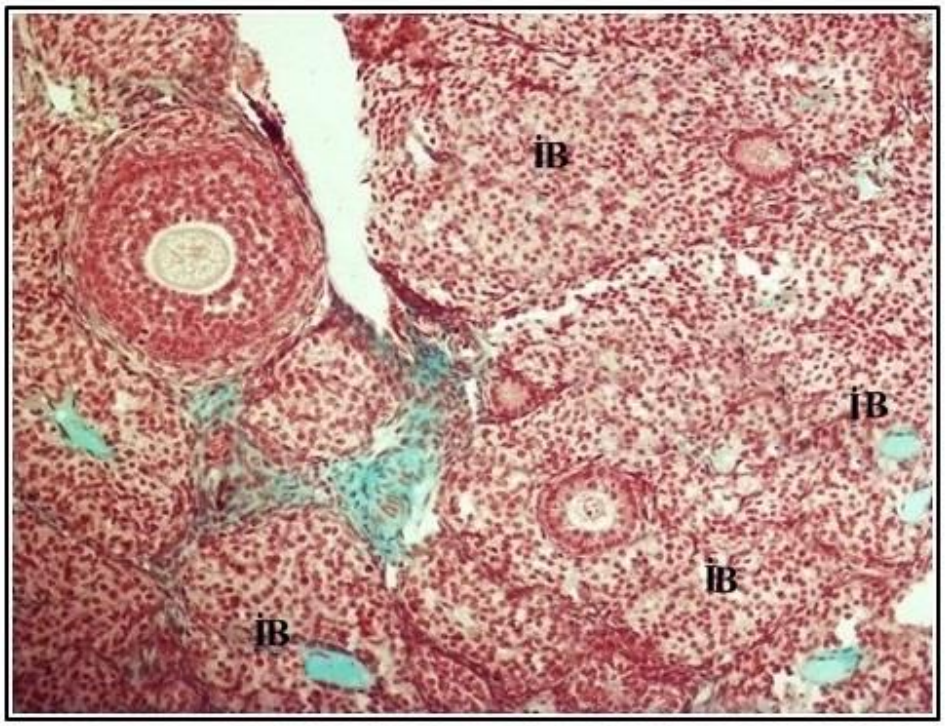
Şekil 39. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, primordiyal folikül (ok başı), küçük çaplı primer folikül (PF) ve sekonder foliküllere (SF) rastlanmaktadır. Strese maruz kalma sonucu interstisyel bezlerdeki (İB) artış gösterilmiştir. *:oosit. H+E, X200.



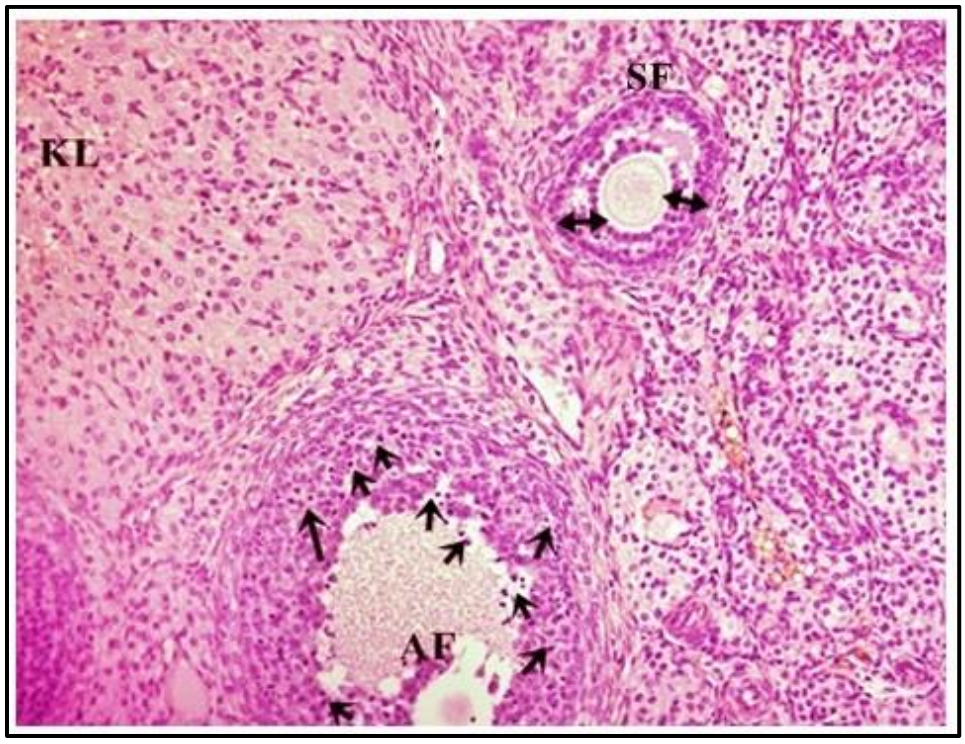
Şekil 40. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, küçük çapa sahip primer foliküller (PF), atretik sürece girmiş bir sekonder folikül (SF) ve hipertrofiye insterstisyel bezler (İB) izlenmektedir. Masson Trikrom, X200.



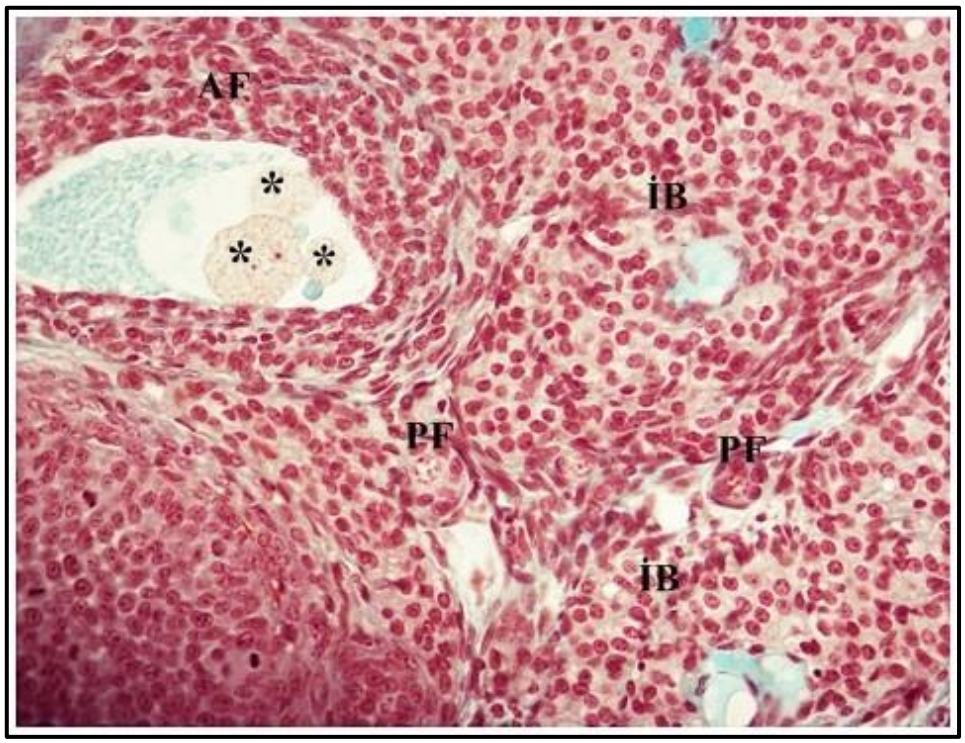
Şekil 41. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, artan sayıda interstisyel bezler (İB) izlenmektedir. GE: germinal epitel, PF: primer folikül. H+E, X400.



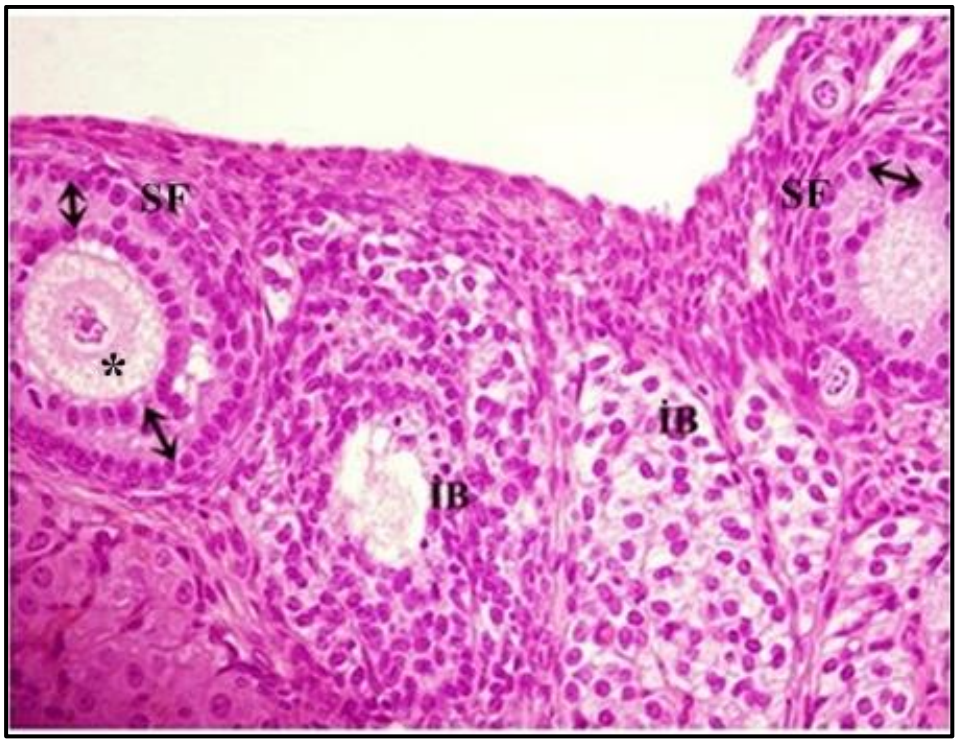
Şekil 42. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, az sayıda gelişmekte olan foliküle kıyasla, artan sayıda interstisyel bezler (İB) gösterilmiştir. Masson Trikrom, X200.



Şekil 43. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, atretik foliküldeki (AF) piknotik nükleuslar (ok) ve sekonder folikülün granüloza hücreleri arasındaki ayrılmalar (çift taraflı ok) görülmektedir. KL: korpus luteum. H+E, X200.



Şekil 44. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, oosit fragmantasyonu (*), sayıca az küçük çaplı primer foliküller (PF) gözlenmektedir. AF: atretik folikül, İB: interstisyel bez. Masson Trikrom, X400.



Şekil 45. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, sekonder folikül (SF) oositinde vakuolizasyon (*) ve granüloza hücreleri arasındaki bağlantıların zayıflaması sonucu hücreler arasındaki ayrılmalar (çift taraflı ok) gösterilmiştir. İB: İnterstisye bez. H+E, X400.

İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

Kontrol grubu ve immobiliza stres grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde, foliküler farklılaşmada rol alan büyüme faktörlerinden IGF-1, AMH ve Bcl-2 için immunohistokimyasal boyamalar yapılmıştır. Üç antikora ait ovariyan immünoreaktivite değerlendirilmiş, semikantitatif olarak HSCORE yöntemi ile de boyanma şiddetleri hesaplanmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirilip Tablo 4'te sunulmaktadır.

Tablo 4. Kontrol ve stres gruplarına ait IGF-1, AMH ve Bcl-2 için HSCORE değerlerinin karşılaştırılması

	Kontrol Grubu (n=8)	**Stres Grubu (n=8)**	**p**
IGF-1 HSCORE	215,63 ± 21,3	128,75 ± 13,6	**<0,0001***
AMH HSCORE	233,75 ± 13	143, 75 ± 22,6	**<0,0001***
Bcl-2 HSCORE	142,50± 14,9	106,25 ± 14,1	**<0,0001***

***: Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, p<0,0001.**

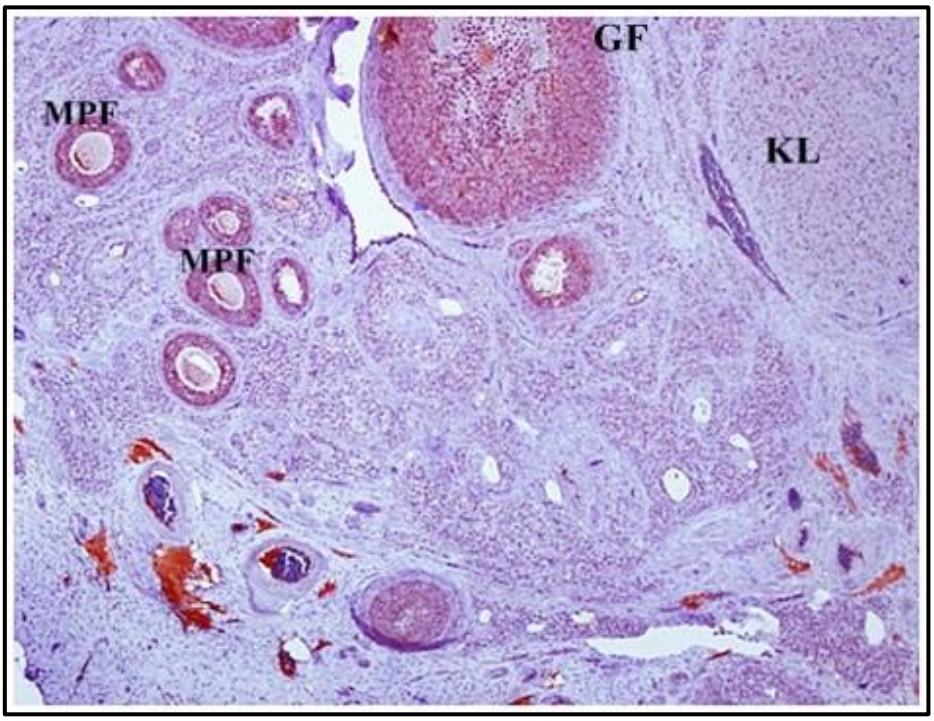
IGF-1 İmmünoreaktivite Değerlendirmesi

Kontrol grubu ovaryum kesitlerinde, sitoplazmik IGF-1 immünoreaktivitesi farklı gelişim aşamasındaki tüm sağlıklı foliküllerde gözlenmiştir. Stromada ve korpus luteumlarda ise herhangi bir immünoreaktivite saptanmamıştır (Şekil 46). En şiddetli boyanmalar multilaminar primer ve sekonder aşamadaki foliküllerin granüloza hücrelerinde ve oositlerinde tespit edilmiştir. Fakat teka tabakalarında immünoreaktivite oldukça zayıf izlenmektedir (Şekil 47). Germinal epitel ve interstisyel alanda da IGF-1 immün boyanması gözlenmezken (Şekil 48), atretik foliküllerde, atrezinin derecesine bağlı olarak granüloza hücrelerinin zayıf ya da negatif immün boyanma sergilediği görülmektedir (Şekil 49).

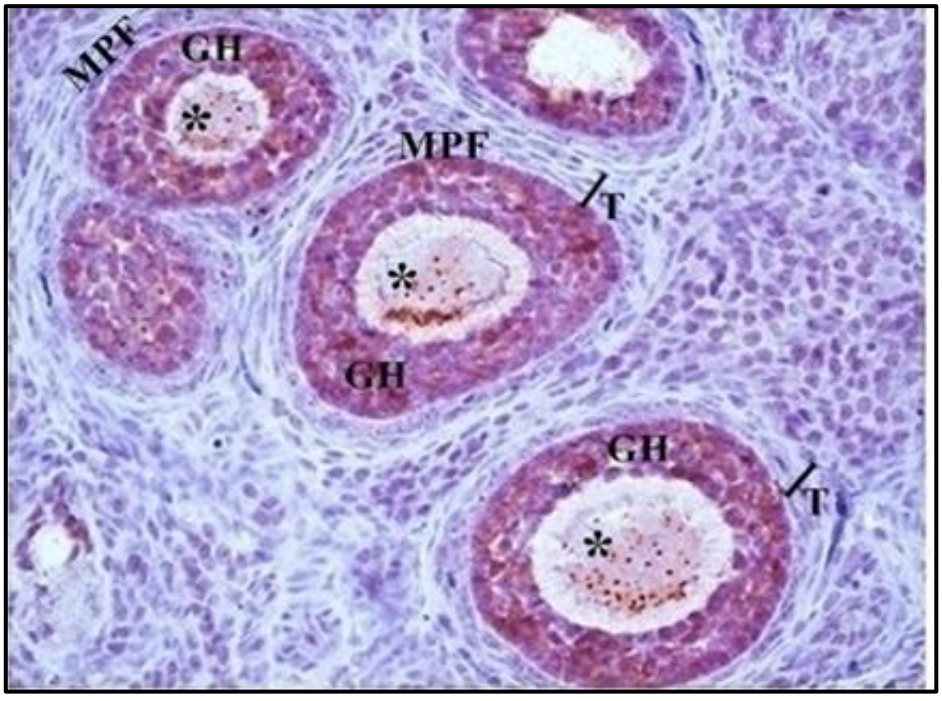
Stres grubuna ait ovaryum kesitlerinde, az sayıda IGF-1 pozitif boyanmış foliküller izlenirken, boyanma şiddetinin de zayıf olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 50). Bu grupta, sağlıklı foliküllerin granüloza hücrelerinin ve oositlerinin sitoplazmalarında, IGF-1 ifadesinin zayıf ve orta şiddette olduğu izlenirken, teka tabakası ve interstisyel alanda boyanma tespit edilmemiştir (Şekil 51). Atretik foliküllerin granüloza hücrelerinde ise IGF-1 immünoreaktivitesi negatif olarak saptanmıştır (Şekil 52).

Her iki grupta, her bir deneğe ait IGF-1 ile boyanmış üç ovaryum preperatı incelendiğinde stres grubu HSCORE değerinin (128,7), kontrol grubu değerinden (215,6) daha düşük olduğu ve iki skor arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlılık taşıdığı görülmüştür ($p<0,0001$; Tablo 4).

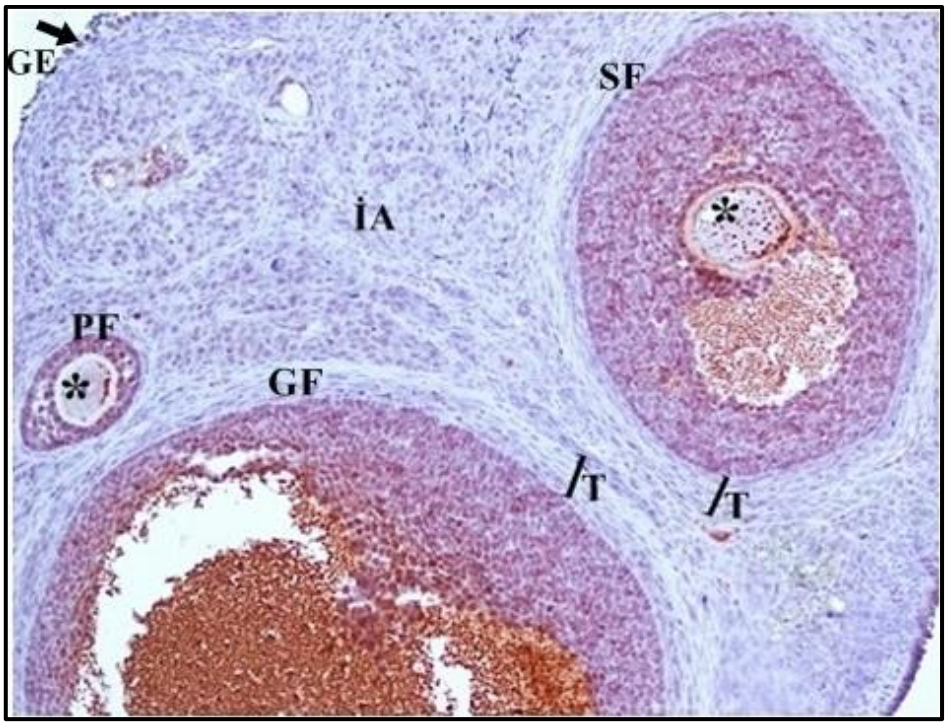
Kontrol Grubu Ovaryum Kesitleri



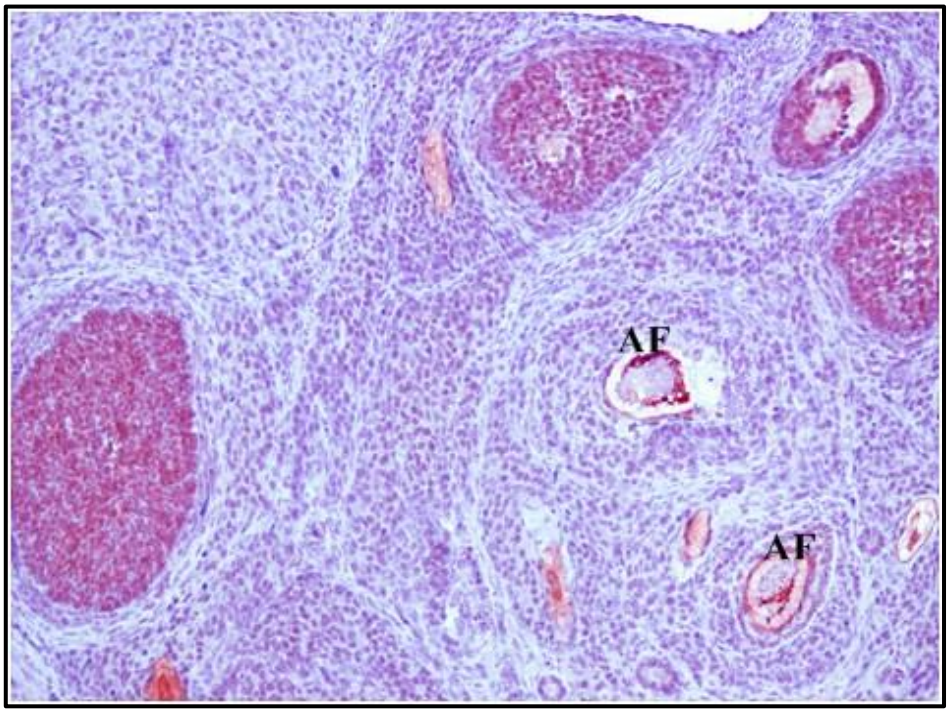
Şekil 46. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, farklı gelişim aşamalarındaki çok sayıda sağlıklı folikülün granüloza hücrelerinde sitoplazmik IGF-1 immünoreaktivitesi görülmektedir. MPF: multilaminar primer folikül, GF: graaf folikülü, KL: korpus luteum. Hematoksilen zıt boyaması, X100.



Şekil 47. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, multilaminar primer foliküllerin (MPF) granüloza hücrelerinde (GH) ve oositlerde (*) belirgin IGF-1 immünoreaktivitesi gözlenirken, folikülleri saran teka tabakasında (T) negatif boyanma izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.

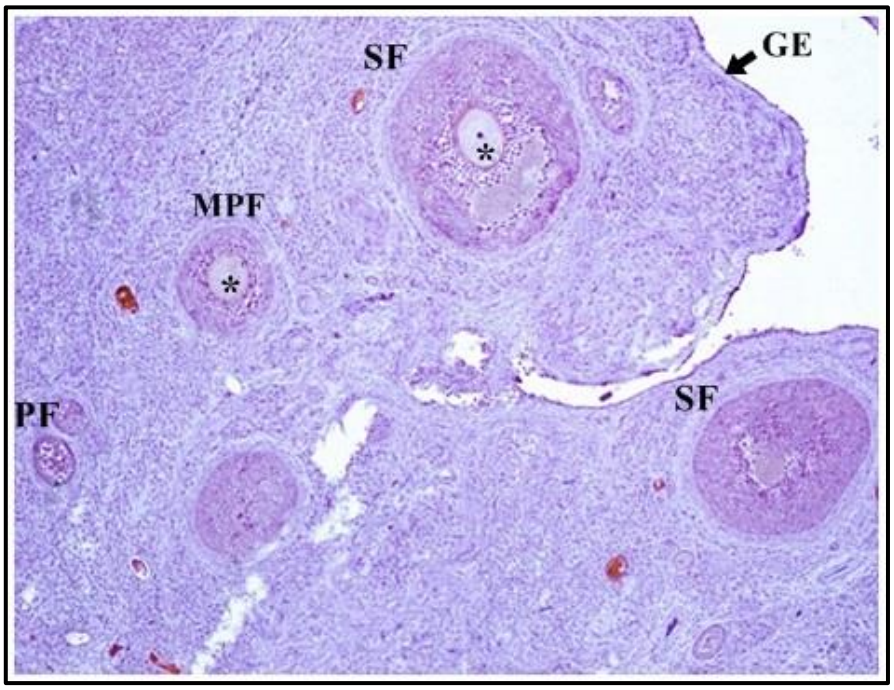


Şekil 48. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, primer folikül (PF), sekonder folikül (SF) ve graaf folikülünün (GF) granüloza hücreleri ve oositlerinde (*), orta şiddette IGF-1 immünoreaktivitesi izlenirken, interstisyel alanda (İA) boyanma gözlenmemektedir. T: teka tabakası. Hematoksilen zıt boyaması, X200.

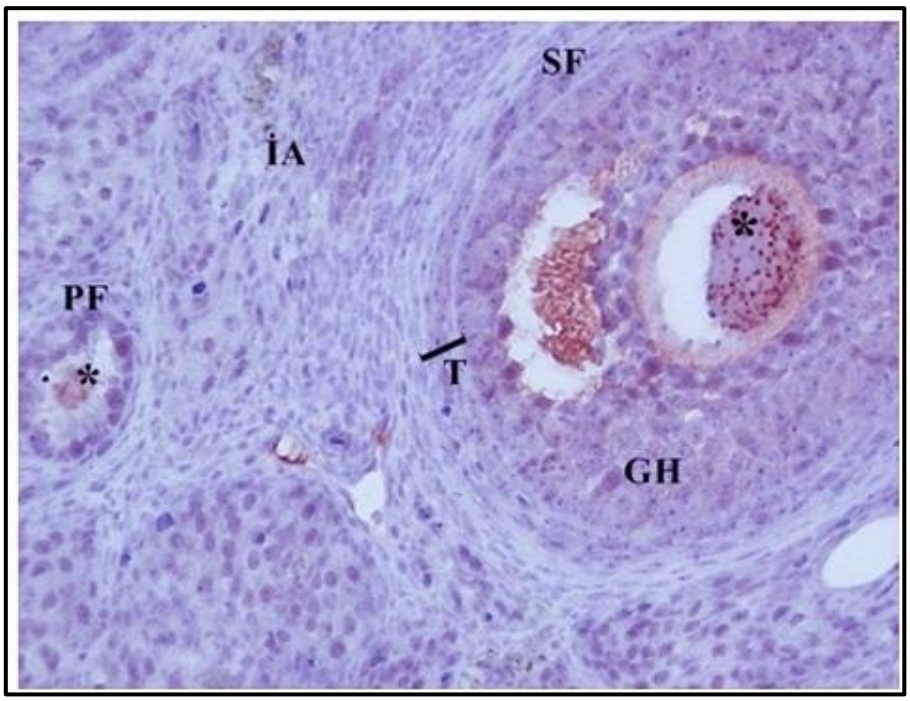


Şekil 49. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, sağlıklı foliküllerin arasında bulunan atretik foliküllerde (AF), IGF-1 immonoreaktivitesi gözlenmemektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.

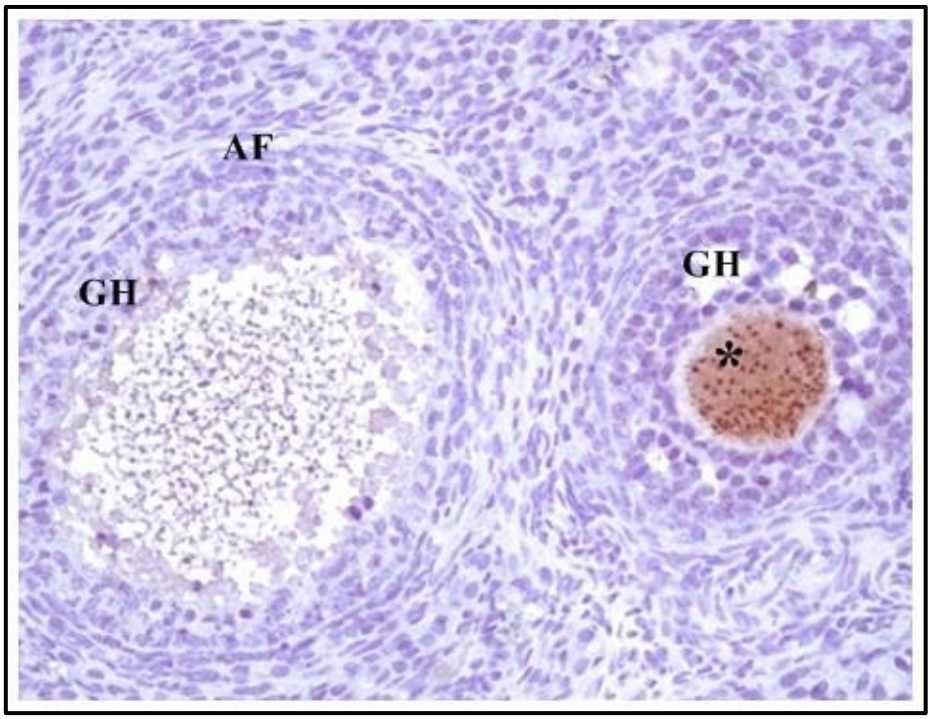
Stres Grubu Ovaryum Kesitleri



Şekil 50. Stres grubuna ait ovaryum kesitlerinde, primer folikül (PF) ile sekonder foliküllerde (SF), hem granüloza hücreleri hem de oositlerinde (*) çok zayıf IGF-1 immünoreaktivitesi gözlenmektedir. GE: germinal epitel. Hematoksilen zıt boyaması, X100.



Şekil 51. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, büyük ve küçük çaplı folikül oositleri (*) IGF-1 için orta şiddette immünoreaktivite gösterirken, granüloza hücreleri (GH) zayıf, teka tabakası (T) ise negatif boyanma sergilemektedir. İA: interstisyel alan, PF: primer folikül, SF: sekonder folikül. Hematoksilen zıt boyaması, X400.



Şekil 52. Stres grubuna ait ovaryum kesitleri az sayıda sağlıklı folikül içermesi ile karakterizedir. Şekildeki sağlıklı folikülde, oosit (*) boyanması belirgin iken granüloza hücreleri (GH), IGF-1 için negatif boyanma sergilemiştir. Atretik foliküllerin (AF) granüloza hücrelerinde de negatif IGF-1 immünoreaktivitesi izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X200.

AMH İmmünoreaktivite Değerlendirmesi

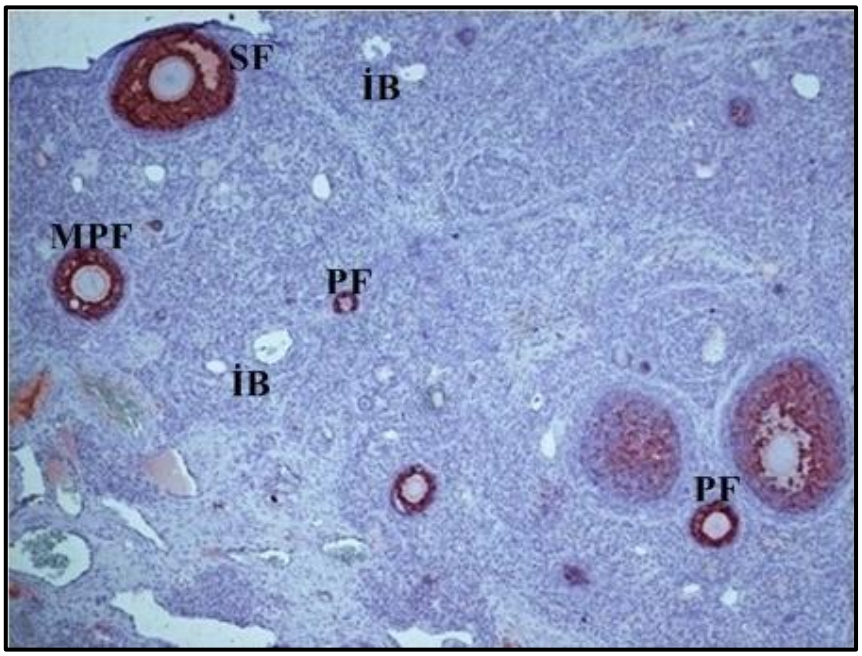
Kontrol ve stres gruplarına ait ovaryum doku örnekleri incelendiğinde, AMH immünoreaktivitesi sadece foliküllerin granüloza hücre sitoplazmalarında görülmüş olup, boyanma şiddeti HSCORE kullanılarak değerlendirilmiştir.

Kontrol grubu ovaryum kesitleri üzerinde, tüm gelişim aşamasındaki sağlıklı foliküllerde, AMH immünoreaktivitesinin olduğu, ancak germinal epitel, korpus luteum ve interstisyel bezlerde herhangi bir boyanmanın olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 53). Primer foliküllerin ileri aşamasında ve sekonder foliküllerde, oldukça yoğun bir AMH immünoreaktivitesi izlenmiştir (Şekil 54). Dönüşüm aşamasındaki primordiyal foliküllerde ve graaf foliküllerinde zayıf/orta derecelerde AMH immünoreaktivitesi olduğu gözlenirken (Şekil 55), atretik foliküllerin çoğunda negatif boyanma tespit edilmiştir (Şekil 56).

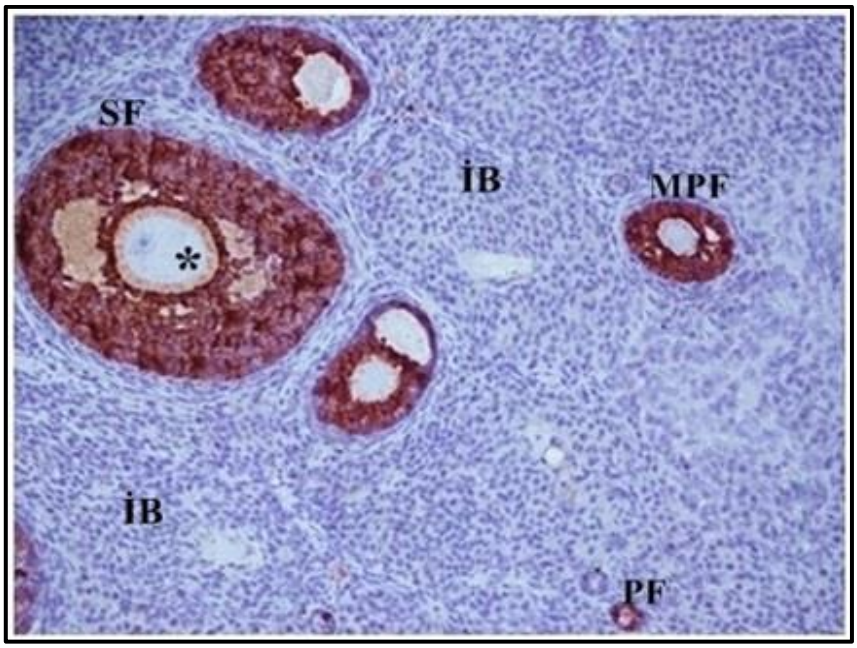
Stres grubuna ait deneklerden alınmış ovaryum doku örnekleri incelendiğinde, pozitif boyanan folikül miktarının, kontrol grubuna kıyasla daha az olduğu gözlenmiştir. Bu gruba ait sağlıklı primer ve sekonder foliküllerde, AMH immünoreaktivitesinin orta ve zayıf şiddette olduğu tespit edilmiştir (Şekil 57). Gerek primordiyal gerekse primer aşamadaki foliküllerde, AMH immünoreaktivitesi zayıf olarak gözlenirken, multilaminar primer ve sekonder foliküllerde boyanma şiddeti, kontrol grubuna göre belirgin olarak azalmıştır (Şekil 58). Kontrol grubuna benzer şekilde stres grubunda da, ovaryumu çevreleyen germinal epitelde (Şekil 58), interstisyel bezlerde (Şekil 59) ve korpus luteumda negatif AMH immün boyanması tespit edilmiştir. Graaf foliküllerinin granüloza hücre sitoplazmalarında ise kontrol grubuna kıyasla, çok düşük şiddette AMH immünoreaktivitesi gözlenmiştir. (Şekil 60).

Her iki grupta, her deneğe ait ovaryum kesitleri incelendiğinde, stres grubunda AMH immünoreaktivitesinin kontrole kıyasla daha zayıf olduğu görülmüştür. Kontrol grubu HSCORE değeri (233,7) ile stres grubu HSCORE değeri (143,7) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$; Tablo 4).

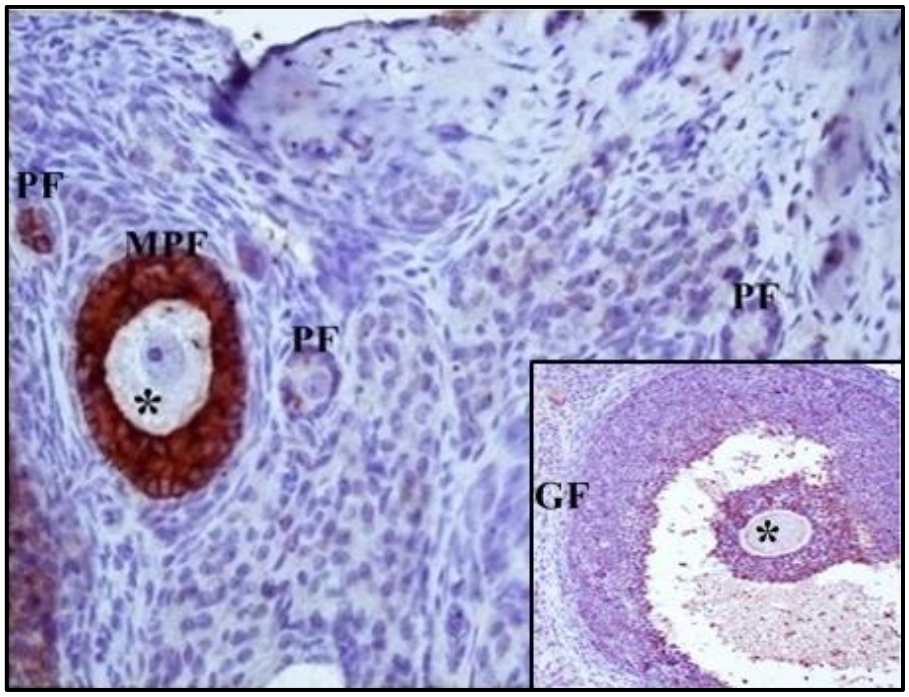
Kontrol Grubu Ovaryum Kesitleri



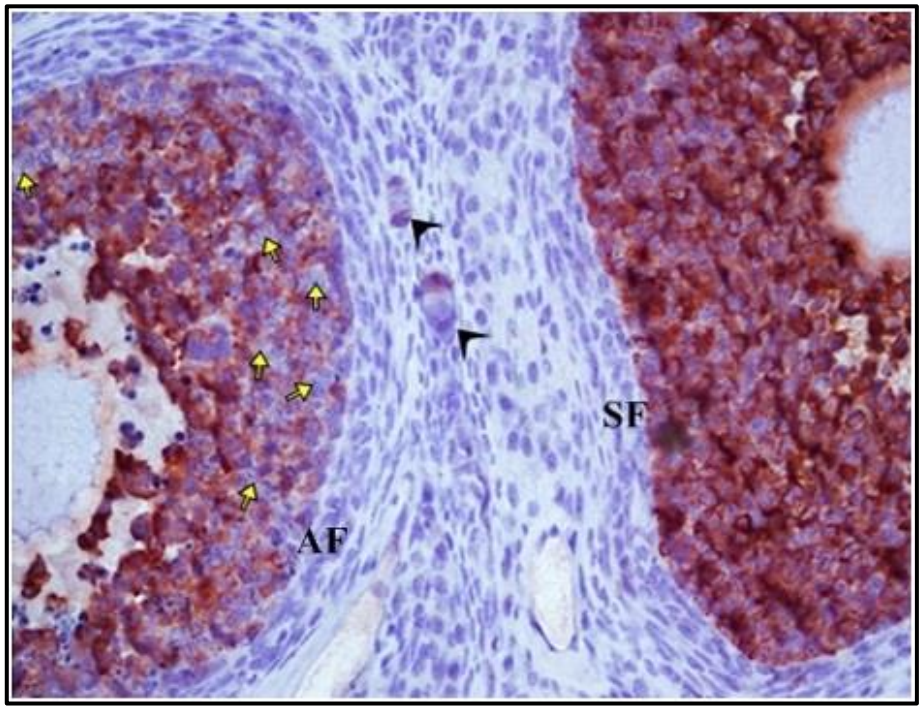
Şekil 53. Kontrol grubu ovaryum kesitinde, başlıca granüloza hücre sitoplazmalarında olmak üzere, multilaminar primer foliküllerde (MPF) ve sekonder foliküllerde (SF) şiddetli AMH immünoreaktivitesi izlenmektedir. Foliküllerin teka tabakasında, interstisyel alan ve bezlerde (İB) ise negatif boyanma gözlenmektedir. PF: küçük çaplı primer folikül. Hematoksilen zıt boyaması, X100.



Şekil 54. Kontrol grubu ovaryum kesitinde, sekonder foliküllerde (SF) şiddetli, küçük çaplı primer foliküllerde (PF) ise orta şiddette AMH immünoreaktivitesi gözlenirken, interstisyel bezlerde (İB) boyanma saptanmamıştır. MPF: multilaminar primer folikül. Hematoksilen zıt boyaması, X200.

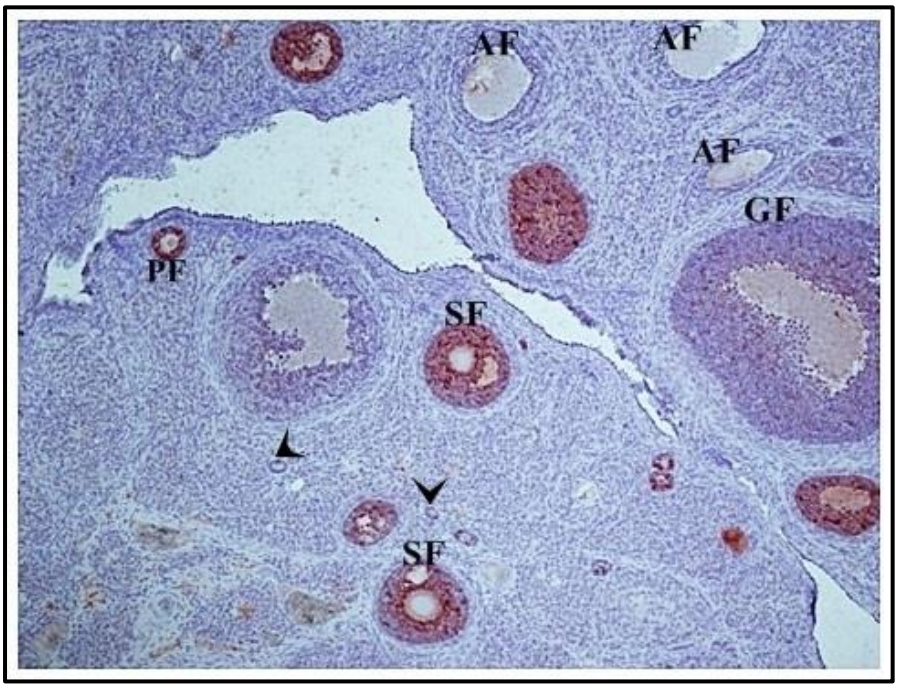


Şekil 55. Kontrol grubu ovaryum kesitinde, ovariyan foliküller içerisinde en şiddetli AMH immünoreaktivitesinin gözlendiği aşama, multilaminar primer folikül (MPF) aşamasıdır. Şekildeki folikülde oosit (*) negatif boyanırken granüloza hücre boyanması oldukça şiddetli bir şekilde izlenmektedir. PF:primer folikül. İçsel şekil: Bu mikrografta zayıf/orta şiddette boyanmış graaf folikülü görülmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.

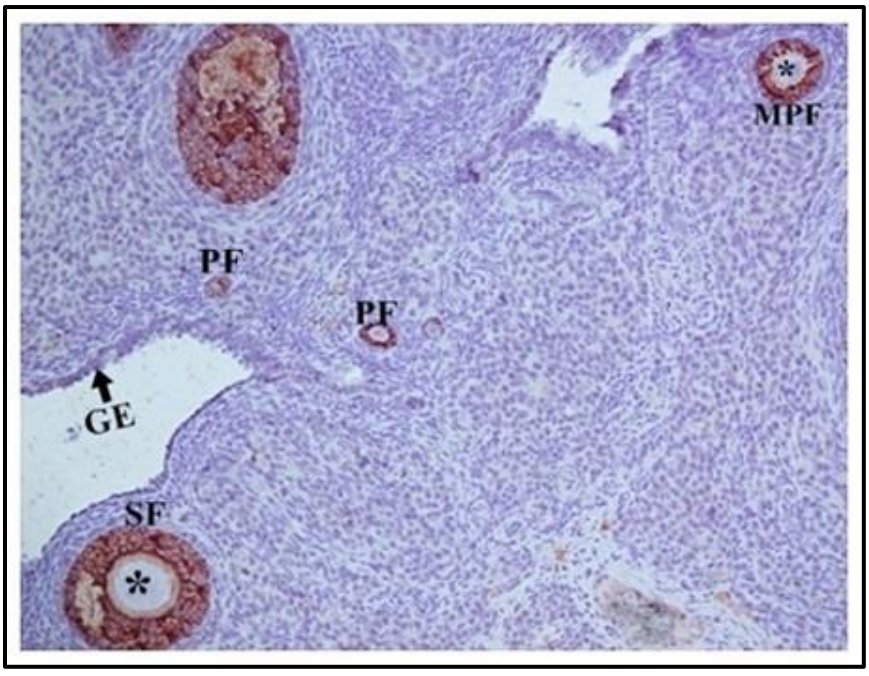


Şekil 56. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, atretik foliküllerde (AF), sağlıklı foliküllere kıyasla, çok sayıda negatif AMH immünoreaktivitesi gösteren granüloza hücrelerinin (sarı ok) varlığı izlenmektedir. Ok başı: primordiyal foliküller. SF: sekonder folikül. Hematoksilen zıt boyaması, X400.

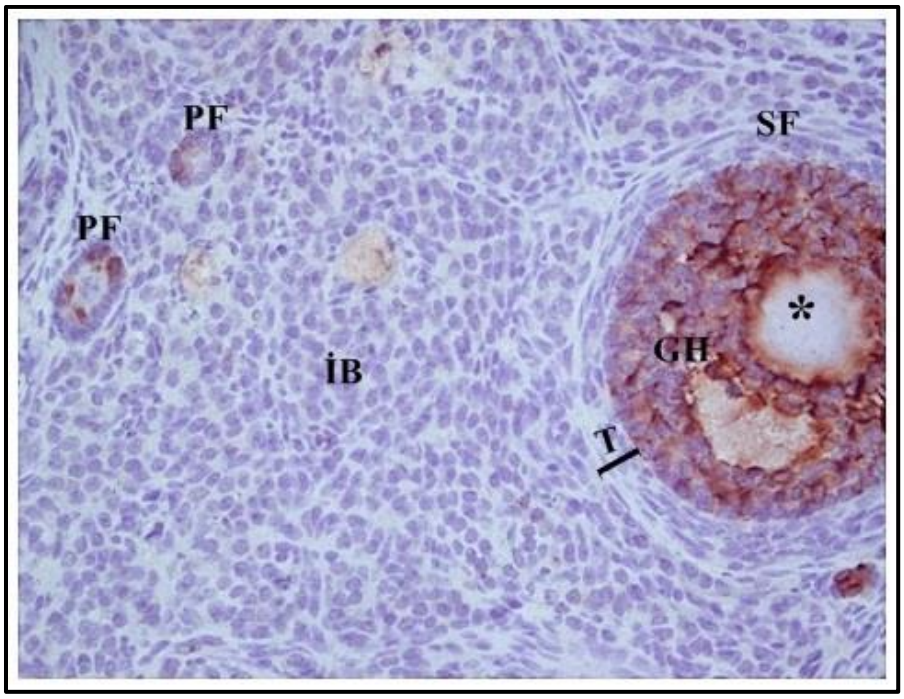
Stres Grubu Ovaryum Kesitleri



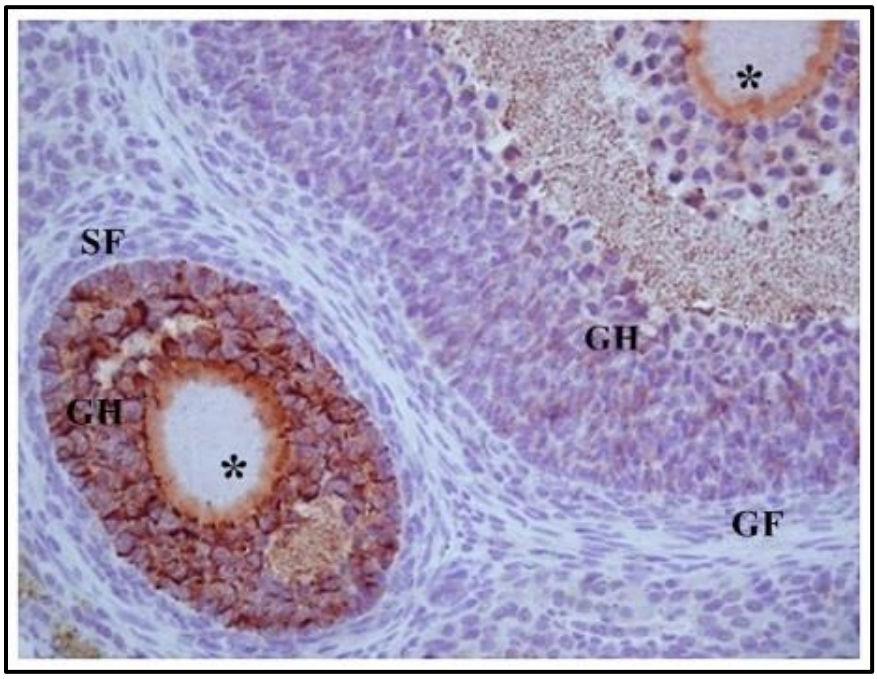
Şekil 57. Stres grubu ovaryum kesitinde, primordiyal foliküllerin (ok başı) çoğunda AMH ile zayıf immün boyanma gözlenirken, küçük ve orta çaplı primer foliküller (PF) ile sekonder foliküllerde (SF) granüloza hücre sitoplazmalarında zayıf/orta AMH immünoreaktivitesi izlenmektedir. AF: atretik folikül. GF: graaf folikülü. Hematoksilen zıt boyaması, X100.



Şekil 58. Stres grubu ovaryum kesitinde, kontrol grubuyla benzer şekilde, germinal epitelde (GE) ve interstisyel alanda AMH boyanması görülmemektedir. Primer foliküller (PF) ve multilaminar primer foliküllerde (MPF) ise zayıf şiddette AMH immünoreaktivitesi gösterilmiştir. SF: sekonder folikül. Hematoksilen zıt boyaması, X200.



Şekil 59. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, primer foliküllerde (PF), AMH için çoğunlukla negatife yakın bir immünoreaktivite gözlenirken, sekonder foliküllerin (SF) granüloza hücre (GH) sitoplazmalarında, kontrol grubuna kıyasla zayıf bir boyanma şiddeti olduğu izlenmektedir. Ayrıca oosit (*), teka tabakası (T) ve interstisyel bezlerde (İB) AMH immünoreaktivitesinin negatif olduğu görülmüştür. Hematoksilen zıt boyaması, X400.



Şekil 60. Stres grubu ovaryum kesitinde, graaf folikülü (GF) granüloza hücrelerinde (GH), sekonder foliküllere (SF) kıyasla oldukça zayıf bir AMH immünoreaktivitesi olduğu görülmektedir. *: oosit. Hematoksilen zıt boyaması, X400.

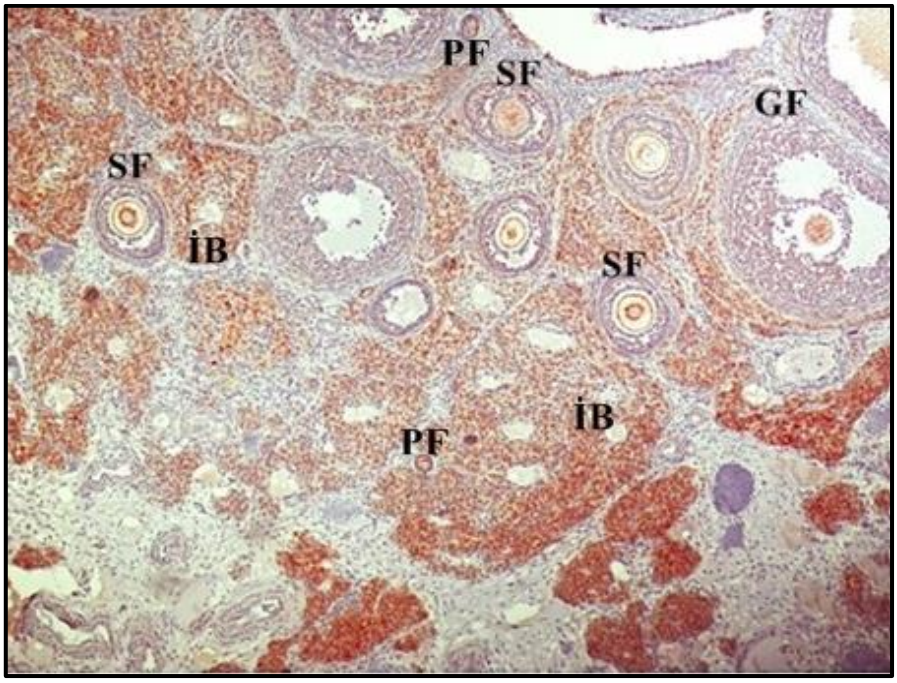
Bcl-2 İmmünorektivite Değerlendirmesi

Kontrol grubu ovaryum doku örneklerinde, başta foliküller olmak üzere germinal epitel, interstisyel bezler ve korpus luteumda da sitoplazmik Bcl-2 boyanmasının belirgin seviyede olduğu gözlenmiştir (Şekil 61). Primordiyal foliküllerin foliküler hücreleri ile oositlerinde orta şiddette boyanma gözlenirken (Şekil 62), başlıca multilaminar ve sekonder foliküllerin oositlerinde şiddetli, granüloza ve teka hücrelerinde ise orta şiddette Bcl-2 immünoreaktivitesinin olduğu tespit edilmiştir (Şekil 63). Atrezinin derecesine bağlı olarak, atretik foliküllerde zayıf/negatif boyanma saptanmıştır (Şekil 63). Ayrıca bu grupta, korpus luteumlarda orta, interstisyel bezlerde ise orta/şiddetli immün boyanma olduğu görülmüştür (Şekil 64).

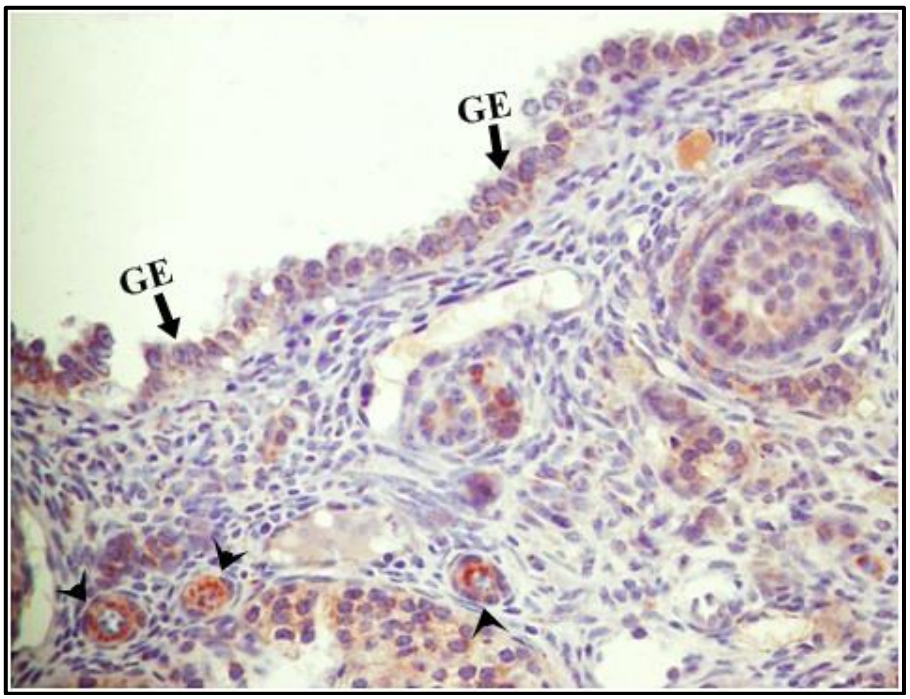
Stres grubundaki deneklerden alınan ovaryum kesitleri incelendiğinde, Bcl-2 immünoreaktivitesinin orta ve zayıf şiddette olduğu saptanmıştır (Şekil 65). Germinal epitel, interstisyel bezler ve korpus luteumlarda Bcl-2 immünoreaktivitesinin oldukça zayıf olduğu izlenmiştir. Ayrıca bu gruba ait ovaryum kesitlerinde, fazla sayıda gözlenen atretik foliküller, Bcl-2 için negatif boyanma sergilemektedir (Şekil 65,66). Primordiyal ve primer foliküllerin foliküler hücreleri zayıf şiddette boyanırken, oositlerde Bcl-2 boyanması orta şiddette gözlemlenmiştir (Şekil 67). Sekonder ve graaf foliküllerinde de hem oosit hem de granüloza hücrelerinde, Bcl-2 ifadesi zayıf şiddette tespit edilmiştir (Şekil 68).

Her deneğe ait Bcl-2 immün boyanması yapılmış ovaryum kesitleri incelendiğinde, stres grubunda boyanma şiddetinin kontrole kıyasla daha zayıf olduğu görülmüştür. Kontrol grubu HSCORE değeri (142,5) ile stres grubu HSCORE değeri (106,2) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$; Tablo 4).

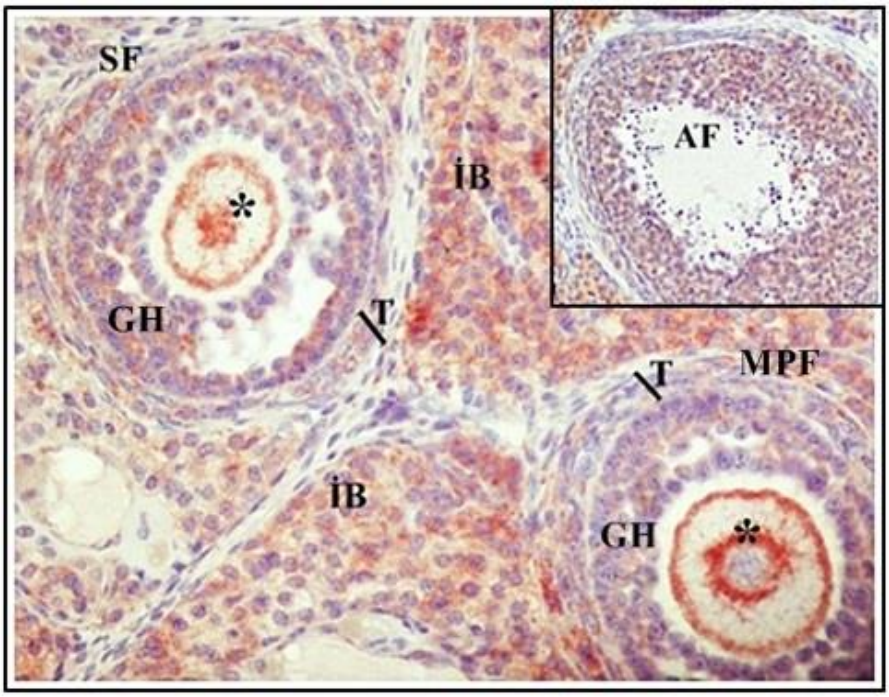
Kontrol Grubu Ovaryum Kesitleri



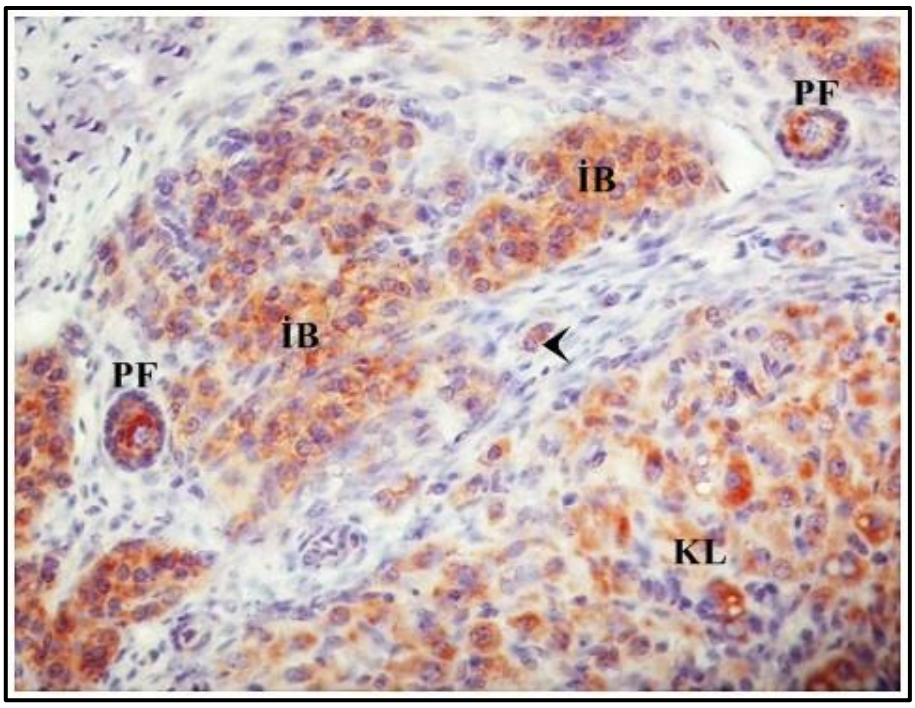
Şekil 61. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, sağlıklı primer foliküller (PF), sekonder foliküller (SF) ve graaf folikülünde (GF) ayrıca, interstisyel bezlerde (İB) pozitif Bcl-2 immünoreaktivitesi izlenmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X100.



Şekil 62. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitinde, ovaryumu saran germinal epitel (GE) ve ovariyan kortekste bulunan sağlıklı primordiyal foliküllerde (ok başı) orta şiddetli Bcl-2 immünoreaktivitesi gösterilmiştir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.

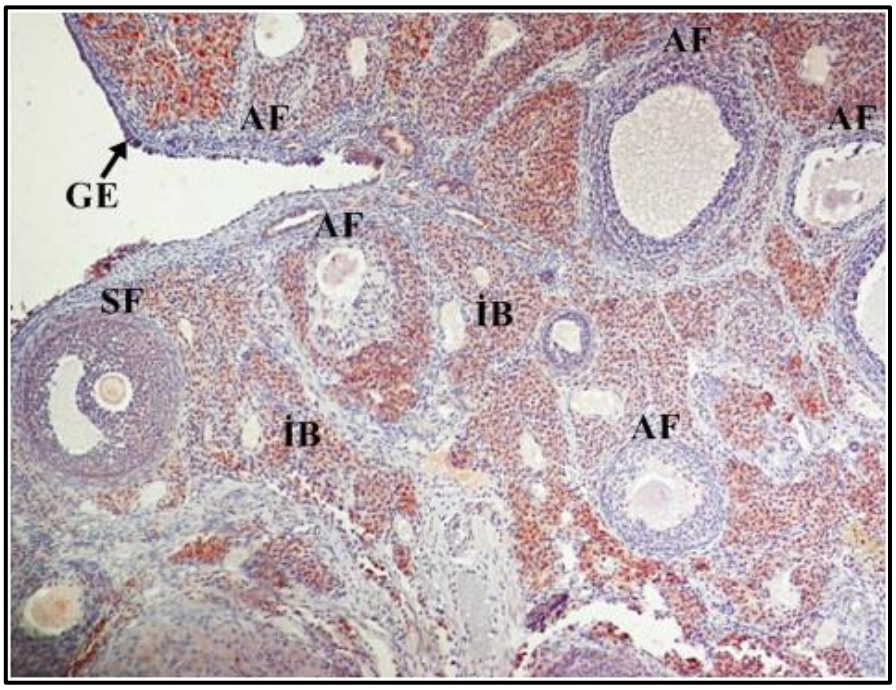


Sekil 63. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde, multilaminar primer folikül (MPF) ve sekonder foliküllerin (SF), granüloza hücrelerinde (GH) orta, oositlerinde (*) ise şiddetli Bcl-2 immünoreaktivitesi görülmektedir. T: teka tabakası, İB: interstisyel bezler, İçsel şekil: Atretik foliküllerde (AF) sağlıklı foliküllere göre Bcl-2 boyanma şiddeti oldukça zayıftır. Hematoksilen zıt boyaması, X200.

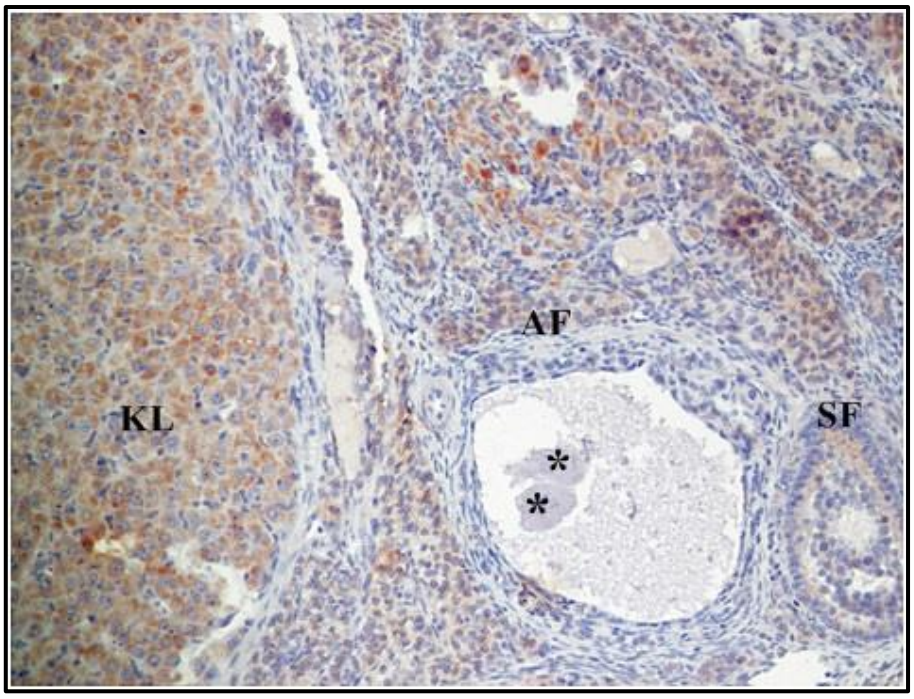


Şekil 64. Kontrol grubuna ait ovaryum kesitlerinde, primordiyal foliküllerde (ok başı), primer foliküllerde (PF) ve korpus luteumlarda (KL) orta şiddetli, interstisyel bezlerde (İB) ise şiddetli Bcl-2 immünoreaktivitesi görülmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.

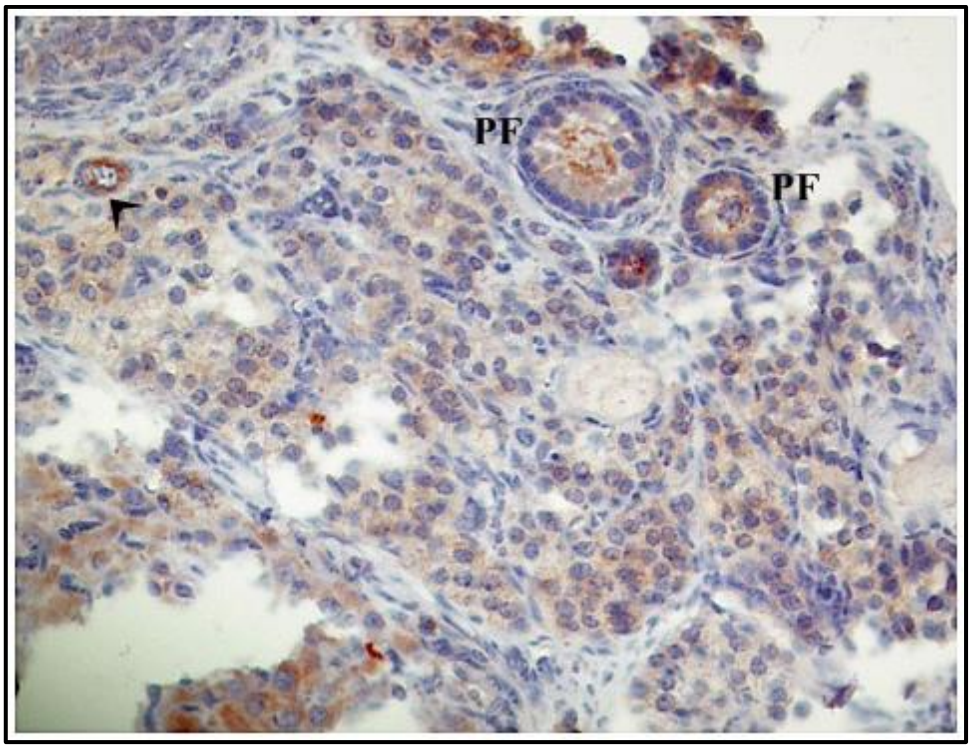
Stres Grubu Ovaryum Kesitleri



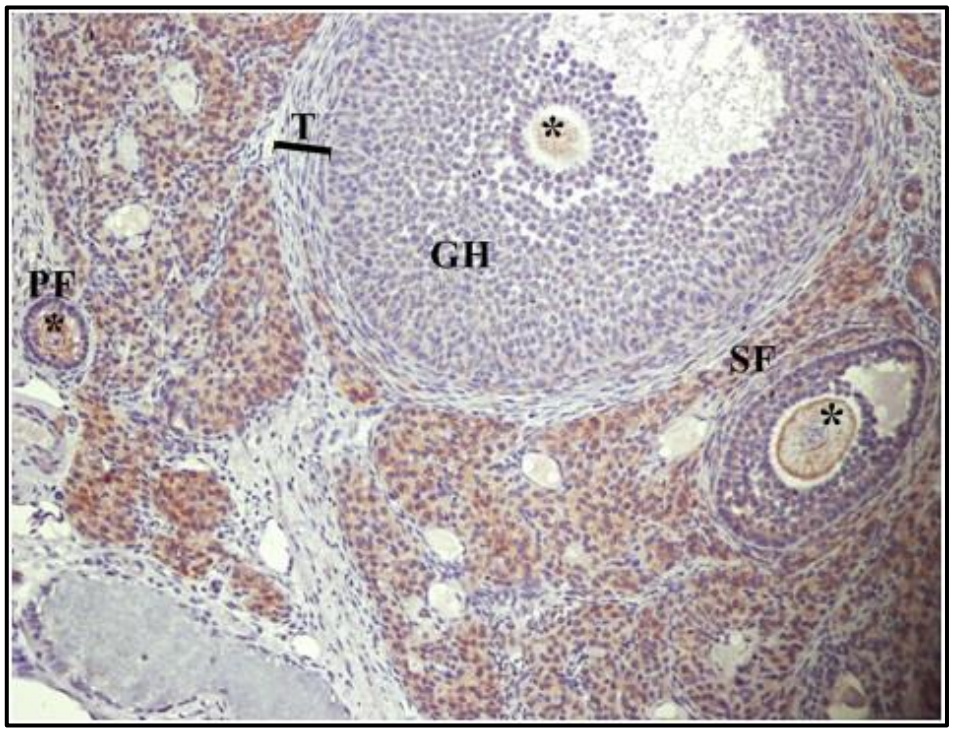
Şekil 65. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde gözlenen az sayıda sağlıklı foliküllerde, Bcl-2 immünoreaktivitesi zayıf şiddette iken, atretik foliküller (AF) negatif boyanmıştır. Germinal epitel (GE) ve interstisyel bezlerde (İB) Bcl-2 zayıf şiddette izlenmektedir. SF: sekonder folikül. Hematoksilen zıt boyaması, X100.



Şekil 66. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, korpus luteumda (KL) zayıf şiddette Bcl-2 immünoreaktivitesi var iken, atretik folikülde (AF) Bcl-2 immün boyanması gözlenmemektedir. SF: sekonder folikül. *: fragmente oosit. Hematoksilen zıt boyaması, X200.



Şekil 67. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, primordiyal foliküllerde (ok başı) ve primer foliküllerde (PF) zayıf şiddette Bcl-2 immünoreaktivitesi görülmektedir. Hematoksilen zıt boyaması, X400.



Şekil 68. Stres grubuna ait ovaryum kesitinde, büyük çaplı foliküllerin granüloza hücrelerinde (GH) negatife yakın, oositlerinde (*) ise orta şiddette Bcl-2 immünoreaktivitesi gözlenmiştir. PF: primer folikül, SF: sekonder folikül, T:teka tabakası. Hematoksilen zıt boyaması, X200.

TARTIŞMA

Günümüzde toplum yapısı, kültürü, ekonomisi ve yaşam alanlarının farklılaşması, hatta çalışma ritminin değişmesi gibi nedenlerle kadınlar üzerindeki baskı giderek artmaktadır. Bu baskı sonucu oluşan stres maruziyetinin olumsuz etkilerinden biri de üremeyle ilgili sorunlardır. Çalışmalarda gebelik oluşma süresinin uzaması ve infertilite riskinin artması, gebelik öncesi yaşanan stres ile ilişkilendirilmiştir. Kadınlarda, özellikle infertiliteye bağlı olarak yaşanan stres, üreme tedavisinin sonucuna doğrudan ya da dolaylı olarak olumsuz yönde etki edebilmektedir. Üremenin olumsuz yönde etkilenmesi, stres yaratan olaylar tarafından tetiklenebilir ve bu durum yüksek fizyolojik stres yanıtı oluşturmaya duyarlı kadınlarda daha sık gözlenebilir. Dişilerde üreme potansiyeli, ovariyan rezervin kapasitesi ile bağlantılıdır. Ovaryumda çok sayıda folikül ve sağlıklı oositlerin bulunması ise iyi bir ovariyan rezervin belirteçleri arasında düşünülmektedir. Bugüne kadar dişilerde stres bulguları üzerine çok sayıda çalışma olmakla birlikte, ovaryum dinamiğindeki değişimleri ortaya koymak için, foliküler farklılaşma ve oosit büyümesinde rol alan IGF-1, AMH ve Bcl-2 seviyeleri üzerine sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda, kronik fizyolojik stres uygulamasının dişi erişkin ratlarda davranışsal, fizyolojik/endokrin ve ovaryum histolojisi üzerine etkilerinin ortaya konmuştur.

Kronik stresin fizyolojik etkileri arasında, ilk gözlenen değişimlerden biri ağırlık bulgularıdır. Yapılan çalışmalarda, immobilizasyon stresine maruz kalan erkek sıçanlarda, vücut ve testis ağırlığında azalma olduğu saptanmıştır (6,96). Wang ve ark. (97) üç haftalık kısıtlama stresine maruz bıraktıkları sıçanların, vücut ağırlıklarında düşüş olduğunu ileri sürmüştür. Bir diğer çalışmada, 21 gün, günde 6 saat kısıtlama stresi uygulanmış dişi sıçanlarda, stresin etkisi ve uzunluğuna bağlı olarak vücut ağırlıklarının kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı rapor

edilmiştir (71). Mairesse ve ark. (98) kronik stres uygulamasının ardından gözlenen ağırlık azalmasını, besin alımındaki azalma ile ilişkilendirmişlerdir. Dişi sıçanlar kullandığımız bu çalışmada, 8 haftalık deney prosedürü sonunda, önceki çalışmalara paralel olarak deneklerin kilo alma oranlarında ve ovaryum ağırlıklarında, kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir azalma tespit edilmiştir.

Organizmalar, çevreleri ile denge kurarak ayakta kalmaktadır. Stresin kontrol altına alınması ve adaptasyon, bu denge için önemlidir. Stres uyaranları bireylerde, fizyolojik ve psikolojik özellikleri değiştirebilmektedir. Kısıtlama stresi (immobilizasyon stres) de fizyolojik ve psikolojik streslerin bir kombinasyonu olarak görülmektedir. Bununla birlikte, kısıtlama stresinin duygusal davranış üzerine etkileri değişkenlik göstermektedir. Araştırmacılar kısıtlama stresi sonucu, deneklerde gözlenen farklı davranışsal sonuçların, deneklerin var olan duruma adaptasyon yeteneklerinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Bu adaptasyon ise deney modelinin uygulanma şekli ya da maruziyet süresiyle ilişkili olabilir (99).

Çalışmamızda, 8 hafta süreyle, immobilizan kısıtlama stresine maruz bırakılan dişi erişkin deneklerde, uygulanan stresin lokomotor aktiviteler üzerine etkileri rota rod testi ile değerlendirilirken, stres kaynaklı anksiyete için, altın standart kabul edilen, açık alan ve yükseltilmiş artı labirent testleri kullanılmıştır. Ramos-Ortolaza ve ark. (100), izolasyon stresi uyguladıkları dişilerde, lokomotor aktivitenin diöstrus fazında diğer fazlardan daha yüksek olduğunu bildirseler de çalışmamızda metöstrus fazındaki deneklere uygulanan rota rod testi sonucunda, kontrol ve stres grupları arasında, lokomotor aktivite açısından herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

Uzun süreli strese maruz kalınması canlıda kaygı, depresyon ve anksiyete gibi duygu durum bozukluklarına karşı hassasiyetin artmasına katkı sağlamaktadır (101). Çalışmamızda anksiyeteyi değerlendiren bir ölçüt olarak açık alan testinde, stres grubu deneklerin periferde ve hareketsiz kalması, artı labirent testinde ise kapalı kola girme sıklığının kontrol grubundan fazla olması, deneklerde anksiyete varlığı olarak değerlendirilmiştir. Son zamanlarda strese karşı davranışsal ve fizyolojik değişiklikler değerlendirilirken, cinsiyet farklılığını göz önünde tutan çalışmalar ağırlık kazanmaktadır. Luine ve ark. (102), kısıtlama stresi sonrasında bu iki test için, erkek sıçanlarda anksiyete artışı, dişi sıçanlarda ise durum değişikliğinin olmadığını bildirmişlerdir. Pek çok çalışma, dolaşımdaki yüksek östradiol seviyesinin dişilerde, kronik strese karşı bireysel dayanıklılık sağladığını göstermekle birlikte, hormonal seviye değişikliklerinin dişileri anksiyete bozukluklarına karşı daha hassas hale getirdiğine dair çalışmalar da bulunmaktadır (103). Bazı çalışmalar, yüksek seviyede östrojene sahip olmamaları

nedeniyle, erkeklerin depresyona daha yatkın olduklarını bildirirken, hormonal değişikliklere maruz kalmadıkları için, erkeklerin strese karşı dişilerden daha dirençli olduğunu öne süren çalışmalar da bulunmaktadır (104). Gerçekten de dişilerde puberte, gebelik ve perimenopozal dönem, belirgin hormonal durum değişikliklerinin yaşandığı evrelerdir ve depresyon-anksiyete oluşma riskinde artış ile yakından ilişkilidir (103). Erkek ve dişiler arasında, yukarıda bahsedilen farklılıklara cevap arayan çalışmalar, stres sırasında östrojenin rolü üzerine odaklanmaktadır.

Çalışmamızda östrus siklusu takibi ile immobilizan stres süresince olası hormonal değişikliklerin tespit edilmesi amaçlanmıştır. Östrus döngüleri, ovaryumda, uterus ve vajinada morfolojik değişiklikler ile karakterizedir (105). Östrus siklusu boyunca salınan gonadal steroidler, dişide strese karşı immun-inflamatuar yanıtları düzenleyen mediyatörler olarak düşünülmektedir (106). Stres kaynaklı menstrual siklus düzensizliğinde, merkezi ve periferal yolaklar aktive edilir. Bu aktivasyon sonucunda HPG ekseninin inhibisyonu gerçekleşmektedir (107,108). Bununla birlikte literatürde, stresin doğrudan menstrual siklus düzensizliği üzerine etkilerini ortaya koyan sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda, stresin genital kanal üzerine etkilerini gözlemlemek için, kontrol ve stres grubu deneklerden deney süresince, günde 1 kez vajinal smear örneği alınmıştır. Vajinal smear yöntemi, kolay uygulanabilen ve hızlı veri sağlayan bir teknik olarak kabul edilir (109). Dorfman ve ark. (110) sıçanlar üzerinde yaptıkları kronik soğuk stresi sonucunda, 3 ve 4 hafta süreli stres gruplarının östrus sikluslarında değişiklik gözlenmediğini vurgulamışlardır. İnsan olmayan primatlarla yapılan bir çalışmada ise menstrual döngünün foliküler fazı boyunca, 5 gün süreyle inflamatuvar benzeri bir stres atağı uygulanmış ve tüm maymunlarda foliküler fazın önemli ölçüde uzadığı tespit edilmiştir (111).

Çalışmamızda düzenli olarak incelenen smearler sonucunda elde ettiğimiz bulgular, kronik fizyolojik stresin dişi genital kanal üzerine etkilerini ortaya koymaya desteklik sağlamış ve ayrıca çalışmamızın özgün değer taşımasına katkıda bulunmuştur. Detaylı bir şekilde incelenen smearler sonucunda, stres grubu deneklerinin her fazına ait örneklerde, normal hücre populasyonunun yanı sıra nötrofillerin varlığı saptanmıştır. Bu durum, strese yanıt olarak MSS'nin stres yanıtını düzenlemek ve homeostazisi korumak için inflamasyon başlattığı ve devam ettirdiğine dair çok sayıda bulgu ile açıklanabilir (112). Bununla birlikte, stres grubu deneklerimizde, deney süresince tekrarlanan siklus sayısındaki azalma, metöstrus ve diöstrus fazlarının süresindeki artış nedeniyle ortaya çıkmıştır. Ayrıca stres grubunda, bir siklusun süresinde ve diöstrus indeksinde artış gözlenmiştir. Bununla ilişkili olarak, Xiao ve ark. (107) inflamatuar/immün-stres uyguladıkları çalışmalarında, östradiol seviyesinin baskılandığını bildirmişlerdir. Diğer yandan, Ramos-Ortolaza ve ark. (100) ise izolasyon stresi uyguladıkları

dişilerde, östrus fazı süresinde artışın yanı sıra, proöstrus gözlenmeyen siklusların oluştuğunu rapor etmiştir. Stres ile aktive edilen sistemlerin hipotalamusta, hipofiz bezinde ya da üreme organlarında etki göstererek çoğalmayı olumsuz yönde etkilediği bilinmektedir (113).

Çalışmamızda değerlendirilen diğer bir fizyolojik parametre de serum kortizol seviyesidir. Yaptığımız literatür taraması sonucunda, maruz kalınan stres etkeninin tipi, süresi ve cinsiyete bağlı olarak, ölçülen serum kortizol seviyesinin değişkenlik gösterdiği tespit edilmiştir. HPA ekseni, stres reaksiyonlarını indükleyebilecek ekzojen ve endojen faktörler tarafından uyarılır, böylece fizyolojik tepkiler tetiklenmiş olur. HPA ekseni, uyarıcı sinyalleri aldığında, glukokortikoidlerin salgılanması artmaktadır (114). Kortizol, en önemli stres belirteci olan glukokortikoid türüdür. Normal bir ovaryumda, folikül gelişimi ve yüksek kalitede oositlerin üretimi, endokrin sistemin düzgün çalışmasına bağlıdır. HPA ekseni stres ile uyarıldığında, dişi üreme sistemi üzerinde engelleyici etkilere yol açmaktadır (115).

Dişi sıçanların kullanıldığı bir çalışmada, 3 ve 4 hafta boyunca kronik soğuk stres ugulaması sonucunda, her iki stres grubunun serum kortizol seviyelerinde, kontrol grubuna göre bir değişiklik olmadığı saptanmıştır (110). Aynı stres faktörüne maruz kalan farklı hayvanlar farklı kortikosteron düzeylerine sahip olabilir; bu da deneysel değişkenliğin artmasına neden olmaktadır (99). Galea ve ark. (116) erkek sıçanlarda, kısıtlama stresinin 14. gününde kortikosteron seviyelerinin, 1. ve 7. günlere kıyasla daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir. Benzer şekilde Cengiz (117) stres ile indüklenen kortizol seviyesi artışının, akut cevap olarak ortaya çıktığını bildirmiştir. Yirmi bir gün, günde üç saat kronik kısıtlama stresine maruz bırakılan erkek sıçanlarda serum kortikosteron miktarının kontrole göre anlamlı olarak arttığı belirtilmiştir (118). Erkek ve hamile dişi sıçanların kullanıldığı başka bir çalışmada ise, 15 gün, günde üç defa 30 dakika uygulanan kısıtlama stresinin dişilerde kortikosteron seviyesini arttırırken, erkek sıçanlarda bir değişiklik yapmadığı gösterilmiştir (12). Bu bulgulara benzer şekilde, kronik stres uygulanan çalışmamızda, stres grubu serum kortizol seviyeleri ile kontrol grubu arasında farklılık gözlenmemiştir. Bu durum, deney başlangıcından sonuna kadar izlenen davranış değişlikleri ile birlikte değerlendirildiğinde, deneklerin var olan stres koşullarına alışıp, homeostazisi sağladığını düşündürmektedir.

Bununla birlikte, önceki çalışmalarda dişi genital kanalda tanımlanmış olan CRH ve reseptörlerinin, ovaryumda apoptozu indüklediği (119), yüksek strese maruz kalan kadınlarda POY ile ilişkili olduğu ve ovaryum içi parakrin faktörlerin değişimine neden olarak infertiliteyle ilişkili olabileceği (115) öne sürülmektedir. Bu bulgular, stresin dişi üreme sistemi üzerine

etkileri araştırılırken serum kortizol seviyesinin yanı sıra, ovaryum CRH seviyesinin de göz önünde tutulması gerektiğini düşündürmektedir.

Strese maruziyetinde ovaryum fonksiyonlarını test etmeye yönelik çok sayıda çalışma olmakla birlikte, kronik stres uygulaması sonrasında, ovaryum dokusunda histolojik değişiklikleri değerlendiren sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmamızda stres grubu diöstrus fazındaki ovaryumlarda, sağlıklı folikül sayısında belirgin azalma ile birlikte atretik folikül ve interstisyel bez oluşumunda artış gözlemlenmiştir. İmmobilizasyon stresi farelerde primer, sekonder ve tersiyer folikül sayılarının azalmasına neden olmuştur (59). Isı stresi sonucunda dişi sıçan ovaryumlarında dominant folikül çapında küçülme, atretik folikül oluşumunda artış ve ovulasyonda azalma gözlenmiştir (120). Dişi fareler ile yapılan kısıtlama stresi sonucunda ovulasyonda ve oosit gelişiminde işlevsel bozulmalar olduğu tespit edilmiştir (65). Dişi farelerin kullanıldığı başka bir çalışmada, eCG enjeksiyonundan bir gün sonra 24 saatlik kısıtlama stresi uygulanmış ve stres grubunda metafaz 2 aşamasındaki oosit yüzdesinde kontrole kıyasla bir değişiklik olmaz iken, oosit kültüründe blastosist yüzdesi anlamlı derecede azalmıştır (119).

Kemirgenler ve bazı memelilerin ovaryum stromalarında, foliküllerin yanı sıra interstisyel bezler de bulunmaktadır. İnterstisyel bez hücreleri, atretik foliküllerin teka hücrelerinden köken alırlar. Geniş polihedral şekilli hücreler, lipid depolarlar. LH reseptörüne sahiptirler ve steroidojenik enzimlere de sahip olmaları sonucu androjen üretirler (121,122). Ovaryumda, prematüre ovarian yaşlanma sonucunda, rezidüel ovaryum dokusunun interstisyel bezlere dönüştüğü, progesteron ve androstenedion üretme yeteneğinde olduğu ortaya konmuştur (123). İnterstisyel bez artışı, granüloza hücrelerinin apoptozisi ve foliküllerin atrezisi ile yakından ilişkilidir (124). Çalışmamızda, stres uygulamasının ardından, östrus siklusundaki düzensizlik ve progestif fazlarda gözlenen süre uzamasının, ovaryumda interstisyel bez artışıyla ve dolayısıyla değişen androjenik hormonal ortam nedeniyle gerçekleşmiş olabileceğini düşünmekteyiz. Bu çalışmada ayrıca ilk kez, kronik stres maruziyeti sonrasında interstisyel bezler de değerlendirilmiş, stres grubunda interstisyel bezleri oluşturan hücrelerde hipertrofi ve bez sayısında artışın olduğu tespit edilmiştir. Buna ek olarak, interstisyel alandaki artışın, toplam kesit alanına oranının istatistiksel anlamlılık taşıdığı gözlenmiştir.

Foliküler atrezi sırasında, ovariyan hücre ölümlerine neden olan apoptozis, hem insan hem de diğer memeli türlerinde, ovaryumun homeostazisi için önemlidir. Foliküllerin granüloza hücrelerinde gerçekleşen apoptozisi, birçok faktör kontrol etmektedir. Foliküller IGF-1 proteinini üretir ve bu da folikül gelişiminde oldukça önemlidir (23). IGF-1'den yoksun olan farelerin, ovulasyon yapamadığı, ovaryum dokularının mevcut ağırlığının ve serum östradiol

seviyesinin düştüğü gözlenmiştir (125). Konu ile ilgili az sayıda çalışma olmakla birlikte, kümülüs hücreleri tarafından çevrelenmiş olan oositlere IGF-I uygulaması, metefaz 2 aşamasına ulaşabilen oosit sayısını artırırken, çıplak (kümülüssüz) oositlerde böyle bir etkinin gerçekleşmediği bildirilmiştir. Böylece kümülüs hücrelerinde IGF-I reseptörlerinin bulunduğu sonucu elde edilmiştir (126). Dişi fareler kullanılarak gerçekleştirilen kısıtlama stresi çalışmasında, stres grubunda kontrole kıyasla, serum ve ovaryumdaki IGF-1 seviyesinde azalma gözlenmiştir. Bu durum artan CRH'ın IGF-1 proteininin salınmasını baskılamasıyla açıklanmıştır (119). Erkek sıçanlarda, suya daldırma ve kısıtlama stresinin uygulandığı bir çalışmada, gastrik mukoza dokusunda IGF-1 ekspresyonun arttığı ve IGF-1 in gastrik mukozanın hücre apoptozunu düzenlediği belirtilmiştir. Aynı çalışmada, IGF-1 proteinin sperm ve leydig hücre sitoplazmalarında lokalize olduğu bildirilirken, ekspresyonun stres grubunda kontrole kıyasla arttığı ileri sürülmüştür (114). Buna karşın çalışmamızda kısıtlama stres grubunda, ovaryumdaki IGF-1'in ifadesinin azaldığı immünohistokimyasal yöntem ile tespit edilmiştir. IGF-1, atretik folliküllerde negatif boyanırken, farklı aşamalardaki sağlıklı foliküllerde, yoğun şekilde gözlenmiştir. IGF-1, granüloza ve oosit hücre sitoplazmalarında kuvvetli bir şekilde immünoreaksiyon göstermiştir.

Kadınların üretkenliği, ovaryum rezervine bağlıdır. Günümüzde stres maruziyetinin, üreme yetmezliği ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. Bununla birlikte ovaryum rezervinin güvenilir klinik belirleyicisi AMH'dır. AMH, folikül rezervini koruyan kritik öneme sahip bir ovaryum belirtecidir. Gelişmiş in vivo ve in vitro çalışmalarla, AMH' nin primordiyal foliküllerin primer foliküle geçişini baskıladığını göstermektedir. Buna ek olarak infertil kadınlarda AMH seviyesi ve stres arasında ilişki olduğu belirtilmiştir (127). Çin'de 23-45 yaşlarında 576 infertil kadının (üreme konusunda teknolojik destek alan, daha önce hormonal ilaç almamış, mental veya hormonal hastalığı olmayan, ovaryum veya uterus amelyatı geçirmemiş) kullanıldığı çalışmada, ovaryum rezervinin göstergesi olan AMH konsantrasyonu incelenmiştir. Özellikle 35 beş yaşın üstündeki bayanlarda AMH konsantrasyonu anlamlı derecede düşük bulunmuştur (127). Biz de yaptığımız çalışma ile kronik fizyolojik stresin, foliküllerde AMH ekspresyonunu düşürdüğünü gösterdik. Bu sonuçlar, meydana gelen AMH ekspresyon düşmesine bağlı olarak primordiyal folikül kaybının yaşanabileceğini ayrıca infertiliteye etki edebileceğini düşündürmektedir (128).

B hücre lenfoma-2, mitokondriyi yeniden şekillendirerek, mitokondriyal dış membran permeabilizasyonunu başlatır ve pro-apoptotik proteinlerin mitokondrilerden salınmasını sağlar. Böylece apoptoz sürecinde hayati bir rol oynar (129). Yapılan çalışmalar kısıtlama stresi sonucunda, Bcl-2'nin mRNA ifadesinde düşüş olduğunu göstermektedir (97). Başka bir

çalışmada kronik stres uygulanan dişi farelerde ovaryum dokusunda Bcl-2 seviyesi, kontrol grubuna göre stres grubunda azalmıştır. Bu çalışma ile paralel olarak, stres grubu deneklerimizin ovaryum dokusunda, Bcl-2 ifadesinin aynı şekilde kontrol grubuna göre azaldığını immünohistokimyasal yöntem ile ortaya koyduk. Stres grubu ovaryum kesitlerinde Bcl-2 ifadesindeki azalmanın, atretik folikül sayısındaki artışın nedeni olabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, kronik stresin dişi ratlarda vücut ağırlığında ve ovaryum ağırlığında azalmaya neden olduğunu, östrus siklusu düzensizliği oluşturduğunu, ovaryumda ise IGF-1, AMH ve Bcl-2 ifadelerinde azalmaya neden olarak folikül gelişimini aksattığını göstermektedir. Stresin göstergesi olan serum kortizol seviyesinde, kontrol ve stres grupları arasında fark gözlenmese de mevcut literatür bilgileri, ovaryum dokusunda tespit ettiğimiz değişikliklerin, ovaryum içi CRH seviyesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

SONUÇLAR

Çalışmamızda, erişkin dişi ratlarda kronik immobilizan stres maruziyetinin, östrus siklusu, ovaryum histolojisi ve foliküler gelişimde rol alan IGF-1, AMH ve Bcl-2 immünoreaktiviteleri üzerine etkileri araştırılmıştır. Elde ettiğimiz bulgular ışığında sonuçlarımız;

1. İmmobilizan stres maruziyeti sonucunda deneklerde, son ağırlık–ilk ağırlık farkı kontrol grubuna kıyasla, belirgin olarak azaldı ($p<0,0001$). Ovaryum ağırlıkları, stres grubunda anlamlı olarak azalma gösterdi ($p=0,013$), bununla birlikte kontrol grubuyla kıyaslandığında, ovaryum ağırlığı/vücut ağırlığı oranında anlamlı fark gözlenmedi ($p=0,065$).
2. Açık alan testinde, deneklerin hem merkezde bulunma süresi hem de toplam gezdikleri mesafe, stres grubunda (sırasıyla;11,40sn, 1487,12cm) kontrol grubuna kıyasla (sırasıyla;67,259sn, 1627,29cm) azalma eğilimi gözterdi. Yükseltilmiş artı labirent testinde ise kapalı kola girme sıklığında, stres grubu deneklerinde (7,4) kontrol grubuna göre artış (5,5) gözlendi. Davranış testleri sonuçlarında istatistiksel anlamlılık elde edilemese de, bulgular deneklerde anksiyete varlığını düşündürmektedir.
3. Vajinal smear örneklerinde, stres grubunda kontrol grubundan farklı olarak, proöstrus ve östrus fazlarında nötrofil varlığı izlendi. Ayrıca kontrol grubu ile kıyaslandığında, stres grubu deneklerde, toplam siklus sayısı/toplam gün oranında anlamlı bir azalma ($p<0,0001$), bir siklusa ait faz sayısında, bir siklusun uzunluğunda ($p<0,001$) ve diöstrus indeksinde ($p=0,011$) ise anlamlı artış olduğu tespit edildi.
4. Deneklerin serum kortizol seviyeleri ölçüldü ve gruplar arasında istatistiksel fark olmadığı saptandı ($p=0,384$).

5. Ovaryum histolojik kesitleri incelendiğinde stres grubu deneklerinde, başta sekonder folikül olmak üzere folikül sayısında azalma, folikül atrezisinde ise artış gözlendi. İnterstisyel bez sayısının strese bağlı olarak artmasından dolayı, interstisyel alan/toplam kesit alanı oranında anlamlı bir artış olduğu saptandı ($p<0,001$).
6. IGF-1 immünoreaktivitesi ovaryum foliküllerinin granüloza hücreleri ve oosit sitoplazmalarında belirlendi. AMH immünoreaktivitesi, sadece granüloza hücre sitoplazmalarında tespit edildi. Bcl-2 immünoreaktivitesi ise granüloza hücre sitoplazmaları, oositler, büyük foliküllerin teka tabakaları, korpus luteumlar, interstisyel bezler ve germinal epitelde izlendi. IGF-1, AMH ve Bcl-2 boyanma yoğunluğu semikantitatif olarak değerlendirildiğinde (HSCORE), stres grubunda her üç proteinin immünohistokimyasal ifadelerinin kontrol grubuna göre, anlamlı derecede azaldığı tespit edildi ($p<0,0001$).

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, kronik stresin dişi ratlarda vücut ağırlığında ve ovaryum ağırlığında azalmaya neden olduğunu, östrus siklusu düzensizliği oluşturduğunu, ovaryumda ise IGF-1, AMH ve Bcl-2 ifadelerinde azalmaya neden olarak folikül gelişimini aksattığını göstermektedir. Stresin göstergesi olan serum kortizol seviyesinde, kontrol ve stres grupları arasında fark gözlenmese de mevcut literatür bilgileri, ovaryum dokusunda tespit ettiğimiz değişikliklerin, ovaryum içi CRH seviyesi ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

ÖZET

Stres, günümüz modern toplumlarını fizyolojik ve psikolojik olarak etkileyen en önemli dış faktör haline gelmiştir. Bu çalışmadaki amacımız, kronik fizyolojik stresin dişi ratlarda davranış parametreleri, östrus siklusu ve ovaryumlarda foliküler gelişim ile ilişkili IGF-1, AMH ve Bcl-2 proteinlerinin ifadeleri üzerine etkilerini ortaya koymaktır.

Yirmi dört adet *Sprague dawley* türü dişi sıçan kullanılarak; 1. grup: kontrol grubu (n=12) ve 2. grup: stres grubu (n=12), (immobilizan kısıtlama stresi, 5 gün/hafta, 1 saat/gün, 8 hafta) olmak üzere iki grup oluşturulmuştur. Her iki gruptan da sekiz hafta boyunca vajinal smear örnekleri alınmıştır. Deney sonunda tüm denekler, metöstrus fazında davranış testlerine tabi tutulup, diöstrus fazında sakrifiye edilmişlerdir. Alınan ovaryum doku örnekleri tartılıp işlemlendirildikten sonra histolojik (H+E, Masson Trikrom) ve immünohistokimyasal (IGF-1, AMH, Bcl-2) olarak incelenmiştir.

Gruplar arası son ağırlık-ilk ağırlık farkları kıyaslandığında, stres grubunda anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır ($p<0,0001$). Ovaryum doku örneklerinin toplam ağırlıkları, kontrol grubuna kıyasla stres grubunda azalmıştır ($p=0,013$). Metöstrus fazında uygulanan davranış testleri sonucunda açık alan testinde, stres grubu deneklerin, düzeneğin merkezinde bulunma süreleri ve toplam gezdikleri mesafe azalmış iken, yükseltilmiş artı labirent testinde, bu grupta kapalı kola girme sıklığı kontrol grubuna göre artmıştır.

Düzenli olarak alınan vajinal smear örnekleri incelendiğinde, stres grubunda kontrol grubuyla kıyaslandığında, siklus sayılarının azalmasına bağlı olarak toplam siklus/toplam gün sayısındaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,0001$). Bununla birlikte, stres grubunda kontrol grubuna kıyasla, diöstrus indeksi anlamlı derecede yüksek tespit edilmiştir

(p=0,011). Serumlarda, deneklerin kortizol düzeyleri ölçülmüş ve gruplar arasında fark gözlenmemiştir (p=0,384).

Stres grubu ovaryum histolojisinde gözlenen değişiklikler, gelişmekte olan folikül sayısında azalma, atretik folikül sayısında ve interstisyel bezlerde artış şeklindedir. İmmünohistokimyasal değerlendirme sonucunda ise ovaryumda IGF-1, AMH ve Bcl-2 HSCORE değerlerinin stres grubunda anlamlı olarak azaldığı saptanmıştır (p<0,0001).

Sonuç olarak; kronik fizyolojik stresin, dişilerde hem ovaryum içi dinamiği hem de üreme siklusu üzerinde oluşturduğu değişiklikler gözönüne alındığında, dişi üreme fonksiyonlarını etkileyerek infertiliteye neden olabileceği kanısındayız.

Anahtar kelimeler: Kronik stres, Ovaryum, Apoptoz, IGF-1, AMH, Bcl-2

EFFECT OF CHRONIC PHYSIOLOGICAL STRESS ON THE FOLLICULAR DEVELOPMENT AND OOCYTE RESERVE IN FEMALE RAT OVARY: ROLE OF IGF-1, AMH AND BCL-2

SUMMARY

Stress has become the most important external factor that physiologically and psychologically affects today's modern societies. Our aim in this study is to demonstrate the effects of chronic physiological stress on the behavioral parameters, oestrous cycle and the expression of IGF-1, AMH and Bcl-2 proteins which are associated with follicular development in the ovaries of female rats.

Twenty-four Sprague-Dawley female rats were used and divided in the two groups: 1st group: control group (n = 12) and 2nd group: stress group (n = 12), (immobilization restriction stress, 5 days/week, 1 hour/day, 8 weeks). Vaginal smear samples were taken from both groups for eight weeks. At the end of the experiment, all animals were subjected to behavioral tests in the metrostus phase and were sacrificed in the diestrus phase. After weighing and processing, the ovarian tissues were examined by histologically (H+E, Masson's trichrome) and immunohistochemically (IGF-1, AMH, Bcl-2).

When compared to body weights differences were significantly decreased in the stress group when compared to control group ($p < 0,0001$). The total weight of the ovarian tissue samples was significantly reduced in the stress group ($p = 0,013$). The results of behavioral tests which were performed to the subjects in to the metrostus phase: In the open field test, staying in the center of the area and the distance of total trips decreased in the stres group when compared

the control group. In addition, in the stres group, the frequency of entring in to the closed arm elevated when compared the control group.

As a result of regular vaginal smear analyses, in the stres group, we determined the significant decrease in total cycle/total days, and an increase in the numbers of day for one cycle ($p < 0,001$). In the stress group, the diestrus index significantly increased when compared the control group ($p = 0,011$). Serum cortisol levels were also measured and no difference was detected between the groups ($p = 0,384$).

The histological alterations in the stress exposed ovaries: decreasing in the number of developing follicles and increasing in the atretic follicle and interstitial gland numbers. Immunohistochemical evaluation revealed that the IGF-1, AMH and Bcl-2 HSCORE values in the ovaries of stres group were significantly decreased when compared to the control group ($p < 0,0001$).

As a result; Considering chronic physiological stress effects on ovarian dynamics and reproductive cycle in female rats, we think that stress may cause infertility by affecting female reproductive functions.

Key words: Chronic stress, Ovary, Apoptosis, IGF-1, AMH, Bcl-2

KAYNAKLAR

1. Kudielka BM, Wüst S. Human models in acute and chronic stress: assessing determinants of individual hypothalamus-pituitary-adrenal axis activity and reactivity. Stress 2010;13(1):1-14.

2. Diane A, Victoriano M, Fromentin G, Tome D, Larue-Achagiotis C. Acute stress modifies food choice in Wistar male and female rats. Appetite 2008;50(2-3):397-407.

3. Balcıoğlu İ, Savrun M. Stres ve Hormonlar. T Klin Psik 2001;2:43-50.

4. Editorial: Focus on stress. Nat Neurosci 2015;18(10):1343.

5. Valenti O, Gill KM, Grace AA. Different stressors produce excitation or inhibition of mesolimbic dopamine neuron activity: response alteration by stress pre-exposure. Eur J Neurosci 2012;35(8):1312-21.

6. Arun S, Burawat J, Sukhorum W, Sampannang A, Maneenin C, Iamsaard S. Chronic restraint stress induces sperm acrosome reaction and changes in testicular tyrosine phosphorylated proteins in rats. Int J Reprod Biomed (Yazd) 2016;14(7):443-52.

7. Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. Trends Neurosci 1997;20(2):78-84.

8. Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. Eur J Neurosci 2001;14(7):1143-52.

9. Braastad OB. Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed mammals. App Anim Behav Sci 1998;61:159-180.

10. Wellman CL. Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. J Neurobiol 2001;49(3):245-53.

11. Damti OB, Sarid O, Sheiner E, Zilberstein T, Cwikel J. Stress and distress in infertility among women. Harefuah 2008;147(3):256-60.

12. Szuran TF, Pliska V, Pokorny J, Welzl H. Prenatal stress in rats: effects on plasma corticosterone, hippocampal glucocorticoid receptors, and maze performance. Physiol Behav 2000;71(3-4):353-62.

13. Chung KC, Peisen F, Kogler L, Radke S, Turetsky B, Freiherr J, Derntl B. The Influence of Menstrual Cycle and Androstadienone on Female Stress Reactions:An fMRI Study. Front Hum Neurosci 2016;(16)10:44.

14. Wu XF, Yuan HJ, Li H, Gong S, Lin J, Miao YL, Wang TY, Tan JH. Restraint stress on female mice diminishes the developmental potential of oocytes: roles of chromatin configuration and histone modification in germinal vesicle stage oocytes. Biol Reprod 2015;92(1):13,1-9.

15. Cruz G, Fernandois D, Paredes AH. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation. Reprod 2017;153(2):59-68.

16. Sirotkin AV. The Role and Application of Sirtuins and mTOR Signaling in the Control of Ovarian Functions. Cells 2016;5(4):1-8.

17. Wang XF, Zhang L, Wu QH, Min JX, Ma N, Luo LC. Biological mechanisms of premature ovarian failure caused by psychological stress based on support vector regression. Int J Clin Exp Med 2015;8(11):21393-9.

18. Hsueh AJ, Billig H, Tsafriri A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. Endocr Rev 1994;15(6):707-24.

19. Kaipia A, Hsueh AJ. Regulation of ovarian follicle atresia. Annu Rev Physiol 1997;59:349-63.

20. Flaws JA, Hirshfield AN, Hewitt JA, Babus JK, Furth PA. Effect of bcl-2 on the primordial follicle endowment in the mouse ovary. Biol Reprod 2001;64(4):1153-9.

21. Chun SY, Billig H, Tilly JL, Furuta I, Tsafriri A, Hsueh AJ. Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. Endocrinol 1994;135(5):1845-53.

22. Yıldırım K. Kedi Oositlerinin in Vitro Gelişimi Üzerine EGF ve IGF-I Büyüme Faktörlerinin Etkilerinin Araştırılması (tez). Ankara: Ankara Üniversitesi; 2010.

23. Shimizu T. Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows. J Reprod Dev 2016;62(4):323-9.

24. Mescher AL. Junqueira's Temel Histoloji Atlas Kitap (çeviri: S. Solakoğlu). Dişi Üreme Sistemi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri: 2015. s. 449-478.

25. McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. Endocr Rev 2000;21(2):200-14.

26. Banerjee S, Banerjee S, Saraswat G, Bandyopadhyay SA, Kabir SN. Female reproductive aging is master-planned at the level of ovary. PLoS One 2014;9(5):e96210.

27. Liu YX. Advanced studies on ovary physiology in China in the past 30 years. Sheng Li Xue Bao 2016;68(4):366-84.

28. Sanchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. Biochim Biophys Acta 2012;1822(12):1896-912.

29. Merchant-Larios H, Centeno B. Morphogenesis of the ovary from the sterile W/Wv mouse. Prog Clin Biol Res 1981;59B:383-92.

30. Ross MH, Pawlina W. Dişi üreme sistemi (çeviri: B. Baykal). Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. İstanbul: Palme Yayıncılık;2013. s. 830-895.

31. Skinner MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. Hum Reprod Update 2005;11(5):461-71.

32. Choi Y, Rajkovic A. Genetics of early mammalian folliculogenesis. Cell Mol Life Sci 2006;63(5):579-90.

33. Sadler TW. Gametogenez: Germ Hücrelerinin Erkek ve Dişi Gametlere Dönüşmesi.Langman's Medical Embriyoloji (çeviri: A. Can Başaklar). Ankara: Palme Yayıncılık;2011. s. 13-27.

34. Junqueira LC, Carneiro J. Dişi üreme sistemi (çeviri: Aytekin Y, Solakoğlu S.). Temel Histoloji Text and Atlas. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri;2009. s.435-42.

35. Chowdhury I, Thomas K, Thompson WE. Prohibitin (PHB) roles in granulosa cell physiology. Cell Tissue Res 2016;363(1):19-29.

36. Yding AC. Inhibin-B secretion and FSH isoform distribution may play an integral part of follicular selection in the natural menstrual cycle. Mol Hum Reprod. 2017;23(1):16-24.

37. Kierszenbaum AL. Folikül gelişimi ve menstrual döngü (çeviri: R. Demir). Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara: Palme Yayıncılık;2006. s. 565-75.

38. Peterson JS, Timmons AK, Mondragon AA, McCall K. The End of the Beginning: Cell Death in the Germline. Curr Top Dev Biol 2015;114:93-119.

39. Hutt KJ. The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. Reprod 2015;149(2):R81-9.

40. Lopez SG, Luderer U. Effects of cyclophosphamide and buthionine sulfoximine on ovarian glutathione and apoptosis. Free Radic Biol Med 2004;36(11):1366-77.

41. Hiremath MB, Kaliwal BB. Effect of endosulfan on ovarian compensatory hypertrophy in hemicastrated albino mice. Reprod Toxicol 2002;16(6):783-90.

42. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu Rev Genet 2009;43:67-93.

43. Zeuner A, Muller K, Reguszynski K, Jewgenow K. Apoptosis within bovine follicular cells and its effect on oocyte development during in vitro maturation. Theriogenol 2003;59(5-6):1421-33.

44. Koçyiğit A, Çevik M. Memeli Reprodüktif Dokuları, Gamet Hücreleri ve Embriyolarında Apoptozis. Erciyes Üniv Vet Fak Derg 2011;8(1):33-41.

45. Ozden-Akkaya O, Altunbas K, Yagci A. Effects of methoxychlor on IGF-I signaling pathway in rat ovary. Biotech Histochem 2017;92(3):230-42.

46. Visser JA, Themmen AP. Anti-Mullerian hormone and folliculogenesis. Mol Cell Endocrinol 2005;234(1-2):81-6.

47. Johnson AL, Bridgham JT. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. Reprod 2002;124(1):19-27.

48. Monget P, Fabre S, Mulsant P, Lecerf F, Elsen JM, Mazerbourg S, et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. Domest Anim Endocrinol 2002;23(1-2):139-54.

49. Gervasio CG, Bernuci MP, Silva-de-Sa MF, Rosa ESAC. The role of androgen hormones in early follicular development. ISRN Obstet Gynecol 2014;10:818010.

50. Akkaya ÖÖ. Metoxychlor'un Sıçan Ovaryumunda IGF-I Sinyal Yolağı Üzerine Etkisi (tez). Afyonkarahisar: Afyon Kocatepe Üniversitesi; 2014.

51. Peluso C, Fonseca FL, Rodart IF, Cavalcanti V, Gastaldo G, Christofolini DM, Barbosa CP, Bianco B. AMH: An ovarian reserve biomarker in assisted reproduction. Clin Chim Acta 2014;437:175-82.

52. Jamil Z, Fatima SS, Ahmed K, Malik R. Anti-Mullerian Hormone: Above and Beyond Conventional Ovarian Reserve Markers. Dis Markers 2016;2016:5246217.

53. Dewailly D, Andersen CY, Balen A, Broekmans F, Dilaver N, Fanchin R, et al. The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. Hum Reprod Update 2014;20(3):370-85.

54. Iliodromiti S, Nelson SM. Ovarian response biomarkers: physiology and performance. Curr Opin Obstet Gynecol 2015;27(3):182-6.

55. Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, et al. Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. Endocrinol 2006;147(7):3228-34.

56. R.Hussein M. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. Hum Reprod Update 2005; 11(2):162-77.

57. Ray A, Gulati K, Rai N. Stress, Anxiety, and immunomodulation: A Pharmacological analysis. Vitam Horm 2017;103:1-25.

58. McEwen BS. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. Physiol Rev 2007;87(3):873-904.

59. Yousaf M, Butt SA, Qamar K. Count variation of ovarian follicles after immobilization. Pak Armed Forces Med J 2015; 65(6): 751-54.

60. Gedikli S. Kronik stresin adrenal bez ve tiroid bezi üzerine etkilerinin morfometrik ve histokimyasal yöntemlerle sıçan modeli üzerinde araştırılması (tez). Erzurum: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2010.

61. Sahin E, Gumuslu S. Immobilization stress in rat tissues: alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol 2007;144(4):342-7.

62. Ralph CR, Lehman MN, Goodman RL, Tilbrook AJ. Impact of psychosocial stress on gonadotrophins and sexual behaviour in females: role for cortisol? Reprod 2016;152(1):R1-14.

63. Conrad CD, Grote KA, Hobbs RJ, Ferayorni A. Sex differences in spatial and non-spatial Y-maze performance after chronic stress. Neurobiol Learn Mem 2003;79(1):32-40.

64. Kala M, Nivsarkar M. Role of cortisol and superoxide dismutase in psychological stress induced anovulation. Gen Comp Endocrinol 2016;225:117-24.

65. Zhang SY, Wang JZ, Li JJ, Wei DL, Sui HS, Zhang ZH, et al. Maternal restraint stress diminishes the developmental potential of oocytes. Biol Reprod 2011;84(4):672-81.

66. Hyobin Seo C-HP, Seokrip Choi, Woocheol Kim, Byung-Duk Jeon, Seungpil Ryu. Effects of voluntary exercise on apoptosis and cortisol after chronic restraint stress in mice. J Exerc Nut Biochem 2016.

67. Ampuero E, Luarte A, Santibanez M, Varas-Godoy M, Toledo J, Diaz-Veliz G, et al. Two Chronic Stress Models Based on Movement Restriction in Rats Respond Selectively to Antidepressant Drugs: Aldolase C As a Potential Biomarker. Int J Neuropsychopharmacol. 2015;18(10):pyv038.

68. Liu YX, Cheng YN, Miao YL, Wei DL, Zhao LH, Luo MJ, et al. Psychological stress on female mice diminishes the developmental potential of oocytes: a study using the predatory stress model. PLoS One 2012;7(10):e48083.

69. Hansen PJ. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2009;364(1534):3341-50.

70. Feng Z, Liu L, Zhang C, Zheng T, Wang J, Lin M, et al. Chronic restraint stress attenuates p53 function and promotes tumorigenesis. Proc Natl Acad Sci U S A 2012;109(18):7013-8.

71. Bowman RE, Ferguson D, Luine VN. Effects of chronic restraint stress and estradiol on open field activity, spatial memory, and monoaminergic neurotransmitters in ovariectomized rats. Neurosci 2002;113(2):401-10.

72. Li XF, O'Byrne KT. Stress and the Reproductive System. Knobil and Neill's Physiol Reprod 2015;1637-60.

73. Ho RT, Fong TC, Wan AH, Au-Yeung FS, Chen EY, Spiegel D. Associations between diurnal cortisol patterns and lifestyle factors, psychotic symptoms, and neurological deficits: A longitudinal study on patients with chronic schizophrenia. J Psychiatr Res 2016;81:16-22.

74. Chung S, Son GH, Kim K. Circadian rhythm of adrenal glucocorticoid: its regulation and clinical implications. Biochim Biophys Acta 2011;1812(5):581-91.

75. Calogero AE, Barreca A, Burrello N, Palermo I, Giordano G, D'Agata R, ve ark. Corticotrophin-releasing hormone inhibits insulin-like growth factor-I release from primary cultures of rat granulosa cells. J Endocrinol 2002;174(3):493-8.

76. Stilley JA, Birt JA, Sharpe-Timms KL. Cellular and molecular basis for endometriosis-associated infertility. Cell Tissue Res 2012;349(3):849-62.

77. 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.

78. Mendoza-Rodriguez CA, Merchant-Larios H, Segura-Valdez Md Mde L, Moreno-Mendoza N, Cruz ME, Arteaga-Lopez P ve ark. Expression of p53 in luminal and glandular epithelium during the growth and regression of rat uterus during the estrous cycle. Mol Reprod Dev 2002;61(4):445-52.

79. Little CC. Biology of the laboratory mouse. In: Snell GD (Ed.). Reproduction. New York: Dover Publ: 1980. p.66.

80. Orchard MD, Murphy CR. Alterations in tight junction molecules of uterine epithelial cells during early pregnancy in the rat. Acta Histochem 2002;104(2):149-55.

81. Hubscher CH, Brooks DL, Johnson JR. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. Biotech Histochem 2005;80(2):79-87.

82. Singletary SJ, Kirsch AJ, Watson J, Karim BO, Huso DL, Hurn PD, et al. Lack of correlation of vaginal impedance measurements with hormone levels in the rat. Contemp Top Lab Anim Sci 2005;44(6):37-42.

83. Ma M, Kondo T, Ban S, Umemura T, Kurahashi N, Takeda M, Kishi R. Exposure of prepubertal female rats to inhaled di(2-ethylhexyl)phthalate affects the onset of puberty and postpubertal reproductive functions. Toxicol Sci 2006;93(1):164-71.

84. Kaur T, Pathak CM, Pandhi P, Khanduja KL. Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. Brain Cogn 2008;67(1):25-30.

85. Uzbay Tİ. Psikofarmakolojinin Temelleri ve Deneysel Araştırma Teknikleri Ankara: Çizgi Tıp Yayınevi, 2004:97-142.

86. Küçük A, Gölgeli A. Deney hayvanlarında anksiyete modelleri ve anksiyetenin değerlendirilmesi. Sağ Bil Derg 2005;14(3):209-17.

87. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. Eur J Pharmacol 2003;463(1-3):3-33.

88. Carvajal CC, Vercauteren F, Dumont Y, Michalkiewicz M, Quirion R. Aged neuropeptide Y transgenic rats are resistant to acute stress but maintain spatial and non-spatial learning. Behav Brain Res 2004;153(2):471-80.

89. Wall PM, Messier C. Methodological and conceptual issues in the use of the elevated plus-maze as a psychological measurement instrument of animal anxiety-like behavior. Neurosci Biobehav Rev 2001;25(3):275-86.

90. Aykaç A, Süer K, Taşkıran C. Anksiyete araştırmalarında kullanılan sıçan davranış modelleri. Marm Med J 2015;28:1-7.

91. Crema LM, Diehl LA, Aguiar AP, Almeida L, Fontella FU, Pettenuzzo L, et al. Effects of chronic restraint stress and 17-beta-estradiol replacement on oxidative stress in the spinal cord of ovariectomized female rats. Neurochem Res 2010;35(11):1700-7.

92. Nath PP, Sarkar K, Mondal M, Paul G. Metanil yellow impairs the estrous cycle physiology and ovarian folliculogenesis in female rats. Environ Toxicol 2016;31(12):2057-67.

93. Kanter M, Sapmaz MM, Ömürlü İK. Balb/C Türü dişi farelerde uniseksüel gruplamanın östrus siklusu üzerine etkileri. Yen Tıp Derg 2010;7:235-239.

94. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. Hum Reprod Update 2012;18(1):73-91.

95. Kizilay G, Cakmak H, Yen CF, Atabekoglu C, Arici A, Kayisli UA. Expression and regulation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in endometrial cells in vivo and in vitro. Histochem Cell Biol 2008;130(4):761-71.

96. Arun S, Burawat J, Sukhorum W, Sampannang A, Uabundit N, Iamsaard S. Changes of testicular phosphorylated proteins in response to restraint stress in male rats. J Zhejiang Univ Sci B 2016;17(1):21-9.

97. Wang X, Xie Y, Zhang T, Bo S, Bai X, Liu H, et al. Resveratrol reverses chronic restraint stress-induced depression-like behaviour: Involvement of BDNF level, ERK phosphorylation and expression of Bcl-2 and Bax in rats. Brain Res Bull 2016;125:134-43.

98. Mairesse J, Lesage J, Breton C, Breant B, Hahn T, Darnaudery M ve ark. Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007;292(6):E1526-33.

99. Zhao Y, Ma R, Shen J, Su H, Xing D, Du L. A mouse model of depression induced by repeated corticosterone injections. Eur J Pharmacol 2008;581(1-2):113-20.

100. Ramos-Ortolaza DL, Doreste-Mendez RJ, Alvarado-Torres JK, Torres-Reveron A. Ovarian hormones modify anxiety behavior and glucocorticoid receptors after chronic social isolation stress. Behav Brain Res 2017;328:115-22.

101. Seo JS, Wei J, Qin L, Kim Y, Yan Z, Greengard P. Cellular and molecular basis for stress-induced depression. Mol Psychiatry 2017;22(10):1440-7.

102. Luine V, Gomez J, Beck K, Bowman R. Sex Differences in chronic stress: Role of estradiol in cognitive resilience. Stress:Neuroendocrinol and Neurobiol 2017;317-25.

103. Halbreich U, Kahn LS. Role of estrogen in the aetiology and treatment of mood disorders. CNS Drugs 2001;15(10):797-817.

104. Kessler RC, McGonagle KA, Swartz M, Blazer DG, Nelson CB. Sex and depression in the National Comorbidity Survey. I: Lifetime prevalence, chronicity and recurrence. J Affect Disord. 1993;29(2-3):85-96.

105. Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol 2007;80(2):84-97.

106. Northoff H, Symons S, Zieker D, Schaible EV, Schafer K, Thoma S, et al. Gender- and menstrual phase dependent regulation of inflammatory gene expression in response to aerobic exercise. Exerc Immunol Rev 2008;14:86-103.

107. Xiao E, Xia-Zhang L, Barth A, Zhu J, Ferin M. Stress and the menstrual cycle: relevance of cycle quality in the short- and long-term response to a 5-day endotoxin challenge during the follicular phase in the rhesus monkey. J Clin Endocrinol Metab 1998;83(7):2454-60.

108. Witorsch RJ. Effects of elevated glucocorticoids on reproduction and development: relevance to endocrine disruptor screening. Crit Rev Toxicol 2016;46(5):420-36.

109. Sapmaz-Metin M, Topcu-Tarladacalisir Y, Kurt-Omurlu I, Karaoz Weller B, Unsal-Atan S. A morphological study of uterine alterations in mice due to exposure to cadmium. Biotech Histochem 2017;92(4):264-73.

110. Dorfman M, Arancibia S, Fiedler JL, Lara HE. Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. Biol Reprod 2003;68(6):2038-43.

111. Xiao E, Xia-Zhang L, Ferin M. Stress and the menstrual cycle: short- and long-term response to a five-day endotoxin challenge during the luteal phase in the rhesus monkey. J Clin Endocrinol Metab 1999;84(2):623-6.

112. Arakawa K, Arakawa H, Hueston CM, Deak T. Effects of the estrous cycle and ovarian hormones on central expression of interleukin-1 evoked by stress in female rats. Neuroendocrinol 2014;100(2-3):162-77.

113. Tilbrook AJ, Turner AI, Clarke IJ. Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. Rev Reprod 2000;5(2):105-13.

114. Huang P, Zhou Z, Shi F, Shao G, Wang R, Wang J, et al. Effects of the IGF-1/PTEN/Akt/FoxO signaling pathway on male reproduction in rats subjected to water immersion and restraint stress. Mol Med Rep 2016;14(6):5116-24.

115. Kalantaridou SN, Makrigiannakis A, Zoumakis E, Chrousos GP. Stress and the female reproductive system. J Reprod Immunol 2004;62(1-2):61-8.

116. Galea LA, McEwen BS, Tanapat P, Deak T, Spencer RL, Dhabhar FS. Sex differences in dendritic atrophy of CA3 pyramidal neurons in response to chronic restraint stress. Neurosci 1997;81(3):689-97.

117. Cengiz F. Hayvanlarda Zorlanım (Stres) Oluşturan Etkenler. J Fac Vet Med. 2001;20:147-53.

118. Cook SC, Wellman CL. Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex. J Neurobiol 2004;60(2):236-48.

119. Liang B, Wei DL, Cheng YN, Yuan HJ, Lin J, Cui XZ, et al. Restraint stress impairs oocyte developmental potential in mice: role of CRH-induced apoptosis of ovarian cells. Biol Reprod 2013;89(3):64.

120. Shimizu T, Ohshima I, Ozawa M, Takahashi S, Tajima A, Shiota M, et al. Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. Reprod 2005;129(4):463-72.

121. Erickson GF, Magoffin DA, Dyer CA, Hofeditz C. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships. Endocr Rev 1985;6(3):371-99.

122. Li X, Peegel H, Menon KM. Regulation of high density lipoprotein receptor messenger ribonucleic acid expression and cholesterol transport in theca-interstitial cells by insulin and human chorionic gonadotropin. Endocrinol 2001;142(1):174-81.

123. Mayer LP, Pearsall NA, Christian PJ, Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, et al. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. Reprod Toxicol 2002;16(6):775-81.

124. Miyabayashi K, Tokunaga K, Otake H, Baba T, Shima Y, Morohashi K. Heterogeneity of ovarian theca and interstitial gland cells in mice. PLoS One 2015;10(6):e0128352.

125. Li L, Fu YC, Xu JJ, Chen XC, Lin XH, Luo LL. Caloric restriction promotes the reproductive capacity of female rats via modulating the level of insulin-like growth factor-1 (IGF-1). Gen Comp Endocrinol 2011;174(2):232-7.

126. Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Cabi Publ 2003;2:115-117.

127. Dong YZ, Zhou FJ, Sun YP. Psychological stress is related to a decrease of serum anti-müllerian hormone level in infertile women. Reprod Biol Endocrinol 2017;11;15(1):51.

128. Çelik S. Ovaryum kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu sonrasında folikül kaybı mekanizmalarında rol alan baskılayıcı moleküllerin araştırılması (tez). Antalya: Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2016.

129. Wang HW, Zhao WP, Liu J, Tan PP, Zhang C, Zhou BH. Fluoride-induced oxidative stress and apoptosis are involved in the reducing of oocytes development potential in mice. Chemosph 2017;186:911-8.

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Primordiyal germ hücrelerinin gonadal kabartılara göçü 4
Şekil 2: IGF-1 proteininin erken folikül gelişimi üzerindeki etkisinin şematik gösterimi . 11
Şekil 3: Stres sırasında kortizol salınımı ve etkileri 16
Şekil 4: Rota rod cihazı 22
Şekil 5: Açık alan test düzeneği 23
Şekil 6: Yükseltilmiş artı labirent test düzeneği 24
Şekil 7: Tüm gruplara ait vücut ve ovaryum ağırlıkları değişimi 29
Şekil 8: Açık alan testi, merkez alanda geçirilen süre ve toplam gezilen mesafe 30
Şekil 9: Yükseltilmiş artı labirent testi, kapalı kola girme sıklığı 31
Şekil 10: Kontrol grubu, H+E, X100 33
Şekil 11: Kontrol grubu, H+E, X400 33
Şekil 12: Kontrol grubu, H+E, X100 34
Şekil 13: Kontrol grubu, H+E, X200 34
Şekil 14: Kontrol grubu, H+E, X100 35
Şekil 15: Kontrol grubu, H+E, X400 35
Şekil 16: Kontrol grubu, H+E, X100 36
Şekil 17: Kontrol grubu, H+E, X400 36
Şekil 18: Stres grubu, H+E, X100 37
Şekil 19: Stres grubu, H+E, X400 37
Şekil 20: Stres grubu, H+E, X200 38
Şekil 21: Stres grubu, H+E, X400 38
Şekil 22: Stres grubu, H+E, X200 39
Şekil 23: Stres grubu, H+E, X400 39

Şekil 24. Stres grubu, H+E, X200 40
Şekil 25. Stres grubu, H+E, X400 40
Şekil 26: Ovaryumda interstisyel alan/toplam kesit alanı oranı 41
Şekil 27: Kontrol grubu, H+E, X100 44
Şekil 28: Kontrol grubu, Masson Trikrom, X100 44
Şekil 29: Kontrol grubu, H+E, X200 45
Şekil 30: Kontrol grubu, Masson Trikrom, X400 45
Şekil 31: Kontrol grubu, H+E, X400 46
Şekil 32: Kontrol grubu, Masson Trikrom, X400 46
Şekil 33: Kontrol grubu, H+E, X200 47
Şekil 34: Kontrol grubu, Masson Trikrom, X400 47
Şekil 35: Kontrol grubu, H+E, X400 48
Şekil 36: Kontrol grubu, Masson Trikrom, X100 48
Şekil 37: Stres grubu, H+E, X100 49
Şekil 38: Stres grubu, Masson Trikrom, X100 49
Şekil 39: Stres grubu, H+E, X200 50
Şekil 40: Stres grubu, Masson Trikrom, X200 50
Şekil 41: Stres grubu, H+E, X200 51
Şekil 42: Stres grubu, Masson Trikrom, X400 51
Şekil 43: Stres grubu, H+E, X200 52
Şekil 44: Stres grubu, Masson Trikrom, X400 52
Şekil 45: Stres grubu, H+E, X400 53
Şekil 46: Kontrol grubu, IGF-1, hematoksilen zıt boyaması, X100 56
Şekil 47: Kontrol grubu, IGF-1, hematoksilen zıt boyaması, X400 56
Şekil 48: Kontrol grubu, IGF-1, hematoksilen zıt boyaması, X200 57
Şekil 49: Kontrol grubu, IGF-1, hematoksilen zıt boyaması, X200 57
Şekil 50: Stres grubu, IGF-1, hematoksilen zıt boyaması, X100 58
Şekil 51: Stres grubu, IGF-1, hematoksilen zıt boyaması, X400 58
Şekil 52: Stres grubu, IGF-1, hematoksilen zıt boyaması, X200 59
Şekil 53: Kontrol grubu, AMH, hematoksilen zıt boyaması, X100 61
Şekil 54: Kontrol grubu, AMH, hematoksilen zıt boyaması, X200 61
Şekil 55: Kontrol grubu, AMH, hematoksilen zıt boyaması, X400 62
Şekil 56: Kontrol grubu, AMH, hematoksilen zıt boyaması, X400 62

Şekil 57: Stres grubu, AMH, hematoksilen zıt boyaması, X100 63
Şekil 58: Stres grubu, AMH, hematoksilen zıt boyaması, X200 63
Şekil 59: Stres grubu, AMH, hematoksilen zıt boyaması, X400 64
Şekil 60: Stres grubu, AMH, hematoksilen zıt boyaması, X400 64
Şekil 61: Kontrol grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, X100 66
Şekil 62: Kontrol grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, X400 66
Şekil 63: Kontrol grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, X200 67
Şekil 64: Kontrol grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, X400 67
Şekil 65: Stres grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, X100 68
Şekil 66: Stres grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, X200 68
Şekil 67: Stres grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, X400 69
Şekil 68: Stres grubu, Bcl-2, hematoksilen zıt boyaması, X200 69

TABLOLAR

Tablo 1. Östrus siklusuna ait fazların ve vajinal smearde bulunan hücre morfolojisinin sınıflandırılması…….....19

Tablo 2. Gruplara ait 8 haftalık vajinal smear bulguları……..32

Tablo 3. Kortizol seviyeleri……..41

Tablo 4. Kontrol ve stres gruplarına ait IGF-1, AMH ve Bcl-2 için HSCORE değerlerinin karşılaştırılması…….54

ÖZGEÇMİŞ

1992 yılında İstanbul'da doğdu. Ortaöğrenimini Kırklareli Atatürk Anadolu Lisesinde 2010 yılında tamamladıktan sonra, 2010-2014 yılları arasında Marmara Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimini aldı. 2015 yılında Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen eğitimine Trakya Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrencisi olarak devam etmektedir.

EKLER

Ek 1

T.C.
TRAKYA ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(Trakya University, Local Ethics Committee of Animal Experiments)

Oturum Sayısı: 2016/03 **Karar Tarihi: 26.02.2016**

KARAR NO: 2016.03.06

Yürütücülüğünü Trakya Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Melike SAPMAZ METİN'in yaptığı, TÜHADYEK-2016/19 protkol nolu "**Kronik fizyolojik stres uygulamasının sıçan ovaryumlarında foliküler gelişim ve oosit rezervi üzerine etkileri: IGF1, AMH ve Bcl-2'nin rolü**" başlıklı çalışma görüşüldü. Araştırmanın amaç, yaklaşım, gereç ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmesi sonucunda; Hayvan deneyleri yerel etik kurulu yönergesinde belirtilen ilke ve kurallara uygun bulunarak, çalışmanın yapılabileceğine mevcudun oy birliği ile karar verilmiştir.

Doç. Dr. Enis ULUÇAM
Başkan
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

-İZİNLİ-
Vet. Hekim Ziya ÇUKUR
Vet. Hek. Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Hayati ARDA
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Beytullah ÖZKAN
Fen Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒evet ☐ hayır

Doç. Dr. Y. Atakan SEZER
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Doç. Dr. Tevfik AKTOZ
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

-İZİNLİ-
Doç. Dr. Hakan GÜRKAN
Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

Yrd. Doç. Dr. Elvan BAKAR
Ziraat Fakültesi Öğretim Üyesi
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☒yok
Toplantı Katılım: ☒ evet ☐ hayır

-KATILMADI-
Ecz. F. Uygar GÜLER
Sivil Toplum Kuruluşu Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır

-MAZERETLİ-
Osman GÜLTEKİN
Sivil Üye
Araştırma ile İlişki: ☐ var ☐yok
Toplantı Katılım: ☐ evet ☐ hayır