SIRTUIN (SIRT) VE APOPTOZ GENLERİNİN LEPTİN UYGULANAN FARELERİN YAVRULARININ GRANULOSA HÜCRELERİNDEKİ EKSPRESYONU

Merve ERKOÇ
201503102

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman: Doç. Dr. Çağrı ÖNER

İstanbul

T.C. Maltepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Şubat, 2023

SIRTUIN (SIRT) VE APOPTOZ GENLERİNİN LEPTİN UYGULANAN FARELERİN YAVRULARININ GRANULOSA HÜCRELERİNDEKİ EKSPRESYONU

Merve ERKOÇ

201503102

ORCID: 0000-0003-1458-0395

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı

Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı

Danışman: Doç. Dr. Çağrı ÖNER

İstanbul

T.C. Maltepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Şubat, 2023



JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI

Bu belge, Yükseköğretim Kurulu tarafından 19.01.2021 tarihli "Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge" ile bildirilen 6698 Sayılı Kişisel Verilerin Korunması Kanunu kapsamında gizlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda yanımda olan, manevi yönden desteğini hissettiren; tezimin planlanmasında, içeriğinin düzenlenmesinde, tez sonuçlarının yorumlanmasında, tez çalışması için ortamın sağlanmasında ve tezin her aşamasında özverilerini, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen, tez danışmanım Maltepe Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Çağrı ÖNER'e ve Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet CINCIK'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin yürütülmesi esnasında, tüm laboratuvar imkânlarından faydalanmamı sağlayan ve hayvan çalışmalarında önerileri ile bana yol gösterici olan Veteriner Hekim Necdet ALTINER'e; çalışmamın her aşamasına büyük özveriyle katıldıkları ve özellikle psikolojik destekleri için Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi öğrencileri Abdullah PEHLİVAN'a ve Ahmet Hakan TEMİZ'e teşekkür ederim.

Bilgisini ve sabrını zorladığım ancak her zaman bana yardımcı olan laboratuvar sorumlum Feridun YAKAR'a; bu yola beraber çıktığım ve yüksek lisans eğitimim boyunca yanımda olan sınıf arkadaşım Hümeyra ÇEBİ'ye başta olmak üzere bütün yüksek lisans arkadaşlarıma destekleri ve katkıları için çok teşekkür ederim.

Varlıkları ile kendimi şanslı hissetmemi sağlayan, her türlü konuda yanımda olarak beni cesaretlendiren, hayatımdaki en önemli insanlar olan annem ve babama, kardeşim Mert'e teşekkür ederim.

Merve ERKOÇ

Şubat, 2023

ÖZET

SIRTUIN (SIRT) VE APOPTOZ GENLERİNİN LEPTİN UYGULANAN FARELERİN YAVRULARININ GRANULOSA HÜCRELERİNDEKİ EKSPRESYONU

Merve Erkoç
Yüksek Lisans Tezi
Disiplinlerarası Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Klinik Embriyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı
Danışman: Doç. Dr. Çağrı Öner
Maltepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, 2023

Leptin, ağırlıklı olarak adipoz dokudaki adipositler tarafından sentezlenerek kana salınan, dolayısıyla kişinin yağ dokusu ile orantılı olarak serum düzeylerinde yükselen bir hormondur. Plazma leptin konsantrasyonları, yaş ve vücut kitle indeksi ile uyumlu gebe olmayan dişilere kıyasla hamile dişilerde önemli ölçüde yüksektir ve doğumdan sonra keskin bir şekilde düşmektedir. Plasentada leptin metabolizmasının ve/veya leptin fonksiyonunun deregülasyonu, tekrarlayan düşük, gestasyonel diyabet, intrauterin büyüme kısıtlaması ve preeklampsi gibi gebelik sırasındaki çeşitli bozuklukların patogenezinde rol oynayabilmektedir. Yapılan tez çalışmasının amacı, subkutan leptin uygulanan dişi Balb-C farelerin dişi yavrularının yumurtalığından elde edilen granulosa hücrelerinde, yumurta korunumu ve fonksiyonlarıyla alakalı olduğu düşünülen SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 gen ekspresyonları ile aynı örneklerde programlı hücre ölümü olan apoptozun yolak molekülleri olan p53, Bcl-2 ve Bax gen ekspresyonlarını belirlemektir.
Bu çalışmada ikinci jenerasyon 14 adet Balb-C tipi dişi fare kullanıldı. Fareler kontrol ve leptin uygulanan deney grubu olmak üzere ikiye ayrıldı. Çalışmamızda deney grubu dişilere gebelikleri boyunca leptin uygulaması subkutan enjeksiyon ile uygulandı. Doğumu takiben 10. Haftada dişi farelerden çıkarılan ovaryumlar, kit prosedürüne göre total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA izolasyonu işlemini takiben cDNA çevrimi ve RT-PCR ile gen ekspresyonları belirlendi. Elde edilen veriler istatistiksel olarak SPSS 26.0 programı ile değerlendirildi.
Elde edilen verilere göre kilo açısındanda gruplar arasında fark bulunmadı ($p>0.05$). Deney grubunda p53 ile Bcl-2 gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı derecede

azalırken ($p<0.0001$); Bax ekspresyonunda gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0.05$). Deney grubunun SIRT1 gen ekspresyonu kontrol grubuna göre istatistiksel azalma görülürken ($p<0.0001$); SIRT6 ve SIRT7 gen ekspresyonlarında gruplar arasında istatistiksel fark bulunamadı ($p>0.05$).

Bu tez çalışması ile genetik açıdan leptinin ikinci jenarasyonda da etkilerinin olduğunu, hatta bu etkinin dişilerde üreme (yumurta kalitesi gibi) üzerinde olduğu belirlendi. Leptinin ikinci jenarasyon dişilerin yumurtalarını besleyen granulosa hücrelerinde apoptozdan kaçabilme yeteneği azalttığı ve daha çok hayatta kalma yeteneği kazandırabileceği fikrini yaratmaktadır.

Anahtar Sözcükler: Bax, Bcl-2, Granulosa Hücresi, Leptin, p53, SIRT1, SIRT6, SIRT7

ABSTRACT

EXPRESSION OF SIRTUIN (SIRT) AND APOPTOSIS GENES IN GRANULOSA CELLS OF OFFSPRING OF LEPTIN-ADMINISTERED MICE

Merve Erkoç
Master Thesis
Department of Interdisciplinary Clinical Embryology
Clinical Embryology Programme With Thesis
Thesis Advisor: Doç.Dr. Çağrı Öner
Maltepe University Graduate School, 2023

Leptin is a hormone that is predominantly synthesized by adipocytes in adipose tissue. Plasma leptin concentrations are significantly higher in pregnant females compared to non-pregnant females consistent with age and body mass index and decline sharply after birth. The aim of the study was to determine the SIRT1, SIRT6 and SIRT7 gene expressions, which are thought to be related to ovary preservation and functions, in granulosa cells obtained from the ovaries of female Balb-C mice with subcutaneous leptin administered, as well as to determine p53, Bcl- 2 and Bax gene expressions.

In this study, 14 second generation Balb-C type female mice were used. Mice were divided into control and leptin-treated experimental groups. In our study, leptin was administered to the experimental group females during their pregnancy by subcutaneous injection. Total RNA was isolated from ovaries extracted from female mice at week 10 following birth, according to the kit procedure. Following the total RNA isolation, gene expressions were determined by RT-PCR. The obtained data were statistically evaluated with the SPSS 26.0 program.

According to the obtained data, there was no difference between the groups in terms of weight ($p>0.05$). While p53 and Bcl-2 gene expressions were statistically significantly decreased in the experimental group ($p<0.0001$); there was no statistical difference between the groups in Bax expression ($p>0.05$). While SIRT1 gene expression of the experimental group was statistically decreased compared to the control group ($p<0.0001$); There was no statistical difference between the groups in SIRT6 and SIRT7 gene expressions ($p>0.05$).

In this thesis study, it was determined that leptin has effects in genetics of second generation, and even this effect is on female reproduction. It creates the idea that leptin reduces the ability to escape apoptosis in granulosa cells which feeding the ovaries of second-generation females and may provide more survival ability.

Keywords: Bcl-2, Bax, Granulosa Cells, Leptin, p53, SIRT1, SIRT 6, SIRT 7

İÇİNDEKİLER

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI ii
ETİK İLKE VE KURALLARA UYUM BEYANI iii
TEŞEKKÜR iv
ÖZET v
ABSTRACT vii
İÇİNDEKİLER ix
ŞEKİLLER LİSTESİ xii
KISALTMALAR xiii
1. GİRİŞ 1
1.1. Problem 1
1.2. Amaç 4
1.3. Önem 5
1.4. Varsayımlar 5
1.5. Sınırlılıklar 6
Tanımlar 6
2. GENEL BİLGİLER 7
2.1. Dişi Üreme Sistemi 7
2.2. Folikül Gelişimi 8
2.3.Foliküler Atrezi 12
2.4. Over Folikül Gelişim Aşamalarında Apoptoz 12
2.5. Leptin Hakkında Genel Bilgiler 15
2.6. Leptin ve Metabolik Etkileri 16
2.7. Leptin Sentezi ve Salgısının Düzenlenmesi 17
2.8. Leptin ve Obezite 18

2.9. Gonadotrop Salgılanmasının Düzenlenmesinde Leptinin Rolü 19
2.10. Leptin Ve Hipotalamus-Hipofiz-Gonad (HPG) Ekseni 20
2.1.1. Sırtuinler 23
3. YÖNTEM 27
3.1. Gereç ve Yöntem 27
3.1.1. Deney hayvanlarının yetiştirilmesi ve leptinin subkutan olarak uygulanması: 27
3.1.2. İkinci nesil dişi farelerden izole edilen granulosa hücrelerinin toplanması: 27
3.1.3. Total RNA izolasyonu: 28
3.1.4. Revers transkripsiyon ile komplementer DNA (cDNA) oluşturma 29
3.1.5. Real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ekspresyonu tayini 29
3.1.6. İstatistiksel değerlendirmeler 30
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 31
4.1. Bulgular 31
4.2. Tartışma 34
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 38
KAYNAKLAR 40
ÖZGEÇMİŞ 55

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. Real-Time PCR'da Kullanılan Primerler..... 30

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Yetişkin overi.. 8
Şekil 2. Primordial germ hücrelerinden antral foliküle 10
Şekil 3. Folikül gelişim aşamaları şeması 12
Şekil 4. Apoptotik yolaklar..... 13
Şekil 5. Ekstrensik, intrensik ve perforin-granzim yolları..... 14
Şekil 6. Kontrol ve Deney Grupları arasındaki kiloların karşılaştırılması 31
Şekil 7. **A.** Kontrol ve deney grupları arasında p53, Bax, Bcl-2 gen ekspresyonlarının karşılaştırılması. **B.** Kontrol ve deney gruplarında arasında p53, Bax, Bcl-2 gen ekspresyonlarının artış/azalış katsayısı grafiği …….……..32
Şekil 8. A. Kontrol ve deney gruplarında SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 gen ekspresyonlarının karşılaştırılması. **B.** Kontrol ve deney gruplarında arasında SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 gen ekspresyonlarının artış/azalış katsayısı grafiği…….....33-34

KISALTMALAR

FFA **:** Free Fatty Acids (serbest yağ asitleri

FSH **:**Folikül stimüle edici hormon

GnRH **:** Gonadotropin Salgılatıcı Hormon

RNS **:** Reaktif oksijen türleri

OMI **:** Oosit maturasyon inhibitörü

LH **:** Luteinizan Hormon

IGF-1 **:**İnsülin benzeri büyüme faktörü

EGF **:**Epidermal büyüme faktörü

1. GİRİŞ

1.1.Problem

İnsan dişi üreme işlevi, 20'li yaşların başında maksimum etkinliğe ulaşır ve daha sonra memeli türleri aracılığıyla evrensel bir şekilde azalmaktadır (Wood, 1989). Kademeli doğurganlık kaybı, 30'ların sonlarında, ortalama 50-51 yaşlarında menopozla sonuçlanan daha belirgin hale gelmektedir. Kadın üreme fonksiyonunun ana düzenleyicisi yumurtalık olup; birincil rolü doğum öncesi veya doğumdan kısa bir süre sonra oluşabilen ve üreme ömrü boyunca nitelik ve niceliği giderek azalan bir germ hücresi rezervi sağlamaktır. Pubertede gonad, ilk mayoz bölünmenin profazında bloke edilen ve menopoz gerçekleşene kadar büyüme fazına alınabilen oositleri içeren 300.000 primordial folikül ile donatılmıştır. Çoğu atretik hale gelirken, sadece birkaçı büyük antral folikül aşamasına ulaşır ve yumurtlama sırasında mayozu metafaz II aşamasına (MII) tamamlayarak fertilizasyon için yetkin hale gelmektedir (Hennet ve Combelles, 2012; Sánchez ve Smitz, 2012; Sobinoff ve ark., 2013).

Cinsiyet steroidleri, insülin ve somatotropik eksen, yumurtalık düzeyinde etki etmektedir (Hull ve Harvey, 2001). Bu nedenle, vücut ağırlığı arttığında bu sistemleri etkileyen işlev bozuklukları, yumurtalıkta fonksiyonel değişiklikler meydana getirmede rol oynayabilir. Bununla birlikte, obezitenin oositi doğrudan etkileyerek kalitesini bozduğuna dair ortaya çıkan kanıtlar bulunmaktadır. Hayvan çalışmaları, aslında, obez farelerden elde edilen oositlerin diğer gruplara göre daha küçük olduğunu, gecikmiş mayotik olgunlaşma ve artmış foliküler apoptoz gösterdiğini ve önemli iğ veya kromozom yanlış hizalama kusurlarına sahip olduğunu göstermiştir (Jungheim ve ark., 2010). Özellikle hem hayvan hem de insan çalışmaları, yumurtalık içinde FFA birikiminin endoplazmik retikulum (ER) stresi, oositlerin mitokondriyal disfonksiyonu ve son olarak kümülüs-oosit komplekslerinin apoptozisi ile ilişkili olduğunu göstermektedir (Jungheim ve ark., 2011).

Gebelik döneminde alınan takviye gıdalar fetüsün hem gelişimini hem de doğumdan sonraki dönemde tüm fizyolojik sistemini etkilemektedir ve bu sistemlerden biri de üreme sistemidir. Sağlıklı, dengeli beslenen ve takviye gıdaları belirli oranda kullanan bireylerin yavruları diğer bireylere göre daha sağlıklı olmaktadır (Newbern ve ark., 2011).

Leptin, serbest yağ asitleri (FFA) ve sitokinler gibi birçok faktörün üretimi yoluyla yağ dokusu, oosit olgunlaşmasında ve endometriyal epitel alıcılığında son bir değişiklikle hem yumurtalık hem de endometrium fonksiyonlarını etkileyebilir (Gambineri ve ark. 2019). 146 aminoasit kalıntısından (16 kDa) oluşan küçük, glikosile edilmemiş bir pleiotropik peptit olan leptinin, yağ dokusu tarafından salgılandığı bulunmuştur. Leptin tokluk ve enerji homeostazını modüle eder. Leptinin ve fonksiyonel reseptörlerinin trofoblast hücreleri tarafından sentezi ve salgılanması geniş çapta gösterilmiştir, bu da leptinin bir parakrin veya otokrin mekanizma yoluyla etki edebileceğini düşündürmektedir (Cervero ve ark., 2005). Plasentada leptin metabolizmasının ve/veya leptin fonksiyonunun deregülasyonu, tekrarlayan düşük, gestasyonel diyabet, preeklampsi gibi gebelik sırasındaki çeşitli bozuklukların patogenezinde rol oynayabilmektedir (Pasquali ve Gambineri, 2006).

Periferik leptin seviyeleri ve vücuttaki yağ miktarı doğrudan ilişkilir. Bu sebeple, vücut ağırlığındaki kusur koşulları, kendiliğinden doğurganlığı baskılayan leptin seviyelerinde bir azalmaya neden olurken, aşırı vücut ağırlığı koşulları, artan leptin sekresyonu ile ilişkilidir. Bununla birlikte, obezitenin çoğu formu, en azından merkezi düzeyde, muhtemelen leptin reseptör ekspresyonunun aşağı regülasyonu yoluyla bir leptin direnci durumu ile karakterize edilmektedir (Moschos ve ark., 2002). Tortoriello ve ark. hipotalamusta leptin reseptörlerinin daha yüksek ekspresyonuna sahip farelerin obezite ve kısırlık geliştirmede dirençli olduğunu gözlemlemişlerdir (Tortoriello ve ark., 2007). Beynin aksine, yumurtalıklar gibi diğer dokular leptine duyarlı kalmaktadır bu nedenle obeziteye eşlik eden yüksek dolaşımdaki leptin seviyelerine maruz kalırlar. İnsan yumurtalığındaki leptin, hem granulosa hem de tekal hücre steroidogenezini inhibe eder ve ovulasyon sürecine müdahale etmektedir (Duggal ve ark., 2000). Dolayısıyla doğurganlığı doğrudan etkiler. Son olarak, obeziteye eşlik eden merkezi bir insülin direnci durumu, lüteinize edici hormon (LH) salgılama darbelerinin sıklığı ve genliği üzerindeki etki yoluyla obezitede gözlenen kısırlık süreçlerinde rol oynayabilmektedir (Brüning ve ark., 2000).

Sirtuinler (SIRT), çok sayıda fonksiyon için önemli olan NAD+ bağımlı deasetilazlar/ADP-ribosil transferazlar/deasilazlar ailesidir. (Haigis ve Sinclair, 2010). Memelilerde bulunan yedi sirtuin (SIRT1-7) arasında en kapsamlı olarak çalışılan SIRT1

olup; çekirdekte ilk eksprese edilir ve anahtar transkripsiyon faktörlerini düzenlemektedir (Haigis ve Sinclair, 2010; Tang, 2016). SIRT1 ayrıca önemli antioksidan fonksiyonlara sahiptir. Genel olarak, hücre sağkalımını, mitokondriyal bütünlüğü ve antioksidan savunmayı modüle ederek SIRT1, yaşlanma ve yaşam süresi ile bağlantılıdır (Tang, 2016). Son zamanlarda, doğurganlığın düzenlenmesinde SIRT1'in olası bir rolü ortaya çıkarılmıştır. İki cinsiyette de üreme kusurları, kısırlık veya değiştirilmiş gametogenez sergileyen SIRT1-knockout hayvanlarda ve düşük canlılığa sahip yavrularda tarif edilmiştir (McBurney ve ark., 2003; Coussens ve ark., 2008). Tüm sirtuinlerin ekspresyonu, fare oositlerinde ve embriyolarında gözlenmiştir. Bunlar arasında SIRT1'in in vitro fertilizasyon ve kültür sırasında stres koşullarına karşı korumada yer aldığı görülmektedir. Diyet antioksidan stratejileri ile yaşlanmanın önlenmesine odaklanan bir çalışma, SIRT1 aktivitesinin yumurtalık yaşlanma sürecinin düzenlenmesinde önemli rolü olduğuna dair yeni ve dolaylı kanıtlar sağlamıştır (Liu ve ark., 2012). SIRT6, DNA rekombinasyonunu susturan ve böylece yaşam süresini düzenleyen bir kromatin düzenleyicidir. SIRT6'nın kromatin ile ilişkili olduğunu ve bu faktör için eksik olan hücrelerin yüksek düzeyde spontan genomik kararsızlık gösterdiği belirlenmiştir. (Mostoslavsky ve Katrin F. Chua, 2006). Ayrıca, farelerde SIRT6 eksikliği, yaşlanma benzeri dejeneratif süreçlere yol açar. Memelilerde, genomik stabilitenin düzenlenmesi hem tümör baskılanması hem de yaşlanma ile ilişkilendirilmiştir (Lombard ve ark., 2005). Oositlerde SIRT6 yıkımının, DNA hasarını ve apoptozu indüklediği çalışmalarda gösterilmiştir. SIRT6 nın aşırı ekspresyonu telomer uzunluğunu arttırarak, yaşlı fare embriyolarının ömrünü uzattığı ve fenotiplerinde önemli düzelmelere sebep olduğu aynı çalışma içerisinde yer almaktadır (Ge ve ark., 2019). SIRT7 protein seviyesi obez farelerin oositlerinde önemli ölçüde azalır. SIRT7 nakavt fare oositlerinde anormal mayotik yapılar ve bozulmuş olgunlaşma progresyonu gözlemlenmiştir (Gao, et al., 2018).

P53, doğal formunda apoptozun pozitif düzenleyicisi olarak görev alan tümör baskılayıcı gendir. P53 proteini, ısı şoku, hipoksi, ozmotik şok ve DNA hasarı gibi farklı stres uyaranlarına yanıt olarak artan, büyümenin durmasına, apoptoz ve DNA onarımına yol açan bir ana transkripsiyon faktörüdür (Prives ve Hall, 1999). DNA hasarı, artan gen transkripsiyonu ve hücre büyümesinin baskılanmasına ve p53 aracılı hücre döngüsü durmasına yol açan normal olarak hızla degrade olan p53 proteininin stabilizasyonu

yoluyla p53 proteininin toplam konsantrasyonunda hızlı artışa neden olmaktadır. Atretik foliküllerin apoptotik granulosa hücrelerinde p53 proteininin ekspresyonu, atrezideki olası rolünü düşündürür (Hussein, 2005). Ayrıca, p53, SIRT1 aracılı deasetilasyon tarafından düzenlenir. SIRT1 proteini, p53 asetilasyonunu ve p53'e bağlı apoptozu düzenler. Ayrıca Ghafari ve ark. p53 geninin, kontrol noktalarında oositlerin düzenlenmesinde ve seçiminde rol oynadığını, aksi takdirde kaybedilecek olan oositlerin p53 olmadığında veya azaldığında devam edebileceğini gösterdi (Ghafari ve ark., 2009). Pek çok işlevi arasında p53, hücre döngüsünde inhibitör olan p21'in ve proapoptotik bir mitokondriyal gözenek proteini olan BAX'ın transkripsiyonunu destekler (Liu, Yang ve Yang, 2021). Bir başka protein ailesi, BCL-2, intrinsik apoptotik yolun ana düzenleyicisi olarak işlev görür (Danial ve Korsmeyer, 2004). Bir ölüm uyaranının ardından, çok alanlı proapoptotik aile üyeleri, BAX ve BAK proteinleri, mitokondriyal dış zar geçirgenliğini ve Sitokrom c gibi zarlar arası boşluk proteinlerinin salınımını ve akış aşağı apoptotik yolun aktivasyonunu tetikleyen homo ve hetero-oligomerler oluşturur. BAX'ın etkileri, anti-apoptotik BCL-2 tarafından zayıflatılır (Basañez ve ark., 2012).

1.2.Amaç

İnsan yumurtalığındaki leptin, hem granulosa hem de tekal hücre steroidogenezini inhibe etmekte olup ovulasyon sürecine müdahale eder dolayısıyla doğurganlığı doğrudan etkilemektedir. Cinsiyet steroidleri, insülin ve somatotropik eksen, yumurtalık düzeyinde etki etmektedir. Bu nedenle, vücut ağırlığı arttığında bu sistemleri etkileyen işlev bozuklukları, yumurtalıkta fonksiyonel değişiklikler meydana getirmede rol oynayabilmektedir. Bununla birlikte, obezitenin oositi doğrudan etkileyerek kalitesini bozduğuna dair ortaya çıkan kanıtlar bulunmaktadır (Agarwal, 1999). Bu bilgiler göz önüne alındığında tezimin hipotezi; Gebelikte kullanılan leptinin etkisi sonraki nesilde elde edilen oositler üzerinde normale göre daha küçük olmasına, ayrıca gecikmiş mayotik olgunlaşma ve artmış foliküler apoptoz göstermesine neden olmaktadır, şeklindedir. Araştırma sorusu ise; Subkutan olarak enjekte edilen leptin, bir sonraki jenerasyondaki dişi yumurtalarında SIRT ve apoptotik mekanizmada yer alan genler üzerinde herhangi bir etki yaratır mı? şeklinde olmaktadır.

1.3.Önem

Gebe bireylerde embriyonik gelişim sırasında yüksek leptin seviyesi belirlenmiş olup, doğum sonrasında bu seviyenin ani bir şekilde azaldığı belirlenmiştir. Yapılan çeşitli çalışmalarda yüksek leptin seviyesi yağlanma ve obezitede belirlenmiş olup, obez bireylerde görülen infertilitenin temel nedenleri arasında olabileceği de düşünülmektedir. Veriler göz önünde bulundurulduğunda, yüksek leptin seviyesine sahip hamile bireylerin yavrularında, leptin seviyesinin kısırlığa neden olup olamayacağını araştırmak hedeflendi. Bu durumu ortaya koymak için apoptotik yolakta yer alan p53, Bcl-2 ve Bax moleküllerinin seviyesi ile hem infertilitede hem de obezite ve apoptozla olası etkisi bilinen Sirtuin genlerinin (SIRT1, 6 ve 7) ifadelerindeki değişimleri belirleyerek koymayı planlandı. Yapılan bu çalışma ile leptin miktarının bir sonraki jenerasyondaki dişi bireylerin yumurtası üzerindeki etkisine bakılmış olup, bu açıdan literatürde ilk sıralarda yer alacağı düşünülmektedir. Bir sonraki jenerasyonda yumurta korunumu ve gelişiminde etkisi olan SIRT genleri ve infertilite ile alakalı olan apoptotik mekanizma üzerindeki etkisi net olarak araştırıldı. Bu açıdan da literatürde ilk olan yayınlar arasında yer alacaktır. Bu çalışma leptin seviyesinin infertilite ve yumurta kalitesi üzerindeki etkisi genetik parametreler açısından belirlenerek önemli sonuçlar yaratacaktır.

1.4.Varsayımlar

İnsan yumurtalığındaki leptin, hem granüloza hem de tekal hücre steroidogenezini inhibe eder ve ovulasyon sürecine müdahale eder dolayısıyla doğurganlığı doğrudan etkilemektedir. Cinsiyet steroidleri, insülin ve somatotropik eksen, yumurtalık düzeyinde etki eder. Bu nedenle, vücut ağırlığı arttığında bu sistemleri etkileyen işlev bozuklukları, yumurtalıkta fonksiyonel değişiklikler meydana getirmede rol oynayabilmektedir. Bununla birlikte, obezitenin oositi doğrudan etkileyerek kalitesini bozduğuna dair ortaya çıkan kanıtlar bulunmaktadır (Agarwal, 1999). Bu bilgiler göz önüne alındığında hipotezimiz "*Gebelikte kullanılan leptinin etkisi sonraki nesilde elde edilen oositler üzerinde normale göre daha küçük olmasına, ayrıca gecikmiş mayotik olgunlaşma ve artmış foliküler apoptoz göstermesine neden olmaktadır.*" şeklindedir. Araştırma sorusu ise; "*Subkutan olarak enjekte edilen leptin, bir sonraki jenerasyondaki*

dişi yumurtalarında SIRT ve apoptotik mekanizmada yer alan genler üzerinde herhangi bir etki yaratır mı?" şeklindedir.

1.5. Sınırlılıklar

Çalışma süresinin kısıtlı olması, çalışmanın fonlanması ve verilecek olan fonun sınırlı olması çalışmanın temel sınırlayıcıları olarak sayılabilmektedir. Bu nedenden dolayı bakılan parametreler temel hedefler üzerinde seçilmiştir. Bununla birlikte, ikinci jenerasyonda yer alacak olan dişi fareleri deneye alındığından., deney ve kontrol grubu için en az deneye dahil edilecek olan hayvan sayısı uygulandı.

Tanımlar

1. **Fertilizasyon:** Bir yumurtanın sperm tarafından döllenmesi sürecine fertilizasyon denir.
2. **İmplantasyon:** Embriyonun uterusa gömülme işlemine implantasyon denir.
3. **Apoptosis (veya apoptoz):** Programlı hücre ölümüdür.
4. **Granulosa:** Folikülü çevreleyen ve yumurtlamadan sonra lüteal hücrelere dönüşen hücre katmanıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Sistemi

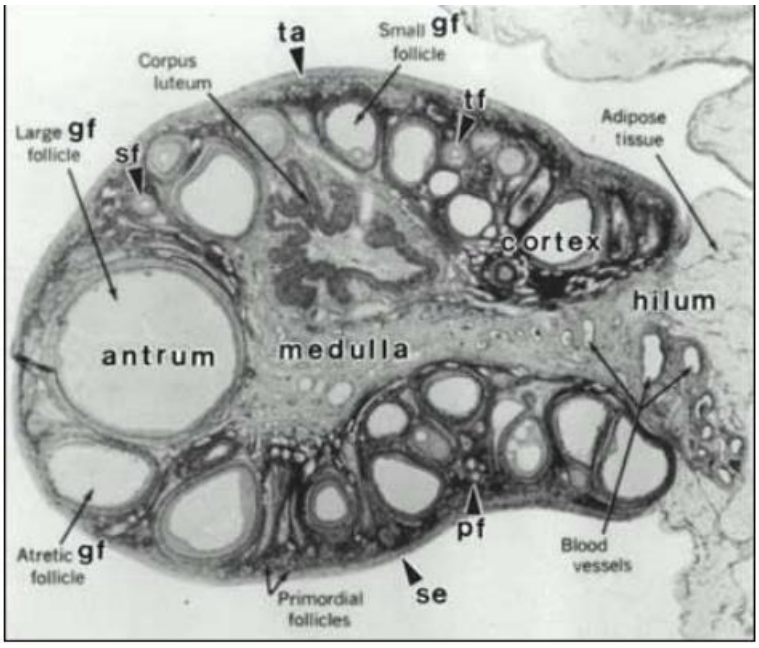
Dişi üreme sisteminde yumurtalık rezervinde oositlerin dışında, folikül ve granulosa hücreleri bulunmaktadır. Oosit etrafında bulunan granulosa hücreleri, sadece fiziki olarak destek sağlamakla kalmamakla beraber oosit içi regülasyonun düzenlenmesinde ve oositin beslenmesinde önemli rol oynayan hücrelerdir. Aynı zamanda granulosa hücrelerinin yaşaması ve farklılaşmasında da oositin büyük rolü vardır. Glikoproteinlerin, streoid hormonlarının ve büyüme hormonlarının gelişmekte olan folikülde üretiminin ve granulosa hücrelerinin proliferasyonunun artması, apoptoza neden olabilmektedir. Granulosa hücrelerindeki bu süreç, oosit maturasyonunu direkt olarak etkilemektedir. Yapılan çalışmalarda; oosit ve embriyo kalitesinin, düşük implantasyon oranlarının sebeplerinin moleküler düzeyde olduğu hala tartışılmaktadır.

Apoptoz, hücre ölümünün kontrollü, programlanmış bir şekilde gerçekleşmesidir. Genel olarak, etrafı canlı hücrelerle çevrilmiş, tek bir hücrede başlamaktadır. Granulosa hücrelerindeki apoptoz foliküler atrezinin bir göstergesidir ve yaşam boyu devam eden bir süreçtir. Apoptoz, atretik foliküllerdeki granulosa hücrelerin azalması ve östrojen üretimindeki düşüş ile tanımlanabilir (Spencer ve ark. 1996; Yuan ve ark. 1997). Granulosa hücrelerindeki apoptoz oranı foliküler sıvıda bulunan reaktif oksijen türlerinin (Reactive oxygen species, ROS) miktarı ile de doğru orantılıdır (Duncan ve ark. 2005). Çalışmalar, granulosa hücrelerinde yüksek apoptotik hücre insidansının tüp bebek sikluslarında kötü prognoza sebep olabileceğini göstermektedir (González-Fernández ve ark. 2010).

Foliküler sıvı, ovulasyon öncesi oositin etrafında gerçekleşen metabolik ve hormonal değişiklikleri yansıtan bir penceredir. Foliküler sıvıdan elde edilen parametreler ile tüp bebek tedavilerindeki fertilizasyon oranları, embriyo klivajları, embriyo morfolojileri ve gebelik oranları belirlenebilmektedir. (Sacha ve ark. 2020). Oosit ve oostin içinde bulunduğu foliküler sıvıdaki hormonlar, büyüme faktörleri, sitokininlerle birlikte bu çevrede var olan granulosa hücreleri ve lökositler, reaktif oksijen türleri (reaktif oxygen species, ROS) ve reaktif nitrojen türleri (reactive nitrogen species, RNS) üretimine neden

olmaktadırlar. Ancak hücrelerin normal olarak fizyolojik aktivitelerini sürdürebilmeleri adına antioksidant kapasitenin dengede olması gerekmektedir (Agarwal ve ark 2017).

Ovaryumlar, uterusun her iki yanında, karın boşluğunda, fallop tüplerinin altında birer adet bulunmaktadırlar. Yaklaşık olarak 3 cm uzunluğunda, badem şeklinde ve 4-8 gram ağırlığındadırlar. Ovaryumun perifer bölgesi korteks veya kortikal bölge olarak adlandırılmaktadır (Şekil. 1). Bu kortikal bölge çok sayıda folikül ve bağ dokusu hücrelerini bir arada bulundurur. Gevşek bağ dokusu, kollajen, geniş kan damarları, lenf damarları ve sinirlerce zengin bir yapı gösterir (Uludağ, 2017).



Şekil 1. Yetişkin Overi (Bloom W, Fawcett DW: A Textbook of Histology. Philadelphia, WB Saunders Company, 1975 adlı kaynaktan alınmıştır)

2.2. Folikül Gelişimi

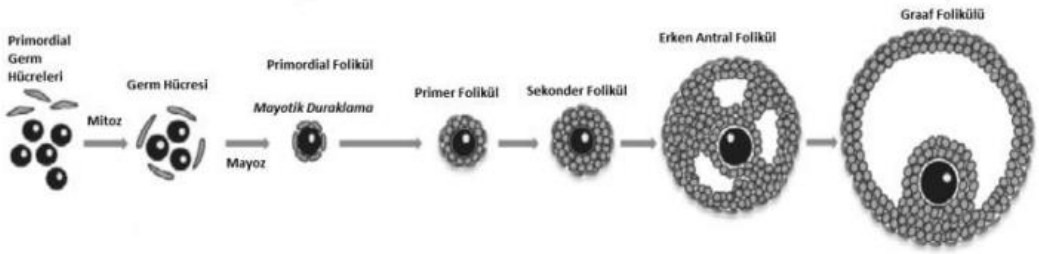
Gelişimin üçüncü haftasının sonunda vitellus (yolk) kesesi duvarında beliren primitif üreme hücrelerinden, dişi ve erkek üreme hücreleri gelişmektedirler. Bu hücreler vitellus kesesinden, ameboik hareketlerle göç ederek, gelişmekte olan gonadlara 4. haftanın sonunda veya 5. haftanın başında ulaşmaktadırlar (Sawler, 2022). Prenatal maturasyon evresi ise primordiyal germ hücrelerinin oogoniumlara farklanması ve içerisinde primer oositi barındıran primordiyal folikülün oluşması süreci olarak adlandırılmaktadır. Ard

arda mitozla çoğalan oogoniumlar kümeler oluşturarak yaklaşık 3.ayın sonunda epitel hücreleriyle çevrelenmektedirler (William ve ark. 2015). Oogoniumların birçoğu mitoz bölünmeye devam ederken, diğer kısmı da primer oositlere farklılaşmaktadırlar. Oluşan primer oositler DNA (deoksiribonükleik asit)'larını bir kat arttırır ve ardından birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girmektedirler. Kısa süre içinde oogoniumların sayısı hızla artarak gelişimin 5.ayına doğru ovaryum içindeki üreme hücrelerinin sayısı maksimuma, yaklaşık olarak 7.000.000'a ulaşmaktadır. Bu aylardan sonra başlayan hücre dejenerasyonu ile, oogoniumların birçoğu ve primer oositler atreziye uğramaktadır. 7. ayda yüzeye yakın yerleşimi olan oogoniumların dışında, çoğu dejenere olmaktadır. Hayatta kalan birincil oositlerin tamamı, mayoz bölünmeye girerek ve her biri tek katlı yassı epitel tabakasıyla çevrelenmektedir. Oluşan primer oosit, çevresindeki epitel hücreleriyle beraber primordiyal folikül olarak bilinir (Edson ve ark. 2009). Primordiyal foliküller, foliküler gelişimin erken safhalarında ve fötal gelişimi takriben ilk üç ay içerisinde baskın olarak bulunmaktadırlar. Foliküllerin büyümesi gonadotropin stimülasyonuna bağlı olmaktadır. Oositin çapı 30µm kadardır ve 1. mayoz bölünmenin profaz safhasında bulunmaktadır. (Pawlina, 2018).

Doğumdan sonra oositin olgunlaşma süreci, postnatal maturasyon olarak adlandırılmaktadır. Doğumda ise tüm birincil oositler, birinci mayoz bölünmenin profaz safhasında bulunmaktadır. Ancak, bölünme metafazla devam etmez. Oositler, çekirdekte bulunan kromatinin düzensiz bir yapılaşma gösterdiği diploten fazında dinlenme dönemine girmektedirler. Puberteye kadar birincil oositler, I. mayoz bölünmenin profaz evresinde (istirahat halinde) kalmaktadırlar. Bu süre içerisinde, oositin olgunlaşması folikül hücrelerinden salgılanmakta olan ve oosit olgunlaşmasını engelleyen eden oosit maturasyon inhibitörü (oocyte maturation inhibitor, OMI) tarafınca baskılanmaktadır. Doğumda ise overlerde bulunan birincil oosit sayısının, yaklaşık olarak 700.000 ve 2.000.000 arasında değişim gösterdiği tahmin edilmektedir. Bu oositlerin büyük çoğunluğu puberteye kadar atreziye uğramaktadır. Puberte başlangıcında ise bu sayı 400.000'e kadar düşmektedir. Ancak 500'den daha az oosit kadının doğurgan periyodu içinde ovulasyonla yumurtalıkların dışına atılmaktadır. (Kark ve ark. 2003).

Pubertenin başlamasıyla, her bir siklusta 5 ile 15 arasında primordial folikül olgunlaşmaya başlamaktadır. Diploten evresinde duraksama halinde bulunan birincil

oosit büyümeye başlar ve oosit etrafındaki yassı epitel hücreleri, kübikleşip çoğalarak, sıralı bir epitel tabaka oluşturur. Oosit etrafında oluşan bu hücrelere granulosa hücreleri denilmektedir. Bu biçimiyle foliküller artık primer follikül olarak adlandırılmaktadır (Şekil. 2; Holesh ve ark. 2017).



Şekil 2. Primordial Germ Hücrelerinden Antral Foliküle (Sánchez ve Smitz, 2012'den değiştirilerek alınmıştır.)

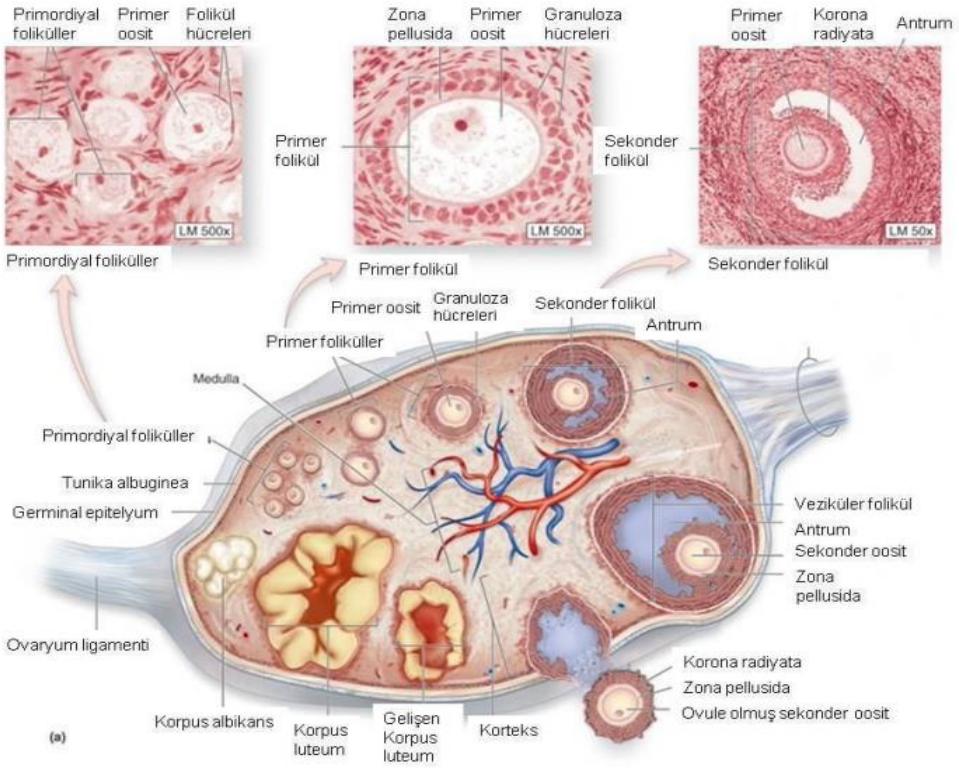
Oosit ve granulosa hücreleri birlikte glikozaminoglikanlar ve glikoproteinlerce zengin olan zona pellusidayı oluşturmaktadır. Foliküllerin büyümesi hipofizden salınan folikül uyarıcı hormon (follicle stimulating hormone, FSH), insülin benzeri büyüme faktörü (insulin-like growth factor-1, IGF-1), epidermal büyüme faktörü (epidermal growth factor, EGF) ve kalsiyum iyonlarının (Ca^{+2}) etkisine bağlıdır (Richards ve ark. 2010).

Oosit çapı artarken bu sırada granulosa hücre sayısı mitozla artmaktadır. Granulosa hücreleri aralarındaki iletişimi gap junctionlar yolu ile kurmaktadırlar. Folikül büyüdükçe ise granulosa hücreleri arasında bulunan boşluklara sıvı birikmeye başlamaktadır. Boşluklar birleşerek daha büyük boşlukları oluşturmaktadır. Bu yapı antrum olarak adlandırılmaktadır. Boşluklarda sıvı biriktiğinde bu foliküle artık sekonder veya antral folikül adı verilmektedir. Foliküler olgunlaşma süresince, granulosa hücre yüzeyinde bulunan mikrovillus sayısında artış olmaktadır.

Folikül büyümesi sırasında granulosa hücreler sayısında artış yaşanırken, bağ dokusuna ait hücreler folikül etrafında yer almaya başlamaktadır. Bu hücreler bol miktarda LH reseptörü içermektedir. 10 mm ve daha büyük çapa ulaşmış foliküllere Graaf folikülü denilmektedir. Bu aşamadan itibaren granulosa hücrelerindeki mitotik aktivitede azalma gözlenirken, granulosa hücre tabakasında incelme, hücreler arası boşlukta ise artış

olmaktadır. Antrum yüzeyi genişlerken bu sırada oosit ile kumulus hücreleri arasında gittikçe gevşeme olmaktadır. Bu olay, folikülün ovulasyon yapabileceğine işaret etmektedir (De Felici ve ark. 2004). İnsanlarda, Gonadotropin salgılatıcı hormon (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) artış ile LH ve FSH seviyesi düzenlenmekte ve bu sayede folikülü ovulasyona teşvik ettiği bilinmektedir. GnRH salınımının pubertede başlaması, hipofizden FSH ve LH salınımını stimüle etmektedir. Bu hipofiz hormonlarının etkisi ile overlerde 28 ile 30 gün süren over siklusu şekillenmektedir. Her siklusta FSH etkisi ile 5 ile 15 adet primer folikül gelişmekte olup, genelde bu foliküllerden bir tanesi olgun hale gelmektedir. Ovulasyon ile overlerden bu olgun oosit atılmaktadır. Geride kalan antral foliküller ise atreziye uğramaktadır (Barbieri ve ark. 2014).

Foliküler atreziden apoptozun sorumlu olduğu düşünülmektedir. O ay hangi folikülün büyüme fazına gireceği ve aralarından hangisinin dominant folikül olarak seçileceği bu şekilde belirlenmektedir (Şekil. 3). Folikül olgunlaşması bu şekilde tamamlanırken, oosit mayoz bölünmeyi bitirmektedir. Oosit membranı ile zona pellucida arasına birinci kutup cismini bırakır. Ovulasyona gitmekte olan folikülde ise oosit II. Mayoz bölünmenin metafazına girmektedir (Zafeiriou ve ark. 2000).



Şekil 3. Folikül Gelişim Aşamaları (Histology: A Text and Atlas, Michael H Ross, 4th edition).

2.3.Foliküler Atrezi

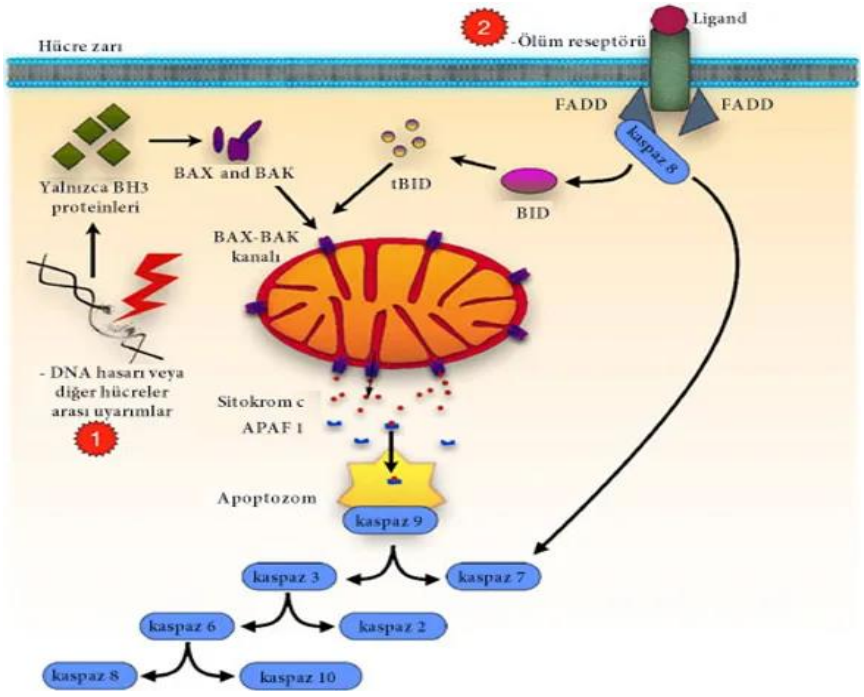
Oosit dejenerasyonu, doğumdan önce başlayarak puberteye kadar artarak devam etmektedir. Dejenerasyon üretken çağda da devam etmektedir. Folikül gelişiminin herhangi bir aşamasında foliküler atrezi başlayabilmektedir. Granulosa hücreleri kılcal damarlar tarafından çevrilip, antral boşluğa dökülmektedir. Teka hücreleri hipertrofiye olur ve bu şekilde oosit kısa zamanda dejenere olmaktadır (Vaskivuo ve ark. 2003).

2.4. Over Folikül Gelişim Aşamalarında Apoptoz

Gametogenezde, kadın üreme hücrelerinde gelişimsel ölümler görülmektedir. Programlanmış hücre ölümü olarak bilinen apoptoz; embriyolojik gelişmeden, büyüme ve farklılaşmaya kadar, hücrelerin ölümünü sağlayan bir mekanizma olarak bilinmektedir (Morita, 1999). Yumurtalıklarda bulunan mevcut foliküller, primordiyal foliküler formasyona girmeden önce dejenerasyon oluşmaya başlamaktadır. Doğuma kadar ise germ hücre sayısında belirgin azalma olmaktadır. Doğumda ise maksimum sayının

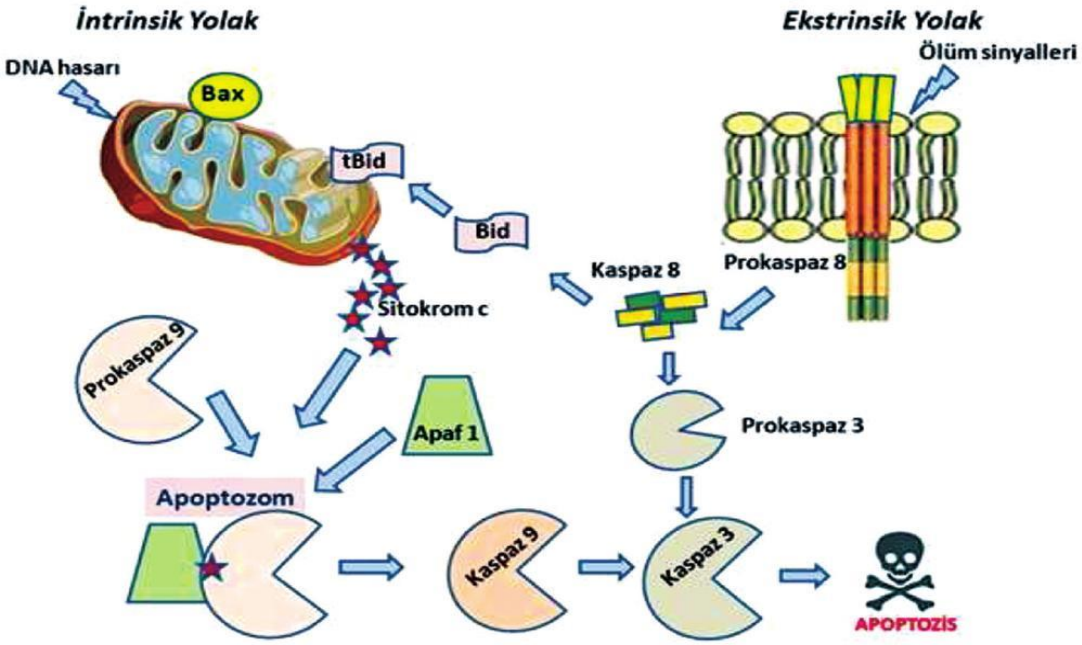
%20'sinden daha az folikül bulunmaktadır. Mevcut foliküllerin %99,9'dan daha fazlası ise menapoza kadar hiçbir zaman ovulasyona uğramamaktadır (Markstrom ve ark. 2002). Gelişen foliküllerin apoptoz ile büyük kısmının azalması ovulasyona tek folikülün ulaşmasını sağlamaktadır. Gelişecek primordiyal foliküllerin seçilmesi, ovulasyon ve lüteinizasyon basamaklarından sonra folikül maturasyonu sağlanmaktadır. Gelişme ve foliküler farklılaşmanın her basamağında atrezi görülebilmektedir. Antral kavite oluştuktan sonra ise folikül FSH'a bağımlı hale gelmektedir. LH pikine cevap veren foliküllerin sayısı ise korpus luteum sayısı ile aynı olmaktadır. LH artışına cevap veren foliküller ovulasyona kadar apoptoza uğramamaktadırlar.

Foliküler atrezi IGF-1, EGF, aktivin gibi parakrin faktörler ve FSH-LH gibi faktörler tarafından regüle edilmektedirler. Granulosa hücrelerindeki apoptoz, protein sentezine ve transkripsiyonuna bağımlı, aktif bir olaydır. Yapılan çalışmalarda, omurgalı overlerinde folikül atrezisinin apoptoz aracılığı ile olduğu gösterilmektedir. Germ hücreleri ve granulosa hücrelerindeki apoptoz fizyolojik veya patolojik sinyallerle başlatılabilir (Markstrom ve ark., 2002). Sürecin başlangıcından sonuna kadar farklı kaspazlar rol almaktadır (Kerr, 2002) (Şekil 4).



Şekil 4. Apoptotik Yolaklar (Glowacki ve ark., 2013)'den uyarlanarak alınmıştır.

Apoptoz mekanizması enerji bağımlı moleküler aktivite kaskadını içerir. Yapılan çalışmalarda, intrensek, eksternsek ve endoplazmik retikulum aracılı olmak üzere üç ana apopitotik yolak olduğu bildirilmiştir. Hücresel stresin kalsiyum (Ca^{+}) salınımı ile mitokondriyal yolağı veya kaspaz-12'yi aktive etmesiyle apoptozu indüklediği görüşü de savunulmaktadır (Yan ve ark., 2005).



Şekil 5. Ekstrensik, İntrensik ve Perforin-Granzim Yolları (Celepli ve ark., 2020)

Ekstrensik, intrensik ve perforin-granzim yolları, aynı ölüm yolunda birleşirler (Şekil 5). Bu yol kaspaz-3'ün prokaspaz-3'ten farklılaşıp aktif hale gelmesi ie başlamaktadır. DNA fragmantasyonu, nükleer proteinlerin ve hücre iskeletinin bozulması, proteinlerin çapraz olarak yer değiştirmesi, fagositik hücre reseptörleri için ligand eksprese edilmesi ve ardından hücrenin fagositler tarafınca ortadan kaldırılması ile sonuçlanmaktadır. Apoptozun düzenlenmesinde, kaspazlar, Bcl-2 ailesi proteinleri, p53 ve ilişkili proteinler rol oynamaktadır. Programlanmış hücre ölümünde üç temel mekanizma bulunmaktadır. Bunlar;

a. Ekstrensek Yolak; Ölüm reseptörleri yolu
b. İntrensek Yolak; Mitokondrial yol
c. Perforin –Granzim Yolu; Granül bağımlı yol

Hücrede ölüm kararı verildiğinde, apoptotik ölüm reseptörlerinin koordinasyonuyla çok sayıda yolak aktive edilir. Bcl-2 ailesi ve kaspaz ailesi en önemli apoptotik düzenleyici faktörlerdir. Kaspaz ailesinin apoptotik sürecin en önemli yöneticisi olduğu düşünülmektedir. Kaspaz aracılığı ile apoptoza yol açan 100'den fazla madde tanımlanmıştır. Sağlıklı foliküllerde kaspaz-3 inaktif şekilde bulunur. Atretik foliküllerde, aktif kaspaz-3 konsantrasyonlarının arttığı gösterilmektedir. Preanatal folikülden preovulatuar foliküle kadar olan atrezide, apoptoz granulosa hücrelerinde başlamaktadır.

Bcl-2 ailesi de anti-apoptotik ve pro-apoptotik üyeleri olan bir ailedir. Proapoptotik faktörlerin salınımını düzenlemektedir. Mitokondriden sitoplazmaya sitokrom c salınımını sağlamaktadırlar. Mitokondri proapoptotik birçok maddenin sitoplazmaya salınımını sağlamaktadır. Sitokrom-c kaspaz-9 aktivasyonunda rol almaktadır. Apoptotik düzenleyicilerin birçoğu mitokondride depolanarak, uyarı geldiğinde salınmaktadır. Apoptotik ölümden sonra oluşan hücresel artıklar ortamdan uzaklaştırılmaktadır. (Kerr ve ark., 2002).

2.5. Leptin Hakkında Genel Bilgiler

Leptin ilk kez 1994 yılında keşfedilmiş olup, obezite geninin 167 aminoasitlik hormonal protein ürününe verilmiş addır (Zhang, 1994). Leptin, 16 kilodalton ağırlıkta, polipeptid yapıya sahip, tek zincirli bir hormondur (Christos ve Mantzoros 1999; Meier ve Gressner 2004).

Leptin Yunanca ince, zayıf anlamına gelen *leptos* kelimesinden türetilmiştir. Asıl olarak beyaz adipoz dokuda üretilirken, kahverengi adipoz dokuda da üretilmektedir. Sinyal peptidi, molekülden ayrıldıktan sonra kan dolaşımına salınmaktadır (Auwerx ve Staels 1998; Barb ve ark. 2001). Leptinin, iştah metabolizması ve enerji dengesi ile ilgili olduğu tanımlanmış ve ardından adipositlerden hipotalamusa feedback mekanizmasıyla etkili bir anti-obezite faktörü olduğu çalışmalarca gösterilmiştir (Zhang ve ark. 1994).

Leptin aynı zamanda karaciğer, mide, meme dokusu, kemik iliği, bağırsak, ovaryum, testisler, iskelet kası, mide ve plasentadan da salınmaktadır. (Meier ve Gressner 2004). Serbest veya proteine bağlı olarak bulunmakta olan leptin aktivitesinden, leptinin serbest

formu sorumlu tutulmaktadır. Obez bireylerde ise serumdaki leptinin büyük çoğunluğu serbest formda bulunmaktadır (Brabant ve ark. 2000; Meier ve Gressner 2004).

Leptinin kemirgenlerde yaklaşık olarak 85, 176 ve 240 kDa'luk olmak üzere 3, insanlarda yaklaşık 176 ve 240 kDA'luk olarak 2 serum makromolekülüne bağlandığı tespit edilmiştir. Bağlayıcı proteinlerin leptin reseptörlerinin eriyebilir formları olduğu düşünülmektedir. Leptin bağlayıcı protein, leptinin biyolojik aktivitesini ve yarı ömrünü düzenler (Houseknecht ve Portocarrero 1998). Leptin özellikle böbrekler olmak üzere aynı zamanda karaciğer gibi iç organlar tarafından atılmaktadır (Zeng ve ark. 1997).

Leptinin plazmadaki konsantrasyonu sabit bulunmamakla birlikte sirkadian varyasyon göstermektedir. Leptin seviyeleri, öğleden sonra yükselmekte ve gece yarısından sonra pik yapıp, gün doğumuna doğru alt seviyelere indiği yapılan bir çalışmada, (Van Aggel-Leijssen ve ark. 1999) bildirilmektedir. Leptinin gece uyku esnasında iştah azaltıcı etkisi olduğu ve bunun gün boyunca alınan gıda ve hiperinsülinemi etkisi ile olabileceği belirtilmektedir (Goumenou ve ark. 2002).

2.6. Leptin ve Metabolik Etkileri

Leptin, metabolik etkilerini merkezi sinir sisteminde, periferik dokularda (akciğer, karaciğer, kalp, pankreas, böbrek, adrenal bezler, ovaryum, uterus, testis vb.) bulunmakta olan reseptörlerle etkileşime girerek göstermektedir (Goumenou ve ark. 2002; Houseknecht ve ark. 1998). Leptin reseptörlerinin asıl etki alanı hipotalamustur. Üreme, büyüme kontrolü ve iştah ile ilişkili hipotalamik alanda bulunmaktadır (Yu ve ark. 1997; Jin ve ark. 1999). Leptin, aynı zamanda yağ hücresi kökenli bir sinyal faktörü olarak da tanımlanmaktadır. Reseptörleriyle etkileşime girdikten sonra, vücut ağırlığı ve enerji tüketiminin kontrolü gibi yanıtları uyardığı gibi, üreme ve nöroendokrin sinyal oluşumunda da rol almaktadır. Kardiovasküler sistem ve üriner sistemin çalışmasına katıldığı gibi, puberte başlangıcının kontrolünde, insülin direncinde ve hipotalamik-hipofizer fonksiyonların regülasyonunda da önemli görev almaktadır (Goumenou ve ark. 2002; Teker ve ark. 2002).

Cinsiyet, leptin düzeyini belirleyen faktörlerden biridir. Vücut kitle indeksi, total yağ dokusu, vücut yağ oranı ve yaşa bağlı olarak dişilerdeki leptin düzeyi erkeklerden daha

fazla olmaktadır (Schwartz ve Seeley 1997). Yağ oranının dişilerde daha fazla ve dağılımının farklı olması, leptin kan seviyeleri daha yüksek olmasının yanısıra, erkeklerde bulunan testosteronun leptin seviyesini baskılamasının bu duruma yol açtığı düşünülmektedir (Himms-Hagen 1999). Leptin, yağ deposunda bir düzenleyici olmakla beraber, aşırı ve yetersiz beslenmeye karşı hayvanların adaptasyonunda önemli bir rol oynamaktadır. Yetersiz, dengesiz beslenen hayvanların plazma leptin düzeyinde hızlı bir düşüş görülürken, reprodüksiyonda kesilme, tiroid aktivitesinde, protein sentezinde ve enerji harcanmasında azalma görülmektedir (Chelikani ve ark. 2004).

İnsanlarda yapılan çalışmalarda, leptin konsantrasyonunun yükselmesinde insülinin akut bir etkisinin olmadığı, yüksek insülin seviyeleri sonrası leptin konsantrasyonunn arttığı bildirilmiştir (D'Adamo ve ark. 1998). *In vivo* sürekli leptin uygulaması, insülin duyarlılığını arttırdığı gibi, *in vitro* olarak adipositlerin ya da iskelet kasının leptine maruz kalması, insülin varlığında ve yokluğunda, glukoz transportunu etkilememektedir (Zierath ve ark. 1998).

Leptin salınımını glukokortikoidlerin arttırdığı, adrenerjik stimülasyonun ise azalttığı bildirilmektedir. Leptinin kronik enjeksiyonu ile kahverengi adipoz dokuda GLUT4'ün düzeyleri ve glukoz kullanımı artarken, beyaz adipoz dokuda GLUT4 düzeyi ve glukoz alını düşmektedir. Bu uygulama ile karaciğer dokusunun insüline duyarlılığı ve insülinle uyarılan glikojen sentezi artmaktadır. Laboratuvar hayvanlarına farklı dozlarda leptin enjeksiyonu yapıldığında glukoz homeostazisini iyileştirdiği gözlenmektedir (Fruhbeck ve ark. 1998). Günlük uygulanan leptin enjeksiyonlarında, ob/ob cinsi farelerde, gıda alımının azaldığı, enerji harcamasının arttığı ve bunlara bağlı olarak bu hayvanlarda belirgin bir şekilde kilo kaybının gözlendiği bildirilmektedir (Kim 1996). Açlık durumunda, vücut ağırlığında önemsiz değişimler olsa da serum leptin seviyelerinin glukoz ve insülin düzeylerindeki azalmayla paralel olarak azaldığı gösterilmiştir. (Morton ve ark. 1999).

2.7. Leptin Sentezi ve Salgısının Düzenlenmesi

Leptin sentezi ve salgısının düzenlenmesi vücuttaki adiposit miktarı ile doğru orantılı olmaktadır. Leptin, yağ yüzdesi ya da vücut kitle indeksinden çok mutlak yağ kitlesi ile ilişkilidir. Dolaşımda saptanan leptin düzeylerinin ise doğrudan adipoz dokuda bulunan

leptin mRNA miktarı ile ilişkili olduğu bildirilmektedir (Bartness ve Bamshad 1998; Baile ve ark. 2000).

Leptin, yağ asitlerinin sentezinde ve alımında da etkilidir. Leptin, in-vitro olarak kullanıldığında, yağ asidi sentezini sınırlayan asetil-CoA karboksilaz ve yağ asidi sentetaz enzimlerinin ekspresyonunu engellediği çalışmalarda gösterilmiştir. Asetil-CoA karboksilazın engellenmesi, malonilCoA'da azalışa neden olur. Bu şekilde yağ asidi alımı arttığı gibi, oksidasyonu da artmaktadır. Kahverengi adipoz dokuda bulunan leptin, lipoprotein lipazın ekspresyonunu da artırmaktadır (Scarpace ve Matheny 1998; Siegrist-Kaiser ve ark. 1997)

2.8. Leptin ve Obezite

Son yıllarda, lipogenezis ve lipolizis ile üreme, büyüme gbi fizyolojik olaylar arasındaki ilişkiler, özellikle laboratuvar ve besi hayvanlarında yapılan önemli güncel araştırmalardandır. Bu fizyolojik olaylar metabolik hormonlardan oldukça etkilenmektedir. Insülin, büyüme hormonu gibi metabolik hormonlar arasında leptinin önemli bir yeri olduğu düşünülmektedir. Vücut ağırlığının dengesi, leptin hormonunun aracılığı ile perifer doku ve hipotalamus arasındaki etkileşimler sonucu gerçekleşmektedir (Baile ve ark. 2000). Leptin beyaz adipoz dokuda sentezlenip, ardından kan dolaşımı ile beyne taşınmaktadır. Leptinin bu metabolik etkileri santral yolla gerçekleşmektedir. Leptin hipotalamusta yiyecek alımı için bir stimulatör görevi gören nöropeptit Y sentezini engellemektedir (Houseknecht ve ark. 1998). Kısa leptin reseptörü aracılığı (Ob-Ra) ile kan-beyin bariyerinden (KBB) geçişini takiben, leptin uzun reseptör izoformuna (Ob-Rb) bağlanarak hipotalamik alana ulaşmaktadır. Spesifik bir sinyal akışını takiben leptin birçok oreksijenik nöropeptidi engellerken, birçok anoreksijenik peptidin etkisini ise artırmaktadır. Yağ depolarındaki azalmayla beraber leptin azalarak, iştahı ve dolayısıyla besin alımını artırır. Leptin seviyesindeki azalma ile gıda alınımı artıp, enerji harcanması azalır. Depolardaki artış ise leptini arttırıp, iştahı keserek besin alınımı azalmış olur. Leptinin artışı ile enerji harcanması besin alınmasını geçer (Karlsson, 2000). Vücut enerji dengesinin düzenlenmesi hem akut hem de kronik sinyallere karşı cevabı aynı zamanda enerji alımı ve enerji harcanmasının düzenlenmesini içermektedir. Kronik sinyaller, fizyolojik ve besinsel durumdaki değişiklikler ve

hastalıklara karşı oluşan yanıt nedeniyle gerçekleşen enerji talebinden kaynaklanmaktadır (Houseknecht ve Portocarrero 1998; Harris 1998). Yapılan çalışamalarda, obez kişilerin kanlarındaki leptin seviyeleri normal kişilere nazaran daha yüksek bulunmuştur (Montague ve ark. 1997). Kan Beyin Bariyeri (KBB)'nde bulunan taşıyıcılarda ve Merkezi Sinir Sistemi (MSS)' nde bulunan reseptör seviyesindeki bozukluklar leptin direncinin oluşmasına sebebiyet vermektedir. Deneylerden elde edilen bulgularla obezitenin, leptininin KBB'ndeki transportunda oluşturduğu bozukluklardan kaynaklandığı düşünülmektedir (Banks 2001).

Obezitenin kadın kısırlığına katkıda bulunduğuna ve yardımcı üreme teknolojilerinin başarısını azalttığına dair ortaya çıkan kanıtlar bulunmaktadır. Çalışma sonuçları tutarsız ve çalışma tasarımları heterojen olsa da kadın obezitesi in vitro fertilizasyondan (IVF) sonra gebelik oranlarında %25-50 azalma ile ilişkilendirilmektedir. IVF uygulanan hastalar için aşırı kilo (özellikle morbid obezite), artan gonadotropin gereksinimleri, daha yüksek iptal oranları, azalmış folikül gelişimi ve oosit sayıları, daha düşük ortalama embriyo dereceleri, daha az embriyo kriyoprezervasyonu, daha düşük implantasyon oranları ve daha düşük canlı doğum oranları ile ilişkilidir (Spicer ve ark., 2000)

2.9. Gonadotrop Salgılanmasının Düzenlenmesinde Leptinin Rolü

Herhangi bir türün hayatta kalması, üreme yeteneğine bağlıdır, aksi takdirde nesli tükenmektedir. Üreme, enerji gerektiren bir süreçtir. Üreme yeteneği, insanlarda farklı yaşlarda başlar, ancak her zaman ilk adet döngüsü ile sonuçlanan bir cinsel olgunlaşma dönemini içerir. Kendilenmiş fare suşlarının çoğunda, ilk yumurtlama 6-8 haftalıkken gerçekleşir, ancak insanlarda ergenlik, dişilerde yaklaşık 12-13 yaşlarında ulaşılmaktadır. Ergenliğin başlangıcı, bir dişinin üreme ömrünün ayırt edici özelliği olsa da gebelik, doğum ve emzirme üreme biyolojisinin dönüm noktasıdır ve fizyolojik olarak en karmaşık ve enerji gerektiren yaşam süreçleri olmaya devam etmektedir.

Bir organizmanın yağ kütlesi, bir enerji depolama rezervuarını temsil etmektedir. Hazırda bekletme veya uyuşukluk dönemlerine maruz kalan organizmalarda, adipoz kütlesinin birikmesi, düşük metabolik hızları sürdürür ve en iyi yer sincaplarında örneklendiği gibi, üreme işlevi için gerekmektedir (Forger ve ark. 1986). Keseli hayvanlar dışında,

memelilerde uyuşukluk hayatta kalmak için bir gereklilik değildir, ancak kritik dönemlerde şişmanlama yeteneği normal fizyolojinin temel bir bileşeni olmaktadır.

Hipotalamusun gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) hücreleri, ergenlik ve yumurtlamayı düzenleyen üreme ekseninin birincil düzenleyicileridir. Beyindeki GnRH üreten hücrelerin çoğu, hipotalamusun preoptik bölgesinde bulunmaktadır. GnRH, hipofiz portal kan damarlarına salgılanarak, gonadotropinleri luteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormonun (FSH) salgılanmasını kontrol etmektedir. Leptinin GnRH sekresyonunun düzenlenmesinde ve nihayetinde üremede önemli bir rol oynadığı hipotezi, çeşitli bulgulardan kaynaklanmaktadır.

İşlevsel bir leptin genine sahip olmayan ob/ob faresi kısırdır ve atrofik üreme organları bulundurmaktadırlar (Cheab ve ark. 1996). Leptin ile tedavi, ob/ob farelerde üreme sistemini gençleştirerek üreme organlarının büyümesine ve işlevine ve gonadotropinlerin salgılanması yoluyla doğurganlığa yol açmaktadır. İnsanlarda, leptin proteini veya fonksiyonel LEPR'leri olmayan hastalar pubertal olgunluğa ulaşamazlar ve düşük serum folikül uyarıcı hormon ve LH seviyelerine sahiptirler (K Clement ve ark. 1998). Kadınlarda adet döngüsünün başlaması ve üreme sisteminin işlevi, kritik bir eşik leptin konsantrasyonunun varlığını düşündürmektedir. Bununla birlikte, preoptik alandaki GnRH nöronları, LEPR-b'yi ifade etmez; bu, leptinin, GnRH nöronlarının üst akışındaki internöronlar üzerinde hareket ederek bu hücreleri dolaylı olarak düzenlediğini göstermektedir (JH Quennell ve ark. 2009).

2.10. Leptin Ve Hipotalamus-Hipofiz-Gonad (HPG) Ekseni

Leptinin hipotalamik düzeyde HPG ekseni üzerindeki uyarıcı etkisinin yanı sıra ön hipofiz üzerinde de doğrudan etkileri bulunmaktadır (Long Jin ve ark. 1999*). Pars tuberalis*'teki gonadotropların neredeyse %90'ı (yani, hipofiz portal sisteminin primer pleksusuna yakın hipofiz bölümü) ve *pars distalis'*teki gonadotropların %30'u *LEPR* ifade etmektedir. Hipofiz doku kültürü çalışmalarından elde edilen sonuçlar, leptinin gonadotroplarda nitrik oksit sentaz aktivasyonu yoluyla LH, FSH ve prolaktin (PRL) salınımında doza bağlı bir artışı indüklediğini göstermektedir (WH Yu ve ark. 1997). Yapılan araştırmalar, LH sekresyonunun kısıtlı beslenmeyle inhibisyonunun leptin tedavisi ile tersine çevrildiğini ve LH sekresyonu ile leptin arasında pozitif bir ilişki

olduğunu göstermektedir (M Amstalden ve ark. 2001; Gwendolyn W Louis ve ark. 2011). Ayrıca, ön hipofiz hücrelerinin %20-25 kadarı, ağırlıklı olarak folikülostellat hücreler ve kortikotroplar, LH/FSH sekresyonu üzerindeki etkisine ek olarak hipofiz hücre büyümesini ve farklılaşmasını düzenlemeye hizmet edebilen leptini eksprese etmektedir. Ek olarak, leptin, NPY ve (veya) POMC hücre gövdelerindeki etkisi yoluyla dolaylı olarak kisspeptin nöronları aracılığıyla aracılık edilebilen GnRH fonksiyonunun düzenlenmesi yoluyla gonadotropin sekresyonunu düzenlemektedir (Gwendolyn W Louis ve ark. 2011).

Leptin seviyelerindeki artış, puberte başlangıcının en erken sinyali olarak gösterilebilmektedir ve HPG ekseninin aktivasyonuna katkıda bulunabilir, bu da seks steroid üretiminin artmasına ve ardından GH/IGF-I ekseninin aktivasyonuna neden olduğu çalışmalarca öne sürülmüştür (Gwendolyn W Louis ve ark. 2011). LEPR eksikliği olan kemirgenler ve insanlarda hipotalamik hipogonadizm bulunmaktadır, bu da gecikmiş ergenlik gelişimi ve kısırlığa neden olmaktadır. Bunlarda atrofik uterin ve yumurtalık boyutu, anormal östrus döngüsü ve bozulmuş meme bezi morfolojisi ve işlevi bildirilmektedir (M Caprio ve ark. 2001). Birlikte ele alındığında, bu çalışmalar leptinin LH sekresyonunu düzenlediğini veya önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir (T Sir-Petermann ve ark. 2001).

Özet olarak, leptin, GnRH nöronal aktivitesini ve salgılanmasını düzenlemek için merkezi olarak hipotalamusta hareket ederek ve ayrıca doğrudan gonadotroplar üzerinde etki ederek, normal üreme fonksiyonunun başlatılması ve sürdürülmesi için gerekli olan gonadotropin hormonlarının salgılanmasını artırır.

Leptin, hipotalamik/hipofiz faaliyetleri yoluyla gonadotropin sekresyonunun kontrolüne katılmakla kalmaz, aynı zamanda dolaşımdaki veya yerel olarak üretilen leptin, yumurtalık fonksiyonunun doğrudan modülasyonunu da sağlayabilmektedir. Leptin proteini, serumda bildirilenlere karşılık gelen konsantrasyonlarla foliküler sıvıda bulunmaktadır. Leptin, leptin transkriptinin erken foliküler aşamalarda saptandığı foliküler gelişimde rol oynarken, leptin proteini sadece olgun foliküllerde ve sonraki luteal fonksiyonda görülmektedir. Ayrıca, insan yumurtalığının granulosa, teka ve interstisyel hücrelerinde *LEPR*'ler tanımlanmıştır (C Karlsson ve ark. 1997). Bunlarda,

birkaç in vitro çalışma, orta-yüksek fizyolojik dozlarla (10 ng/mL'den başlayan) leptin ile tedavinin insan granulosa ve teka hücrelerinde steroidogenezi inhibe ettiğini ve ovule oosit sayısında belirgin bir düşüşe yol açtığı gösterilmektedir (J D Brannian ve ark. 1999). Bu nedenle, yumurtalıktaki yüksek leptin konsantrasyonları östradiol üretimini baskılayabilir ve baskın foliküllerin gelişimini ve oosit olgunlaşmasını engelleyerek anovülasyona yatkınlık oluşturabilmektedir. Bu nedenle, aşırı enerji depolarının olduğu veya obezite ve polikistik over sendromu, leptin gibi metabolik bozuklukların olduğu durumlar gonadlar üzerinde inhibitör etkiye sahip olmaktadır. Bununla birlikte, yeme bozuklukları, egzersizle indüklenen amenore ve fonksiyonel hipotalamik amenore gibi optimal olmayan beslenme durumunda, leptin eksikliği HPG disfonksiyonuna neden olmaktadır. Bu patofizyolojik koşullarda çıkan anormallikler nispi leptin direnci veya eksikliğinin en azından kısmen üreme organlarından sorumlu olabileceği ihtimalini artırmaktadır (I S Farooqi ve ark. 1999).

Olgunlaşan oositlerde ve implantasyon öncesi embriyolarda reseptör aracılı olaylara odaklanan çok az araştırma vardır. Bununla birlikte, leptinin implantasyonda önemli bir rolü olduğu ileri sürülmektedir. Leptin, döngü boyunca progesteron konsantrasyonları ile korelasyon gösterirken, oositlerdeki *LEPR*'ler de oosit olgunlaşmasını ve gelişimini etkileyebilmektedir (Jesse A Craig ve ark. 2005). Fare oositlerinde leptin, fare metafaz II evre oositlerinde majör bir hücre içi leptin sinyal transdüksiyon proteini olan STAT3'ün tirozin fosforilasyonunu indüklemektedir. Ayrıca, *LEPR* ve leptin mRNA'sı özellikle blastosist aşamasında eksprese edilmektedir. Bir insan in vitro modelinde, leptinin, endometriyal epitelyal hücrelerle birlikte kültürlenmiş olsun ya da olmasın, insan blastosistlerinden alınan şartlandırılmış besiyerinde mevcut olduğu gözlenmiştir (R R González ve ark. 2000).

Embriyo kültür ortamında leptin, embriyoların iki hücreli aşamadan, blastos istlere gelişimini desteklemiştir. Günden güne artan leptin sekresyonu, bu molekülün hücre canlılığının bir belirteci olabileceğini düşündürmektedir. Buna paralel olarak leptinin in vitro embriyonik gelişim üzerinde konsantrasyona ve aşamaya bağlı etkileri bulunmaktadır. Bununla birlikte, in vitro olgunlaşma sırasında domuz veya koyun oositlerinin leptine maruz kalması ve IVF'den sonraki embriyo kültürü, kontrollere göre

daha az blastosist oluşumuyla sonuçlandığı yapılan çalışmalarca görülmektedir (C Simón ve ark. 2001).

2.1.1. Sırtuinler

Sirtuinler yaşlanma ile CR (Calori restriction: enerji alımını azaltan diyet rejimidir) ve metabolik sendromun düzenlenmesinde yer alan bir protein ailesi olarak tanımlanmaktadır. Sirtuinler, NAD+ bağımlı deasetilaz ve/veya mono ADP-ribosiltransferaz aktivitesi ile Sir2 mayasının yüksek oranda korunmuş enzim homologları olarak bilinmektedir. Organizmalar üzerinde yapılan çalışmalarda, sirtuinlerin Saccharomyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans ve Drosophila melanogaster'ın uzun ömürlülüğünün düzenlenmesinde kritik öneme sahip olduğunu gösterilmektedir. Ek olarak, Sir2 veya Drosophila Sir2'deki mutasyonlar, bir CR diyetinin yaşam süresi üzerindeki yararlı etkisini bloke ettiği gösterilmektedir (Rogina ve ark. 2004). Bu nedenle, bu organizmalarda sirtuinler, hem uzun ömürlülüğü hem de yaşam süresindeki metabolizmanın rolünü düzenlemede çok önemli olduğu düşülmektedir. Sirtuinlerin glukoneogenez, glikoliz ve insülin sekresyonu ve duyarlılığı üzerinde çeşitli etkileri olduğu bilinmektedir ve ayrıca lipid oksidasyonunu arttırarak lipid metabolizmasında özel bir role sahiptirler.

2.1.1.1. SIRT 1

SIRT1, filogenetik olarak Sir2 mayasına en çok benzeyen, en öne çıkan ve en kapsamlı şekilde çalışılandır. Esas olarak çekirdekte yer alan ve sitozole bazı çevresel sinyalle tetiklenen mekiklerle SIRT1, öncelikle histon deasetilasyonunun katalizi ve transkripsiyon faktörlerinin veya koaktivatörlerin düzenlenmesi yoluyla ömrü uzatma, yaşlanmayı geciktirme ve yaşlanmayla ilgili hastalıkları önleme yeteneği bulundurmaktadır (Watroba ve ark. 2016). SIRT1, birçok dokuda enerji mevcudiyeti durumu ile hücresel fonksiyon arasında bağlantı kuran bir metabolik sensör proteinidir. Hipotalamik SIRT1'in açlıkla indüklenen regülasyonunun leptin eksikliği olan obez farelerde ortadan kalktığı ayrıca SIRT1'in enerji homeostazının beyin aracılı kontrolünde bir rol oynayabileceğini öne sürülmektedir (Kitamura ve ark., 2006). P53'e bağlı transkripsiyonun inhibisyonu yoluyla apoptoz, NF-κB aktivitesinin azalması yoluyla inflamasyon ve PPAR-γ gibi metabolik enzimlerin düzenlenmesi yoluyla enerji

metabolizması gibi biyolojik ve patolojik süreçlerin düzenlenmesinde yer almaktadır (Yeung ve ark. 2004; Tran ve ark. 2014). Yaşlanma ve yaşlanmayla ilişkili hastalıklarda SIRT1 önleme mekanizmaları muhtemelen çeşitlidir ve düzenlenen proteinlere bağlı olduğu düşülmektedir. Ek olarak, SIRT1 endojen seviyeleri, yaşlanmayla ilişkili hastalık gelişimi ile ilişkilidir. Yaşlanma SIRT1'in protein seviyelerini etkilemesinin yanı sıra aktivitesini de etkilemektedir. Beyin, karaciğer, kas ve arterlerde SIRT1 seviyesinde yaşa bağlı azalma gözlenmektedir. SIRT1 eksikliği, yaşlanmaya özgü genlerin ifadesini teşvik etmektedir (Gong ve ark. 2014).

SIRT1, yalnızca granulosa hücreleri (granulosa cell, GC)'nde ve kümülüs hücrelerinde değil, aynı zamanda oositlerde ve teka hücrelerinde de eksprese edilmektedir. Üreme sisteminde SIRT1, foliküler atrezi sırasında GC apoptozunda rol oynayarak, foliküler rezervin korunması ve yumurtalık ömrünün uzatılmasıyla bağlantılı olduğu ifade edilmektedir. Luteinizasyon ve terminal farklılaşma ile ilişkili steroidogenezin aktivasyonunda temel bir faktör olduğu bilinmektedir (Di Emidio ve ark. 2014).

2.1.1.2. SIRT 6

SIRT6 transgenik farelerin uzun ömürlü kemirgenler olduğu bildirilmiştir (Kanfi ve ark. 2012). Aynı zamana yaşa bağlı metabolik işlev bozukluğuna ve iltihaplanmaya karşı korunmaktadır (Roichman ve ark. 2017). SIRT6, Poli (ADP-riboz) polimeraz 1'e (PARP1) bağımlı bir şekilde ve DNA'ya bağımlı protein kinaz (DNA-PK) ile iş birliği içinde DNA onarım yollarını modüle etmektedir. SIRT6, parakuatla işlenmiş hücrelerde DNA onarımını uyarır, böylece oksidatif stres kaynaklı DNA hasarına karşı önemli bir koruyucu enzimi temsil etmektedir (Mao ve ark. 2011). *SIRT6* $^{-/-}$ fare embriyonik fibroblast kök hücrelerinin her ikisi de γ -ışınmasına karşı artmış hassasiyet ve yüksek kromozomal sapmalar sergiler, bu da SIRT6'nın genom bütünlüğünün korunmasında çok önemli bir rol oynadığı anlamına gelmektedir (Mostoslavsky ve ark. 2006).

SIRT6 ağırlıklı olarak DNA hasarının korunmasına yardımcı olan ve baz eksizyon onarımı ve DNA ucu rezeksiyonu ile ilişki yoluyla genomik kararsızlığı baskılayan nükleer kromatinle ilişkili bir proteindir. Fenotipik olarak, SIRT6 eksikliği olan fareler küçük boyutlu olmaktadır ve iki ila üç haftalıkken bir dizi anormallik geliştirmektedir. -lenfopeni, yağ tükenmesi ve dört haftalık ölümle sonuçlanan ciddi metabolik kusurlar

buna dahil edilmektir. Bu bulgular, SIRT6'nın genom stabilitesi ve uzun ömürle ilgili süreçlerde önemli bir rol oynadığını açıkça göstermektedir; ancak, belirli etkileşim mekanizmaları hala belirsizliğini korumaktadır (Mostoslavsky ve ark. 2006).

Ayrıca SIRT6'nın mayotik ilerlemeyi kontrol etmede kilit bir rolü sahip olduğu kanıtlanmıştır ve SIRT6 hedefli morfolino maliyetinden sonra bunun çökmesi, oositlerde iğ morfolojisi ve kromozom hizalamasının neden olmaktadır (Han ve ark. 2015). Bu durumun dışında Han ve arkadaşları, SIRT6'nın oosit deasetilasyonundaki yönetici belirttiler çünkü SIRT6'nın çökmesi, kromatin bozulmasına neden olduğu ve böylece iğ kusurlarına ve kromatin yanlış hizalamayı yaygınlaştırmada bulunduğu varsayılan histon H4K16'nın hiperasetilasyonuna yol açmaktadır. Bu, yetersiz histon deasetilasyonu, daha sonra embriyonik gelişim kusurlarından sorumlu olan oositlerde kromozom yanlış ayrışmasına ve anöploidiye neden olmaktadır. Kesin olarak, fare oositindeki H4K16 hiperasetilasyonu kinetokor fonksiyonunu etkileyerek kusurlu bir mayotik aparat oluşturmaktadır (Franciosi ve ark., 2017).

Pankreatik β hücrelerinde Sirt6, glikozla uyarılan insülin sekresyonu için önemlidir ve SIRT6'nın aktivasyonu, insülin sekresyonunu iyileştirmeye yardımcı olabilir Karaciğerde SIRT6'ya özgü eksiklik, artan glikoliz, trigliserit sentezi ve yağlı karaciğer oluşumu ile sonuçlanmaktadır. İskelet kasında, SIRT6 delesyonu glukoz ve insülin homeostazını bozarak, tüm vücut enerji harcamasını azaltır ve egzersiz performansını zayıflatmaktadır. Ayrıca, SIRT6, kahverengi ve bej yağın termojenezi için gereklidir ve yağ dokularındaki SIRT6 eksikliği, fareleri obeziteye ve ilgili metabolik sendroma yatkın hale getirmektedir. POMC nöronal Sirt6 eksikliği olan farelerde gözlemlenen obez fenotip, kısmen POMC nöronlarındaki bozulmuş leptin fonksiyonlarından kaynaklanmaktadır, bu da artan gıda alımı ve azalan enerji harcaması ile sonuçlanmaktadır (Schwer ve ark., 2010).

2.1.1.3. SIRT 7

Aktif olarak çoğalan hücrelerde, SIRT7 proteini çoğunlukla nükleolar bölgede bulunur ve ribozomal DNA'nın transkripsiyonel regülasyonunda yer almaktadır. SIRT7'nin nükleolar bölgelerden sitozole translokasyonundan kaynaklanan azaltılmış rDNA transkripsiyonu, replikatif yaşlanma ile bağlantısı bulunmaktadır (Tsai ve ark., 2014).

SIRT7 aşırı ekspresyonu, Pol I aracılı transkripsiyonu arttırırken SIRT7 yıkımı, Pol I'in rDNA ile azalmasına ve Pol I transkripsiyonunun azalmasına neden olmaktadır (Ford ve ark., 2006). SIRT7 ifadesinin susturulması hücre proliferasyonunu durdurarak ve apoptozu tetiklemektedir. SIRT7 ayrıca rDNA transkripsiyon faktörü, yukarı akış bağlama faktörü (UBF) ile doğrudan etkileşime girmektedir. Ayrıca SIRT7, mitoz sırasında sikline bağımlı kinaz 1 (CDK1)-siklin B yolu aracılığıyla fosforile edilir ve bu fosforilasyon olaylarının, SIRT7'nin C-terminal bölgesinde konformasyonel modifikasyonları indüklediği bilinmektedir. Son zamanlarda, SIRT7 eksikliği olan farelerin ortalama ve maksimum yaşam sürelerinde bir azalma yaşadığı ve fibroz ve inflamatuar kardiyomiyopati gibi kalp komplikasyonları geliştirdiği çalışmalarca gösterilmektedir (Grob ve ark. 2009. Ayrıca, son çalışmalarda, SIRT7 ekspresyonunun, çok sayıda fare hücre hattının tümörijenez potansiyeli ile ters orantılı olduğunu göstermektedir; SIRT7, ciddi stresli durumlar altında hücre büyümesinin inhibisyonu yoluyla hücrelerin bir dizi kritik metabolik yolu sürdürmesini sağladığı öne sürülmektedir (Vakhrusheva ve ark. 2008).

3. YÖNTEM

3.1. Gereç ve Yöntem

3.1.1. Deney hayvanlarının yetiştirilmesi ve leptinin subkutan olarak uygulanması:

Leptin uygulanan farelerin yavrularının granulosa hücrelerindeki belirttiğimiz genlerin ekpresyonunu araştımak amacıyla, 20±2 gr ağırlığında 10-12 haftalık Balb-c cinsi 14 adet dişi ve 7 adet erkek fare kullanıldı. Maltepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik (MÜHADYEK) kurulunca onaylanan (2022.06.01) bu çalışmada, Balb-C fareler İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsünden temin edildi. Farelerin bakımı ve tüm deneysel prosedürler Maltepe Üniversitesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde (MÜDEHAM) yapıldı. Çalışma süresince fareler 12 saat aydınlık 12 saat karanlık koşullarda laboratuvar pelet yemi ve su devamlı kullanılabilir durumda tutuldu. Dişi balb-c fareler her 2 dişi balb-c fareye 1 erkek balb-c fare olacak şekilde üretime bırakıldı ve gebelikleri izlendi. Dişi balb-c farelerin gebelik takibi vajinal plak oluşumuna göre tespit edildi. Plak izlenimi ardından, her grupta rastgele 7 balb-c gebe fare olacak şekilde kontrol ve deney (leptin) grupları oluşturuldu.

Kontrol grubunda bulunun farelere gebelikleri boyunca subkutan olarak distile su enjekte edildi. Leptin grubunda bulunan farelere ise distile su ile su ile çözündürülen leptin subkutan olarak uygulandı. Daha önce yapılan çalışmalardan yola çıkılarak, iki günde bir olmak üzere 250 mg/kg olacak şekilde leptin farelere enjekte edildi (Levy ve diğerleri., 2014). Doğum gerçekleştikten yaklaşık 7 hafta sonra erkek ve dişi yavrular anneden ayrılıp ayrı ayrı kafeslere konuldu. Dişi yavrular içerisinden rastgele seçilen 7 yavru kontrol; rastgele seçilen diğer 7 yavru da deney (leptin) grubu olarak 10. Haftaya kadar gözetim altında tutuldu. Yavrular 10.haftaya geldiğinde 10 mg/kg ketamin ile anestezi altına alınarak sakrifiye edildi.

3.1.2. İkinci nesil dişi farelerden izole edilen granulosa hücrelerinin toplanması:

Oositler ve etrafındaki granulosa hücrelerinin toplanabilmesi için ovaryum ve tuba uterinalar stereomikroskop altında insülün enjektörü ile disekte edildi. Oosit-kumulus kompleksleri tuba uterinaların dışına çıktı. Ardından mikropipet yardımı ile pipetaj

yöntemi ile oositlerin ve granulosa hücrelerinin birbirlerinden ayrılmaları sağlandı. Elde edilen granulosa hücreleri sonraki aşama olan total RNA izolasyonuna kadar -80°C'de pbs buffer içinde saklandı.

3.1.3. Total RNA izolasyonu:

-80°C'de PBS içerisindeki granulosa örneklerinin çözülmesinin ardından RNA izolasyonu için kit (Nagel-Machery, Almanya) protokolüne göre aşağıdaki basamaklar uygulandı;

1. Örnekler 1850 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Ardından süpernatantı atılarak, pellet çalışmaya devam etmek amacıyla bırakıldı.
2. Pelletin üzerine daha önce hazırlanmış olan örnek başına 3,5 µL β-merkaptoetanol eklenmiş 350 µL lizis buffer eklenerek vortekslendi.
3. Homojenizatın tamamı NucleoSpin mor filtre kolonlarına yüklendi ve kapakları kapatıldı (2 ml'lik toplama tüplerinin içine geçirilir). 11.000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı.
4. Santrifüj aşamasından sonra mor filtre kolonlar atılarak kalan filtrelenmiş sıvıya 350 µL %70'lik etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.
5. Etanol eklenmiş örneğin tamamı NucleoSpin mavi filtre kolonlarına yüklendi ve kapakları kapatıldı (2 ml'lik toplama tüplerinin içine geçirilir). 11.000g'de 30 saniye santrifüj yapıldı.
6. Toplama tüpleri ayrılarak prosedüre mavi kolon ile devam edildi. Mavi filtre kolonları yeni boş bir toplama tüpüne alınarak üzerine 350 µL Membran Disalting Buffer eklendi ve 11.000g'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Filtreden geçen sıvı uzaklaştırıldı.
7. Yıkama aşamasına geçildi:
    - 200 µL Buffer RAW2 mavi spin kolonun üzerine eklendi. 11.000 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Filtreden geçen sıvı uzaklaştırıldı.
    - 600 µL Buffer RA3 mavi spin kolonun üzerine eklendi. 11.000 g'de 30 saniye santrifüj yapıldı. Filtreden geçen sıvı uzaklaştırıldı.
    - 250 µL Buffer RA3 mavi spin kolonun üzerine eklendi. 11.000 g'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Filtreden geçen sıvı uzaklaştırıldı.
8. NucleoSpin mavi filtre kolonları 1,5 ml'lik ependorf tüplerine yerleştirildi ve üzerine 60 µL RNase-Free Water eklendi. 11.000 g'de 1 dakika santrifüj yapılarak RNA

elüsyonları elde edildi. İzole edilen RNA örneklerinden miktar tayini belirlenmesi amacıyla 260 nm'de ölçüm gerçekleştirildi.

3.1.4. Revers transkripsiyon ile komplementer DNA (cDNA) oluşturma

İzole edilen total RNA'lar cDNA Kit (Bioneer, ABD) protokolüne uygun olarak komplementer DNA'ya (cDNA) çevrildi. Bu aşamada izole edilen total RNA'lar, içinde revers-transkriptaz ve magnezyum klorür ($MgCl_2$) bulunan cDNA karışımı bulunan örneklerin toplam hacmi 20 µl olacak hazırlanıp; ilk başta 42^0C'de 60 dakika, daha sonra ise 94^0C'de 5 dakika olacak şekilde PCR işlemi yapıldı. cDNA'ya dönüştürme basamağının ardından gen ekspresyonlarını belirlemek için Real Time Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) basamağına geçildi.

3.1.5. Real-time polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile gen ekspresyonu tayini

cDNA'ya çevirilen her bir örnek optik kapaklı mat PCR tüplerinde (Nest, Güney Kore) 3 tekrarlı olacak biçimde hazırlandı. Her bir örnek tübüne 5 µl cDNA, 5 µl nükleaz free su ve 10 µl SYBR Green Mix konarak RT-PCR başlatıldı. Her örnek için internal kontrol olarak Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) kullanıldı. Örneklerde apoptotik parametre olarak p53, Bcl-2, Bax gen ekspresyonlarına; yumurta kalitesini değerlendirmek için SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 gen ekspresyonlarına bakılarak Cycle Threshold (CT) değerleri elde edildi. Elde edilen CT değerleri kullanılarak her bir örnekte, her bir gen için ΔΔCT değerleri hesaplandı. Gruplar arasında gen parametreleri arasında kaç kat artış ya da azalma olduğu $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak belirlendi. GAPDH ve kalıp olmayan kontrol grubu (no template control, NTC) kullanıldı. 3 tekrarlı hazırlanan örnekler Real-Time-PCR'da (Lightcycler96, ABD) çoğaltıldı. Kullanılan primerler Tablo1'de verildi (Tablo 1).

Örneklere uygulanan RT-PCR aşamaları sırasıyla; 95ºC'de 10 dakika; daha sonra 40 döngü olacak şekilde sırasıyla 95ºC'de 30 saniye; 55ºC'de 1 dakika ve 72ºC'de 1 dakika uygulandı. En son aşamada, erime sıcaklıklarının (melting temprature, Tm) belirlenmesi için 95ºC'de 30 saniye; 55ºC'de 30 saniye ve tekrar 95ºC'de 30 saniye tutuldu.

Tablo 1. Real-Time PCR'da Kullanılan Primerler

Primerin Adı	Forward Primer	Reverse Primer
p53	5'-TGCATGGACGATCTGTTGCT- '3	5'-GTGGAAGCCATAGTTGCCCT- '3
BAX	5'-CGAGCTGATCAGAACCATCA- '3	5'-GAAAAATGCCTTTCCCCTTC- '3
Bcl-2	5'-TAAGCTGTCACAGAGGGGCT- '3	5'-TGAAGAGTTCCTCCACCACC- '3
SIRT1	5'-CTCCACCAGCATTGGGAACT- '3	5'-CGGTGCTGACTCCTCACATT- '3
SIRT6	5'-GAGGGGCTAATGGGAACGAG- '3	5'-GGAGGAGTACAGAGTGGGGT- '3
SIRT7	5'-TCACCCACATGAGCATCACC- '3	5'- CTAATGTCCCCCTCTCCCCA- '3
GAPDH	5'-GTGAAGGTCGGTGTGAACGG- '3	5'-GATGCAGGGATGATGTTCTG- '3

3.1.6. İstatistiksel değerlendirmeler

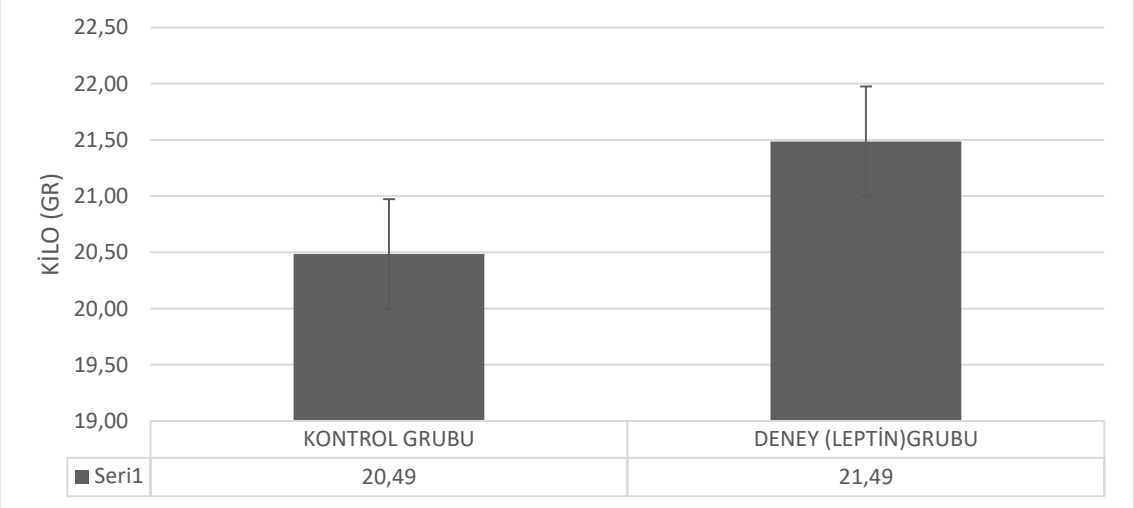
Kolmogorov-Smirnov uygunluk testi kullanılarak değişkenlerin normal dağılımı sağlandı. Tek Yönlü varyans analizi (ANOVA) normal dağılan gruplar arasında karşılaştırmalar; Student t testi de için çoklu karşılaştırmalarda kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen grupları arasındaki karşılaştırmalarda da Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS Statistics 26.0 yazılım paketi kullanılarak gerçekleştirildi. $p<0.01$; $p<0.05$; $p<0.001$ ve $p<0.00001$ gruplar arasındaki anlamlılık düzeyleri; $p>0.05$ ise gruplar arasında fark olmadığını göstermek için kullanıldı. Metin içinde her grupta belirlenen istatistiksel veriler ortalama $\pm$ standart sapma (sd) olarak belirtildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Gebelik döneminde subkutan enjeksiyon olarak leptin uygulanan 12 haftalık, Balb-C farelerin 10 haftalık, dişi 7 yavrusu tez çalışmasının deney grubunu oluştururken; gebelik döneminde subkutan enjeksiyon olarak leptin yerine distile su uygulanan 12 haftalık, Balb-C farelerin 10 haftalık, dişi 7 yavrusu tez çalışmasının kontrol grubunu oluşturmaktadır.

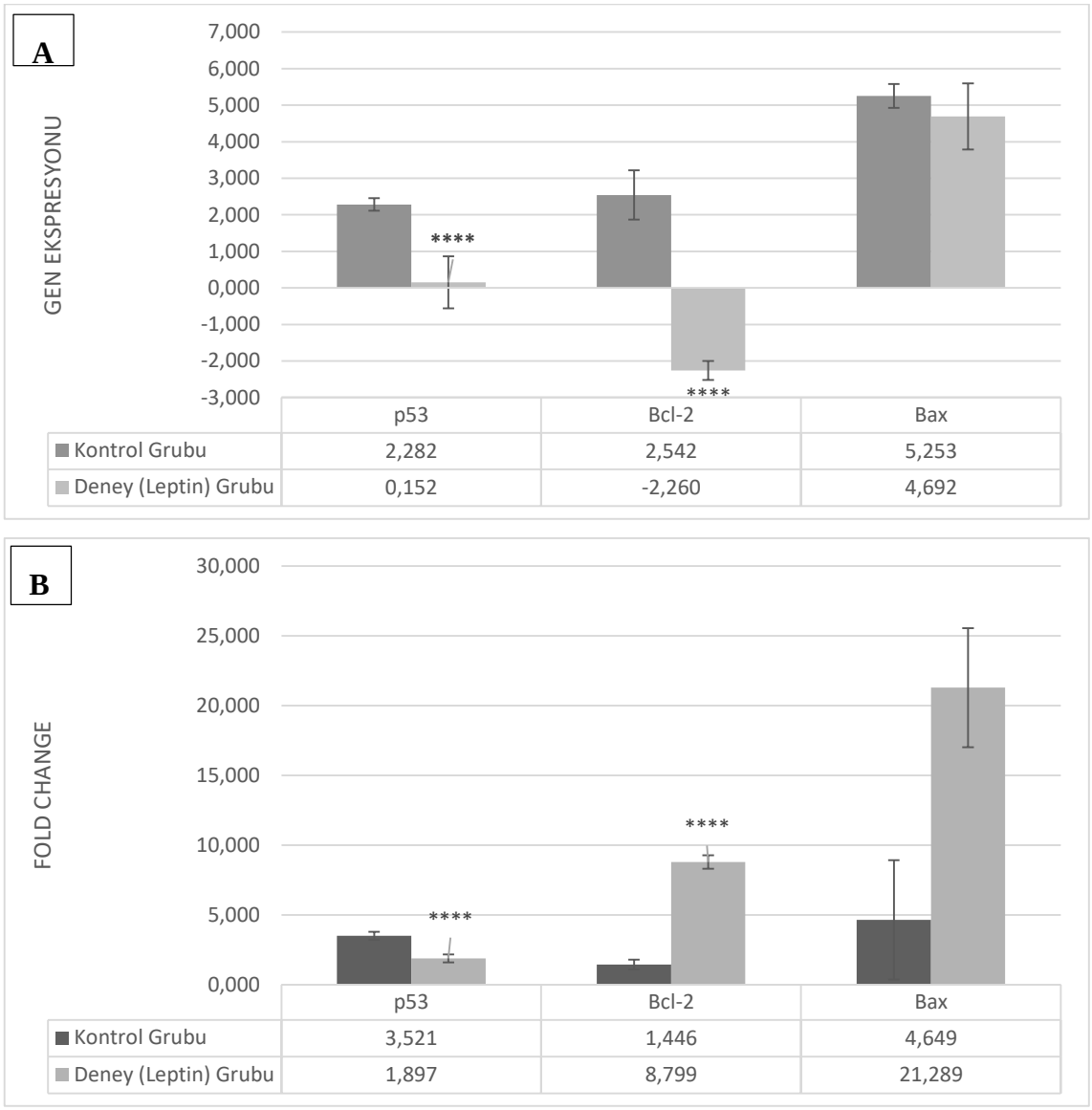
Kontrol grubuna (20.49±0.488) göre deney (leptin) grubunun (21.49±0.488) ağırlığı arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi (p>0.05, Şekil 6).



Şekil 6. Kontrol ve Deney Grupları Arasındaki Kiloların Karşılaştırılması (*p<0.01; **p<0.05; ***p<0.001 ve ****p<0.00001)

p53 gen ekspresyonu açısından kontrol grubuna (2.282±0.171) göre deney (leptin) grubunda (0.152±0.712) istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlendi (p<0.0001, Şekil-7A). Bcl-2 geninin ekspresyonu da kontrol grubuna (2.542±0.672) göre deney (leptin) grubunda (-2.260±0,263) istatiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu belirlendi (p<0.0001, Şekil-7A). Apoptotik yolağın bir diğer parametresi olan Bax gen ekspresyonunda kontrol grubuna (5.253±0.328) göre deney (leptin) grubunda (4.692±0,907) istatiksel olarak anlamlı fark çıkmadı (p>0.05, Şekil-7A).

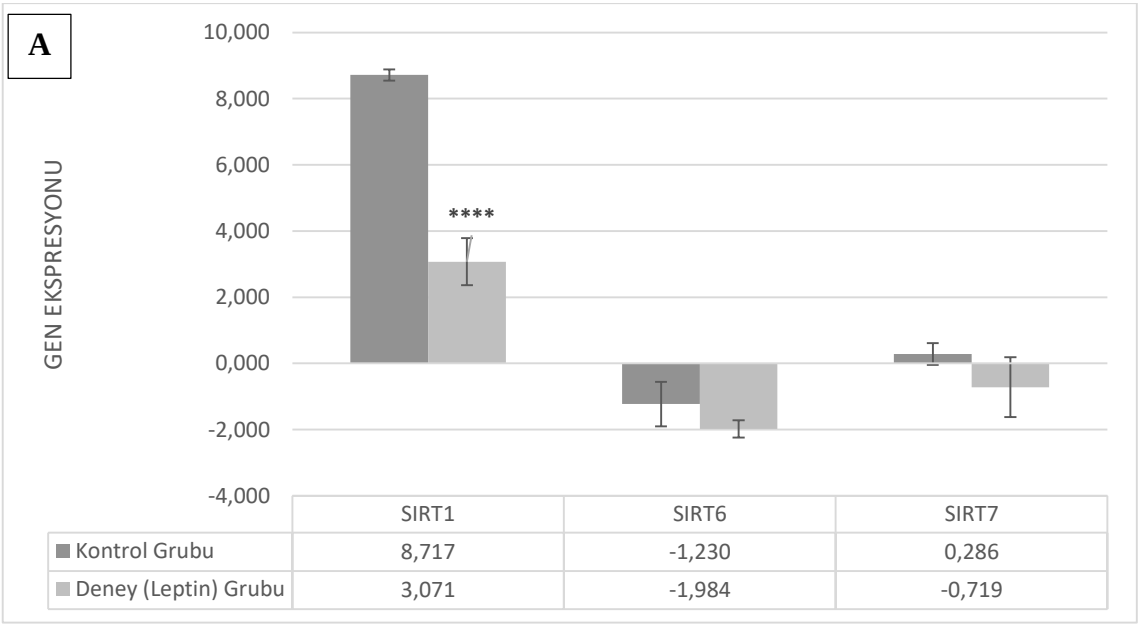
Gruplar arasındaki ekspresyon değişimlerinin azalış ya da artış kat sayıları göz önünde bulundurulduğunda; p53 ile Bcl-2 gen ekspresyonlarında kontrol gruplarına (3.521±0.284; 1.446±0.351) göre deney (leptin) grubunda (1.897±0.284; 8.799±0.485) anlamlı bir katsayı artışı belirlendi ($p<0.0001$, Şekil-7B). Bax gen ekspresyonu da kontrol grubuna göre deney (leptin) grubundaki azalma istatistiksel olarak anlamlı bir derecede olmadı ($p>0.05$, Şekil-7B).

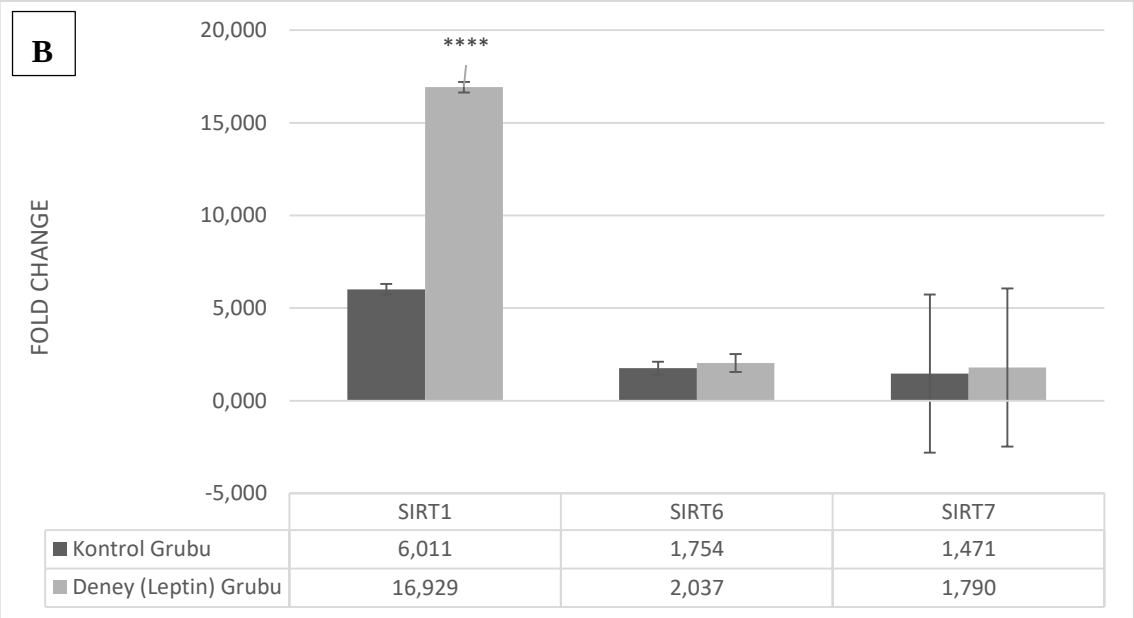


Şekil 7. A. Kontrol ve Deney Grupları Arasında p53, Bax, Bcl-2 Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması. **B.** Kontrol ve Deney Gruplarında Arasında p53, Bax, Bcl-2 Gen Ekspresyonlarının Artış/Azalış Katsayısı Grafiği (*$p<0.01$; **$p<0.05$; ***$p<0.001$ ve ****$p<0.00001$)

Sirtuin genlerinin ekspresyonlarında ise; deney (leptin) grubu (3.071±0.670) kontrol grubuna (8.717±2.912) göre SIRT1 gen ekspresyonunda istatiksel olarak anlamlı derecede azaldı ($p<0.0001$, Şekil 8A). SIRT6 gen ekspresyonu kontrol grubuna (-1.230±0.439) göre deney (leptin) grubunda (-1.984±0.423) istatiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$, Şekil-8A). SIRT7 gen ekspresyonunda kontrol grubuna (0.286±0.548) göre leptin grubunda (-0.719±0.371) istatiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ($p>0.05$, Şekil-8A).

Gruplar arasındaki ekspresyon değişimlerinin azalış ya da artış kat sayıları göz önünde bulundurulduğunda; SIRT1 gen ekspresyonunda kontrol grubuna (6.011±2.760) göre deney (leptin) grubunda (16.930±2.285) anlamlı bir katsayı artışı belirlendi ($p<0.0001$, Şekil-8B). SIRT6 gen ifadesinde kontrol grubuna (1.754±0.456) göre deney (leptin) grubunda (2.037±0.438) istatiksel olarak anlamlı bir katsayı artışı gözlenemedi ($p>0.05$, Şekil-8B). SIRT7 gen ekspresyonunda ise kontrol grubuna (1.471±0.236) göre deney (leptin) grubundaki (1.790±0.290) artış istatiksel olarak anlamlı bir artış olarak bulunmadı ($p>0.05$, Şekil-8B).





Şekil 8. A. Kontrol ve Deney Gruplarında SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması. **B.** Kontrol ve Deney Gruplarında Arasında SIRT1, SIRT6 ve SIRT7 Gen Ekspresyonlarının Artış/Azalış Katsayısı Grafiği (*p<0.01; **p<0.05; ***p<0.001 ve ****p<0.00001)

4.2. Tartışma

Olgun oositin gelişimsel yetkinliği, folikülogenez sırasında ve yumurtlamayı takiben germ hücresini hedef alan negatif ve pozitif sinyallerden kaynaklanır. Negatif sinyaller, yumurtalıkta, yumurta kanalında veya IVF öncesi *in vitro* kültür sırasında oosit yaşlanma süreçlerini desteklemektedir. Oosit, yumurtalık yaşlandıkça yaşlanır. Bu süreç, 'üreme yaşlanması' olarak bilinen kadının yaşına bağlı sürecinin temelini oluşturmaktadır. Oositin dinlenme fazında uzun süre kalmasından ve oosit büyümesi ve son olgunlaşması sırasında yaşlanan yumurtalık mikro ortamına maruz kalmasından kaynaklanabilmektedir (Tatone ve ark., 2008). Memeli oositlerinin yumurtlamadan sonra sınırlı bir döllenme süresi vardır (fare 8-12 saat; insanlar <24 saat). Bu nedenle, döllenmeden önce yumurta kanalında oositin uzun süreli varlığı ve tohumlamadan önceki *in vitro* kültürde IVF, 'postovulatuar yaşlanma' olarak bilinen zamana bağlı bir yaşlanma sürecini indüklemektedir (Lord ve Aitken, 2013). Bu iki yaşlanma fenomeni, hücre döngüsünün bozulmuş kontrolü ve hayatta kalma faktörlerinin bozulması ile ilişkili metafaz II iğ aberasyonları ve hücresel parçalanma gibi benzer oosit fenotipi ile

karakterize edilmektedir (Tatone ve ark., 2006). Ayrıca hem üreme yaşlanması hem de postovulatuar yaşlanmanın, oositleri erken kromozom ayrımına ve anöploidiye yatkın hale getiren hatalı iğ kontrol noktalarına neden olduğu gösterilmektedir. Bu iki yaşlanma süreci aynı zamanda mitokondriyal fonksiyonda bir düşüşe ve oosit yeterliliğinin önemli belirleyicileri olan redoks durumundaki değişikliklere yol açmaktadır (Tatone, 2008; Eichenlaub-Ritter, 2012).

Üreme organizmanın enerjiye ihtiyaç duyduğu fizyolojik bir olaydır. Üreme organlarının sağlıklı çalışabilmesi ve canlıların üreyebilmesi için yeterli beslenmesi gerekir. Yetersiz, sağlıksız beslenme ve enerji açıklığına ya da enerji fazlalığına neden olmaktadır. Böyle durumlarda folikulogenezis, gebelik ve laktasyon gibi üreme işlevlerinde bozulma gerçekleşmektedir. Leptin hipotalamus-hipofizer aksı üzerine etki ederek puberteyi başlatmaktadır (Rene-Gonzalez ve ark. 2000). Ovaryumlardan leptin mRNA' sının izole edilmesi hormonun üremede önemli rol oynayabileceğinin göstergesi olarak görülmektedir (Udagawa ve ark., 2006).

Leptin hormonunun puberteyi başlattığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Steroid hormonu sentezini artırmalarına karşı foliküler gelişimi inhibe ettiğini gösteren çalışmada izole edilen preantral foliküllerde leptinin cAMP düzeyini bloke ederek foliküler gelişimi durduğu ileri sürülmüştür (Kikuchi vd 2001). Almog ve arkadaşları (2001) da leptinin pubertenin başlamasını hızlandırdığı ve Bcl-2/Bax oranını artırarak apoptozu azalttığı bildirilmiştir (Almog vd 2001). Yüksek doz leptin seviyelerinin ovaryumda apoptozu arttırdığı çalışmalarca gösterilmiştir. Yapılan çalışmada yüksek düzey leptin seviyelerinin granulosa hücrelerinde çoğalmayı engellediği ve kaspaz-3 regulasyonunu artırıp, Bcl-2'yi azalttığı ve bu şekilde apoptozu indüklediği gösterilmektedir (Lin vd 2017). Bizim çalışmamızda ise, leptinin ikinci nesil farelerin granulosa hücrelerinde p53 ve Bcl-2 gen ekspresyonlarında kontrol grubuna göre leptin grubunda anlamlı bir azalma gözlendi ($p<0.0001$). Bax gen ekspresyonundaki artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0.05$). Bu durum p53 bağımlı apoptotik yolak tarafından granulosa hücrelerinin apoptoz mekanizmasını indükleyebileceği fikrini oluşturmaktadır. Bir tümör supressor olan p53 ekspresyonundaki azalış hücrelerin proliferasyonunu arttırabileceğini ifade etmektedir. p53 ekspresyonuna ek olarak Bcl-2 gen ekspresyonundaki azalış da bir p53 bağımsız apoptotik yolakta anti-apoptotik yani apoptozu inhibe eden bir genin ekspresyonunu azaldığını göstermektedir. p53 ve Bcl-2 genlerinin ekspresyonlarına ek

olarak SIRT1 gen ekspresyonunun da azalması bize granulosa hücrelerinin ikinci jenerasyonda apoptoza yatkın olduklarını desteklemektedir.

Yumurtalık rezervi, üreme ömrü boyunca yumurtlamayı destekleyen hareketsiz primordial foliküllerin stokunu temsil etmektedir. Primordiyal foliküller, pubertenin başlangıcından sonra meydana gelen primer foliküllerin aktivasyonuna kadar uykuda kalmaktadır. Yumurtalık rezervinin boyutu, ilkel foliküller tükenene kadar folikülojenez yoluyla dejenerasyon ve ilerlemeyi içeren karmaşık dinamik olaylar tarafından kontrol edilmektir (Zhang ve Liu, 2015). Genetik olarak değiştirilmiş fareler, ilkel folikül havuzunun dinamiklerini düzenleyen faktörler arasında, Sirtuin sinyaliyle etkileşime giren genlerin olduğuna dair kanıt sağlamıştır. Bu, baskılanması hızlandırılmış primordiyal folikül kaybıyla sonuçlanan bir SIRT1 ve SIRT3 hedefi olan FOXO3a ve baskılanması folikül dinlenmesini teşvik eden SIRT1 ve SIRT2 etkisi altında olduğu bilinen mTOR sinyali durumudur. Bu bağlamda, ilkel folikül rezervinin düzenlenmesinde mTOR sinyalinin besin durumunu algılama yeteneği ile ilgili olarak kilit bir rolü olduğu öne sürülmektedir (Seli ve ark., 2014; Li ve ark., 2015). Tüm Sirtuin'ler, MII oositinde ifade edilir ve ifadeleri, Sirtuin mRNA'larının oogenez sırasında depolandığını gösteren ilk bölünmeyi takiben kademeli olarak azalmaktadır. Sirtuin inhibisyonu, blastosist oluşumunu, blastosistlerdeki toplam hücre sayısını azaltır ve SIRT2 ve SIRT3 dahil olmak üzere temel genlerin aşağı regülasyonuna neden olmaktadır (Kawamura ve ark., 2010; Kwak ve ark., 2012). Sirtuinler arasında özellikle SIRT1 foliküler atrezi sırasında GC apoptozunda rol oynayarak, foliküler rezervin korunması ve yumurtalık ömrünün uzatılmasıyla bağlantılı olduğu çalışmalarca ifade edilmiştir (Di Emidio ve ark. 2014). Oosit SIRT1 ekspresyonundaki değişiklikler hem reprodüktif yaşlanma hem de yumurtlama sonrası yaşlanma ile ilişkilendirilmiştir (Lord ve Aitken, 2013). Resveratrol ile aktive olan SIRT1 ekspresyonu, tek doz *y*- radyasyonuna maruz kalan sıçanlarda artan AMH seviyeleri ve pro-enflamasyon sinyalinin aşağı regülasyonu ve azalan p53 seviyeleri ile ilişkilendirilmektedir (Liu ve ark., 2016). Hipotalamik SIRT1'in açlıkla indüklenen regülasyonunun leptin eksikliği olan obez farelerde ortadan kalktığı ayrıca SIRT1'in enerji homeostazının beyin aracılı kontrolünde bir rol oynayabileceğini öne sürülmektedir (Kitamura ve ark., 2006). Gebelik döneminde leptin uygulanan gebe farelerin dişi yavrularında gözlenen düşük SIRT1 ekspresyonu yumurta gelişimi, korunumu ve kalitesinde bir azalma olduğunu ve ovaryumu besleyen granulosa

hücrelerinin apoptoza uğradığını göstermektedir. Bu sonuç da az besleyici hücrenin düşük kalite yumurta oluşumunda etkili olabileceği fikrini uyandırmaktadır.

Son zamanlarda, kemoterapi ve radyoterapi tedavilerinin uyguladığı gonadotoksisite, düşük yumurtalık Sirtuin seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Buna göre, Sirtuin uyarıcılarının uygulanması, hayvan modellerinde antikanser tedavilerinin neden olduğu yumurtalık toksisitesine karşı koruma sağlamaktadır (Roness ve ark., 2016). Sıçanlarda, bu tedavilerin neden olduğu yumurtalık hasarı, SIRT1, SIRT3 ve SIRT6 ekspresyonunun azalmasıyla sonuçlanmıştır ve Sirtuin aktive edici stratejiler, yani resveratrol uygulaması veya CR ile dengelenebilmektedir (Said ve ark., 2016; Luo ve ark., 2012). SIRT6 eksikliği bulunan fareler obeziteye ve ilgili metabolik sendroma yatkın hale gelmektedir. POMC nöronal SIRT6 eksikliği olan farelerde gözlemlenen obez fenotip, kısmen POMC nöronlarındaki bozulmuş leptin fonksiyonlarından kaynaklanmaktadır, bu da artan gıda alımı ve azalan enerji harcaması ile sonuçlanmaktadır (Schwer ve ark., 2010). Elde edilen verilere göre obezite ve SIRT6 gen ekspresyonu arasında bir korelasyon olabileceğini düşündürmektedir. Bunun temel nedeni ise kilo açısından da SIRT6 gen ekspresyonu açısından da kontrol ile deney grubu arasında istatistiksel bir fark gözlenmemesidir. SIRT6 gen ekspresyonunda düşüş gözlense de bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Yani gruplar arasında fark yaratacak kadar önemli bir düşüş değildir ki; bu durum gruplar arasındaki gen ekspresyonundaki azalış katsayıları bakımından da önemli bir fark belirlenmemesi tarafından onaylanmıştır diyebiliriz. Bir başka gen parametresi olan SIRT7 daha çok oksidatif stres ve tümör oluşumunda etkilidir. Dolaylı olarak apoptozda yer alan p53 ile ilişkili olan SIRT7 geninin direkt olarak yumurta kalitesi ilebilişkilendiren bir yayın bulunmamaktadır. Buna ek olarak, literatürde leptin ve SIRT7 hakkında sınırlı çalışma yapılmasıyla beraber SIRT7 ifadesinin susturulması hücre proliferasyonunu durdurarak ve apoptozu tetiklediği bildirilmiştir. Elde edilen verilerde, SIRT7 gen ekspresyonu ve katsayısındaki artış gözlenmesine rağmen, istatistiksel olarak bu artış anlamlı olmamıştır. Bu durum da dolaylı olarak apoptoz ile alakalı olan SIRT7'nin ikinci jenarasyonda aynı p53 ve Bcl-2 gibi apoptozun başlamasında etkili olduğunu, ancak başlamamasında da etkili olduğunu göstermektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Leptin hipotalamus üzerinden metabolik olarak kilo alımıyla alakalı olmakla beraber, aynı zamanda da yumurta korunumu ve sağlığı ile alakalı olan bir hormondur. Leptinin sorumlu olduğu mekanizmalardan biri olan obezite kısırlık ve olumsuz üreme sonuçları için bir risk faktörüdür. Literatürde var olan çalışmaların aksine direkt leptinin üreme sağlığı üzerindeki etkiye bakmak yerine bir sonraki nesil üzerinde herhangi bir etkisinin olup olmadığı bu tezin temel konusudur. Çoğu parametre açısından literatürde ilklerin bakıldığı bu çalışmada elde edilen genel sonuçlar şu şekilde listelenebilir.

Elde edilen veriler ile;

1. Gebelik sırasında leptin takviyesi alan gebelerin dişi yavruları kilo alımı açısından etkilenmemektedir.
2. Gebelik sırasında leptin takviyesi alan gebelerin dişi yavruların yumurtalarını besleyen granulosa hücreleri genetik açıdan apoptoza uğrayan ve sayılarını azaltabilecek bir alt yapıya sahip olabilecekleri belirlenmiştir. Yumurta sağlığı ve kalitesinde belirli etkiye sahip olan granulosa hücrelerinin apoptozdan kaçamaması ya da erken apoptoza uğraması yumurta stabilitesine, dayanıklılığına ve kalitesine negatif yönde etkiye sahip olabileceği bulunmuştur.
3. SIRT1 gen ekspresyonu ile p53 arasındaki ilişki ikinci jenarasyonda da körele bir şekilde olduğu gözlendi. SIRT1, p53 ve Bcl-2 gen ekspresyonlarındaki gebelik sırasında leptin takviyesinin ikinci jenerasyonda apoptozu indüklediğini göstermektedir.
4. Yumurta kalitesinin çeşitli hipoksik ortamlarda korunmasının sağlanmasında görevi olduğu düşünülen sirtüin genlerinden SIRT6 ve SIRT7 ile leptinin genetik açıdan direkt olarak bir ilişkisinin olmadığı belirlendi.

Bu tez çalışması ile genetik açıdan leptinin ikinci jenarasyonda da etkilerinin olduğunu, hatta bu etkinin dişilerde üreme (yumurta kalitesi gibi) üzerinde olduğu belirlendi. Leptinin ikinci jenarasyon dişilerin yumurtalarını besleyen granulosa hücrelerinde apoptozdan kaçabilme yeteneği azalttığı ve daha çok hayatta kalma yeteneği kazandırabileceği fikrini yaratmaktadır. Tez çalışmamdan elde ettiğim veriler, leptinin ikinci jenarasyon üzerindeki etkisini, apoptoz üzerindeki etkisini, sirtuin genleri ile olan

ilişkisini ve sirtüin genleri üzerindeki etkisini ortaya koyan; bilimsel literatürde ilkler arasında yer alacak çalışmalar arasında olacağını düşünmekteyim.

KAYNAKLAR

Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A. ve Gupta, S. (2012). The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive biology and endocrinology*, *10*(1), 1-31. Uludağ, S. Z., (2017). IUI Kime,Nasıl, Ne zaman?.

Agarwal, S. K., Vogel, K., Weitsman, S. R. ve Magoffin, D. A. (1999). Leptin antagonizes the insulin-like growth factor-I augmentation of steroidogenesis in granulosa and theca cells of the human ovary. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, *84*(3), 1072-1076.

Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. (1996). Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature*, 382, 250-252.

Auwerx J, Staels B (1998). Leptin. *The Lancet*, 351, 737-742.

Bado A, Levasseur S, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJM (1998). The stomach is a source of Leptin, *Nature*, 394, 790-793.

Baile CA, Della-Fera MA, Martin RJ (2000). Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Ann Rev Nutrition*, 20, 105-127.

Bajoria, R., Sooranna, S. R., Ward, B. S. ve Chatterjee, R. (2002). Prospective function of placental leptin at maternal–fetal interface. *Placenta*, *23*(2-3), 103-115.

Barb CR, Hausmane GJ, Houseknecht KL (2001). Biology of leptin in the pig. *Domestic Anim Endocrinol*, 21, 297-317.

Barbieri R. L. (2014). The endocrinology of the menstrual cycle. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, *1154*, 145–169.

Bartness TJ, Bamshad M (1998). Innervation of mammalian white adipose tissue: implications for the regulation of total body fat. *Am J Physiol*, 275, 1399-1411.

Basañez, G., Soane, L., ve Hardwick, J. M. (2012). A new view of the lethal apoptotic pore. *PLoS biology*, *10*(9), e1001399.

Bennet BD, Solar GP, Yuan JO, Thomas GR (1996). A role for leptin and its cognate receptor in haematopoiesis. *Curr Biol*, 6, 1170-1180.

Boden G, Chen X, Mozzoli M, Ryan I (1996). Effect of fasting on serum leptin in normal human subjects. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 3419-23.

Brabant G, Horn R, Mary M, Wuster U, Schnabel D, Heindenreich F (2000). Free and protein bound leptin are distinct and independently controlled factors in energy regulation. *Diabetologia*, 43, 438-42.

Bruning, J. C., Gautam, D., Burks, D. J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P. C., ... ve Kahn, C. R. (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*, *289*(5487), 2122-2125.

Caprio M, Fabbrini E, Isidori AM, Aversa A, Fabbri A (2001). Leptin in reproduction. *Trends in Endocrinol & Metabol*, 12, 65-72.

Celepli, S., Bigat, İ., Celepli, P. ve Karagin, P. H. (2020). Apoptoz ve apoptotik yolların gözden geçirilmesi. *Ankara: Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu*

Cervero, A., Horcajadas, J. A., Domínguez, F., Pellicer, A., ve Simón, C. (2005). Leptin system in embryo development and implantation: a protein in search of a function. *Reproductive biomedicine online*, *10*(2), 217–223.

Chehab FF, Lim ME, Lu R (1996). Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant Leptin. *Nat Genet*, 12, 318-320.

Chehab, F. F., Lim, M. E., ve Lu, R. (1996). Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nature genetics*, *12*(3), 318-320.

Chelikani PK, Ambrose JD, Keisler DH, Kennelly JJ (2004). Effect of short term fasting on plasma concentrations of leptin and other hormones and metabolites in dairy cattle. *Dom Anim Endocrinol*, 26, 33-48.

Christos S, Mantzoros MD (1999). The role of leptin in human obesity and disease: A review of current evidience. *Ann Intern Med*, 13, 671-680.

Comba A (2014). Farklı koyun ırklarında leptin ve lipit profili düzeylerinin belirlenmesi. (Yayın no. 369827) [Doktora Tezi */ Y. Y. Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı* Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi]. https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/tezSorguSonucYeni.jsp

Combelles, C. M. (2013). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, *56*(10-11-12), 819-831.

Coussens, M., Maresh, J. G., Yanagimachi, R., Maeda, G., ve Allsopp, R. (2008). Sirt1 deficiency attenuates spermatogenesis and germ cell function. *PloS one*, *3*(2), e1571.

D'Adamo M, Buongiorno A, Maroccia E, Leonetti F, Barbetti F, Giaccari A, Zorretta D, Tamburrano G, Sbraccia P (1998). Increased OB gene expression leads to elevated plasma leptin concentrations in patients with chronic primary hyperinsulinemia. *Diabetes*, 47, 10, 625-9.

De Felici, M., Scaldaferri, M. L., Lobascio, M., Iona, S., Nazzicone, V., Klinger, F. G., ve Farini, D. (2004). Experimental approaches to the study of primordial germ cell lineage and proliferation. *Human reproduction update*, *10*(3), 197-206.

Di Emidio, G., Falone, S., Vitti, M., D'Alessandro, A. M., Vento, M., Di Pietro, C., ... ve Tatone, C. (2014). SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. *Human Reproduction*, *29*(9), 2006-2017.

Duggal, P. S., Van der Hoek, K. H., Milner, C. R., Ryan, N. K., Armstrong, D. T., Magoffin, D. A., ve Norman, R. J. (2000). The in vivo and in vitro effects of exogenous leptin on ovulation in the rat. *Endocrinology*, *141*(6), 1971-1976.

Dulloo AG, Stock MJ, Solinas G, Boss O, Montani JP, Seydoux J (2002). Leptin directly stimulates thermogenesis in skeletal muscle. *FEBS Letters*, 515, 109-113.

Duncan, W. C., Gay, E., ve Maybin, J. A. (2005). The effect of human chorionic gonadotrophin on the expression of progesterone receptors in human luteal cells in vivo and in vitro. *Reproduction*, *130*(1), 83-93.

Edson, M. A., Nagaraja, A. K., ve Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews*, *30*(6), 624-712.

Eichenlaub-Ritter, U. (2013). Oocyte ageing and its cellular basis. *International Journal of Developmental Biology*, *56*(10-11-12), 841-852.

Eroschenko, V. P., ve Demir, R. (2013). *Di Fiore'nini histoloji atlası: fonksiyonel ilişkileriyle*. Palme Yayıncılık.

Ford, E., Voit, R., Liszt, G., Magin, C., Grummt, I., ve Guarente, L. (2006). Mammalian Sir2 homolog SIRT7 is an activator of RNA polymerase I transcription. *Genes & development*, *20*(9), 1075-1080.

Friedman JM, Halaas JL (1998). Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature*, 395, 763-70.

Fruhbeck G, Jebb SA, Prentice AM (1998). Leptin: physiology and pathophysiology. *Clin Physiol*, 18, 399-419.

Gambineri, A., Laudisio, D., Marocco, C., Radellini, S., Colao, A., Savastano, S., ve Obesity Programs of nutrition, Education, Research and Assessment (OPERA) group (2019). Female infertility: which role for obesity?. *International journal of obesity supplements*, *9*(1), 65–72.

. Ge, J., Li, C., Li, C., Huang, Z., Zeng, J., Han, L., ve Wang, Q. (2019). SIRT6 participates in the quality control of aged oocytes via modulating telomere function. *Aging*, *11*(7), 1965–1976.

Ghafari, F., Pelengaris, S., Walters, E., ve Hartshorne, G. M. (2009). Influence of p53 and genetic background on prenatal oogenesis and oocyte attrition in mice. *Human reproduction (Oxford, England), 24*(6), 1460–1472.

Glowacki, S., Synowiec, E., ve Blasiak, J. (2013). The role of mitochondrial DNA damage and repair in the resistance of BCR/ABL-expressing cells to tyrosine kinase inhibitors. *International journal of molecular sciences*, *14*(8), 16348-16364.

Gong, H., Pang, J., Han, Y., Dai, Y., Dai, D., Cai, J., ve Zhang, T. M. (2014). Age-dependent tissue expression patterns of Sirt1 in senescence-accelerated mice. *Molecular medicine reports*, *10*(6), 3296-3302.

González-Fernández, R., Peña, Ó., Hernández, J., Martín-Vasallo, P., Palumbo, A., ve Ávila, J. (2010). FSH receptor, KL1/2, P450, and PAPP genes in granulosa-lutein cells from in vitro fertilization patients show a different expression pattern depending on the infertility diagnosis. *Fertility and sterility*, *94*(1), 99-104.

Goumenou AG, Matalliotakis IM, Koumantakis GE, Panidis DK (2002). The role of leptin in fertility. *Eur J Obs & Gyn Reprod Biol*, 106, 118-124,

Grob, A., Roussel, P., Wright, J. E., McStay, B., Hernandez-Verdun, D., ve Sirri, V. (2009). Involvement of SIRT7 in resumption of rDNA transcription at the exit from mitosis. *Journal of cell science*, *122*(4), 489-498.

Guerre-Millo M (2002). Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest*, 25, 855-861.

Haigis, M. C., ve Sinclair, D. A. (2010). Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annual review of pathology*, *5*, 253–295.

Han, L., Ge, J., Zhang, L., Ma, R., Hou, X., Li, B., ... ve Wang, Q. (2015). Sirt6 depletion causes spindle defects and chromosome misalignment during meiosis of mouse oocyte. *Scientific reports*, *5*(1), 1-10.

Harris RBS, Zhou J, Weigle DS, Kuijper JL (1997). Recombinant leptin exchanges between parabiosed mice but does not reach equilibrium. *Am J Physiol*, 272, R1800– R1808.

Hekimoğlu A (2006). Leptin ve fizyopatolojik olaylardaki rolü. *Dicle Tıp Derg*, 33, 4, 259-267.

Hennet, M. L., ve Combelles, C. M. (2012). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International journal of developmental biology*, *56*(10-12), 819–831.

Himms-Hagen J (1999). Physiological roles of the leptin endocrine system: Differences between Mice and Humans. *Crit Rev Cl Lab Sci*, 36, 6, 575- 655.

Holesh, J. E., Bass, A. N., ve Lord, M. (2017). *Physiology*, ovulation.

Houseknecht KL, Portocarrero CP (1998). Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrin*, 15, 457-475.

Hull, K. L., ve Harvey, S. (2001). Growth hormone: roles in female reproduction. *Journal of Endocrinology*, *168*(1), 1-23.

Hussein M. R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human reproduction update*, *11*(2), 162–177.

Igney, F. H., ve Krammer, P. H. (2002). Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer*, *2*(4), 277-288.

Jeanrenaud B, Jeanrenaud R (2002). Nöropetidler ve leptinin besin alımı ve obezitedeki rolü. Editör: Dursun N, *International Textbook of Obesity*, 1 baskı, AND Danışmanlık & Yayıncılık, İstanbul, sayfa 101- 112.

Jin L, Burguera BG, Couce ME, Scheıthauer BW, Lamsan J, Eberhardt NL, Kulig E, Lloyd RV (1999). Leptin and leptin receptor expression in normal and neoplastic human pituitary: evidence of a regulatory role for leptin on pituitary cell proliferation. *J Clin Endocr Metab*, 84, 2903- 2911.

Jungheim, E. S., Schoeller, E. L., Marquard, K. L., Louden, E. D., Schaffer, J. E., ve Moley, K. H. (2010). Diet-induced obesity model: abnormal oocytes and persistent growth abnormalities in the offspring. *Endocrinology*, *151*(8), 4039-4046.

Kamohara S, Burcelin R, Halaas JL, Friedman JM, Charron MJ (1997). Acute stimulation of glucose metabolism in mice by leptin treatment. *Nature*, 389, 74-377.

Kanfi Y, Peshti V, Gozlan YM, Rathaus M, Gil R, Cohen HY (2008a) Regulation of SIRT1 protein levels by nutrient availability. *FEBS Lett.* **582**, 2417– 2423.

Karck ve Keck. (2002). Physiology of ovarian function. *Therapeutische Umschau*, *59*(4), 153-158.

Karlsson C (2000). Leptin-a slimmer's dream that crashed*? J Int F Clin Chem Lab Med*, 12, 1-9.

Kawamura, Y., Uchijima, Y., Horike, N., Tonami, K., Nishiyama, K., Amano, T., ... ve Kurihara, H. (2010). Sirt3 protects in vitro–fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress–induced p53-mediated developmental arrest. *The Journal of clinical investigation*, *120*(8).

Kerr, J. F. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, *181*, 471-474.

Kikuchi, N., Andoh, K., Abe, Y., Yamada, K., Mizunuma, H., ve Ibuki, Y. (2001). Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature and adult female mice. *Biology of Reproduction*, *65*(1), 66-71.

Kim KH (1996). Scientists Sprint to Understand Fat-Busting Protein Leptin. *Purdue News*, 11.

Kirel B, Doğruel N (1998). Yeni bir hormon: Leptin. *Sürekli Tıp Eğt Derg*, 7, 421-423.

Kitamura, T., Feng, Y., Ido Kitamura, Y., Chua, S. C., Xu, A. W., Barsh, G. S., ... ve Accili, D. (2006). Forkhead protein FoxO1 mediates Agrp-dependent effects of leptin on food intake. *Nature medicine*, *12*(5), 534-540.

Klein S, Coppack SW, Mohamed-Ali V, Landt M (1996). Adipose tissue leptin production and plasma leptin kinetics in humans. *Diabetes*, 45, 984–987.

Kwak, S. S., Cheong, S. A., Yoon, J. D., Jeon, Y., ve Hyun, S. H. (2012). Expression patterns of sirtuin genes in porcine preimplantation embryos and effects of sirtuin inhibitors on in vitro embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*, *78*(7), 1597-1610.

Li, L., Fu, Y. C., Xu, J. J., Lin, X. H., Chen, X. C., Zhang, X. M., ve Luo, L. L. (2015). Caloric restriction promotes the reserve of follicle pool in adult female rats by inhibiting the activation of mammalian target of rapamycin signaling. *Reproductive Sciences*, *22*(1), 60-67.

Liu, N., Yang, H., ve Yang, L. (2021). Dual roles of SIRT1 in the BAX switch through the P53 module: A mathematical modeling study. *Computational and structural biotechnology journal*, *19*, 5578–5588.

Lord, T., ve Aitken, R. J. (2013). Oxidative stress and ageing of the post-ovulatory oocyte. *Reproduction*, *146*(6), R217-R227.

Mao, Z., Hine, C., Tian, X., Van Meter, M., Au, M., Vaidya, A., ... ve Gorbunova, V. (2011). SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1. *Science*, *332*(6036), 1443-1446.

Markstrom, E., Svensson, E., Shao, R., Svanberg, B., ve Billig, H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis--dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, *123*(1), 23-30.

McBurney, M. W., Yang, X., Jardine, K., Hixon, M., Boekelheide, K., Webb, J. R., Lansdorp, P. M., ve Lemieux, M. (2003). The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Molecular and cellular biology*, *23*(1), 38–54.

Meier U, Gressner AM (2004). Endocrine regulation of energy metabolism: review of pathobiochemical and clinical chemical aspects of leptin, ghrelin, adiponectin and resistin. *Clin Chem*, 50, 9, 1511-1525.

Montague CT, Farooqi IS, Whitehead JP, Soos MA, Rau H, Wareham NJ, Sewter CP, Digby JE, Mohammed SN, Hurst JA, Cheetham CH, Earley AR, Barnett AH, Prins JB, O'Rahilly S (1997). Congenital leptin deficiency is associated with severe early-onset obesity in humans. *Nature*, 387, 903–908.

Moran O, Phillip M (2003). Leptin: obesity, diabetes, and other peripheral effects- a review. *Pediatr Diabetes*, 4, 101-109.

Morita, Y., ve Tilly, J. L. (1999). Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Developmental biology*, *213*(1), 1-17.

Morton NM, Emilsson V, De Groot P, Pallett AL, Cawthorne MA (1999). Leptin signalling in pancreatic islets and clonal insulin-secreting cells. *Journal of Molecular Endocrinology*, 22, 173-184.

Moschos, S., Chan, J. L., ve Mantzoros, C. S. (2002). Leptin and reproduction: a review. *Fertility and sterility*, *77*(3), 433-444.

Mostoslavsky, R., Chua, K. F., Lombard, D. B., Pang, W. W., Fischer, M. R., Gellon, L., ... ve Alt, F. W. (2006). Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell*, *124*(2), 315-329.

Muoio DM, Dohm GL, Fiedorek FT, Tapscott EB, Coleman RA, Dohn GL (1997). Leptin directly alters lipit partitioning in skeletal muscle. *Diabetes*, 46, 1360-1363.

Muzumdar R, Ma X, Yang X, Atzmon G, Bernstein J, Karkanias G, Barzılai N (2003). Physiologic effect of leptin on insulin secretion is mediated mainly through central mechanisms. *FASEB J*, 17, 1130-1132

Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T (2004) Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* **306**, 2105– 2108.

Newbern, D., ve Freemark, M. (2011). Placental hormones and the control of maternal metabolism and fetal growth. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, *18*(6), 409-416.

Pasquali, R., ve Gambineri, A. (2006). Metabolic effects of obesity on reproduction. *Reproductive biomedicine online*, *12*(5), 542–551.

Pawlina, W., ve Ross, M. H. (2018). *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Pearson KJ, Baur JA, Lewis KN, Peshkin L, Price NL, Labinskyy N, Swindell WR, Kamara D, Minor RK, Perez E, Jamieson HA, Zhang Y, Dunn SR, Sharma K, Pleshko N, Woollett LA, Csiszar A, Ikeno Y, Le Couteur D, Elliott PJ, Becker KG, Navas P, Ingram DK, Wolf NS, Ungvari Z, Sinclair DA, De Cabo R (2008) Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span. *Cell Metab.* **8**, 157– 168.

Pelleymounter M, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Bone T, Collins F (1995). effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*, 269, 540-543.

Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschop MH (2008) Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **105**, 9793– 9798.

Pratley RE, Nicolson M, Bogardus C, Ravussin, E (1997). Plasma leptin responses to fasting in Pima Indians. *Am J Physiol*, 273, E644–E649.

Prives, C., ve Hall, P. A. (1999). The p53 pathway. *The Journal of pathology*, *187*(1), 112-126.

Richards, J. S., ve Pangas, S. A. (2010). The ovary: basic biology and clinical implications. *The Journal of clinical investigation*, *120*(4), 963-972.

Riepsamen, A., Wu, L., Lau, L., Listijono, D., Ledger, W., Sinclair, D., ve Homer, H. (2015). Nicotinamide impairs entry into and exit from meiosis I in mouse oocytes. *PLoS One*, *10*(5), e0126194.

Rogina B, Helfand SL (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**, 15998– 16003.

Roichman, A., Kanfi, Y., Glazz, R., Naiman, S., Amit, U., Landa, N., ... ve Cohen, H. Y. (2017). SIRT6 overexpression improves various aspects of mouse healthspan. *The Journals of Gerontology: Series A*, *72*(5), 603-615.

Roness, H., Kashi, O., ve Meirow, D. (2016). Prevention of chemotherapy-induced ovarian damage. *Fertility and sterility*, *105*(1), 20-29.

Sacha, C. R., Chavarro, J. E., Williams, P. L., Ford, J., Zhang, L., Donahoe, P. K., ... ve Mínguez-Alarcón, L. (2020). Follicular fluid anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations and outcomes of in vitro fertilization cycles with fresh embryo transfer among women at a fertility center. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, *37*(11), 2757-2766.

Sadler, T. W. (2022). *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins.

Said, R. S., El-Demerdash, E., Nada, A. S., ve Kamal, M. M. (2016). Resveratrol inhibits inflammatory signaling implicated in ionizing radiation-induced premature ovarian failure through antagonistic crosstalk between silencing information regulator 1 (SIRT1) and poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1). *Biochemical Pharmacology*, *103*, 140-150.

Sánchez, F., ve Smitz, J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochimica et biophysica acta*, *1822*(12), 1896–1912.

Scarpace PJ, Matheny M (1998). Leptin induction of UCP1 gene expression is dependent on sympathetic innervation. *Am J Physiol*, 275, 259-264.

Schwartz MW, Seeley RJ (1997). Neuroendocrine responses to starvation and weight loss, *New Eng J Med*, 19, 1807-1811

Schwer, B., Schumacher, B., Lombard, D. B., Xiao, C., Kurtev, M. V., Gao, J., ... ve Alt, F. W. (2010). Neural sirtuin 6 (Sirt6) ablation attenuates somatic growth and causes obesity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21790-21794.

Seli, E., Babayev, E., Collins, S. C., Nemeth, G., ve Horvath, T. L. (2014). Minireview: metabolism of female reproduction: regulatory mechanisms and clinical implications. *Molecular endocrinology*, *28*(6), 790-804.

Siegrist-Kaiser CA, Pauli V, Juge-Aubry CE, Boss O, Pernin A, Chin WW, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Burger AG, Zapf J, Meier CA (1997). Direct effects of leptin on brown and white adipose tissue. *J Clin Invest*, 100, 2858-2864.

Sirotkin, A. V., Benčo, A., Tandlmajerová, A., ve Vašíček, D. (2012). Involvement of transcription factor p53 and leptin in control of porcine ovarian granulosa cell functions. *Cell Proliferation,* 45(1), 9-14.

Spencer, S. J., Cataldo, N. A., ve Jaffe, R. B. (1996). Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical & gynecological survey*, *51*(5), 314-323.

Tang B. L. (2016). Sirt1 and the Mitochondria. *Molecules and cells*, *39*(2), 87–95

Tatone, C., Carbone, M. C., Gallo, R., Delle Monache, S., Di Cola, M., Alesse, E., ve Amicarelli, F. (2006). Age-associated changes in mouse oocytes during postovulatory in vitro culture: possible role for meiotic kinases and survival factor BCL2. *Biology of reproduction*, *74*(2), 395-402.

Teker Z, Özer G, Topaloglu K, Mungan NÖ, Yüksel B (2002). Leptin yapı ve fizyolojisi. *Arşiv,* 11, 30-40

Thong FSL, Graham TE (1999). Leptin and reproduction: is it a critical link between adipose tissue, nutrition, and reproduction? *Can J Appl Physiol*, 24, 317-336

Tortoriello, D. V., McMinn, J. E., ve Chua, S. C. (2007). Increased expression of hypothalamic leptin receptor and adiponectin accompany resistance to dietary-

induced obesity and infertility in female C57BL/6J mice. *International journal of obesity*, *31*(3), 395-402.

Tran, D., Bergholz, J., Zhang, H., He, H., Wang, Y., Zhang, Y., ... ve Xiao, Z. X. (2014). Insulin-like growth factor-1 regulates the SIRT 1-p53 pathway in cellular senescence. *Aging cell*, *13*(4), 669-678.

Tsai, Y. C., Greco, T. M., ve Cristea, I. M. (2014). Sirtuin 7 plays a role in ribosome biogenesis and protein synthesis. *Molecular & Cellular Proteomics*, *13*(1), 73-83.

Udagawa, J., Hashimoto, R., Suzuki, H., Hatta, T., Sotomaru, Y., Hioki, K., ... ve Otani, H. (2006). The role of leptin in the development of the cerebral cortex in mouse embryos. *Endocrinology*, *147*(2), 647-658.

ULUDAĞ, S. Z., (2017). IUI Kime,Nasıl, Ne zaman?. *Üreme Endokrinolojisi Teknikleri ve Cerrahisi* (pp.175-177), İstanbul: Nobel Yayın Dağıtım Kitabevi

Vakhrusheva, O., Smolka, C., Gajawada, P., Kostin, S., Boettger, T., Kubin, T., ... ve Bober, E. (2008). Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circulation research*, *102*(6), 703-710.

Van Aggel-Leijssen DPC, van Baak MA, Tenenbaum R, Campfield LA, Saris WHM (1999). Regulation of average 24h human plasma leptin level; the influence of exercise and physiological changes in energy balance. *Int J Obesity*, 23, 151–158.

Wang JL, Chinookoswong N, Scully S, Qi M, Shİ ZQ (1999b). Differential effects of leptin in regulation of tissue glucose utilization in vivo. *Endocrinology*, 140, 2117-2124.

Wang ZW, Zhou YT, Lee Y, Hıga M, Kalra SP, Unger RH (1999a). Hyperleptinemia depletes fat from denervated fat tissue. *Biochem Bioph Res Co*, 260, 653-657

Wątroba, M., ve Szukiewicz, D. (2016). The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Advances in Medical Sciences*, *61*(1), 52-62.

Wood, J. W. (1989). Fecundity and natural fertility in humans. *Oxford reviews of reproductive biology*, *11*, 61-109.

Yan, N., ve Shi, Y. (2005). Mechanisms of apoptosis through structural biology. *Annual review of cell and developmental biology*, *21*, 35.

Yeung, F., Hoberg, J. E., Ramsey, C. S., Keller, M. D., Jones, D. R., Frye, R. A., ve Mayo, M. W. (2004). Modulation of NF-κB-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *The EMBO journal*, *23*(12), 2369-2380.

Yıldız S, Blache D, Çelebi F, Kaya I, Saatçi M, Çenesiz M, Güven B (2003). Effects of short-term high carbohydrate or fat intakes on leptin, growth hormone and luteinizing hormone secretions in prepubertal fat-tailed tuj lambs. *Reprod Dom Anim*, 38, 182-186.

Yu Wh, Kimura M, Walczewska A, Karanth S, Mccann SM (1997). Role of leptin in hypothalamic-pituitary function. *P Natl Acad Sci USA*, 94, 1023-1028.

Yuan, W., ve Giudice, L. C. (1997). Programmed cell death in human ovary is a function of follicle and corpus luteum status. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *82*(9), 3148-3155.

Zafeiriou, S., Loutradis, D., ve Michalas, S. (2000). The role of gonadotropins in follicular development and their use in ovulation induction protocols for assisted reproduction. *The European Journal of Contraception & Reproductive Health Care*, *5*(2), 157-167.

Zeng J, Patterson BW, Klein S, Martin DR, Dagogo-Jack S, Kohrt WM, Miller SB, Landt M (1997). Whole body leptin kinetics and renal metabolism in vivo. *Am J Physiol*, 273, 1102–1106.

Zhang, H., ve Liu, K. (2015). Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. *Human reproduction update*, *21*(6), 779-786.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., ve Friedman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature, 372*(6505), 425-432.

Zierath JR, Frevert EU, Ryder JW, Berggren PO, Kahn BB (1998). Evidence against a direct effect of leptin on glucose transport in skeletal muscle and adipocytes. *Diabetes*, 47, 1-4.

.

ÖZGEÇMİŞ

Merve ERKOÇ

Eğitim

Derece	Yıl	Üniversite, Enstitü, Anabilim/Anasanat Dalı
Yüksek Lisans	2023	Maltepe Ünivesitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Klinik Embriyoloji Anabilim Dalı
Lisans	2015	İstanbul Üniversitesi, Biyoloji
Lise	2011	Rami Atatürk Anadolu Lisesi

İş/İstihdam (Varsa)

2022-halen	Biyolog, Memorial Bahçelievler Hastanesi
2021	Biyolog, Adatıp Kurtköy Hastanesi