



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

**DOKTORA  
TEZİ**

**ÜROGENİTAL SİSTEM KANSERLERİNDE KULLANILAN  
CİSPLATİNİN NEDEN OLDUĞU OVARYUM HASARININ,  
TELOMERLERLE İLİŞKİSİ**

**GÖKÇE NUR ARIK EROL**

**HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**MART 2024**



**ÜROGENİTAL SİSTEM KANSERLERİNDE KULLANILAN CİSPLATİNİN  
NEDEN OLDUĞU OVARYUM HASARININ, TELOMERLERLE İLİŞKİSİ**

**Gökçe Nur ARIK EROL**

**DOKTORA TEZİ  
HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MART 2024**

## ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
  - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
  - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
  - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
  - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,
- aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Gökçe Nur ARIK EROL

07/03/2024

# ÜROGENİTAL SİSTEM KANSERLERİNDE KULLANILAN CİSPLATİNİN NEDEN OLDUĞU OVARYUM HASARININ, TELOMERLERLE İLİŞKİSİ

(Doktora Tezi)

Gökçe Nur ARIK EROL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2024

## ÖZET

Bu çalışmada cisplatinin neden olduğu ovaryum hasarına sikloastrogenolün etkilerinin, foliküler aktivasyon, hücrel proliferasyon, protein sentezi ve apoptoz yolları üzerinden araştırılması hedeflendi. Bu amaçla, gavaj ve intraperitoneal uygulama yapılan kontrol grupları (n=5), sikloastrogenol verilen grup (n=10), cisplatin verilen grup (n=10) ve cisplatin+sikloastrogenol verilen grup (n=10) olmak üzere, 180-200 gram ağırlığındaki 40 adet *sprague dawley* rattan 5 deney grubu tasarlandı. Deneklerden serumdan AMH ve telomeraz enzim seviyesi ölçümü gerçekleştirildi. FOXO3a, PCNA, mTOR, ve Kaspaz 3 proteinleri immünohistokimya metodu ile değerlendirildi. Histomorfolojik değerlendirmeler neticesinde cisplatinin preantral follikül sayılarında azalmaya neden olurken sikloastrogenolün bu azalmayı tolere ettiği görüldü. İmmünohistokimya deneyleri neticesinde cisplatinin FOXO3a ve PCNA tutulumunda azalmaya neden olurken sikloastrogenol bu azalmaları tolere ettiği gözlemlendi. mTOR immünohistokimya deneyleri neticesinde uzun dönem cisplatin uygulamasının oosit nükleusunda veziküler yıkıma ve disorganizasyona neden olduğu, sikloastrogenol uygulanan gruplarda ise oosit nükleuslarında veziküler tutulumda artış olduğu belirlendi. Bu duru sikloastrogenolün, protein sentezini artırmasıyla ilişkilendirildi. Apoptoz belirteci olan Kaspaz 3 immünohistokimya deneyleri neticesinde ise cisplatinin kaspaz 3 tutulumunu artırdığını, sikloastrogenolün ise anti-apoptotik etki gösterdiği belirlendi. Real-time PCR ile telomer uzunluğu ölçümü sonucunda, cisplatinin telomerlerde kısaltmaya neden olduğu, sikloastrogenolün ise hem telomeraz enzim aktivitesinde artış sağlayarak hem de telomerlerde uzama sağlayarak etki ettiği görüldü. Sonuç olarak cisplatinin düşük doz ve uzun dönem uygulanmasının ovaryum morfolojisi ile folikül sayı ve yapısında dejeneratif etki gösterdiği, ve kısa dönem düşük doz uygulanan CAG'ın ise proflaktik özellik sergilediği belirlendi.

Bilim Kodu : 1033  
Anahtar Kelimeler : Ovaryum, Cisplatin, Sikloastrogenol, Telomer, Folikülojenesis  
Sayfa Adedi : 112  
Danışman : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

THE RELATIONSHIP BETWEEN OVARIAN DAMAGE CAUSED BY CISPLATIN  
USED IN UROGENITAL SYSTEM CANCERS AND TELOMERES

(Ph. D. Thesis)

Gökçe Nur ARIK EROL

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

March 2024

ABSTRACT

In this study, we aimed to investigate the effects of cycloastrogenol on ovarian damage caused by cisplatin through follicular activation, cellular proliferation, protein synthesis and apoptosis pathways. For this purpose we used sprague dawley rats (n=40) and designed 5 experimental groups; gavage and intraperitoneal injection groups (n=5), cycloastrogenol group (n=10), cisplatin group (n=10) and cisplatin+cycloastrogenol group (n=10). We measured AMH and telomerase enzyme levels in the serum of experimental animals. We evaluated FOXO3a, PCNA, mTOR, and caspase 3 proteins by immunohistochemistry method. As a result of histomorphological evaluations, we found that cisplatin caused a decrease in the number of preantral follicles, while cycloastrogenol tolerated this decrease. As a result of immunohistochemistry experiments, we observed that cisplatin caused a decrease in FOXO3a and PCNA expressions, while cycloastrogenol tolerated these decreases. As a result of mTOR immunohistochemistry experiments, we determined that long-term cisplatin application caused vesicular destruction and disorganization in the oocyte nuclei, while there was an increase in vesicles in the oocyte nuclei in the groups administered cycloastrogenol. We associated this with the protein synthesis-enhancing activity of cycloastragenol. As a result of the Caspase 3 immunohistochemistry experiment, which is a marker of apoptosis, we determined that cisplatin increased the expression of caspase 3, while cycloastrogenol had an anti-apoptotic effect. As a result of telomere length measurement with real-time PCR, we found that cisplatin causes shortening of telomeres, while cycloastrogenol acts by both increasing telomerase enzyme activity and lengthening telomeres. As a result, we determined that low-dose and long-term application of cisplatin has a degenerative effect on ovarian morphology, follicle number and structure, and short-term, low-dose CAG has prophylactic properties.

Science Code : 1033  
Key Words : Ovary, Cisplatin, Cycloastrogenol, Telomere, Folliculogenesis  
Page Number : 112  
Supervisor : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

## TEŞEKKÜR

Başta Anabilim Dalımızın değerli başkanı Prof. Dr. Çiğdem ELMAS olmak üzere, danışmanım, Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na, bölümümüzün hocaları, Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU'na , Dr. Öğr. Üyesi Zeynep YIĞMAN'a , Dr. Öğr. Üyesi Duygu DAYANIR'a ve Dr. Öğr. Üyesi Süheyla Esra ÖZKOÇER'e, ve beni her zaman destekleyen, kıymetli hocam, Doç Dr. Cemile Merve Seymen'e,

Deney gruplarımın tasarlanmasından, malzeme alıma kadar her aşamada kıymetli fikirlerini benimle paylaşan, Tıbbi Biyolojinin değerli hocası, Prof. Dr. Atiye Seda YAR SAĞLAM'a,

Yol arkadaşlarım, Arş. Gör. Asiye Aslı EMNİYET SERT, Arş. Gör. Deniz İrem BULUT Arş. Gör. Pınar KAÇAMAK ve başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma,

Anneme, babama, kardeşlerime, torunlarına öğrenmeyi sevdiren Tarih Öğretmeni dedem İsmail ARIK'a, doktora eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, eşim Uzm.

Dr. Süleyman EROL'a, hayat ışığım, motivasyon kaynağım, Bilge Doğa EROL'a,

Türk kadınının ışıkla, bilgi ve kültürle, gerçek faziletle, süslenip, donanmasını sağlayan Ulu Önderimiz Mustafa Kemal ATATÜRK'e,

Ve tezimi , TGA-2022-7945 kodlu BAP projesi dahilinde hazırlamama imkan sunan Gazi Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri birimine , teşekkür ederim.

Gökçe Nur ARIK EROL

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ÖZET .....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER .....	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİ.....	5
2.1. Ovaryum Embriyolojisi.....	5
2.1.1. Oogenezis .....	5
2.2. Ovaryum Anatomisi .....	6
2.3. Ovaryum Histolojisi .....	7
2.4. Folikülogenezis .....	8
2.4.1. Ovulasyon.....	11
2.5. Telomer; Tarihi, Yaşlanmayla İlişkisi ve Moleküler Yapısı.....	13
2.6. Tarihi, Yaşlanmayla İlişkisi .....	13
2.7. Telomerin Moleküler Yapısı .....	15
2.8. Telomeraz ve Ovaryum ilişkisi .....	17
2.9. Kanser Tedavisinde Cisplatin .....	18
2.10. Cisplatin ve Ovaryum .....	18
2.11. Cisplatinin Farmakolojisi ve Moleküler Etki Mekanizması .....	19
2.12. Cisplatin ve Oksidatif Stres.....	19

	<b>Sayfa</b>
2.13. Cisplatin Apoptozisi İndüklemektedir .....	20
2.14. Cisplatin ve Mitojen-Aktive Protein Kinaz (MAPK) İlişkisi .....	20
2.15. Cisplatin ve PCNA .....	20
2.16. Cisplatin ve PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı.....	22
2.17. Cisplatin ve FOXO3.....	24
2.18. Sikloastrogenol (CAG).....	26
2.19. CAG'ın Anti-Aging Etkisi .....	27
2.20. CAG'ın Anti-İnflamatuar Etkisi .....	27
2.21. CAG'ın Farmakokinetik Etki Mekanizması .....	28
2.22. CAG'ın Toksikolojisi.....	28
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM .....</b>	<b>29</b>
3.1. Histokimyasal Metod .....	30
3.2. İmmünohistokimyasal Metod.....	30
3.3. AMH ve Telomeraz Aktivitesi Ölçümü için ELİZA Metodu .....	31
3.4. Telomer Uzunluğu için Real Time PCR Metodu.....	32
3.4.1. DNA izolasyonu .....	32
3.4.2. Real-time PCR.....	32
3.4.3. Telomer uzunluğunun hesaplanması .....	35
3.5. Folikül sayımı.....	37
3.6. İstatistiksel Analizler.....	37
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>39</b>
4.1. Hematoksilen Eozin Bulguları .....	39
4.2. PCNA İmmünohistokimya Boyama Bulguları .....	54
4.3. FOXO3a İmmünohistokimya Boyama Bulguları .....	58
4.4. mTOR İmmünohistokimya Boyama Bulguları .....	62
4.5. Caspaz-3 İmmünohistokimya Boyama Bulguları .....	69

	<b>Sayfa</b>
4.6. AMH ELİZA Bulguları.....	76
4.7. Telomeraz Enzimi ELİZA Bulguları.....	76
4.8. Real Time PCR ile Telomer Uzunluğu Ölçümü .....	77
5. TARTIŞMA .....	79
6. SONUÇ .....	91
KAYNAKLAR .....	93
EKLER.....	109
ÖZGEÇMİŞ .....	112

## ÇİZELGELERİN LİSTESİ

<b>Çizelge</b>	<b>Sayfa</b>
Çizelge 3.1. Deney grupları .....	29
Çizelge 3.2. Real-Time PCR için kullanılan kit .....	33
Çizelge 3.3. Master mix bilgileri .....	33
Çizelge 3.4. Real-Time PCR için kullanılan reaksiyon koşulları .....	33
Çizelge 3.5. PCR master mix bilgileri .....	34
Çizelge 3.6. Reaksiyon koşulları .....	35

## ŞEKİLLERİN LİSTESİ

<b>Şekil</b>	<b>Sayfa</b>
Şekil 2.1. Telomer tarihi .....	15
Şekil 2.2. mTOR ribozom biogenezi hücresel yolağı .....	24
Şekil 2.3. FOXO3a hücre içi sinyal yolları .....	26
Şekil 3.1. Real-Time PCR sonunda elde edilen amplifikasyon ve melting curve grafikleri.....	34
Şekil 3.2. Amplifikasyon ve melting curve .....	35
Şekil 4.1. Gruplar arası primordiyal folikül sayısı grafiği. ....	51
Şekil 4.2. Gruplar arası primer folikül sayısı grafiği. ....	52
Şekil 4.3. Gruplar arası Sekonder folikül sayısı grafiği.....	53
Şekil 4.4. Gruplar arasında atreziye giden folikül sayıları.....	54
Şekil 4.5. PCNA immünreaktivitesinin gruplar arasında ki dağılımı. ....	58
Şekil 4.6. FOXO3a immünreaktivitesinin gruplar arasında ki dağılımı. ....	62
Şekil 4.7. mTOR immünreaktivitesinin gruplar arasında ki dağılımı.....	69
Şekil 4.8. Caspaz 3 immünreaktivitesinin gruplar arasında ki dağılımı. ....	75
Şekil 4.9. Independent-Samples Kruskal-Wallis test sonucuna göre, Serum AMH seviyeleri ölçümü (ng/ml).....	76
Şekil 4.10. Independent-Samples Kruskal-Wallis test sonucuna göre, telomeraz enzim seviyeleri ölçümü (ng/ml). ....	77
Şekil 4.11. Gruplar arası telomer uzunluğu Real – Time PCR grafiği. ....	78

## RESİMLERİN LİSTESİ

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 3.1. Sakrifiye edildikten sonra ovaryum dokuları.....	30
Resim 4.1. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), antral folikül (AF), korpus luteum (CL) ve medulla (M) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40). .....	39
Resim 4.2. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı ok), tunika albuginea (↑, sarı), preantral folikül (PAF), antral folikül (AF), foliküler atrezi (FA), granüloza hücresi ({}), zona pellusida (»), kırmızı) ve teka tabakaları (↘, mavi) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200). .....	40
Resim 4.3. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde primordiyal folikül (→, sarı) ve preantral folikül (PAF) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400). .....	40
Resim 4.4. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde primordiyal folikül (→), preantral folikül (PAF), antral folikül (AF), atretik folikül (FA) ve zona pellusida (») ve teka tabakaları (↘, mavi) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200). .....	41
Resim 4.5. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), preantral folikül (PAF), antral folikül (AF), korpus luteum (CL), Graaf folikül (GF) ve medulla (M) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40). .....	41
Resim 4.6. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde tunika albuginea (↑, sarı), primordiyal folikül (→), preantral folikül (PAF) ve foliküler atrezi (FA) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200). .....	42
Resim 4.7. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde preantral folikül (PAF), zona pellusida (»), granüloza hücre tabakası ({} ve teka folikülü (↘, mavi) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200). .....	42
Resim 4.8. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), zona pellusida (»), Graaf folikül (GF) ve korpus luteum (CL) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100). .....	43
Resim 4.9. CAG grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), preantral folikül (PAF), antral folikül (AF), kistik folikül (CF), foliküler atrezi (FA), vasküler dilatasyon (*) ve Medulla (M) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40). .....	44

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.10. CAG grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), tunika albuginea (↑, sarı), primordiyal folikül (→, sarı), preantral folikül (PAF) , antral folikül (AF) , zona pellusida (»), granüloza hücre katmanı ( { ), teka folikülü (∨, mavi), vasküler dilatasyon (*) ve medulla (M) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40). .....	44
Resim 4.11. CAG grubu over kesitinde primordiyal folikül (→, sarı), antral folikül (AF), zona pellusida (», kırmızı), teka folikülü (∨, mavi), foliküler atrezi (FA) ve vasküler dilatasyon (*) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100)....	45
Resim 4.12. CAG grubu over kesitinde antral folikül (AF) ve kistik folikül (CF) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100). .....	45
Resim 4.13. Cisplatin grubu over kesitinde, germinal epitel (→, kırmızı), foliküler atrezi (FA), hilar hücrelerinde hiperplazi ( <, sarı) ve ödem (⊗) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40). .....	46
Resim 4.14. Cisplatin grubu over kesitinde primordiyal folikül (→, sarı), germinal epitel (→, kırmızı), tunika albuginea (↑, sarı) ve foliküler atrezi (FA) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100). .....	47
Resim 4.15. Cisplatin grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), foliküler atrezi (FA), inflamatuvar hücre infiltrasyonu ( > ) ve ödem (⊗) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100). .....	47
Resim 4.16. Cisplatin grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), primordiyal folikülde dejenerasyon (→, yeşil), foliküler atrezi (FA), tunika albuginea (↑), piknotik granüloza hücreleri (▲), granüloza hücrelerinde vakuolizasyon (▲, kırmızı), inflamatuvar hücre infiltrasyonu ( > ) ve teka tabakalarında dejenerasyon (∨, pembe) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200). .....	48
Resim 4.17. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), foliküler atrezi (FA), antral folikül (AF) ve medulla (M) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40). .....	49
Resim 4.18. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), tunika albuginea (↑, sarı), primordiyal folikül (→, sarı), zona pellusida (») ve granüloza hücreleri ( { ) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100). .....	50
Resim 4.19. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait over kesitinde primordiyal folikül ( →, sarı), antral folikül (AF), preantral folikül (PAF), zona pellusida (»), teka folikülü (∨, mavi) ve foliküler atrezi (FA) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200). .....	50

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.20. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait over kesitinde primordiyal folikül (→, sarı), antral folikül (AF), preantral folikül (PAF), infiltrasyon (>), foliküler atrezi (FA), zona pellusida (») ve teka folikülü (↘, mavi) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100).....	51
Resim 4.21. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde PCNA immün reaktivite görüntüsü. Pozitif tutulum (→, kırmızı), negatif tutulum (→, sarı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	55
Resim 4.22. İ.p. stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde PCNA immün reaktivite görüntüsü. Pozitif tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400). ....	56
Resim 4.23. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde PCNA immün reaktivite görüntüsü. Pozitif tutulum (→, kırmızı), negatif tutulum (→, sarı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	56
Resim 4.24. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde PCNA immün reaktivite görüntüsü. Pozitif tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400). ....	57
Resim 4.25. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde PCNA immün reaktivite görüntüsü. Pozitif tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	57
Resim 4.26. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde FOXO3a immün reaktivite görüntüsü. Oosit (O), FOXO3a tutulumu (→, kırmızı), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	59
Resim 4.27. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde FOXO3a immün reaktivite görüntüsü. FOXO3a tutulumu (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	60
Resim 4.28. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde FOXO3a immün reaktivite görüntüsü. Oosit (O), FOXO3a tutulumu (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	60
Resim 4.29. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde FOXO3a immün reaktivite görüntüsü. Oosit (O), FOXO3a tutulumu (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400). ....	61
Resim 4.30. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde FOXO3a immün reaktivite görüntüsü. Oosit (O), FOXO3a tutulumu (→, kırmızı), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400). ....	61
Resim 4.31. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400). ....	64

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.32. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000). .....	64
Resim 4.33. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	65
Resim 4.34. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000).....	65
Resim 4.35. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400). .....	66
Resim 4.36. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000). .....	66
Resim 4.37. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400). .....	67
Resim 4.38. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000). .....	67
Resim 4.39. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	68
Resim 4.40. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000).....	68
Resim 4.41. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x40). .....	70
Resim 4.42. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü. İmmünreaktivite gösteren foliküller (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	71
Resim 4.43. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x40). ....	71
Resim 4.44. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü. İmmünreaktivite gösteren foliküller (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	72

<b>Resim</b>	<b>Sayfa</b>
Resim 4.45. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x40).....	72
Resim 4.46. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü. İmmünreaktivite gösteren foliküller (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400). ....	73
Resim 4.47. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x40).....	73
Resim 4.48. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü. İmmünreaktivite gösteren foliküller (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400). ....	74
Resim 4.49. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x40). ....	74
Resim 4.50. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü. İmmünreaktivite gösteren foliküller (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).....	75

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile aşağıda sunulmuştur.

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklamalar</b>
<b>AMH</b>	Anti-Mullerian Hormon
<b>CAG</b>	Sikloastrogenol
<b>cAMP</b>	Siklik adenozin monofosfat
<b>cGMP</b>	Siklik guanozin monofosfat
<b>CTR1</b>	Bakır taşıyıcı protein 1
<b>EGF</b>	Epidermal büyüme faktörü
<b>FDA</b>	Gıda ve ilaç dairesi
<b>FSH</b>	Folikül stimüle edici hormon
<b>GnRH</b>	Gonadotrophin serbestleştirici hormon
<b>IGF</b>	İnsülin-benzeri büyüme faktörleri
<b>LH</b>	Luteinize edici hormon
<b>LIF</b>	lösemi inhibitör faktörü
<b>MDR1</b>	Çoklu ilaç direnç geni 1
<b>MPF</b>	Maturasyon uyarıcı faktörü
<b>OMI</b>	Oosit maturasyon inhibitörü
<b>PCNA</b>	Proliferatif Cell Nuclear Antibody
<b>PDE3A</b>	Fosfodiesteraz 3A
<b>PGH</b>	Primordial germ gücreleri
<b>POF</b>	Prematüre ovaryan yetmezlik
<b>rER</b>	Granüllü endoplazmik retikulum
<b>Steel faktör</b>	Kit-Ligand
<b>TZP</b>	Transzonal projeksiyonları



## 1. GİRİŞ

Kemoterapi gibi kanser tedavileri, yaşam kalitesinde azalmaya ve seksüel disfonksiyona neden olmakla birlikte, bu tedavilere karşı oldukça hassas olan ovaryumların folikül rezervini olumsuz etkilemekte ve ilişkili olarak infertiliteye neden olmaktadır, [1]. Araştırmalar, kemoterapi tedavisi gören 40 yaş altı kadınlarda ovaryumlarda %20 oranında işlev kaybı olduğunu göstermektedir [2]. Kanser tedavi yöntemleri ve bu yöntemlerin ovaryumlardaki mekanizması ise yeni tedavi protokollerinin temelini oluşturmaktadır [2]. Kemoterapinin etkilerine karşı uygulanan protektif tedavi ajanları folikül kaybına karşı korunmada etkili olan yöntemler arasında sayılmaktadır. [3]. Yukarıda bahsi geçen ve kadın genital sistem kanserlerinde kullanılan kemoterapi ajanlarından biri olan cisplatin, etkisini DNA'daki purin bazlarına çapraz bağlanarak gerçekleştirmektedir. 2019 yılında Nobel ödülü alan bilim insanı Aziz Sancar'ın da dahil olduğu çalışma grubunun Nature'da yayınlanan çalışmalarında cisplatinin hücre proliferasyonunu durdurarak DNA hasar mekanizmalarını aktive ettiği gösterilmiştir [4]. Araştırmacılar farelerde DNA hasarı ve onarım mekanizmalarının epigenetik ve transkriptomik özelliklerinin dokuya özgü olduğunu ve cisplatinin neden olduğu hasarın hücrenin hem transkripsiyon ve hem de kromatin durumuna göre değişiklik gösterdiğini bulmuşlardır. Literatürde cisplatinin DNA'da neden olduğu hasar konusunda konsensüsüne varılmış durumdadır. 40 yaşından önce cisplatin kullanan kadınlarda, ovaryumlarda prematür ovaryan yetmezlik (prematüre ovarian failor= POF) sendromu görülmektedir [1]. Ajan; bu tedaviyi alan kadınlarda Anti-Müllerian Hormon (AMH) seviyelerini neredeyse 0 ng/mL seviyelerine düşürmek yoluyla POF'u indüklemektedir [1]. Cisplatinin çok sayıda sitotoksik etkisi tanımlanmıştır [5]. Cisplatin, kanserli hücrelerde DNA metabolizmasına hasar vererek hücre döngüsünü durdurmaktadır [1] ve hücredeki antioksidan enzim rezervini etkileyerek hücrel oksidatif strese neden olmaktadır [1]. Hücreye cisplatin girdiğinde, reaktif oksijen türleri yolağına etki ederek apoptozis mekanizmasını aktive etmektedir [1, 6]. Yapılan çalışmalarda cisplatinin en çok bölünme kapasitesi yüksek olan hücreleri hedef aldığı görülmüştür [1]. Özellikle kadınlarda yüksek bölünme kapasitesine sahip hücreler olan primordiyal foliküller bu ajanın hedefinde yer almaktadır [7, 8]. Primordiyal foliküllerde meydana gelen hasar, geri dönüştürülemez olduğundan, oluşan bu hasar infertilite ile sonuçlanabilmektedir [9].

Primordiyal folikül aktivasyonunda çok sayıda hücrel yolak yer almaktadır [10]. Bu yollardan biri, PTEN/ PI3K/AKT sinyal yolağıdır [10]. Bu yolda dormant foliküllerin

aktive olduğu, cisplatin aracılığı ile, aktive olan foliküllerin apoptozise gittiği ve foliküler havuzun hızlı bir şekilde tükendiği görülmüştür [8]. Bir diğer yolak PTEN/Akt/FOXO3a yolağıdır. Yapılan çalışmalarda, cisplatinin PTEN/Akt/FOXO3a yolağına etki ederek, FOXO3a'nın sitoplazmaya transloke olmasını sağladığı ve böylece primordiyal folikül havuzunda hızlı bir şekilde kayba neden olduğu görülmüştür ve bu yolak aracılığıyla aktive olan foliküller apoptozise girme eğilimindedir [8]. FOXO3a hem nükleusta ve hem de sitoplazmada lokalize olan bir proteindir ancak nükleusta tutulum gösterdiğinde, foliküler aktivasyonun sağlıklı olduğu ve havuzun korunduğu anlamına gelmektedir [11]. Primordiyal folikül aktivasyonunda bir diğer önemli yolak da mTOR yolağıdır. mTOR primordiyal folikül aktivasyonu için oldukça önemlidir [12]. mTOR ve primordiyal folikül aktivasyonu TGF-B ve AMPK inhibitör yolağına etki eden moleküller tarafından da uyarılmaktadır [13, 14]. mTOR/PI3K/AKT sinyal yolağı folikülogenez fizyolojisi ile birlikte çok sayıda hücreyel yolakta da görev almaktadır. Bu yolaklar arasında hücreyel hayatta kalma, proliferasyon, büyüme, metabolizma, anjiyogenez, metastaz ve ribozom biyogenezi sayılabilmektedir [15, 16]. Ökaryotik hücreler ile yapılan çalışmalar, mTOR'un özellikle ribozom biyogenezi pre-rRNA sürecinde, ribozomal protein ekspresyonunda ve 5S RNA sentezinde görev aldığını göstermektedir [16]. Hücre döngüsün kontrolünün kilit moleküllerinden olan mTOR, ribozom biyogenezini iki önemli mekanizma ile kontrol etmektedir, bunlardan birincisini ribozomal protein ekspresyonu için mRNA translasyonunu artırması ile sağlarken, ikinci olarak da rRNA sentezini artırması ile gerçekleştirmektedir [16]. Cisplatinin neden olduğu protein ekspresyon mekanizmalarındaki hasar mTOR ekspresyon seviyelerini de etkilemektedir. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda mTOR inhibitörü olan rapamisin, cisplatinin kaynaklı POF'u azaltarak, primordiyal folikül havuzunu koruduğu görülmüştür [17].

Primordiyal folikülleri apoptozise yönlendiren bir molekül olduğu bilinen cisplatinin [18], kaspaz-3'ü aktive ederek apoptozisi indüklediği bildirilmiştir [19]. Yapılan çalışmalarda, cisplatinin sitokrom C'nin mitokondriyondan salınmasını sağlayarak, kaspaz-3 ekspresyon düzeyini arttırdığı ve hücreyel strese bağlı olarak, apoptozis yolağını aktive ettiği görülmüştür [1, 6]. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda cisplatinin dokuda kaspaz-3 seviyelerini arttırarak POF'a neden olduğu tespit edilmiştir [20].

Cisplatin uygulaması koşullarında önemli hale gelen bir diğer molekül olan PCNA (proliferatif hücre nükleer antijeni) proteini ise DNA replikasyonuna ve hücre döngüsüne

katılan, epigenetik mekanizmalarda da görev alan, DNA sentezi için gerekli olan, proliferasyona uğrayan hücreler için önemli bir proliferasyon belirteci ve aynı zamanda bir scaffold protein olarak da tanımlanmaktadır [21, 22]. Son yıllarda kütle spektrofotometrisi ile yapılan çalışmalarda bu proteinin, MAPK ve PI3K/Akt yollarında görev alan sitoplazmik proteinlerle de kompleks oluşturarak sitoplazmada da görev aldığı gösterilmiştir [23]. PCNA proteininin yokluğunda, hücre apoptozise uğramaktadır [24]. Deney hayvanları ile yapılan çalışmalarda cisplatin verilen gruplarda ovaryumlarda PCNA pozitif hücre sayısında, kontrol grubuna kıyasla azalma olduğu görülmüştür [25].

Tüm bu bilgiler doğrultusunda; cisplatin tedavisi gereken koşullarda, ovaryum cisplatinin neden olacağı olası hasarlardan koruyacak ajanların varlığı oldukça önemli hale gelmektedir. Bu ajanlardan biri olan sikloastrogenol (CAG) bir sapogenin molekülüdür ve MAPK, PI3K/AKT, FGFR1/B-Klotho, TXNIP/NLRP3, Wnt/B-Catenin, ERK/JNK, JAK/STAT3 gibi sinyal yollarında görev almaktadır [26]. CAG çok sayıda hücre yolakta görev almasının yanı sıra telomeraz aktivatörü olarak da işlev görmektedir [27]. Farelerde ve hücre kültüründe yapılan çalışmalarda CAG'ın telomeraz enzimini aktive ederek telomer uzunluğunu artırdığı ve Klotho gen ailesi gibi senesens mekanizmasında görev alan proteinlere de etki ettiği gösterilmiştir [27]. Yapılan çalışmalar, ovaryumlar ve mikroçevrelerinin de yaşlanma mekanizmalarından etkilendiğini göstermektedir [28]. Literatürde ovaryum ve çeşitli nedenlerle yaşlanma (yaş , hasar, vs) mekanizmalarının araştırıldığı çalışmaların son 10 yılda oldukça arttığı görülmekle birlikte, bu mekanizmada görev alan hücre yolakları halen tam olarak aydınlatılabilmemiş değildir. Yaşlanma mekanizması ile bire bir ilişkili olan ve yaşlanmanın belirteci olarak tespit edilen telomer uzunluğu, telomeraz enzimin katalitik alt ünitesi olan TERT ile doğrudan ilişkilidir [27]. Yapılan çalışmalarda telomer enzim disfonksiyonunun çeşitli organlarda farklı değişikliklere neden olabildiği gösterilmektedir [29].

Tüm veriler ışığında, bu çalışmada; cisplatinin, DNA hasarına neden olarak, ovaryum folikül havuzuna etkisini ve bir telomeraz enzim aktivatörü olan CAG olası koruyucu özelliğini aşağıda belirtilen yöntemler kullanılarak belirlemesi amaçlanmıştır:

1. Hematoksilen – eosin ile; gruplar arasındaki genel histopatolojik değerlendirme ve kesitler üzerinden folikül sayımı yaparak istatistiksel farklılıklar saptanmış,

2. İmmünohistokimyasal yöntemler ile; folikülogenez yolağında görev alan moleküllerden FOXO3a, protein sentez işaretleyicisi mTOR, proliferasyon işaretleyicisi PCNA ve apoptozis belirteci; Kaspaz-3 protein düzeylerinin gruplar arasındaki farkları belirlenmiş,
3. ELİZA yöntemi ile; folikül havuzunun belirteci olan AMH düzeyleri ve telomeraz enzim aktivitesi ölçülmüş ve gruplar arasındaki farklar istatistiksel olarak değerlendirilmiş,
4. Real Time-PCR yöntemi ile de gruplar arasındaki telomer uzunlukları karşılaştırılmıştır.

## 2. GENEL BİLGİ

Dişi üreme sisteminde organlar iç genital organlar (bir çift ovaryum, tuba uterina, uterus, vajina) ve vulva adı verilen anterior perineumda bulunan dış genital organlar (clitoris, labium majör ve labium minör, hymen klitoris, vestibül ve eksternal üretral orifis) olarak iki ana alt başlığa ayrılmaktadırlar [30].

### 2.1. Ovaryum Embriyolojisi

#### 2.1.1. Oogenezis

Doğumda ovaryumlarda yaklaşık 2 milyon primer oosit bulunmaktadır ve bunlardan yalnızca 40.000'i puberteye kadar hayatta kalmaktadır [31]. Bu hücreler I. Mayoz bölünmenin, profaz aşamasında, diploten evresinde bekleme halindedirler. Bu foliküllerden yalnızca 400 tanesinden biri her menstrual siklusta ovule olmaktadır [31]. Geri kalanları ise dejenere olarak foliküler gelişimin çeşitli evrelerinde atretik hale gelmektedirler [31]. Oosit ve çevreleyen hücreler folikül olarak adlandırılmaktadır ve bir insanda oosit büyüme periyodu 110 ile 120 gün arasında sürmektedir [31]. Bu maturasyon ve büyüme periyodunda oosit, ilk günlerde büyüme ve olgunlaşma için organelleri ve protein birikimini gerçekleştirmektedir [31]. Oosit büyümesinde en önemli etmenlerden biriside hücre iskeleti gibi sitoplazmik faktörlerin asimetrik dağılımıdır [31]. Primordial germ gücreleri (PGH), ilk olarak gametlerin dışında (vitellüs kesesinin endoderm tabakasında) yer alarak erken embriyonik dönemde gonadlara göç ederler [31]. Bu bölgedeki hücreler, fertilizasyondan 24 gün sonra iri boyutları ve yüksek glikojen ile alkalin fosfataz enzim içerikleriyle ayırt edilebilir hale gelirler [31]. PGH'leri özelleştikten sonra ilk olarak allantoisin tabanından gelecekteki arka bağırsağa ve ikinci bir aşama olarak da onları arka bağırsaktan dorsal mezenter boyunca gelecekteki gonadların oluşacağı genital çukurluklara götüren aktif bir göç hareketine başlarlar [31]. PGH'leri bu aktif göçleri sırasında apoptozise uğramaktan koruyan gen Nanos-3 isimli evrimsel olarak korunmuş bir proteindir [31]. Hem primordiyal germ hücrelerinin ameboid hareketleri hem de embriyonun büyümesi yoluyla yer değiştirmesi bu göçe katkı sağlayan faktörler arasında sayılabilmektedir [31]. Bu göç sırasında PGH'leri uzun sitoplazmik çıkıntılar ile birbirleriyle bağlantılıdır. LIF (lösemi inhibe edici faktör) ve Steel faktör (Kit-Ligand) gibi mitojenik faktörler PGH'lerinin çoğalmalarını indüklemektedirler [31]. Gonadlara belirli bir mesafede bulunan PGH'leri göçlerinin ilk

aşamalarında hücre dışı matris substratına yanıt olarak aktif ameboid hareket gerçekleştirmektedirler [31]. PGH'lerin genital sırtlara ulaşmasıyla birlikte kölom epiteli proliferasyon olarak mezoderme gömülür ve primitif cinsiyet kordonlarını oluşturarak farklılaşmış gonad evresine geçer [32]. XX cinsiyet kromozomuna sahip embriyolarda, bu kordonlar yerlerini ovaryumun medullasına bırakırlar [33]. Bu embriyolarda kölom epiteli proliferasyon olarak 7. haftada kortikal kordonlar olarak adlandırılan ikinci nesil hücre kordonları oluştururken, PGH'leri de oogonyumlara farklılaşmaktadır. Çok sayıda mitoz bölünme geçiren oogonyumlar 3. ayın sonunda kortikal kordondan köken alan yassı epitel hücreleri ile çevrelenerek gruplar meydana getirir [34]. Oogonyumların bir kısmı mitoz bölünme ile çoğalırken, bir kısmı da I. mayoz bölünme evresine geçerek, profazın diploten evresinde beklemektedir [34]. Primer oositlerin bekleme evresi foliküler hücreler tarafından salınan OMI (oosit maturasyon inhibitörü) ile sağlanmaktadır [32]. Sonuç olarak oogonyumlar yassı folikül hücreleriyle çevrelenmiş, primer oosit içeren primordiyal foliküllere dönüşürler [32, 35] [36, 37]. Doğumda, yaklaşık 2 milyon olan primordiyal folikül sayısı, puberteye kadar ortalama 300.000 – 400.000'e kadar düşmektedir. Menopoza kadar ovulasyon ile bu foliküllerden 1000'den daha azı atılmaktadır [37, 38]. Puberteden menopoza kadar her ay 15-20 folikül gelişmeye başlar ancak sadece bir folikül dominant folikül olarak gelişimini tamamlayarak ovule olur, diğerleri ise folikülogenezisin herhangi bir basamağında atreziye uğrar [32]. Folikülogenezisteki primer oositlerden dominant olanı mayoz bölünmeye devam eder ve ovulasyondan hemen önce I. Mayoz bölünmeyi tamamlayarak bir sekonder oosit ve perivitellin aralıkta yerleşim gösteren I. polar cisim oluşturur [34], sekonder oosit II. Mayoz bölünmenin metafaz evresinde iken, artan östrojene bağlı oluşan LH piki ile ovulasyon gerçekleşir ve II. Mayoz bölünme ancak fertilizasyon gerçekleşirse tamamlanır [30]. Fertilizasyon olmaması durumunda ise oosit, ortalama 24 saat sonrasında dejenere olur [32, 35].

## 2.2. Ovaryum Anatomisi

Dış genital organlar birlikte vulva (pudendum femininum) olarak bilinmektedir [39]. Ovaryumlar bu sistemde bir çift olarak, pelvis minorun yan duvarlarına, fossa ovaricaya (Waldeyer'in ovaryan çukuruna) yerleşmiş, arteria iliaca interna ile arteria iliaca externa arasında bulunan ve badem şeklinde, gri-pembe renkte, yaklaşık 3 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde, 1 cm kalınlığında ve ortalama 14 g ağırlığında olan organlardır [30]. Fossa ovarica önden oblitere umbilikal arter, chorda Umbilicalis, ligamentum umbilicale medialis,

yukarıdan arteria iliaca externa, arkadan arteria iliaca interna ve üreter tarafından sınırlanır [39]. Çukurun tabanından arteria obturatoria ile nervus obturatorius geçer [39]. Extremitas tubaria vena iliaca externaya yakındır [39]. İçinde arteria vena ovarica ve ovaryan sinirlerin bulunduğu ligamentum suspensorium ovarii (infundibulopelvik ligament) ile tuba uterinanın infundibulum parçasından çıkan fimbria ovarica bu uca tutunur [39]. Ligamentum latum uterinum bir uzantısı olan ligamentum suspensorium ovarii, arteria vena iliaca externaların üzerinden geçip sağda caecum'un solda da colon descendensin arkasına doğru uzanıp musculus psoas majorun üzerinde peritoneumla birleşir [39]. Alt ucu, extremitas uterina, ligamentum ovarii proprium (lig. uterivariicum) denilen ligament ile uterusu bağlanır [39]. Bu ligament, gubernaculumun kalıntısıdır ve ligamentum latum uteri içindedir [39]. Dış yüzü, facies lateralis, fossa ovaricayı örten paryetal periton ile temas eder ve ondan obturator sinir ve damarlara ayrılır [39]. Medial yüzünü, facies medialis, büyük oranda tuba uterina örter, burada ovaryum ile mesosalpinx arasında bir peritoneal çıkma , ovaryan bursa bulunur [39]. Ön kenarı, margo mesovariicus, tuba uterina ve mesosalpinxsin arkasında yer alan mezenter, mezovarium ile ligamentum latum uterinum üst sınırına yakın arka yüzüne tutunur. Mezovarium içinde, hilum ovariiye giden ovaryan damarlar ve sinirler bulunur [30]. Hilum ovarii ovaryumun mesovariuma tutunduğu kenardadır. Arka kenarı margo liber serbesttir ve üretere bakar [39]. Ovaryumların karın arka duvarından pelvise inişi, gubernaculum ovarii, yukarıda ovaryumların alt uçlarından tuba uterinaların uterusu girdiği yere yakın uterusu tutunur [30, 39]. Ovaryumlar uterusun broad ligamentinin posteriyör yüzeyine mezovaryum adı verilen bir peritoneal katlantı ile tutunmaktadırlar [30]. Extremitas tubaria ve extremitas uterina adı verilen iki ucu, margo liber ve margo mesovariicus isimli iki kenarı bulunmaktadır [30, 39]. Organın dıştaki köşesi olan extremitas tubariaya ligamentum suspensorium ovarii ile tutunmaktadır. Bu ligamentin içinde ovaryumun damarları olan arteria ve vena ovaricalar ile sinirler bulunmaktadır ve tuba uterinada bu köşeye doğru uzanmaktadır [30]. Extremitas uterina, ligamentum ovarii proprium isimli bir bağ aracılığıyla uterusu tutunmaktadır [30]. Bu bağ gelişmekte olan gonadları pelvis tabanına bağlayan, embriyonik fibröz kord olan gubernaculumun bir kalıntısıdır [30].

### 2.3. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumlar histolojik olarak, en dışta tek katlı yassıdan kübik epitele değişen, peritonun uzantısı olan germinal epitel ile çevrilidir [40]. Germinal epitel mezovaryumu kaplayan

mezotelyum ile devam etmektedir ve germinal epitelin mezotelyal epitelden köken aldığı ve germ hücrelerinin kökenini oluşturduğu düşünülmektedir [40]. Germinal epitel ile korteks arasında tunika albuginea adı verilen sıkı bağ dokudan kalın bir tabaka yer almaktadır [30]. Tunika albugineanın hemen altında ise organ korteks ve medulla olarak iki histolojik alt birime ayrılmaktadır [30]. Kortekste farklı büyüme evrelerindeki ovaryum folikülleri bulunmaktadır [30]. Stromada düzensiz yerleşim gösteren bu foliküller puberteden menopoza kadar ritmik değişimlere uğramaktadırlar [30]. Medullada ise hilumtan ovaryuma giren bağ dokusu, intersitisyel hücreleri, sinirleri, lenf ve kan damarları bulunmaktadır [30]. Organ dışı gametlerin üretimi, östrojen ve progesteron salgılanması, doğumdan sonra üreme organlarının büyümesinin düzenlenmesi ve sekonder seks karakterlerinin gelişmesi gibi fonksiyonlara sahiptir [30]. Puberteyle birlikte ortalama 28 günde bir gerçekleşen, ritmik menstrasyon döngüsünde, çok sayıda hormonal, histolojik ve fizyolojik değişim meydana gelmektedir [30]. Üreme çağlarının sonuna gelen kadınlar, bu döngülerinin bozulmasıyla menopoza girmektedirler [30]. Anlaşıldığı üzere dışı üreme sistemi çok sayıda hormonal, nörolojik ve fizyolojik faktörün kontrolü altındadır [30].

#### **2.4. Folikülogenezis**

Tek bir oosit içeren foliküller korteks stromasına düzensiz şekilde dağılmış durumdadırlar ve foliküllerin boyutu oositin gelişim evresi hakkında bilgi vermektedir [30]. Oogenezin erken evreleri fetal hayatta meydana gelmektedir. Doğumda meydana gelen oositler gelişimlerinin birinci mayoz bölünmelerinde arreste uğramışlardır ve puberte ile birlikte, küçük guruplar halinde siklik değişimlere uğramaktadırlar [30]. Türden türe değişmekle birlikte, insanlarda her döngüde yalnızca bir oosit tam olgunluğa erişir ve ovulasyona uğrar [30]. Reprodüktif yaşamı boyunca bir kadının ortalama 400 matür ovumu, ovulasyona uğramaktadır [30]. Doğumdan sonra mevcut olan primer oositlerin çoğu maturasyonunu tamamlayamaz ve atreziye uğrarlar [30]. Bu süreç fetal yaşamın 5. ayında başlar ve oositi çevreleyen hücrelerin apoptozisi aracılık eder [30]. Gelişim evrelerine göre foliküller primordiyal foliküller, büyümekte olan foliküller ve Graaf foliküller olarak ayrılmaktadırlar [30]. Döngü boyunca gelişimin çeşitli evrelerinde foliküller görülse de baskın olan folikül primordiyal foliküllerdir [30]. Ovaryum foliküllerinin ilki olan primordiyal foliküller fetal gelişimin 3. ayında, gonadotropin hormonların salgılanmasından bağımsız şekilde ortaya çıkarlar [30]. Puberteye girmiş kadınlarda, mayoz I profaz evresinde bekleyen oositi olan primordiyal foliküller korteks stromasında, tunica albugineanın hemen altında, tek katlı yassı

folikül hücreleriyle çevrelenmiş spesifik, histolojik görüntüleriyle ayırt edilebilirler [30]. Foliküler hücrelerin dışı bazal lamina ile çevrelenmiştir [30]. Bu evrede folikül yaklaşık 30 µm çapındadır ve nükleus esentrik olarak yerleşmiştir ve bir veya daha fazla sayıda nükleolus içerebilmektedir [30]. Ooplazma olarak adlandırılan oosit sitoplazması Balbiani cisimciği adı verilen Golgi vezikülleri, endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondri ve lizozom kompleksi içermektedir [30]. İnsanlarda ek olarak annular lamel adı verilen çok sayıda vezikül de içermektedir [30]. Bu lameller çok sayıda yuvarlak şekilli mitokondrionun oluşturduğu komplekstir. Bu yapı nükleer zarf yapısına da benzemektedir [30] Primodiyal folikülden sonraki ilk foliküler evre, primer folikül evresi olarak da adlandırılmaktadır [30]. Bu evrede hem foliküler hücrelerde, hem onları çevreleyen stromada hem de oositte değişimler meydana gelmektedir [30]. Başlangıçta oosit genişler ardından oositi çevreleyen yassı foliküler hücreler küboidal bir şekil alırlar. Eğer bu küboidal şekilli foliküler hücreler tek katlıysa folikül unilaminar primer folikül, birkaç katlıysa multilaminar primer folikül olarak adlandırılmaktadır [30]. Oosit büyüdükçe, ekstraselüler bir kılıf olan zona pellusidayı sentezlemeye başlarlar [30]. Bu kılıf oosit ve komşu hücreler arasında bulunmaktadır. Bazı kaynaklara göre üç ZP1 (80-120 kDa), ZP2 (73kDa), ZP3(59-65 kDa); bazı kaynaklara göre ise dört ZP4 (59 kDa) alt birimden oluşmaktadır [30, 41]. Oosit ve etrafındaki foliküler hücreler, zona pellusidaya penetre olarak oosit ile temas halinde olan foliküler hücrelerin iki tip transzonal projeksiyonu (TZP) aracılığıyla yakın bir yapısal ve fonksiyonel ilişki halindedir [30]. F-aktin açısından zengin olan tip A-TZP, oluklu bağlantılarla oositten çıkan mikrovilluslara bağlanır [30]. Yüksek mikrotübül içeriğine sahip olan diğer tip ise M-TZP, oositten invajinasyonlarında adherens bağlantılar oluştururlar [30]. Folikül büyürken, küboidal şekilli folikül hücrelerinin tabakalaşması devam eder ve bu hücreler 6-12 tabakalı olduklarında artık folikül hücreleri yerine granüloza hücreleri olarak adlandırılırlar [30]. Bazal lamina ise folikül hücrelerinin en dış tabakasını oluşturmaktadır [30]. Foliküler büyüme boyunca, granüloza hücreleri arasında gap junctionlar bulunmaktadır [30]. Kandan makromoleküllerin ve besinlerin foliküler sıvıya geçmeleri, ovaryumların ve foliküllerin normal gelişimi için bu hücre bağlantı birimleri gereklidir [30]. Primer folikül büyümeye devam ettikçe bağ dokusu hücrelerinde değişiklikler meydana gelerek teka folikülü oluşur [30]. Granüloza hücreleri proliferer oldukça, stromal hücreler bir kılıf veya kapsül oluşturarak, bazal laminanın hemen dışında teka folikülü adını alırlar ve bu folikül teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki tabakaya ayrılır [30]. Teka interna, steroid salgılayan hücre özelliğinde olan içteki oldukça vaskülarize yapıda küboidal sekretuar hücrelerden oluşmaktadır ve çok sayıda LH (luteinize edici hormon) reseptörü de içererek LH

stimülasyonundan sonra androjen setezlemektedirler ve bu androjenler östrojen öncülleridir [30]. Sekretuar hücelere ek olarak teka interna fibroblastları, kollajen demetlerini ve küçük damarları da içermektedirler [30]. Teka eksterna, foliküllerin bağ dokusu hücrelerinin en dış tabakasıdır ve çoğunlukla düz kas hücrelerinden ve kollajen demetlerinden oluşmaktadırlar [30]. Granüloza hücreleri ile teka interna arasındaki bazal lamina bu iki hücre grubu arasında oldukça net bir sınır oluşturmaktadır [30]. Bu sınırla, teka internanın zengin kapiller ağı granüloza hücrelerinden ayrılmaktadır [30]. Erken aşamalarda bu teka tabakaları anjiyogenez faktörü salgılayarak teka tabakasındaki kan damarlarının büyümesini sağlamaktadır [30]. Oositin olgunlaştıkça oosit stoplazmasının organel içeriğinde değişmektedir [30] Memelileri de içeren çok sayıda türde ovaryumlardaki oositler sekretuar veziküller olarak da bilinen kortikal granüller salgılamaktadırlar [30]. Bu veziküller oolemmenin (oosit plazma membranının) hemen altında bulunmaktadırlar ve oositin spermle buluşmasından sonra, proteaz salınımı yapmakla görevlidirler. Oosit ile granüloza hücreleri arasında perivitellin aralık denilen bir aralık bulunmaktadır [30]. Oositin perivitellin aralığa çok sayıda mikrovillus uzanmaktadır ve zona pellusida burada şekillenmektedir [30]. Primer folikül geliştikçe stromanın derinlerine doğru hareket eder ve ilk olarak boyutunu artırır ve foliküler hücreleri prolifer olmaya başlar [30]. Foliküler büyüme ve oosit için folikül stimüle edici hormon (FSH), büyüme faktörleri, epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin-benzeri büyüme faktörleri (IGF) ve kalsiyum iyonları gibi çok sayıda faktör gerekmektedir [30]. Foliküler hücreler 6-12 tabakaya ulaşır stratum granulozuma dönüştüğünde granüloza hücreleri arasında sıvıyla dolu kavite meydana gelmektedir [30]. Hyaluronandan zengin bu kavite likör folikülü olarak adlandırılmaktadırlar [30]. Likör folikülü granüloza hücrelerinin arasında biriktikçe, birleşerek kruvasan şekilli antrum oluşmaktadır [30]. Bu aşamada folikül artık sekonder folikül veya antral folikül olarak adlandırılmaktadır . [30]. Oosit de artık esentrik olarak yerleşmeye başlamıştır ve bu evrede çapı da 125 µm'ye ulaştığında artık folikül daha fazla büyümeyebilir [30]. Bu evrede büyüme, OMI isimli 1-2 kDa ağırlığında, granüloza hücrelerinden antral sıvıya salgılanan bir peptid ile engellenir [30]. Antral folikül büyükçe antrum da genişleyerek oositin periferine doğru itilmesine neden olurken granüloza hücreleriyle oosit arasında antruma doğru çıkıntı oluşturan, kum yığını şeklindeki granüloza hücreleri özel bir isim alarak kumulus ooforus olarak adlandırılmaktadırlar [30]. Bu evrede çapı yaklaşık 10 mm olan folikül Graffian folikül olarak adlandırılmaktadır [30]. Oositi çevreleyen ve ovulasyon ile birlikte atılan kumulus ooforus hücreleri ise yine özel bir isim alarak korona radiata olarak adlandırılmaktadırlar [30]. Özetle hem kumulus ooforus hücreleri hem de

korona radiata hücreleri granüloza hücrelerinden temel almaktadırlar. Kumulus ooforus hücrelerinden oluşan korona radiata hücreleri zona pellusidaya uzanan mikrovilluslar göndererek oositin mikrovilluslarıyla gap junctionlar yapmaktadır [30]. Foliküler maturasyon süresince granüloza hücrelerinin mikrovillus sayıları LH reseptörlerindeki artış ile uyumlu olarak artar [30]. Granüloza hücreleri arasında Call-Exner cisimciği olarak adlandırılan yapılar görülebilmektedir [30]. Call-Exner cisimcikleri granüloza hücreleri tarafından salgılanmakta ve hyaluronan ile proteoglikanları içermektedirler ve içerikleri sayesinde PAS gibi boyama metodlarıyla pozitif reaksiyon vermektedirler [30]. Graafian folikül 10 mm'den daha fazla çapa sahip olduğunda artık dışarıya doğru çıkıntı yapmaktadır [30]. Folikül maksimum boyutuna ulaştıkça granüloza hücrelerinin mitotik aktiviteleri de azalırken granüloza hücre tabakası incelmekte, antrumun boyutu gittikçe artarken granüloza hücreleri, oosit ve kumulus ooforus arasındaki bağlantı gevşemektedir [30]. Bu hücreler ovulasyonda oositle birlikte atılmaktadırlar. Folikülün olgunlaşma periyodu boyunca teka tabakası da oldukça belirginleşmektedir [30]. Teka interna hücreleri arasında, sitoplazmada yağ damlacıkları görülmekte ve bu hücreler steroid salgılayan hücrelerin özelliklerini göstermektedirler [30]. İnsanlarda LH, teka interna hücrelerini uyararak andojen sentezlenmesini sağlamaktadır [30]. Aromataz enzim eksikliğinden dolayı teka interna hücreleri östrojen üretemezler ancak granüloza hücrelerinde bu enzim mevcuttur [30]. FSH'a cevap olarak, granüloza hücreleri androjenleri östrojene dönüştürmektedirler [30]. Ovulasyondan 24 saat öncesinde adenohipofiz FSH ve LH salınımı için uyarılır [30]. LH salınımına cevap olarak granüloza hücreleri üzerindeki LH reseptörleri downregüle olur ve granüloza hücreleri artık daha fazla östrojen üretemez hale gelirler [30]. Böylece primer oosit bölünmesine devam ederek sekonder oosite dönüşür ve birinci polar cisimcik oluşur [30]. Granüloza hücreleri ile teka hücreleri luteinizasyon sürecine geçerek progesteron üretmeye başlar [30].

#### **2.4.1. Ovulasyon**

Ovulasyon, puberte ile birlikte Graafian folikülden sekonder oositin atılmasını sağlayan hormonların öncülük ettiği bir süreçtir ve bu süreçten hormonal ve enzimatik değişimler sorumludur ve oositin atılması 28 günlük menstrual siklusun ortalarına, yaklaşık 14. güne denk gelmektedir. [30]. Ancak ovum tek bir hücre olarak değil; oosit, zona pellusida, korona radiata ve kumulus ooforus hücreleri ile birlikte atılmaktadır [30]. Ovulasyonu uyaran faktör, menstrual siklusun ortasında ön hipofiz bezinden salgılanan LH hormonudur

[31]. LH hormonunun neden olduğu dalgalanmayla birlikte, foliküler duvarın dış katmanlarında bölgesel kan akımı artar ve plazma proteinleri postkapiller venüller yoluyla dokuya sızarak ödem oluşturur [31]. Ödem oluşması neticesinde prostoglandinler, histamin, vazopressin ve plazminojen aktivatör salınarak, matriks metalloproteinazlar lokal olarak sentezlenir [31]. Aynı zamanda kumulus hücreleri tarafından hyalunorik asitin sentezlenmeside oositi çevreleyen hücrelerin gevşemesine neden olurken, matriks metalloproteinazlarda litik aktivite göstererek LH dalgalanmasından yaklaşık 28-36 saat sonra dış foliküler duvarın yırtılmasına neden olmaktadır [31] ve oosit ilk mayoz bölünmesini tamamlayarak bu seferde II. Mayozun metafaz evresinde beklemektedir [30]. Bu süreçte granüloza hücrelerinin yüzeyinde bulunan FSH reseptör ekspresyonunda önemlidir [30]. Mayotik duraklamanın sürdürülmesindeki temel faktör, oosit sitoplazmasında yüksek miktarda bulunan cAMP (siklik adenozin monofosfat)'lerdir [30, 31]. Bu molekül hem oosit tarafından hücre içinde üretilirken, hem de folikül hücreleri tarafından üretilerek bu hücreleri oosite bağlayan oluklu bağlantılar yoluyla oosite taşınmaktadır [30]. Foliküler hücrelerde üretilip oosite taşınan bir diğer faktör cAMP'yi 5AMP'ye dönüştüren enzim olan fosfodiesteraz 3A (PDE3A)'yı inaktive eden cGMP'dir [31]. Bu enzim, maturasyon uyarıcı faktörü (MPF)'i inhibe etmektedir [31]. Ovule olacak oosit menstrual siklusun başlangıcında çok sayıdaki primer folikül arasından seçilmektedir ve germinal epiteli de geçerek atılmaktadır [31]. Ovulasyondan hemen önce şişmiş folikülün çevresindeki ovaryum yüzeyinde küçük bir alanda kan akışı durmaktadır. Germinal epiteldeki bu alan makula pellusida veya foliküler stigma olarak adlandırılmaktadır [31]. Yukarıda da değinildiği gibi, rüptüre olan folikülde korona radiata ve kumulus ooforus hücreleri de atılmaktadır. Ovulasyon zamanında tuba uterinanın fimbriyaları da ovaryuma yaklaşmakta ve kumulus tabakası ile temas ederek nazik bir süpürme hareketiyle folikülü tuba uterinanın abdominal ostimuna taşımaktadırlar [31]. Ovumun tuba uterina içindeki taşınması fertilizasyon meydana gelse de gelmese de ortalama 3-4 gün kadar sürmektedir [31]. Ovumun taşınması ampulla bölgesinde gerçekleşen yavaş taşınma (yaklaşık 72 saat) ve ovum veya embriyonun isthmustan geçerek uterusu doğru hareket ettiği daha hızlı taşınma (8 saat) olmak üzere iki fazda meydana gelmektedir [31]. Ovulasyondan sonra sekonder oositin ve embriyonun uterusu geçmesi ise yaklaşık 80 saat kadar sürmektedir [31].

## 2.5. Telomer; Tarihi, Yaşlanmayla İlişkisi ve Moleküler Yapısı

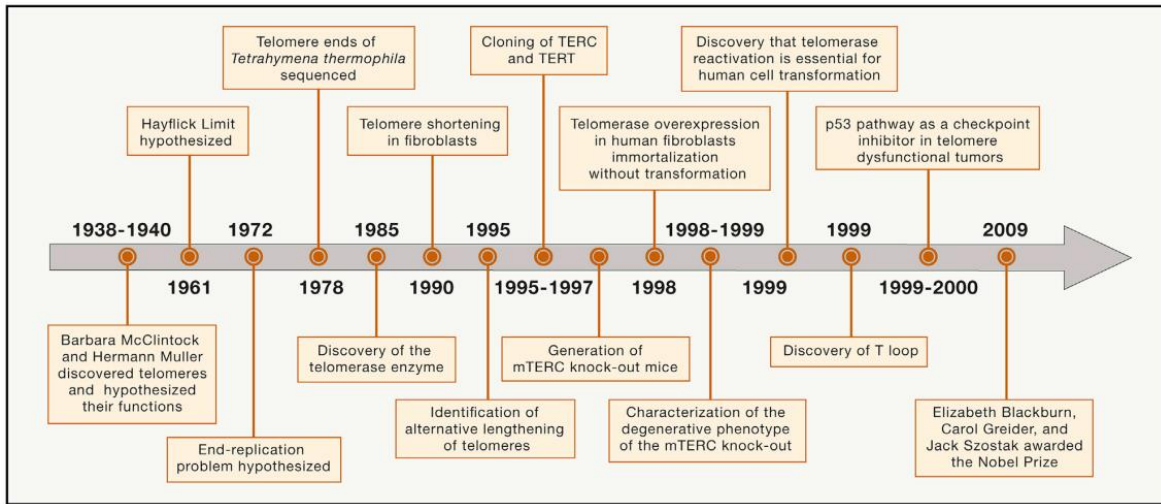
Dünya genelindeki halk sağlığı ve tıp alanındaki gelişmeler sayesinde insanların ortalama yaşam ömrü son yıllarda git gide artmaktadır. 2050 yılında yaklaşık 2,1 milyar kişinin 60 yaşın üzerinde olacağı tahmin edilmektedir ancak bu demografik artışın; yaşlanma ile ilişkili olduğu bilinen Alzheimer, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi hastalıklardaki artışı da beraberinde getireceği öngörülmektedir [42]. Buradan da anlaşılacağı üzere yaşlanma ve bununla ilişkili hastalıklardaki artış bu ikili arasındaki mekanizmaların anlaşılmasını zorunlu hale getirmektedir. Yaşlanma; dokulardaki kök hücrelerin tükenmesi, inflamasyondaki artış, matriks değişiklikleri, hücre senesens ve metabolik işlev bozukluklarının da eşlik ettiği bir dejeneratif değişiklikler silsilesidir [43]. Bu hücre ve doku düzeyinde meydana gelen değişiklikleri anlamak için; mitokondriyon ve ilişkili olduğu yolaklar, proteostazis, hücre içi sinyal yolları, epigenetik mekanizmalar ile DNA tamiriyle ilişkili olarak telomer disfonksiyonuna odaklanılmaktadır [43]. Yaşlanma ve ilişki mekanizmalar ile ilgili yapılan çalışmalar telomerleri önemli bir odak noktası haline getirmektedir. Telomerler, kromozomların bütünlüğünü koruma işlevi gören, kromozom uçlarında bulunarak kep yapısı oluşturan, tekrarlayan ve kodlanmayan DNA dizileridir [42]. Bu tekrar dizileri insanlarda TTAGGG nükleotit dizi tekrarlarından oluşmaktadır ve dizilerin uzunlukları türler arasında farklılık gösterse de aynı işleve sahiptir [44]. İnsanlarda telomer devamlılığını sağlayan genlerin işlevlerindeki aksaklıklar üreme hücreleri ve somatik dejeneratif hastalıklar, diskeratozis konjenita, idiyomatik pulmoner fibrozis, ülseratif kolit ve benzeri hastalıklar ile ilişkilidir [45]. Telomerlerin silindiği ve telomeraz enziminin indüklendiği transgenik farelerle yapılan deneylerin sonucunda telomer disfonksiyonu ve yaşlanma arasında sıkı bir ilişki olduğu görülmektedir [46]. Telomerlerinde işlev bozukluğu olan farelerde endojen telomeraz enziminin yeniden aktivasyonu, erken yaşlanma sürecinin tersine çevrilebileceğinin ön görülmesini sağlamıştır [46].

## 2.6. Tarihi, Yaşlanmayla İlişkisi

Telomer kelimesi ilk olarak 1930'larda McClintock ve Muller tarafından, *Zea mays* ve *Drosophila melanogaster*'in kromozom sonlarında bulunan ve kromozomları füzyondan koruyan yapı olarak ifade edilmiştir [47, 48]. Muller "telomer" terimini Yunanca "son" anlamına gelen telos ve "parça" anlamına gelen "meros" kelimelerinden türetmiştir. 1961 yılında, insan fetal hücrelerinin yaklaşık 50-60 kez bölünme kapasitesine sahip olduğu ifade

edilmiş ve bu duruma “Hayflick Limiti” adı verilmiştir [49, 50]. 1970’lerde [51, 52] lineer DNA replikasyonundaki asimetriyi gözlemleyerek “replikasyon sonu” problemini öne sürülmüştür. Bu problemde araştırmacılar her DNA replikasyonunda terminal RNA primerinin eksilmesi nedeniyle kesintili ipliğin ucunda DNA kaybının olduğunu bildirmişlerdir. Blackburn ve Gall da [53], *Tetrahymena thermophila*’da son DNA dizilerinin 5’-CCCCAA-3’ ve 3’-TTGGGG-5’ tekrarlarına sahip olduğunu göstermişlerdir. Greider ve Blackburn ise tekrarlayan DNA dizilerini kromozomun sonuna ekleyebilen ve telomeraz adı verilen enzimi keşfetmişlerdir [54]. Telomerler insanlarda ise guanin nükleotidinden zengin tekrar dizileri içermektedirler [55]. 1990’larda insan hücreleri ile yapılan hücre kültürü çalışmalarıyla Hyflick limitiyle (bir hücrenin maksimum bölünme sayısı) telomer kısalmasının paralel olduğu anlaşılmıştır [56]. Telomerlerle ilgili heyecan verici bir diğer gelişme ise 1996 yılında, telomeraz enziminin 3’ uç üzerinde etki eden bir ribonükleoprotein yapı olduğunun anlaşılmasıyla ortaya çıkmıştır [57]. Bu gelişmeyi insan telomeraz reverse transkriptaz enzim (hTERT) geninin klonlaması takip etmiştir [58]. Devam eden yıllarda telomer enzim genleri bakımından null olan farelerde yapılan deneylerde telomer disfonksiyonunun prematüre yaşlanma, kanser ve çok sayıda dejeneratif hastalık ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu deneyler neticesinde bozulmamış telomer yapısının genom stabilitesini ve dokulardaki kök hücre rezervini koruduğu ve organ sistemlerinde homeostazı sağladığı ifade edilmiştir [46, 59-61]. 1998 yılında yapılan bir başka çalışmada hTERT enzim ekspresyonunun fibroblastlar, retina pigment hücreleri ve vasküler endotel hücreleri de dahil olmak üzere çok sayıda hücreye sınırsız replikasyon potansiyeli sağladığı gösterilmiştir [62]. Tarihsel olarak telomerazın kanserli hücrelerde upregüle olduğu bilinse de onkogenler ile birlikte TERT ekspresyonunun hücresel transformasyondaki rolü ancak 1999 yılında gösterilebilmiştir [63]. TERC ve TERT knock-out farelerle yapılan deneyler de, telomerlerin yaşlanma mekanizmasındaki rolünü destekler niteliktedir. Telomerler, yaşlanma sürecini yönlendiren bir çekirdek sinyal yolu olarak ifade edilmektedir [60, 64]. Bu modellerden ilkinde telomer disfonksiyonunun yaşam ömrünün kısalması, yaşlı bir fiziksel görüntü, kök hücre rezervinde azalma, organ atrofisi ve hücre ile dokuların stresle başa çıkma mekanizmalarında hasara neden olduğu gösterilmiştir [60, 64]. Bu modele benzer şekilde yapılan bir başka deneysel çalışmada telomer disfonksiyonu ile pregeroid sendromlar ve Parkinson hastalığı arasında bir ilişki de bulunmuştur [59, 60, 64, 65]. Benzer şekilde; yaşlı ve TERC -/- fareler ile yapılan deneylerde, transkriptomik analizler neticesinde yaşlanma ve p53-PGC yolağı ilişkisi açığa çıkarılarak daha önce yaşlanmayla ilgili ortaya atılan her üç teori de; telomer disfonksiyonu (genotoksik stres),

oksidatif hasar ve mitokondriyal fonksiyon kaybı teorileri olarak, ortak bir noktada birleştirilmiştir [61]. Farelerde yapılan TERT geninin indüklendiği bir diğer deney modelinde endojen telomeraz enzim reaktivasyonunun farelerde ileri derecedeki yaşlanmayı tersine çevirdiği gösterilmiştir [46]. Yaşlı farelerde telomeraz enziminin adenovirüsler aracılığı ile indüklendiği bir başka çalışmada ise, akut miyokard enfarktüsünden sonra kalp fonksiyonunun iyileştiği, kas koordinasyonu ve böbrek ile karaciğer fonksiyonlarının geliştiği, insülin direncinin ve deri altı yağ kaybının azaldığı, kemik mineral yoğunluğunu arttığı ve kanser insidansında bir artışa neden olmadan yaşam süresinin uzadığı görülmüştür [66].



Şekil 2.1. Telomer tarihi [42].

## 2.7. Telomerin Moleküler Yapısı

Telomerler en basit canlılardan insan gibi karmaşık sistemli canlılara kadar hepsinde evrimsel olarak DNA uçlarının korunmasını sağlamaktadır [67]. Yapısal olarak oldukça önemli olan bu DNA bölgesi, birkaç taneden yüzbinlerce kilobaza değişen sayıda TTAGGG dizi tekrarlarından oluşmakta ve 3' uçta, guanin nükleotidleri açısından zengin, 75 ila 300 nükleotidlik bir bölgede son bulmaktadır. Telomer dizileri lineer kromozumlu DNA'nın uçlarında bulunmakta, herhangi bir gen bölgesi içermemekte ve bir protein kodlaması yapmamaktadırlar. Telomerler insanlarda kromozomların uçlarında, telomer bölgesinin komşuluğunda bulunan bir adet subtelomerik ve bir adet de telomerik bölge olmak üzere iki alt bölüme ayrılmaktadır [68]. Subtelomerik bölge heterojen şekilde organize olmuş nükleotit tekrarlarından oluşmaktadır ve bu bölgeyi haritalamak veya dizilemek oldukça

zordur [68]. Replikasyon sonu problemlerinden dolayı telomerler her hücre bölünmesinde kısalarak Hyflick limitine erişmektedirler [69]. Griffith ve Lange tarafından yapılan bir çalışma ile, bu bölgenin kendi üzerine katlanarak T loop (telomer loops) , D loop (DNA displaments loop) ve R loop (RNA displaments loop) bölgelerinden oluştuğu gösterilmiştir ve bu bölgeler genellikle 10-20 kb uzunluğundaki tekrar bölgelerinden oluşmaktadır [70]. Bu özel shelterin protein yapı elektron mikroskopuyla tanımlanmıştır ve TRF1, TRF2, TPO1, POT1, TIN2 ve RAP1 protein alt ünitelerinden oluşmaktadır. TRF2 proteini, telomer uzunluğunun ikinci bir negatif düzenleyicisidir ve telomerlerin koruyucu aktivitesinde anahtar rol oynamaktadır, TRF1 ile neredeyse benzer bir yapıya sahiptir ve hücre döngüsünün metafaz evresinde bulunmaktadır ve T loop yapısının korunmasından sorumludur [71]. TRF2 direkt olarak RAP1 ve TIN2'ye bağlanmakta ve TPP1 ile POT1'in bağlanmasına da aracılık etmektedir [71]. Telomer bölgelerinde kısıalma veya olası fonksiyon kayıplarının bir nedeni olarak T-loop bölgesindeki hasarlar da gösterilmiştir. T-loop bölgesinin uzunluğu türden türe değişmektedir. Ancak memelilerde genellikle 300-400 baz çifti arasında olduğu gösterilmiştir [70]. Benzer şekilde tek sarmallı 3' uç, çift sarmallı DNA'nın içine geri girer ve bir yer değiştirme döngüsü (D-loop) oluşturur. Sonuç olarak, telomer loopları, kromozomun uçlarını sınırsız protein bağlanmasından ve çift zincir kırıklarından korumaktadır [72]. Loop formasyonu DNA replikasyonunda çözülmektedir ancak D-loop yapısının nasıl çözüldüğüyle ilgili olan olası mekanizmalar halen anlaşılmiş değildir [72]. Bloom syndrome helicase (BLM) olarakta bilinen helikaz enzimi loop yapısının çözülmesinde temel rolü üstlenmektedir [73]. Benzer şekilde replikasyon proteini A (RPA) da aynı zamanda D-loop yapısına katılmaktadır. RPA ökaryotlarda DNA'ya bağlanan ve DNA replikasyonunun başlatılması ve uzaması için gerekli olan heterotrimerik bir kompleks olarak karşımıza çıkmaktadır.

Telomerler DNA son bölgelerini, füzyondan ve ilişki olarak prematüre senesens mekanizmalarının aktifleşmesinden korumaktadırlar [74]. Sağlıklı dokularda özellikle germ hücreleri, deride farklılaşmamış progenitör hücreler ve kök hücreler ile sindirim sistemi, hematopoietik sistem hücreleri ve testiste telomeraz ekspresyonu söz konusudur [60, 64, 75, 76]. Farklılaşmış hücreler olan keratinositler, fibroblastlar, iskelet kası myositleri, nöronlar, kardiyak myositler ve spermatidlerde TERT seviyeleri ise tespit edilemeyecek düzeydedir [77, 78]. TERC Cajal body RNA'lar (scaRNAs) ile küçük nükleolar RNA (snoRNAs)'lardan meydana gelmektedir. Bu tür RNA'lar diğer genlerin intronlarının içinde kodlanmış olsalar da, TERC kendi promotörüne sahip prototipik bir genidir [79].

## 2.8. Telomeraz ve Ovaryum ilişkisi

Kadınlarda fertilitate ovaryumlardaki foliküler havuz ve bu foliküllerin kalitesiyle ilgilidir. Primordiyal folikül havuzu prenatal yaşam boyunca oluşmaktadır [80]. Foliküler atrezi doğumdan önce başlamakta ve menopoz ile birlikte son bulmaktadır. Foliküler kalitesi ise ovule olup, fertilizasyona gitmeleriyle ilişkilidir. Folikülogenezis boyunca granüloza hücreleri foliküler olgunlaşmayla ilişkili olarak yoğun şekilde proliferasyon olmakta ve folikülün kalitesi yoğun bir şekilde bu hücrelerin proliferasyon kalitesi ile de ilişkili hal almaktadır. Proliferasyon mekanizmasındaki olası bir hasar, kısalmış reproduktif yaşam süresi ve ovulasyon hasarı ile ilişkilendirilmektedir [80]. Yukarıda da değinildiği gibi kromozomların sonlarında bulunan nükleoprotein yapısı olan telomerler, proliferasyon için de bir belirteç görevi görmektedir ve bu özellikleri sayesinde yaşlanma ile direkt ilişkilendirilmektedirler [43]. Telomerlerin uzamasından sorumlu enzim olan telomeraz enzimi [81] insanlarda; embriyonik dokularda, germ hücrelerinde, kök hücrelerde ve lenfositlerde aktivite göstermektedirler. Pek çok yetişkin dokusunda telomeraz aktivitesinden bahsedilemezken, kanserli hücrelerde ise telomerazın yeniden aktive olduğu bulunmuştur [44, 82, 83]. Telomeraz enzimiyle yapılan çalışmalarda enzimin aktivitesini göstermek için dyskrein, NOP10 (nükleolar protein 10) , GAR1 (küçük nükleolar ribonükleoprotein) ve NHP2 (non-histon kromozom proteini) ve TERC alt ünitesine ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir [84]. Telomeraz enziminin, hücre döngüsünün S-fazı boyunca yaklaşık 60 nükleotidlik tekrarlar eklediği bulunmuş ve kısa telomerlerin uzun telomere kıyasla, telomeraz enzimi tarafından daha fazla uzatılma eğiliminde oldukları tespit edilmiştir [85, 86]. Bu durum telomerlerle ilişkili shelterin kompleks üyelerinin telomeraz aktivitesini inhibe etmesiyle ilişkilendirilmiştir [87].

Ovaryumlarda folikülogenezis boyunca granüloza hücrelerinin mitotik indeksi artmaktadır ve dominant folikül mitoz açısından en aktif olan yapıdır. Folikülogenezis ve mitoz aktivitesi düşünüldüğünde, telomer uzunluğu hayati bir önem arz etmektedir. İlginç şekilde telomer kısalmasını sınırlayan en önemli faktör olan telomeraz enzimi, granüloza hücrelerinde çok sayıda replikasyona olanak sağlayacak şekilde yüksek derecede aktiviteye sahiptir ve bu durum granüloza hücrelerinin multipotent kök hücre özelliği göstermesi şeklinde de yorumlanabilmektedir. Telomeraz enziminin bu aktivitesi yıllar önce ineklerde gösterilmiştir [88]. Telomeraz enzim etkinliğinin ovaryumlarda farklı foliküler evrelerde, farklı seviyelerde olduğu şeklinde bir sonuca varılmıştır [89, 90]. En yüksek telomeraz

aktivitesinin preantral foliküllerde olduğu ve foliküler olgunlaşma gerçekleştikçe telomeraz aktivitesinde azalma olduğu bulunmuştur [89, 91, 92]. Buradan yola çıkılarak granüloza hücreleri, bu hücrelerin proliferasyon kapasiteleri ve telomeraz enzimi arasında bir ilişki olduğu söylenebilmektedir [93].

## 2.9. Kanser Tedavisinde Cisplatin

Cis-diamminedichloroplatinum (II) veya cisplatin, etki mekanizması iyi anlaşılmış kanser ilaçlarından biridir. Molekül; mesane, baş-boyun, akciğer, ovaryum ve testiküler kanser tedavilerinde kullanılmaktadır ve karsinomlar, germ hücre tümörleri, lenfoma ve sarkomlar üzerinde de etkilidir [6]. Cisplatin ilk olarak 1844 yılında, M.Peyrone tarafından sentezlenmiştir ve kimyasal yapısı 1893 yılında Alfred Werner tarafından açıklanmıştır. Ancak molekül 1960'lara kadar kanser kemoterapisinde kullanılmamıştır. 1960'ların başında Rosenberg ve arkadaşları tarafından, platinyumun elektroliz ürünlerinin *Escherichia coli*'de hücre bölünmesini inhibe ettiğini göstermişlerdir [94]. Bu aşamadan sonra cisplatin kanser tedavisinde kullanılmaya başlanmış, yakın zamanlarda molekülün sitotoksik etkileri de keşfedilmiş ve 1970'lerin sonlarında germ hücre kanserlerinin sistemik tedavisinde kullanılan temel molekül durumuna gelmiştir [95]. Kanser kemoterapi ilaçları arasında cisplatin en çok ilgi çeken moleküllerden biri olmuştur. 1978 yılında FDA (Food and Drug Administration) tarafından ilk onaylanan platinium temelli kanser ilacıdır [95].

## 2.10. Cisplatin ve Ovaryum

Ovaryum kanserleri jinekolojik kanserler arasında en çok görülen kanser türü olarak karşımıza çıkmaktadır. Pek çok hasta etkili tarama programları olmadığından ve erken dönem semptomlarının azlığından dolayı hastalığın çok geç evrelerinde teşhis edilmektedir. Ameliyatla ovaryumların çıkarılmasının yanı sıra platinyum/taxane ilaçlarıyla kombine kemoterapi uygulanmaktadır. Bu tedavi birincil basamak tedavi olarak uygulanmaktadır ve hastaların %75'inde hastalık yeniden nüks etmektedir. Hastalar kemoterapiye zamanla direnç kazanmaktadırlar [96]. Ovaryum kanserlerinin % 90'ının nedeni bilinmemektedir. Çoğunluğu genetik faktörlere bağlıyken, meme ve kolon kanserleri de ovaryum kanser nedenleri arasında sayılabilmektedir [97]. Cisplatin temelli kanser tedavileri, tedavide direnç gelişme riskine ve çok sayıda yan etkisine rağmen, hala ana tedavi metodudur. Hastalar platinyuma çok duyarlı olsa da zamanla çoğunluğu direnç kazanmaktadır [98]. Direnç

mekanizmasının önüne geçmek için cisplatin genellikle diğer kanser tedavi molekülleri ile birlikte kullanılmaktadır. Cisplatin kullanımı primer ovaryan yetmezlik veya polikistik over sendromu gibi sendromlara neden olmaktadır [7].

### **2.11. Cisplatinin Farmakolojisi ve Moleküler Etki Mekanizması**

Platinyumun çok sayıda membran transportu MDR1 (çoklu ilaç direnç geni)'in analogudur. Bunlar arasında, ATPaz (MRPs,ATP7A/B), (solute carrier family importers) CTR1, SLCs, AQP2 ve AQP9 sayılabilmektedir [99]. MDR1 bir P-glikoprotein olarak bilinen bir ATP bağlayıcı proteindir. Cisplatin kullanımının bakır taşıyıcı CTR1'in, hızlı bozunmasına neden olduğu ve zamanla azalan cisplatin akışının direncine neden olduğu anlaşılmıştır. TMEM205 cisplatin ile ilişkili hücrel direncin tanımlandığı bir membran proteindir. TMEM205 insan dokularında, karaciğerde, pankreasta ve adrenal bezde yüksek ekspresyon seviyelerine sahiptir. Hücrelerdeki artmış TMEM205 ekspresyon seviyeleri kemoterapi alan hastalarda cisplatin direncinin tanımlanması için bir işaretleyici olarak tanımlanmıştır [99].

### **2.12. Cisplatin ve Oksidatif Stres**

Sağlıklı fizyolojik koşullarda hücreler reaktif oksijen türlerinin seviyesini azaltan glutatyon (GSH), süperoksitdismutaz ve katalaz enzim sistemleri ile kontrol altında tutulmaktadır. Ancak oksidatif stres koşullarında, artmış reaktif oksijen türleri hücrel proteinlere, lipidlere ve DNA'ya zarar vererek, lezyon oluşum sürecindeki karsinogeneze katkı sağlamaktadırlar [100]. Kanser hücreleri sağlıklı hücrelerden çok daha fazla reaktif oksijen türlerinin stresine maruz kalmakta ve artmış metabolik aktivite mitokondriyal dezonformasyona neden olmaktadır. Oksidatif stres cisplatin toksisitesinin en önemli mekanizmasıdır. Mitokondriyonlar cisplatinin neden olduğu stresin temel hedefidir ve bu etki neticesinde mitokondriyal proteinlerin sülfidril gruplarındaki kayıp, kalsiyum alımında ve mitokondriyal membran potansiyelinde azalma görülmesine sebep olmaktadır [100]. Cisplatin DNA hasarının yanında hücre ölümünü tetikleyen reaktif oksijen türlerinin üretimini de arttırmaktadır. Reaktif oksijen türlerinin oluşumunda cis-diamindikloro platin (II)'nin konsantrasyonu ve ajana maruz kalma süresi temel faktörlerdir [100]. Hücre içi redoks homeostazı, tiyol grubu (-SH) içeren moleküller tarafından korunmaktadır. Belirli koşullar altında bir tiyol grubu, moleküler oksijen ile etkileşime girebilen tiyil radikallerinin

oluşumuna yol açarak reaktif oksijen türleri oluşturabilmektedir [6, 101]. Aşırı sentezlenen reaktif oksijen türleri hem hücre içinde ve hem de hücre dışındaki ilgili yollara etki ederek apoptozisi indüklemektedir [102]. Hücre dışı apoptozis yolağında, Fas ligand tarafından üretilen reaktif oksijen türleri ve kaspaz-8 etkiliyken, hücre içi yolda reaktif oksijen türleri Bcl-2 ve Bcl-xL'i aktive etmektedir [103]. Artmış reaktif oksijen türleri kanser hücrelerinde, hem apoptozisi ve hem de nekrozu indüklemektedir [104]. Reaktif oksijen türleri aynı zamanda otofajiyle hücre ölümünü de indüklemektedirler [105].

### **2.13. Cisplatin Apoptozisi İndüklemektedir**

Apoptozis; hücrenin büzülmesine, kromatinlerin yoğunlaşmasına, membranda tomurcuklanmaya ve kaspaz adı verilen bir sistein proteaz ailesinin aktivasyonuna yol açan bir hücre ölümü türüdür [106]. Kaspaz aktivasyonu apoptozisin başlangıcıdır ve çok sayıda kaspaz molekülü, çok sayıda hücre içi yolağa etki etmektedir. Örneğin, kaspaz-8 plazma membranındaki hücre ölümü reseptörlerini aktive ederken, kaspaz-9 mitokondriyal disfonksiyonda görev almaktadır. Kaspazlar apoptozisin hem başlatılmasında ve hem de yürütülmesinde görev almaktadırlar. Apoptozisi başlatan kaspazlar arasında kaspaz-3 ve kaspaz-7 sayılırken, devam ettiren kaspazların ise poli-ADP-riboz polimeraza ve DNA fragmentasyonuna neden olarak etki gösterdiği bildirilmektedir [6].

### **2.14. Cisplatin ve Mitojen-Aktive Protein Kinaz (MAPK) İlişkisi**

Mitojen aktive protein kinaz ailesi yapısal olarak serin/threonin protein kinaz aile üyesidir ve hücre büyümesi ve hücrenin hayatta kalması gibi çok sayıda ekstraselüler sinyal yolağının düzenlenmesinde görev almaktadır [107]. Cisplatinin çok sayıda hücre çeşidinde ERK (ekstraselüler sinyal düzenleyici kinazlar) sinyal yolağını aktive ettiği görülmüştür. Cisplatin ile indüklenen ERK aktivasyonu, p53 aracılı DNA hasarı tepkisinden önce gerçekleşmektedir çünkü ERK, p53'ü doğrudan fosforile ederek p21'in düzenlenmesine, büyümenin durmasına ve DNA hasarına (GADD45) neden olmaktadır [108].

### **2.15. Cisplatin ve PCNA**

PCNA molekülü replikasyon çatalının şefi olarak da ifade edilebilmektedir [109]. Ökaryotik hücrelerde hücre bölünmesinin (S) fazı boyunca, genom duplikasyonu olaylanmaktadır ve

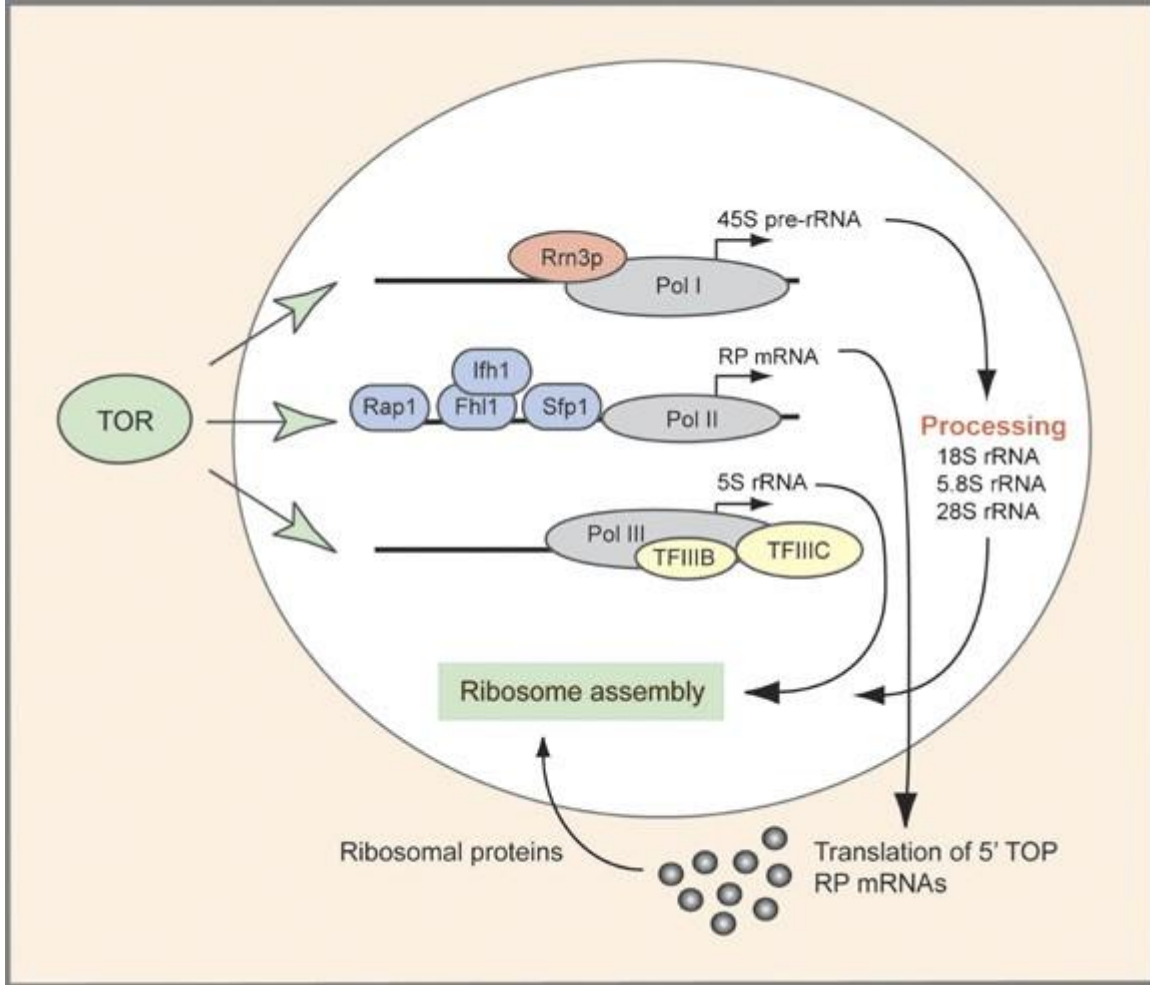
bu sürece çok sayıda farklı faktör etki etmektedir. Bu süreçteki en ufak aksama ise DNA hasarına neden olabilmektedir. DNA replikasyonu replikasyon çatalından başlamakta [110] ve iki önemli adımda gerçekleşmektedir. Bunlar prereplikatif kompleksin (pre-RC) bağlandığı G1 evresi ve S evresidir. DNA polimerazlar ve diğer faktörler DNA sentezi için gereklidir. Helikazlar çift sarmallı yapıyı açarlarken, zincir sentezi, 5'-3'ucu yönünde DNA polimeraz aktivitesiyle gerçekleşmektedir. Primaz, DNA replikasyonu için RNA primeri eklemektedir [109]. Replikasyon faktör C, (RFC) primer kalıba bağlanmakta ve halka şeklindeki replikasyon faktörü olan PCNA'nın bağlanmasını katalizlemektedir [109]. PCNA, replikatif enzimler olan ve DNA sentezinin büyük çoğunluğunu gerçekleştiren enzimler olan Pol $\delta$  ve Pol $\epsilon$  enzimlerinin işlevselliğini artırmaktadır. Bu enzimler 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi içermektedirler. PCNA, yapısal ve işlevsel olarak korunmuş olan DNA kayan kıskaçlar ( $\beta$ -kelepçeler) ailesine aittir ve ATP varlığında DNA'ya bağlanmakta ve bu kıskaçlar asidik yapıdaki proteinlerden oluşmaktadır. Molekül negatif yüklüdür ancak merkezde ki  $\alpha$ -helikaz bölgesi pozitif yüklü aminoasitlerle kaplıdır. Bu yük halkaya pozitif elektrostatik potansiyel kazandırmakta ve bu sayede molekül DNA üzerinde kayarak hareket edebilmektedir [109, 111]. B-kelepçeler DNA'yı saran halka şeklinde ki komplekslerdir ve PCNA monomerleri iki benzer globular domaindir ve esnek bir ilmek oluşturmaktadırlar. PCNA, DNA'ya korunmuş bir şaperon kompleks olan RFC ile tutunmaktadır [112]. ATP bağlanması PCNA-RFC kompleksinin formasyonu için gereklidir ve bu sayede DNA'ya yüklenebilmektedir. RFC, PCNA'nın C terminaline bağlanarak PCNA'yı uzayan DNA'nın 3'ucuna doğru yönlendirmektedir. Böylece PCNA'nın C terminaline bağlanan polimerazların da uzayan uca doğru yönlenmesi sağlanmaktadır [111]. Molekül özellikle kesintili zincirdeki Okazaki fragmanlarının sentezlenmesi ve işlenmesi için önemli olan DNA ligaz ve endonükleaz 1 (FEN1) için de önemli bir role sahiptir [113]. PCNA aynı zamanda DNA onarımı, kromatinlerin yeniden modellenmesi ve hücre döngüsü kontrollerinde de görev almaktadır. Bu moleküllerin PCNA'ya ve enzimlere bağlanmaları arasındaki geçiş farklı mekanizmalar tarafından tetiklenebilmekte ve bu mekanizmalar arasında bağlanma affinitesi, proteolizis veya post-translasyonel modifikasyonlar sayılabilmektedir [113]. PCNA son yıllarda DNA metabolizması ve DNA hasar tolerans mekanizmasına olan katkısıyla da çalışılmaktadır. DNA'nın çok sayıdaki mekanizması ve metabolik yolağı DNA'yı maruz kaldığı strese korumak üzerine kuruludur. PCNA ise replikasyon çatalındaki görevleriyle bu süreçlere ALT'ye (alternatif telomer uzatma) katkıda bulunmaktadır [114]. ALT-aracılı telomer uzaması, POLD3 ve RAD52 rekombinazlar aracılığıyla gerçekleşen BIR (break induced replication) aracılığıyla olmaktadır [115, 116].

Replikasyon sırasında meydana gelen stres, CFSs (common fragile sites) ve telomerler gibi replikasyonu zor olan bölgeleri de etkilemektedir [117, 118].

## 2.16. Cisplatin ve PI3K/Akt/mTOR Sinyal Yolağı

Ökaryot TOR proteinleri ~280 kDa ağırlığında olan ve yaklaşık % 40-60 arasında primer dizilerinde benzerlik gösteren, kinazlar olarak da bilinen fosfotidilinozitol kinaz (PIKK) aile üyesi proteinlerdir ve hücrede büyümeyi ve protein sentezini kontrol etmektedirler [119]. PIKK ailesi üyeleri, fosfatidilinositol 3-kinazların (PI3K) ve PI4K'lerin katalitik alanına benzeyen bir karboksi-terminal serin/treonin protein kinaz bölgesi içerir. TOR'daki kinaz bölgesinin amino terminali, FKBP12-rapamisin bağlama alanıdır [119]. PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı besinlerin, hormonların ve büyüme faktörleriyle stimüle olan tümörlerin hücrel büyümesinde ve proliferasyonunda görev alan temel hayatta kalma yolağıdır. Büyüme koşulları uygun olduğunda, TOR proteini aktive olarak ribozom biogenezinin başlamasını sağlamaktadır ve mayalarda yapılan çalışmalarda rapamycin eklenen kültürlerde TOR sentezinin downregüle olduğu, protein sentezinin ve makrotofajinin azaldığı, çok sayıda stres-tepki proteininin sentezinde artış olduğu da görülmüştür [119]. Buradan yola çıkılarak rapamycin-sensitive TOR'un ribozom biogenezi, mRNA translasyonu, hücre döngüsüne giriş ve anjiyogenez gibi anabolik süreçleri indükleyerek, katabolik süreçleri antagonize ettiği söylenebilmektedir [119]. Fareler üzerinde yapılan çalışmalarda aynı zamanda mTOR (mammalian target of rapamycin) proteinlerinin gelişim için gerekli olduğunu ve rapamycine maruz kalan ratların hücre proliferasyonunun arreste uğradığını bulmuşlardır [120]. mTOR, memeli hücrelerinde bulunan PI3K ve Akt sinyal yolağını etkileyen bir serin/threonin protein kinazdır. PI3K ve Akt'nin downregülasyonunda görev almaktadır [121]. Büyüme faktörü stimülasyonu ile PI3K'daki trozinler otofosforilasyona uğramakta ve daha sonra PI3K fosfotirozin alt ünitelerine direk bağlanarak membrana alınmaktadır. Bu, CAT alt ünitesinin allosterik aktivasyonunu sağlamaktadır [122]. Çok kısa bir süre içinde PI3K aktivasyonu ikincil mesajcı olan fosforlanmış fosfotidilinositol-3,4 bifosfat (PIP2)'in fosforlanmış fosfotidilinositol-3,4,5 trifosfata (PIP3) dönüşmesiyle aktive olur. PI3K daha sonra, protein serin/treonin kinaz-3'-fosfoinositile bağımlı kinaz 1 (PDK1) ve Akt/protein kinaz B (PKB) dahil olmak üzere zara pleckstrin homoloji (PH) alanlarına sahip bir sinyal proteinleri alt kümesini alır. Ardından PIP3 Akt'te bağlanarak, Akt'nin aktive olduğu plazma membranına transloke olur. Akt, T308 ve S473'ün fosforlanmasıyla aktive olur [123]. Akt'nin fosforlanması çok sayıda

hücreyel yolak üzerine etki eder ancak en bilineni mTOR aktivasyonudur. Akt, mTOR'u direkt veya indirekt olarak aktive etmektedir. Akt/mTOR yolu hücreyel hayatta kalmayı ve apoptozis direncini aktive etmektedir. Akt'nin artmış ekspresyon seviyeleri ilaç direnciyle ilişkilidir. Bu yolu aktivasyonu hücre büyümesi ve hayatta kalması için gerekli olan dengede bozulmalara neden olarak metastaza, anjiyogenezde artışa ve tedavilerde dirence neden olmaktadır. [122, 123]. Aktive olan mTOR, mTORc1 ve mTORc2 olmak üzere iki kompleks şeklinde görev yapmaktadır [123]. MtorC1 rapamisin ve rapamisin analoglarının hedefidir. mTORc1 çok iyi çalışılmış ve karakterize edilmiş olsa da, mTORc2'nin hücre metabolizmasını etkilediği ve kanser hücre büyümesinde görev aldığı anlaşılmıştır [124]. mTOR protein ailesi; aktin-iskelet yapısına, proteinlerin yıkımına, sinyalizasyonuna ve ribozomların yapımında mRNA transkripsiyonuna ve protein translasyonun başlatılmasına katılırlar [125]. Akt/mTOR yolundaki dejenerasyonlar kansere neden olmaktadır ancak ovaryum kanserleri ve bu yolu ilişkisi halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir [126]. Mtor yolunun aktivasyonu, primordiyal folikül aktivasyonu için önemlidir çünkü molekül mRNA translasyonunu, hücre büyümesini, proliferasyonu, otofajiyi, besin sinyallerini ve hücreyel hayatta kalmayı regüle etmektedir [119].

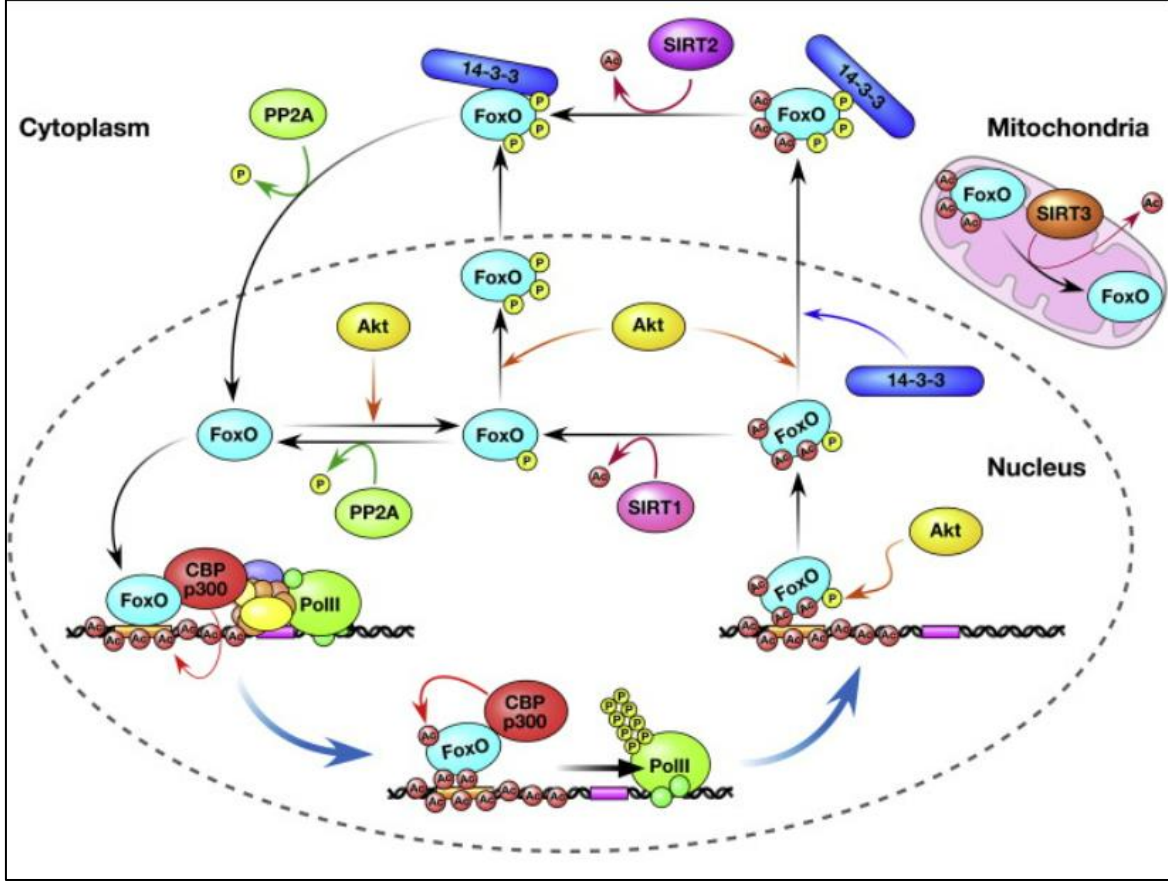


Şekil 2.2. mTOR ribozom biogenezi hücresel yoluğı [16].

### 2.17. Cisplatin ve FOXO3

Forkhead box, kelimelerinin kısaltılmasından oluşan FOX protein ailesi, transkripsiyon faktör süper ailesi üyesidir [127]. Forkhead (replikasyon çatalı) geni ilk olarak 1989 yılında *Drosophila*'da tanımlanmıştır [128]. Forkhead box, süper aile üyeleri olarak FOXO3 (FOXO3a/FKHRL1, FKHR-like 1), FOXO4 (AFX, acute-lymphocytic-leukemia-1 fused gene from chromosome X) ve FOXOa genleri sayılabilir [127]. Bu protein ailesi yaşam süresi, stres direnci, apoptozis, hücre proliferasyonu ve döngüsü, farklılaşma ve metabolizma ile ilişkili hücresel yollarda görev almaktadır [129]. Bu molekül aynı zamanda foliküler gelişimin düzenlenmesi, ovaryum patolojileri ve ilişkili olarak ovaryum yaşlanması, yaşam uzunluğu ile ilişkili yollarda da görev almaktadır. FOXO3a aktivitesi çok sayıda mekanizma ile kontrol edilmektedir. Bu mekanizmalar arasında fosforillenme, asetilasyon, ubiquitinasyon, metilasyon ve protein-protein etkileşimleri sayılabilmektedir.

Bu aktivasyon mekanizmaları ile molekülün subseleler organizasyonu, protein sentez düzeyleri ve DNA'ya bağlanma özellikleri değişmektedir [130]. Molekülün fosforlanması ekstraselüler enzimler olan protein kinaz B (PKB), serum glukokortikoid-indükleyici kinaz ve inhibitör kapp B kinaz ile yapılmaktadır [131]. Fosforillenen FOXO3a sitoplazmaya diffüze olmaktadır. FOXO3a'nın transkripsiyonel regülasyonu, PI3K sinyal yolağıyla ilişkilidir. Memelilerde FOXO3a PKB tarafından fosforillendikten sonra nükleustan sitoplazmaya diffüze olmaktadır. Sitoplazmaya geçen FOXO3a poliubiquitinasyon yolağına girerek preteazomlar tarafından degrade olmaktadır. FOXO3a eksikliği, primordiyal folikül havuzunda azalmaya ve ilişkili olarak prematüre ovaryan yetmezliğe neden olmaktadır [129]. Aktive olan primordiyal foliküllerde FOXO3a fosforile edilmekte ve fosfo-FOXO3a proteini sitoplazmaya geçmektedir [132]. Nükleer FOXO3a proteini primordiyal foliküllerdeki dormansinin devam ettiğinin histolojik bir kanıtıdır ve foliküler aktivasyonla birlikte protein sitoplazmaya diffüze olmaktadır [132, 133]. FOXO3a hücre döngüsü, DNA hasarı tamir mekanizması, apoptozis, oksidatif stres ve metabolik süreçlerle yakından ilişkilidir ve molekülün foliküler gelişimde nasıl bir rol oynayacağı bu yollardan hangisinin aktive olduğuyula alakalıdır. Oksidatif stres altında, ROS türlerindeki artış FOXO3a'nın post-translasyonel modifikasyonlarına neden olmaktadır. FOXO3a'nın regülasyonu hücre döngüsü arrest yolağı ve apoptozis yolağında görev alarak hedef genlerin downregülasyonunu sağlamaktadır ve PKB, SIRT1, ROS ve mTOR aracılığıyla oksidatif stres ve enerji metabolizmasına katılarak apoptozisi artırarak direk olarak primordiyal folikül aktivasyonu, oosit ve granüloza hücre apoptozisi ile folikül gelişimi ve büyümesine etki etmektedir [130].



Şekil 2.3. FOXO3a hücre içi sinyal yolları [130].

## 2.18. Sikloastrogenol (CAG)

Sikloastrogenol (CAG), steroid-iskelet yapısındadır ve *Astragalus membranaceus*'un aktif ürünüdür [134]. Çok sayıda çalışma CAG'nin çok çeşitli farmakolojik aktivitelere sahip olduğunu göstermiştir. Bu aktiviteleri arasında anti-inflamatuar, anti-fibrözis [135], anti-oksidatif stres, antibakteriyal, antiviral, endoteli koruyucu aktivite ve immün regülatör aktiviteleri sayılabilmektedir [27]. Molekül bu etkilerini ERK/JNK, Wnt/ $\beta$ -catenin, AKT-mTOR-RPS6KB1 ve JAK/STAT3 sinyal yolları aracılığıyla göstermektedir [136]. Mevcut literatür bilgileri, bu ajanın farmakolojik ve farmakokinetik etki mekanizmasına odaklanmış durumdadır. Molekül telomeraz aktivatörü olarak da aktivite göstermektedir [27]. Bilindiği üzere telomeraz aktivitesi somatik hücrelerin yaşam döngüsünü uzatmaktadır ve yeni doğanlarla karşılaştırıldığında yetişkinlerin telomer uzunluklarının kısaldığı görülmektedir. Çok sayıda hastalıkta da telomeraz enzim disfonksiyonu olduğu belirlenmiştir. Bu hastalıklar arasında çoklu sistem bozuklukları, kardiyovasküler sistem hastalıkları, solunum sistemi hastalıkları ve nörodejeneratif hastalıklar sayılabilmektedir

[137-140]. Bu hastalıklar düşünüldüğünde CAG ve etki mekanizması önem arz etmektedir. CAG özellikle HEK-neonatal keratinositlerdeki ve HEK293 hücrelerindeki ERK sinyal yolağının fosforilasyonunu arttırmaktadır [135]. Ancak telomeraz enzimiyle ilişkili olan etki mekanizması halen tam olarak anlaşılmamıştır. CAG'ın telomeraz enzim aktivitesi MAPK ve Akt sinyal yolağıyla ilişkilidir [135]. Akt sinyal yolağının aktive olması telomeraz reverse transkriptaz enziminin (TERT) katalitik alt ünitesinde, post-transkripsiyonel modifikasyonlar aracılığıyla fosforilasyona neden olmaktadır [135]. Ek olarak epidermal büyüme faktörü (EGF), direkt olarak hTERT'in promotör bölgesine Ras/MEK/ERK yolağı ve Ets faktörü aracılığıyla bağlanmaktadır [135].

### **2.19. CAG'ın Anti-Aging Etkisi**

Yaşlanma, yaşamı tehdit eden birçok hastalığın temel nedenidir [141]. CAG yaşamı tehdit eden bu süreç için potansiyel bir tedavi ajanı olmaya aday bir molekül olarak karşımıza çıkmakta ve insanlarda lenfositlerdeki ortalama telomer uzunluğunun, yaşlanma ve ölüm gibi süreçlerde bir biomarker olabileceğini göstermektedir [142, 143]. Telomeraz enzim sentezindeki inhibisyonların, özellikle hücre ölümüyle sonuçlanan hücresel yaşlanmayı indüklediği görülmüştür [144, 145]. CAG'ın anti-aging etkisinin telomeraz enzimiyle gerçekleştiği düşünülmektedir ve CAG popüler anti-aging protokolleri literatürüne girmiştir [27]. Son zamanlarda Xu ve diğerleri, CAG'ın  $\beta$ -Klotho (KLB) ekspresyonunu upregüle ettiği ve ROS (reaktif oksijen türleri) üretimini etkileyerek sığırlardaki granüloza hücrelerinde işlev bozukluğunu hafiflettiği görülmüştür [146]. Klotho geninin aşırı ekspresyonu yaşam sürelerini uzatırken, gende meydana gelen mutasyonlar prematüre yaşlanma sendromlarına neden olmaktadır [147]. CAG ve TERT'in sığır granüloza hücrelerindeki plazmid ekspresyon seviyeleri KLB ekspresyonunu artırırken ROS seviyelerini azalttığını ve hücrelerin apoptozisini inhibe ettiğini göstermiştir [27].

### **2.20. CAG'ın Anti-İnflamatuvar Etkisi**

İnflamasyon bağışıklık sisteminin mikrobiyal invazyon veya zararlı uyaranlara karşı verdiği cevabın bir sonucu olarak karşımıza çıkmaktadır [148]. 2019 yılında Deng ve diğerleri, yaptığı bir çalışmada 50 mg/kg CAG'ın farelerde sedef benzeri cilt iltihabını önemli ölçüde iyileştirebildiğini ve IL-1 $\beta$ , TNF-a ve IL-6 gibi proinflamatuvar sitokinlerin seviyelerini düşürebildiğini göstermiştir [149]. CAG'ın özellikle NLRP3 inflamazomları üzerinde etki

gösterdiği bildirilmiş ve bu inflamazomların inflamatuvar hastalıkların gelişmesinde önemli bir role sahip olduğu tespit edilmiştir. CAG'ın özellikle NLRP3 inflamazomlarının sentezini inhibe ettiği ve mitokondriyal membran kaybını, kaspaz-1'in ve kaspaz-3'ün aktivasyonlarını inhibe ederek yeniden düzenlediği gösterilmiştir [150-152].

### 2.21. CAG'ın Farmakokinetik Etki Mekanizması

Farmakokinetik çalışmalar özellikle terapötik ajanların kimyasının tanınmasında ve optimizasyonunda temel adımı oluşturmaktadır [153]. 2010 yılında, CAG'ın farmakokinetik etki mekanizması üzerine yapılan bir çalışmada araştırmacılar Caco-2 modelinde karaciğerdeki mikrozoamların *in vitro* koşullarda değerlendirmesini yapmışlardır. Buna göre molekülün pasif diffüzyon ile hücre membranından geçtiğini ve 30 dk'lık inkübasyonun ardından yalnızca %17.4 ile %8.2'sinin karaciğer mikrozoamlarında görüldüğünü bulmuşlardır. Araştırmacılar CAG'ın faz-I [154] reaksiyonuna maruz kaldığını göstermişlerdir [155]. Yapılan çalışmalarda, CAG'ın %0.5 karboksimetil selüloz ile oral yolla uygulanan 10 mg/kg dozunun, yaklaşık  $5.70 \pm 1.62$  saat sonunda absorpsiyon oranının %25.70 oranında olması, ajanı yeni bir klinik ilaç olarak tanımlamaya yeterli olarak görülmüştür [156]. Idrees ve diğerleri, 2023 yılında, CAG ve yaşlanma mekanizması ilişkisini araştırmak için yaptıkları çalışmada molekülün telomeraz aktivitesini moleküler docking (moleküler kenetlenme) metodu ile göstermiş ve araştırmacılar CAG ile telomeraz enziminin katalitik bölgesi olan TERT'in kinetik olarak uyumunu da göstererek, molekülün telomeraz enzim aktivatörü olduğunu ispatlamışlardır [27].

### 2.22. CAG'ın Toksikolojisi

CAG'ın etki mekanizmasının genişliği ve farmakolojik etkileri onu önemli bir klinik ajan yapsa da molekülün klinik kullanımda güvenilirliği sorusunu halen tam olarak cevaplanamamıştır. CAG bir telomeraz aktivatörüdür ancak toksik etkileriyle ilgili çalışma sayıları sınırlıdır. Deney hayvanları üzerinde yapılan deneysel bir çalışmada 150 mg/kg dozunda ve 91 gün süresince uygulanan CAG dozunun herhangi bir toksik etkisinin olmadığını eritrosit mikronükleus metodu ile gösterilmiştir [157]. Yaklaşık 7000 insan üzerinde 5 yıl süresince yapılan bir başka çalışmada ise, yılda 50 mg/kg dozunda uygulanan CAG'ın sadece birkaç insanda hafif yan etkiye neden olduğu gösterilmiştir [158]. Molekül, 2014 yılında FDA tarafından güvenli ilaç kategorisine alınmıştır [26].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada 6-8 haftalık *Sprague dawley* cinsi 40 adet dişi rat kullanıldı. Ratlar ortalama  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık döngüde, ad libitum içme suyu ve standart yem ile beslendi. Ratlardan rastgele seçim yapılarak 5 deney grubu oluşturuldu (Çizelge 3.1.). 14 gün süresince deneklerin ağırlıkları ölçüldü. Deney bitiminde deneklerden yüksek anesteziik madde dozu altında intrakardiyak kan alındı.

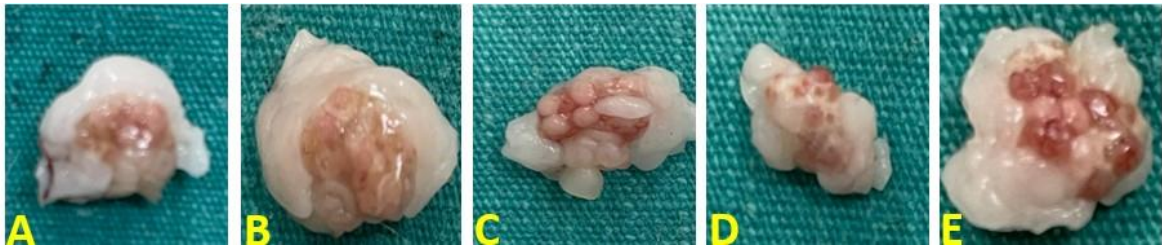
Çizelge 3.1. Ratlardan rastgele 5 deney grubu

DENEY GRUPLARI					
GRUP NO	ADI	DOZ	UYGULAMA ŞEKLİ	DENEK SAYISI	UYGULAMA SÜRESİ
1.	Çözücü Grubu (DMSO)	% 5 DMSO	Gavaj	n=5	14 Gün
2.	Çözücü Grubu (DMSO)	%5 DMSO	İntraperitoneal Enjeksiyon	n=5	14 Gün
3.	Cycloastrogenol (CAG)	7 mg/kg (% 5 DMSO)	Gavaj	n=10	14 Gün
4.	Cisplatin (CİS)	1,5 mg/kg (% 5 DMSO)	Intraperitoneal Enjeksiyon	n=10	14 Gün
5.	Cycloastrogenol (CAG) + Cisplatin (CİS)	7 mg/kg (%5 DMSO) + 1,5 mg/kg (%5 DMSO)	Gavaj + Intraperitoneal Enjeksiyon	n=10	14 Gün

1. İlk çözücü grubuna, %5'lik DMSO (Merck, Lot; K54374143231) gavaj yoluyla uygulanmıştır.
2. İkinci çözücü grubuna, %5'lik DMSO (Merck, Lot; K54374143231) intraperitoneal enjeksiyon (i.p.) ile uygulanmıştır.
3. Cycloastrogenol (CAG) grubuna, 7 mg/kg CAG (Sigma-Aldrich, Lot; SMB00372) %5 'lik DMSO'da çözünerek 14 gün süresince gavaj yoluyla uygulanmıştır [159].
4. Cisplatin (CİS) grubuna, 1,5 mg/kg CİS (MedChemExpress, Lot; 266775563) %5'lik DMSO'da çözünerek 14 gün süresince i.p. yoluyla uygulanmıştır.
5. CAG+CİS grubuna, % 5'lik DMSO'da çözünen 7 mg/kg CAG ve % 5'lik DMSO'da çözünen 1,5 mg/kg CİS 14 gün süresince sırasıyla gavaj ve i.p. yoluyla uygulanmışlardır.

### 3.1. Histokimyasal Metod

Deney bitiminde alınan ovaryum dokuları (Resim 3.1) % 10 nötral formalinde 24 saat fikse edildikten sonra rutin histolojik takip işlemlerinden geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan parafin bloklardan 4 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler etüvde 57°C’de 2 saat deparafinize edildikten sonra % 100, % 96, % 80, % 70 % 50 şeklinde azalan alkol serilerinden geçirildi. 10 dk akarsuda yıkandıktan ve alkol uzaklaştırıldıktan sonra Harris’ Hematoksilen solüsyonunda 10 dk tutuldu ve akarsuya alınarak boyanın renginin oturması sağlandı. Ardından % 1’lik HCl solüsyonunda (asit-alkol) 1-2 dip yapıldıktan sonra kesitler tekrar akarsuda yıkandı. Lamlar fazla su uzaklaştırıldıktan sonra 10 dk Eozin solüsyonunda bekletildi. Fazla boyayı uzaklaştırmak için 10 dk akarsuda yıkandıktan sonra kurutularak % 50, % 70, % 80, % 96, % 100 şeklinde artan alkol serilerinden geçirildi ve suyun kesitlerden uzaklaştırılması sağlandı. 45 dk ksilolde şeffaflaştırıldıktan sonra entellan ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) ışık mikroskopunda, LAS9 bilgisayar destekli programda görüntülenerek kaydedildi.



Resim 3.1. Sakrifiye edildikten sonra ovaryum dokuları. A; Kontrol-1, B; Kontrol-2, C; Sikloastrogenol (CAG), D; Cisplatin (CİS), E; Sikloastrogenol (CAG) + Cisplatin (CİS).

### 3.2. İmmunohistokimyasal Metod

İndirekt immünohistokimya yöntemi kullanılarak folikülogeneziste önemli antikorların işaretlemesi yapıldı. Bu amaçla L-polilizinli lamlara alınan 4 mikron kalınlığındaki kesitler etüvde 57°C’de 2 saat bekletilerek deparafinize edildi. Lamlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15’er dakika ksilolde tutulduktan sonra sırasıyla % 100’lük, % 96’lık, % 80’lik ve % 70’lik alkol serilerinden 7’şer dakika geçirilerek rehidratasyonları sağlandı. Ardından 2 kez 5’er dakika distile suda bekletilerek alkolden kurtarıldı. Doku içerisinde formaldehitin kapattığı antikor bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla mikrodalga fırında 1 M sitrat tamponunda (pH:6.0) 3x5 dk etkin bırakıldı ve oda

ısısında 20 dk soğutulduktan sonra hidrofobik kalem ile dokuların etrafı çizildi. Lamlar %3'lük hidrojen peroksit nemli ortamda etkin bırakılarak dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Daha sonra lamlar phosphate buffer saline (PBS) (pH: 7,4) ile yıkandı. Bundan sonraki aşamalara indirekt immünohistokimyasal ile uyumlu kit ile devam edildi. Öncelikle özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla Ultra V Block (Thermo-scientific, Lot; PHLT811) uygulandı. Bloking aşamasının ardından kesitler yıkanmadan PCNA (Santa cruz., lot:#J2219, 1/100) , anti-MTOR (Affinity bio, lot:#AF6308, 1/100) ve anti-FOXO3A (Affinity bio, #AF6020, 1/75) anti-Caspaz 3 (Bioss, lot#AG12061316, 1/200), primer antikörlerine bir gece +4<sup>0</sup>C' da etkin bırakıldı. Süre sonunda dokular 3x3 dk PBS ile yıkandıktan sonra, 10 dk biyotinli goat anti-poyvalent (Thermo-scientific, lot; PHLT811) sekonder antikoru uygulandı. Dokular, 3x3 PBS ile yıkanmanın ardından enzimin biyotine bağlanması amacıyla 10 dk streptavidin peroksidaz enzim kompleksine (Thermo-scientific, lot; PHLT811) etkin bırakıldı. Lamlar tekrar 3x3 PBS ile yıkandıktan sonra AEC kromojen (Thermo-scientific, Lot; HA53704) uygulanarak gözle görülebilen immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. Zemin boyaması için Harris' Hematoksilen 10 saniye süresince damlatılarak 5 dk akarsuyun altında yıkandı. Vision Mount solüsyonuyla lamlar, lamellerle kapatıldı. Elde edilen preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) ışık mikroskopunda, LAS9 bilgisayar destekli programda görüntülenerek kaydedildi.

İmmünohistokimyasal tutulumlar her bir antikör ve her grup için değerlendirildi ve gruplar arasında tutulum yoğunlukları arasında anlamlı bir farklılık olup olmadığının tespiti için uygun istatistiksel analizler yapıldı. İmmünohistokimyasal tutulumların değerlendirilmesi image J programında yapıldı [160].

### **3.3. AMH ve Telomeraz Aktivitesi Ölçümü için ELİZA Metodu**

Primordiyal folikül havuzu tayini için AMH (BT Lab, lot; 202302008) ve enzim aktivitesi tayini için de Telomeraz Enzim ölçümleri (BT Lab, lot; 202302008) ELİZA metodu ile uygulandı. İntrakardiyak kan alımı ile sarı kapaklı tüplere toplanan kan örnekleri oda sıcaklığında 10-20 dk boyunca bekletildikten sonra 20 dk süresince 4000 rpm'de 4' de santrifüj edildi. Süpernatant ve serum toplanarak pellet atıldı ve sandviç-ELİZA metodu uygulandı. Kit oda ısısına gelmesi için 30 dk bekletildi. Yıkama tamponu, standart çalışma solüsyonu, biyotinli antikör çalışma solüsyonu ve HRP konjügatı çalışma solüsyonu kitin

içeriğine uygun şekilde hazırlandı. Mikroplate kuyucuklarına 100 µl hazırlanan standart çalışma solüsyonu eklenerek standart serileri oluşturuldu. Diğer kuyucuklara 40 µl serum örneklerinden ve biyotinli HRP solüsyonu eklendikten sonra 60 dk 37°'de sıcaklıktaki etüvde inkübe edildi. İnkübasyon sonunda fazla sıvı uzaklaştırıldı ve mikroplate 5 defa wash buffer ile yıkandı. 50 µl solüsyon A ile 50 µl solüsyon B eklenerek karanlıkta 37°'de sıcaklıktaki etüvde 10 dk inkübe edildi. Son olarak 50 µl stop solüsyonu eklenerek AMH ve Telomeraz Enzimi için 450 nm'de ölçüm yapıldı.

### **3.4. Telomer Uzunluğu için Real Time PCR Metodu**

#### **3.4.1. DNA izolasyonu**

Gene ALL, Exgene Blood SV, Lot: 105-326 Kit ile DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

DNA izolasyon protokolü aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir.

1. Dokular bistüri yardımıyla kesildi ve 1.5 ml tüp içerisine 20 uL Proteinase K eklendi.
2. 20 ul RNase A eklendi. Pipetaj yapıldı. Oda sıcaklığında 2 dk bekletildi.
3. 200 ul BL Buffer eklendi. 56°C 10 dk inkübe edildi.
4. 200 ul absolute ethanol eklendi.
5. Kolona aktarıldı ve 10,000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
6. 600 ul BW Buffer eklendi. 10,000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Collection tüp yenilendi.
7. 700 ul TW Buffer eklendi. 10,000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
8. Boş olarak full speed 14,000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi.
9. Temiz ve etiketlenmiş tüp içerisine alındı. 60 ul AE Buffer eklendi. 14.000 rpm'de 2 dk santrifüj yapıldı.
10. Elde edilen DNA örnekleri -20 °C'de donduruldu.

#### **3.4.2. Real-time PCR**

DNA izolasyonundan sonra Real-Time PCR aşamasına geçildi. Real-Time PCR için aşağıda marka, isim ve katalog numarası verilen malzemeler kullanıldı (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. Real-Time PCR için kullanılan kit

Real-Time PCR için Kullanılan Malzemeler		
Kullanılan Kitin Markası	Kit Adı	Katalog No
ELK Biotechnology	Rat Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (Relative)	EQ028

Real-time PCR (TEL)

TEL primer seti kullanılarak master mix hazırlandı. Master mix bilgileri aşağıdaki tabloda verilmiştir (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. Master mix bilgileri

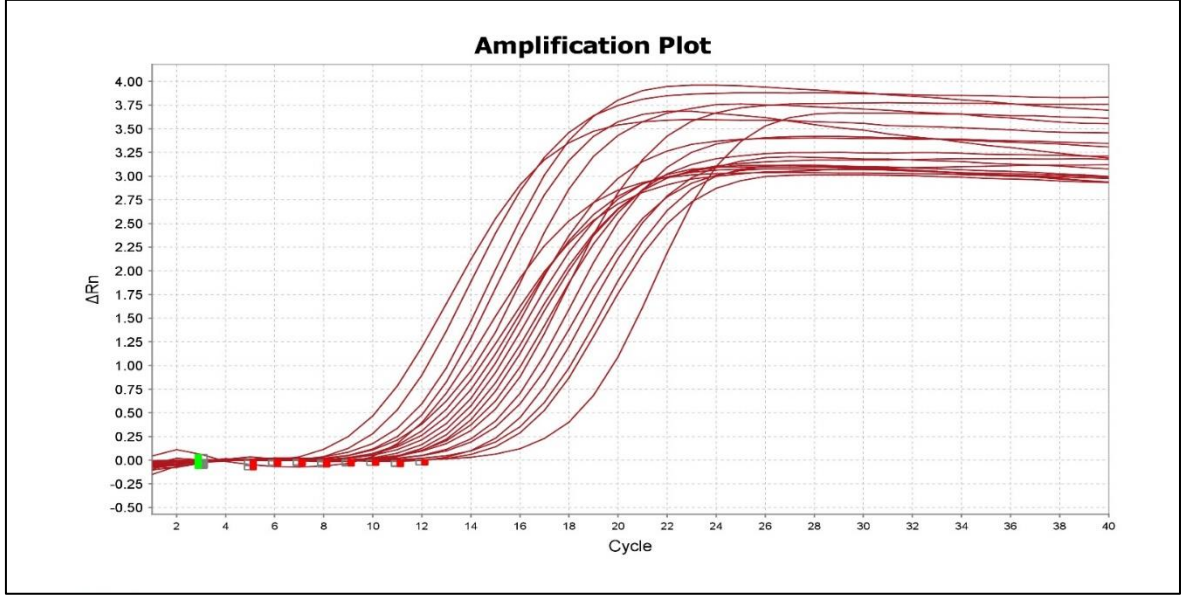
Real-Time PCR için Hazırlanan Master Mix Bilgileri	
Bileşen	Hacim (µl)
2 x Mix	10
Telomer (TEL) primer set (10 uM)	0.4
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	8.2
Genomic DNA Template (0.5~5ng/ul)	1
<b>TOPLAM</b>	<b>20</b>

Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time PCR reaksiyonu başlatıldı. Real-Time PCR için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. Real-Time PCR reaksiyonu Applied Biosystems™ QuantStudio 5 cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. Real-Time PCR için kullanılan reaksiyon koşulları

PCR Reaksiyonu Koşulları			
	Temp (°C)	Time	Cycle
Pre- Denaturation	95	1 min.	1
Denaturation	95	10 sec.	40
Annealing	55	30 sec.	
Extended	72	45 sec.	
Melt Curve			

Real-Time PCR sonunda elde edilen amplifikasyon ve melting curve grafikleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Real-Time PCR sonunda elde edilen amplifikasyon ve melting curve grafiği (Single copy reference)

#### Single copy reference real-time PCR (SCR)

SCR primer seti kullanılarak master mix hazırlandı. Master mix bilgileri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 3.5. PCR master mix bilgileri

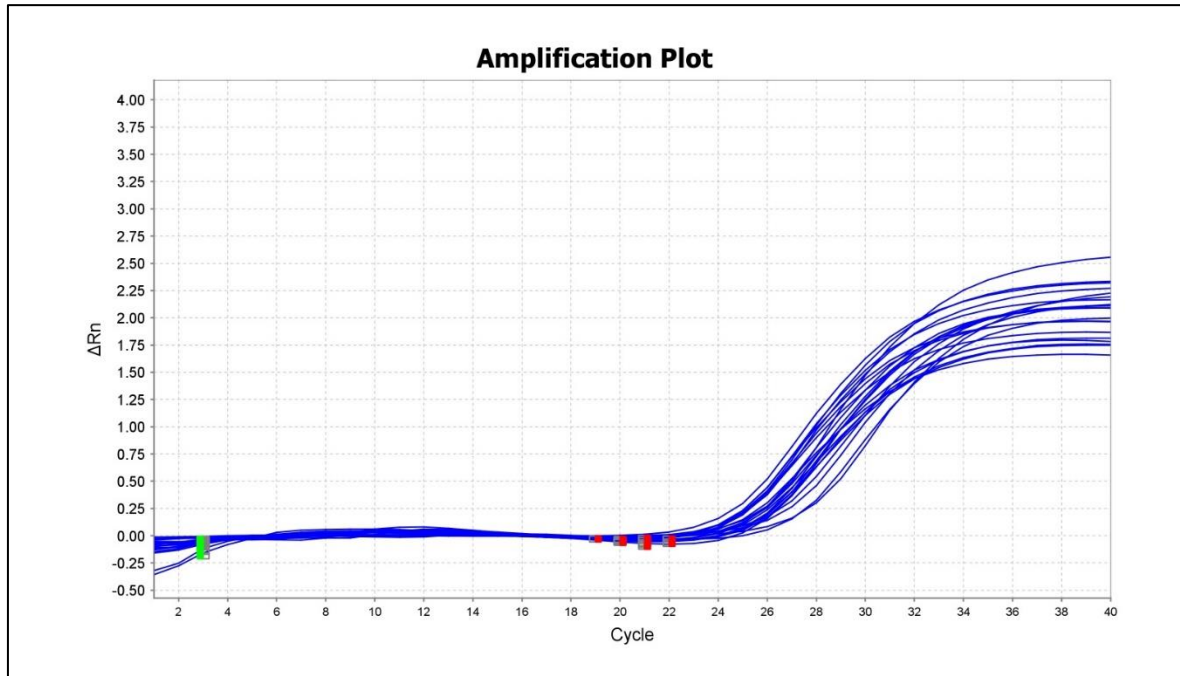
Real-Time PCR için Hazırlanan Master Mix Bilgileri	
Bileşen	Hacim (µl)
2X mix	10
Single Copy Reference Primer Mix (10 uM)	0.4
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	8.2
Genomic DNA Template (0.5~5ng/ul)	1
TOPLAM	20

Mastermix hazırlandıktan sonra Real-Time PCR reaksiyonu başlatıldı. Real-Time PCR için kullanılan reaksiyon koşulları aşağıdaki tabloda belirtilmiştir. Real-Time PCR reaksiyonu Applied Biosystems™ QuantStudio 5 cihazında gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.6. Reaksiyon koşulları

PCR Reaksiyonu Koşulları			
	Temp (°C)	Time	Cycle
Pre- Denaturation	95	1 min.	1
Denaturation	95	10 sec.	40
Annealing	55	30 sec.	
Extended	72	45 sec.	
Melt Curve			

SCR primerleri kullanılarak gerçekleştirilen Real-Time PCR reaksiyonu amplifikasyon ve melting curve grafiği aşağıdaki şekildedir.



Şekil 3.2. Amplifikasyon ve melting curve (TEL)

### 3.4.3. Telomer uzunluğunun hesaplanması

1. TEL primerleri kullanılarak izole edilen DNA örneklerinden elde edilen C<sub>q</sub> değerinden, Referans DNA örneğinin C<sub>q</sub> değeri çıkarılarak normalize edilmiş ve ΔC<sub>q</sub> (TEL) değeri elde edilmiştir.

$$\Delta C_q (TEL) = C_q (TEL, izole edilen DNA örneği) - C_q (TEL, referans DNA örneği)$$

2. SCR primerleri kullanılarak izole edilen DNA örneklerinden elde edilen Cq değerinden, Referans DNA örneğinin Cq değeri çıkarılarak normalize edilmiş ve  $\Delta Cq$  (SCR) değeri elde edilmiştir.

$$\Delta Cq (SCR) = Cq (SCR, izole edilen DNA örneği) - Cq (SCR, referans DNA örneği)$$

3.  $\Delta Cq$  (TEL) değerinden  $\Delta Cq$  (SCR) değeri çıkarılarak  $\Delta\Delta Cq$  değeri elde edilmiştir.

$$\Delta\Delta Cq = \Delta Cq (TEL) - \Delta Cq (SCR)$$

4. İzole edilen DNA örneğinin referans numuneye göre göreceli telomer uzunluğunu kat değişimi cinsinden (Fold Change) belirlemek için;  $\Delta\Delta Cq$  değeri  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  ifadesine dönüştürülmüştür.

$$\text{İzole edilen DNA örneklerinin referans DNA örneğine göre göreceli telomer uzunluğunu (Fold)} = 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

5. Diploid hücre başına izole edilen DNA örneğinin toplam telomer uzunluğunu belirlemek için; 4. adımda belirlenen DNA örneklerinin referans numuneye göre göreceli telomer uzunluğu değeri, referans örneğin telomer uzunluğuyla (4.39 mb) çarpılmıştır. Referans örneğin telomer uzunluğu kit üreticisi firma tarafından daha önce belirlenmiş olup, 4,39 mb'dır.

$$\text{Diploid hücre başına izole edilen DNA örneğinin toplam telomer uzunluğu} = \text{Referans DNA örneğinin telomer uzunluğu} \times 2^{-\Delta\Delta Cq}$$

6. Tek bir kromozom ucundaki ortalama telomer uzunluğunu belirlemek için; 5. adımda belirlenen diploid hücre başına izole edilen DNA örneğinin toplam telomer uzunluğu değeri, 84'e bölünmüştür (Bir diploid insan hücresinde 84 kromozom ucu bulunur).

$$\text{Tek bir kromozom ucundaki ortalama telomer uzunluğu} = \text{Diploid hücre başına izole edilen DNA örneğinin toplam telomer uzunluğu} / 84$$

Sonuçlar: Referans genomik DNA örneğinin ortalama telomer uzunluğu:

*Diploid hücre başına  $6,32 \pm 0,45$  Mb veya kromozom ucu başına  $75,2 \pm 5,4$  kb.*

### **3.5. Folikül sayısı**

Folikül sayımı için her gruptan rastgele 6 preparat seçildi Gruplar arasında folikül sayılarını değerlendirmek için, her denek için rastgele seçilen 6 kesitte, x400 büyültmede sayımlar gerçekleştirildi [161]. Foliküler primordiyal, primer, sekonder, Graaf ve atretik foliküller olarak alt başlıklara ayrıldı [162].

*Primordiyal folikül;* merkezde primer oosit ve çevresinde tek katlı yassı foliküler hücrelerin olduğu foliküldür.

*Primer Folikül;* antrumun henüz şekillenmediği ve foliküler hücrelerin küboidal şekil aldığı foliküllerdir.

*Antral Folikül;* antrum adı verilen kavitenin şekillendiği foliküllerdir.

*Atrezi;* foliküler hücrelerin kollabe ve çoğunun piknotik görünümlü olduğu ve granüloza hücrelerinin bazal membranından ayrıldığı, zona pellusidanın dejenere olduğu, oositin periferine doğru çekildiği foliküller dejenerasyondur [163].

### **3.6. İstatistiksel Analizler**

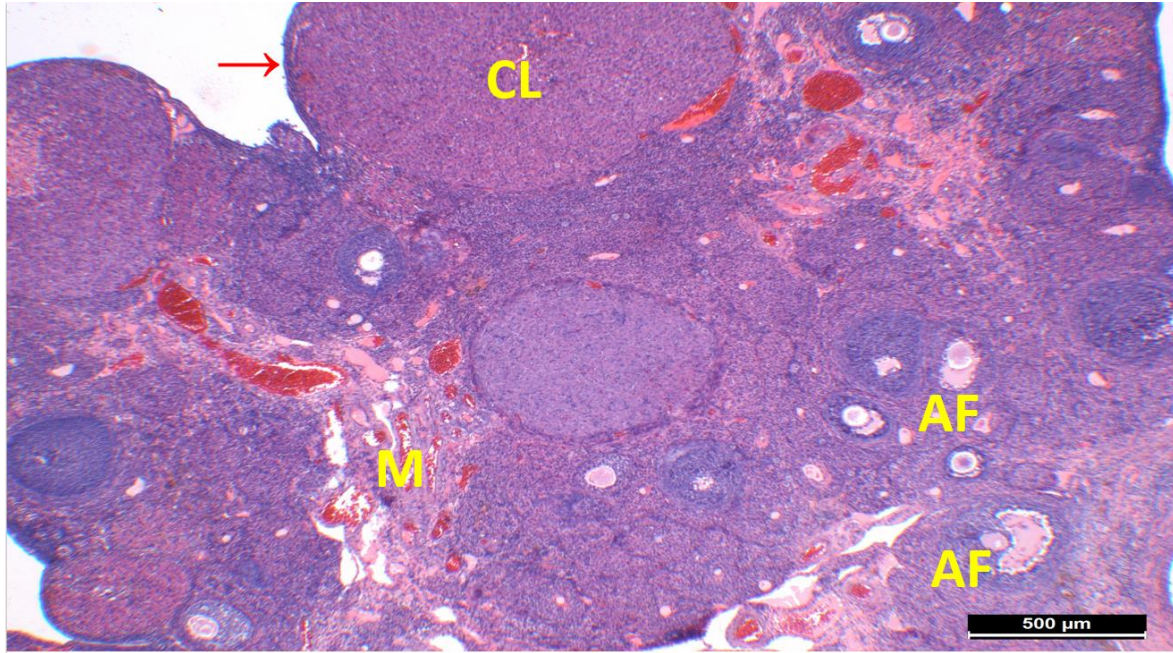
İstatistiksel analizler, SPSS programıyla yapıldı ve non-parametrik gruplara, Independent-Samples Kruskal-Wallis testi uygulandı. p değeri 0,05 ten küçük değerler anlamlı kabul edildi. Gavaj ve i.p. enjeksiyon uygulanan çözücü gruplarının arasında ki değerlerde p değeri anlamlı çıkmadığı için gruplar istatistik yapılırken birleştirildi. Her istatistikten önce her iki grubunda kendi aralarında istatistiği yapıldı. Real-time PCR metodunda grupların son telomer uzunluğu değerlerinin ortalaması alınarak Mann-Whitney testi kullanılarak istatistik yapıldı. İmmunohistokimya metodunun istatistiksel değerlendirmeleri için Image J programında, threshold yapılarak elde edilen verilerin istatistikleri yapıldı [160].



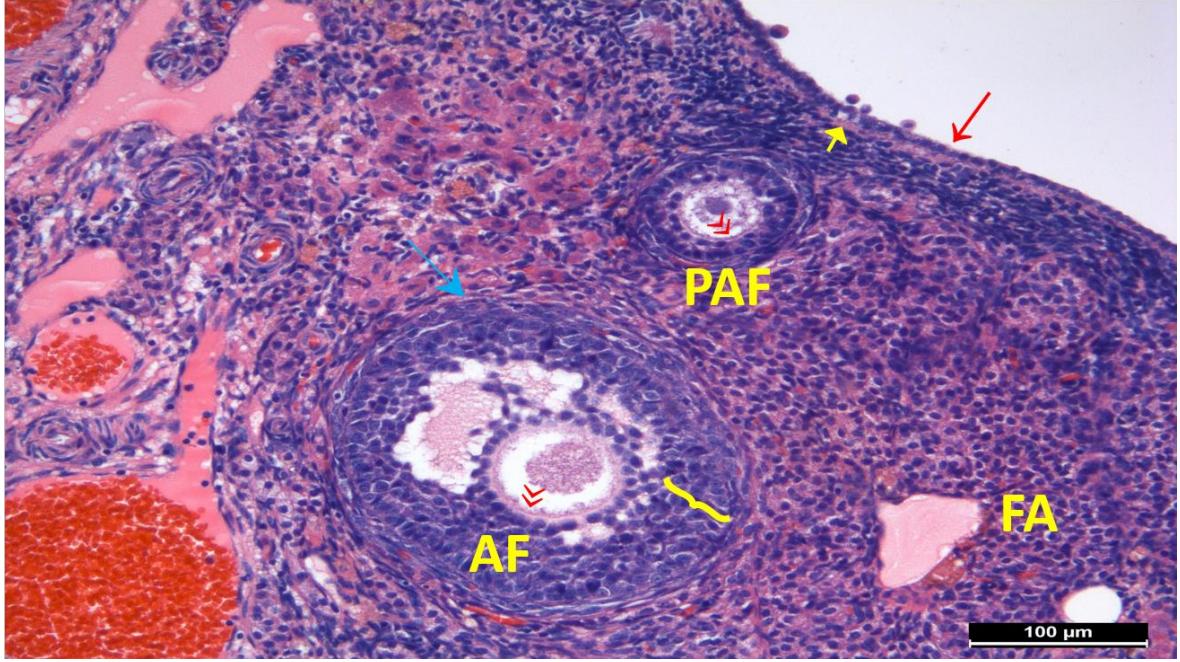
## 4. BULGULAR

### 4.1. Hematoksilen Eozin Bulguları

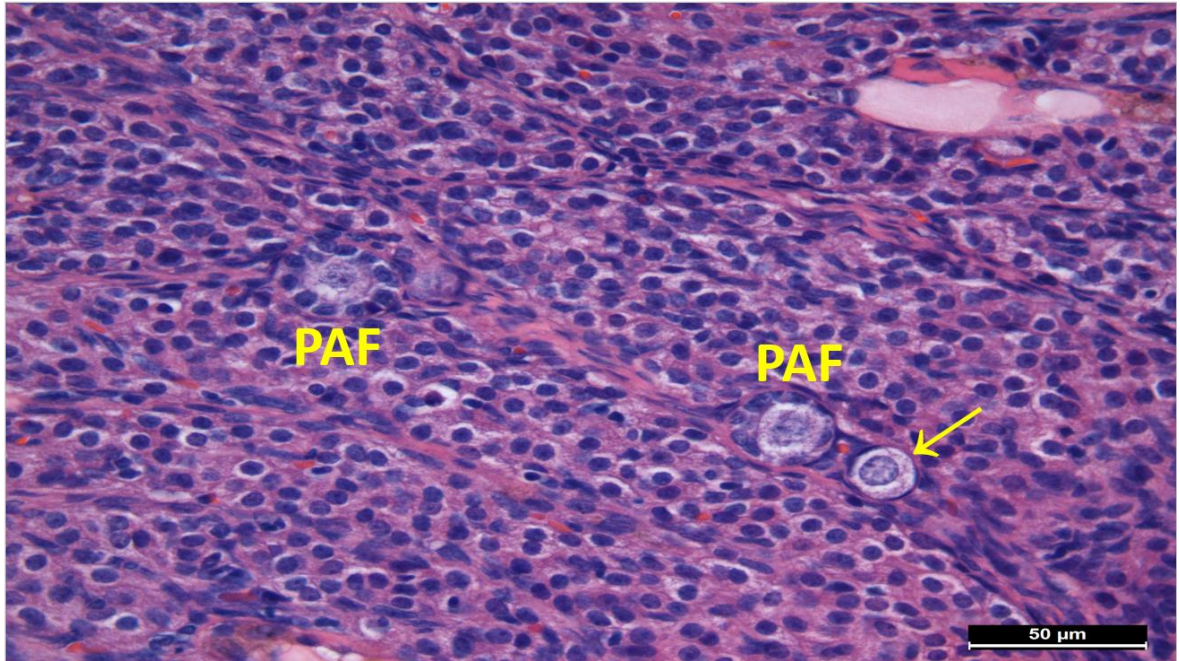
Gavaj ve i.p. enjeksiyon uygulanan çözücü gruplarının Hematoksilen-Eozinle yapılan küçük büyütmeli incelemelerinde (Resim 4.1, Resim 4.5); germinal epitel tek katlı prizmatik (küçük) - yassı epitele değişen şekildeyken (Resim 4.2, Resim 4.6), epitelin hemen altında yer alan Tunika albuginea fibröz bağ dokusu yapısıyla ayırt edildi (Resim 4.3, Resim 4.6). Tunika albugineanın hemen altında bulunan korteks, gelişimin çeşitli evrelerindeki foliküller (primordiyal, preantral, antral, Graaf) ile karakterizydi (Resim 4.4, Resim 4.8). Bu foliküllerde zona pellusida bütün ve parlak şekilde izlenirler, granüloza hücreleri ise düzenli görünüşleriyle karakterizydi. Teka tabakaları ve oosit bazal membranı net bir şekilde ayırt edilmekteydi (Resim 4.4, 4.8). Medullada ise kan damarları ve medullar bağ dokusu normal yapısında ayırt ediliyordu (Resim 4.1, Resim 4.5).



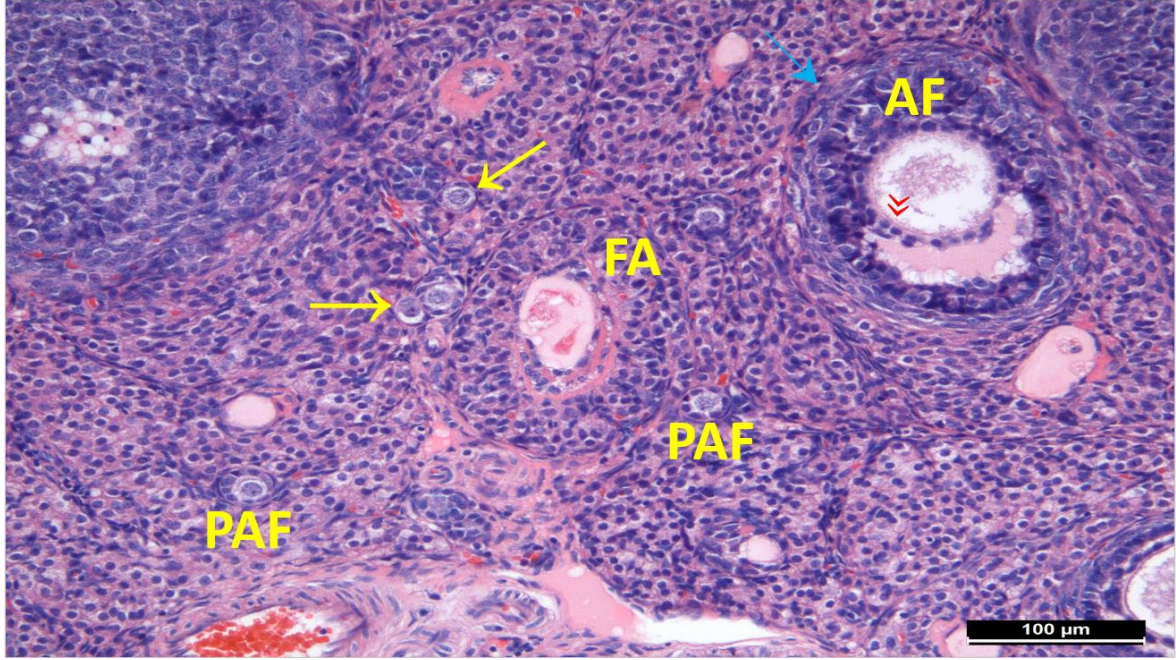
Resim 4.1. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), antral folikül (AF) , korpus luteum (CL) ve medulla (M) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40).



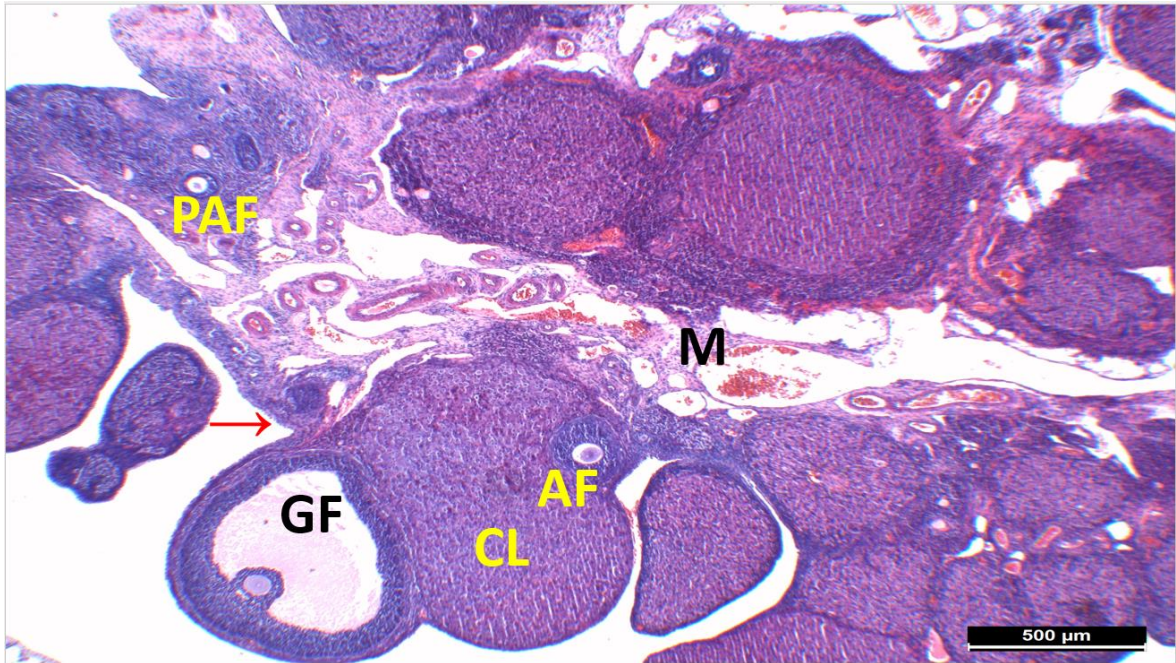
Resim 4.2. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı ok), tunika albuginea (↑, sarı) , preantral folikül (PAF) , antral folikül (AF) , foliküler atrezi (FA), granuloza hücresi (↵), zona pellusida (»», kırmızı) ve teka tabakaları (↘, mavi) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200).



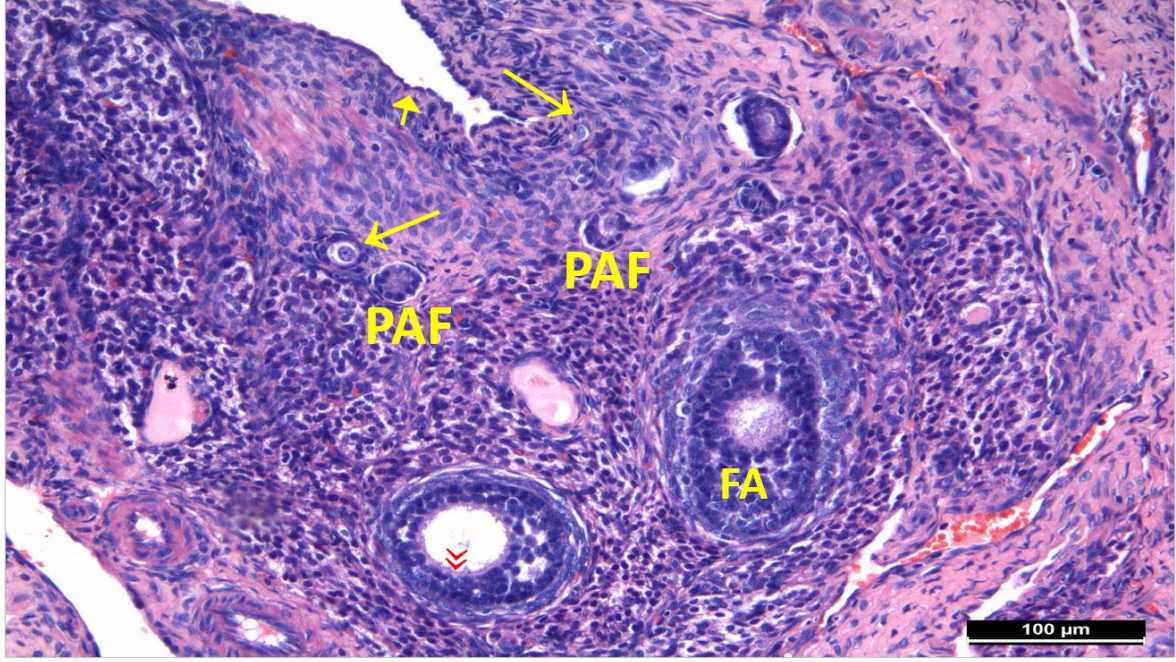
Resim 4.3. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde primordiyal folikül (→, sarı) ve preantral folikül (PAF) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x400).



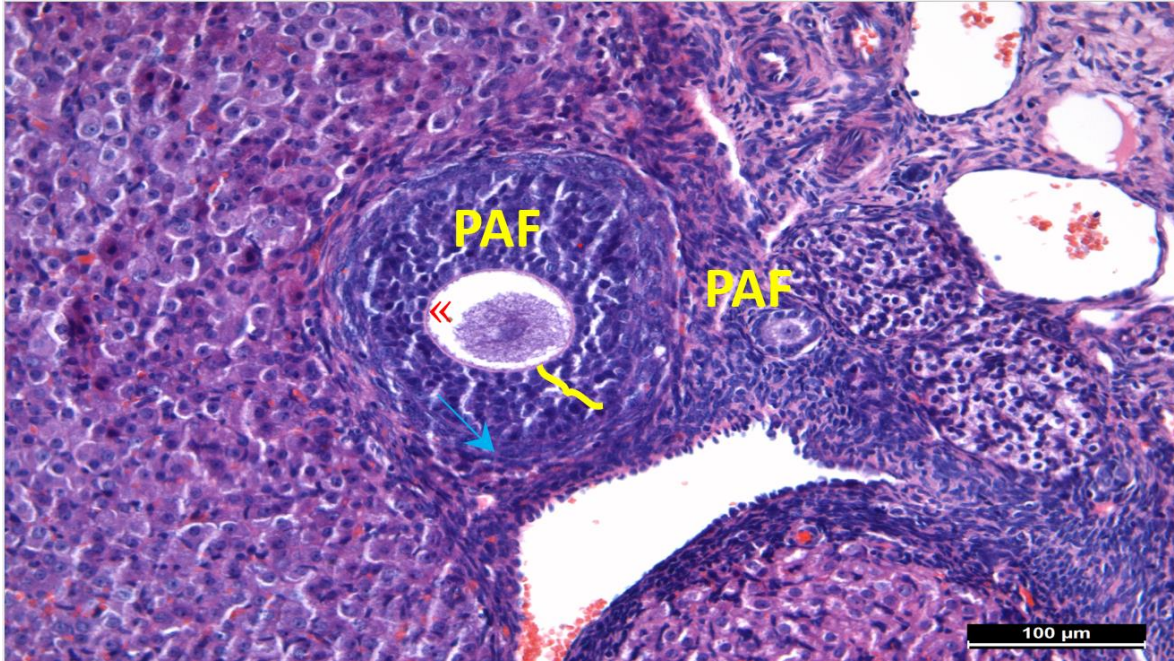
Resim 4.4. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde primordiyal folikül (→), preantral folikül (PAF) , antral folikül (AF), atretik folikül (FA) ve zona pellusida (») ve teka tabakaları (↘, mavi) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200).



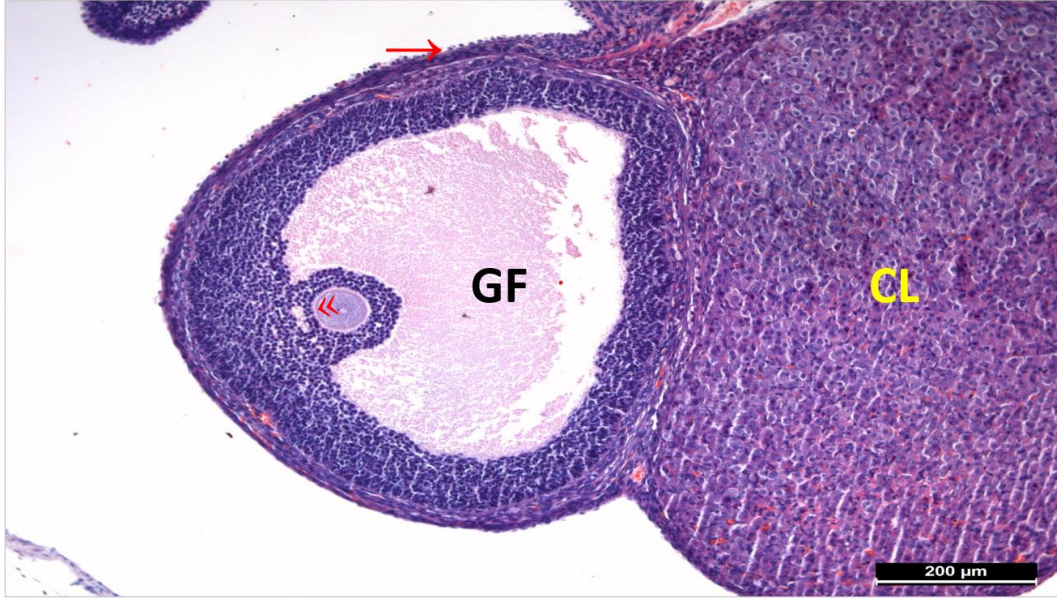
Resim 4.5. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), preantral folikül (PAF), antral folikül (AF) , korpus luteum (CL), Graaf folikül (GF) ve medulla (M) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40).



Resim 4.6. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde tunika albuginea (↑, sarı), primordiyal folikül (→), preantral folikül (PAF) ve foliküler atrezi (FA) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200).



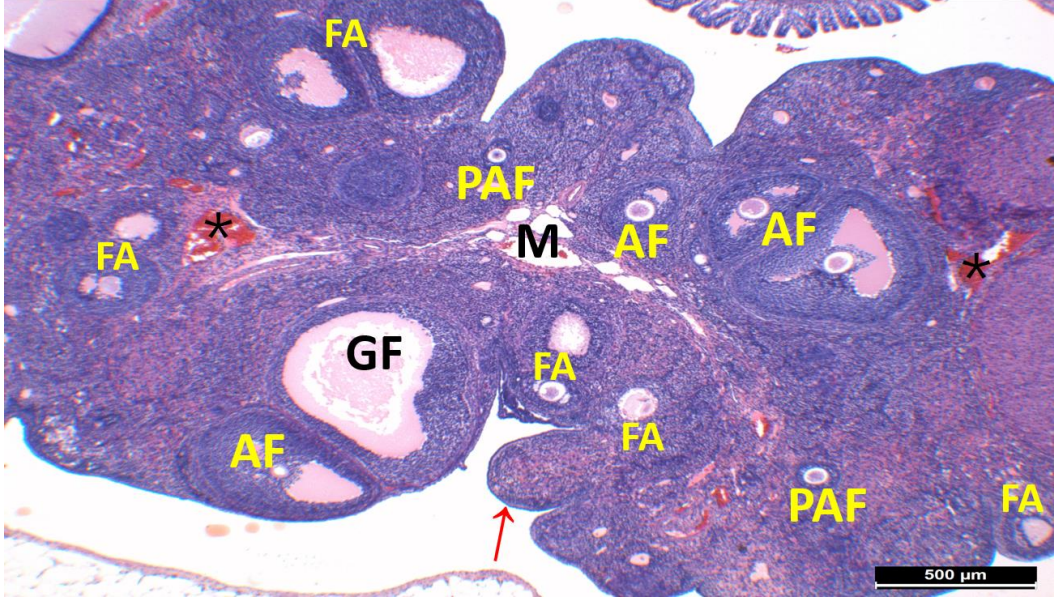
Resim 4.7. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde preantral folikül (PAF) , zona pellucida (⇐), granüloza hücre tabakası ({} ve teka folikülü (↘, mavi) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200).



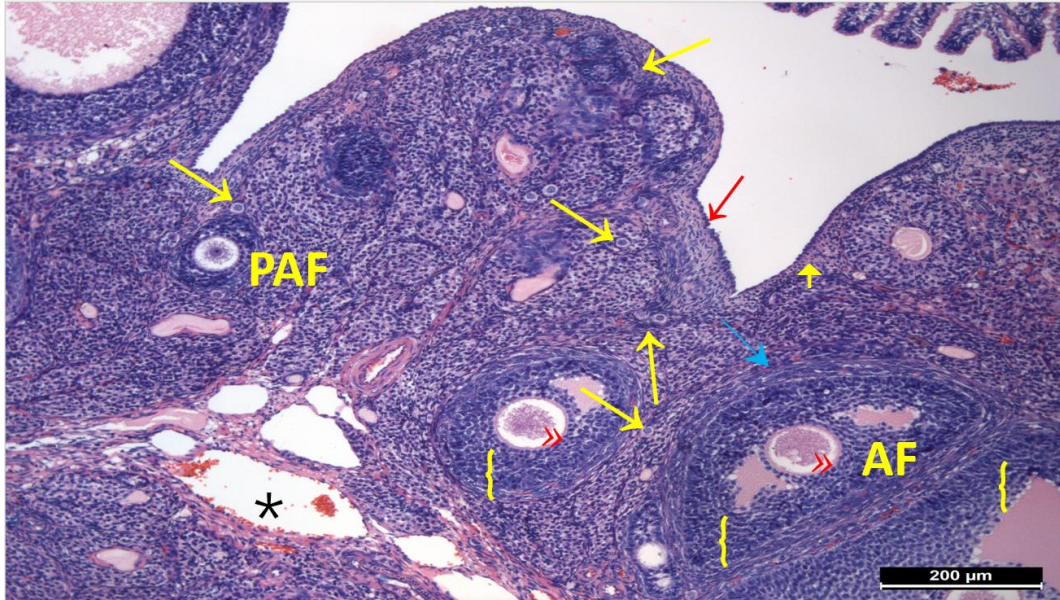
Resim 4.8. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), zona pellusida (»), Graaf folikül (GF) ve korpus luteum (CL) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100).

CAG verilen grupta, kontrol grubuna benzer şekilde germinal epitel tek katlı alçak boylu prizmatikten yassı epitele değişen şekilde izlenirken, epitelin hemen altında yer alan tunika albuginea fibröz bağ dokusu yapısıyla ayırt edildi (Resim 4.9, Resim 4.10). Tunika albugineanın hemen altında bulunan korteks, gelişimin çeşitli evrelerindeki foliküller ile karakterizeydi (primordiyal, preantral, antral, Graaf) (Resim 4.9, Resim 4.10.). Bu foliküllerde zona pellusida bütün ve parlak şekilde izlenirken, granüloza hücreleri düzenli görünüşleriyle karakterizeydi (Resim 4.10, Resim 4.11). Teka tabakaları ve oosit bazal membranı net bir şekilde ayırt edildi (Resim 4.11.). Folikül sayımlarında elde edilen veriler üzerinde yapılan istatistiksel incelemeler sonucunda; kontrol grupları ile kıyaslandığında CAG uygulanan grupta primordiyal folikül sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı tespit edildi ( $p=1$ , Mann-Whitney Testi) ancak primer folikül sayıları kontrol grubuna kıyasla artış göstermekteydi ( $p=0,009$ , Mann-Whitney Testi) (Resim 4.12.) (Şekil 4.1). Primer folikül sayılarına benzer şekilde sekonder folikül sayılarında da kontrol grubuna kıyasla artış mevcuttu ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi (Şekil 4.2.) ( $p=0,102$ , Mann-Whitney Testi). Atreziye giden folikül sayısı ise kontrol grubu ile kıyaslandığında ise azalmış olarak bulundu ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edilmedi (Şekil 4.3) ( $p=0,100$ , Mann-Whitney Testi). Atreziye giden folikül sayıları cisplatin grubu ile kıyaslandığında ise ( $p<,001$ , Mann-Whitney Testi) istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalmıştı. Cisplatin ve sikloastrogenol uygulaması yapılan grup ile

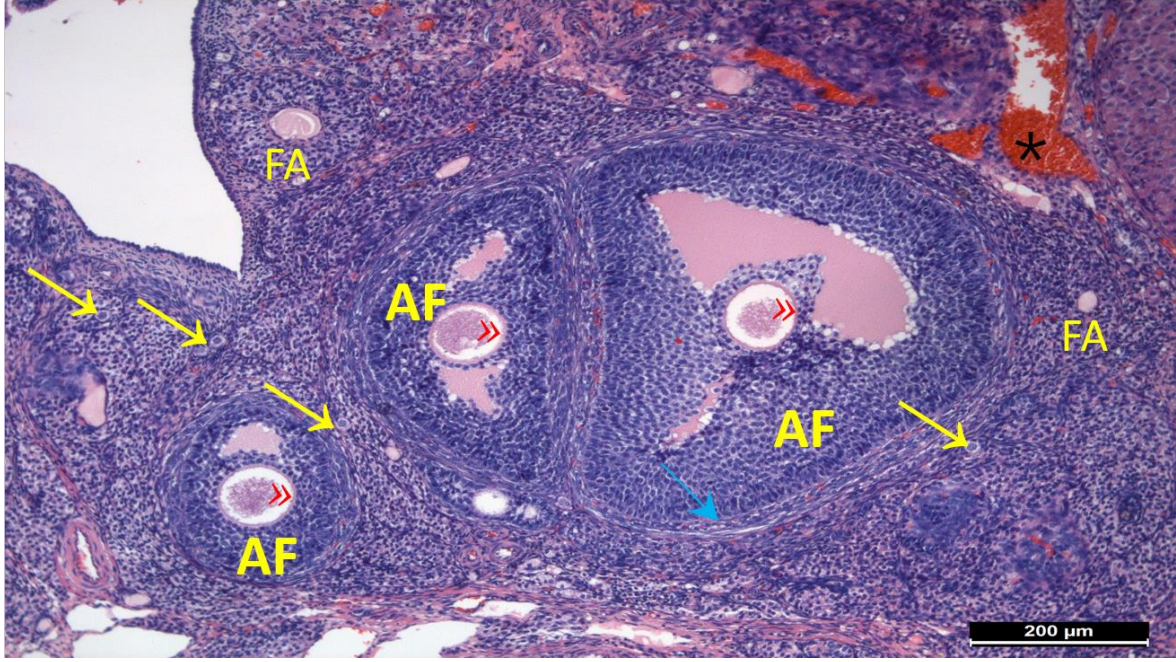
kıyaslandığında ise, yine istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş bu gruplar arasında da mevcuttu ( $p=0,031$ , Mann -Whitney Testi). Medullada kontrol grubundan ayrıcalıklı olarak vasküler dilatasyon ilgiyi çekti (Resim 4.9).



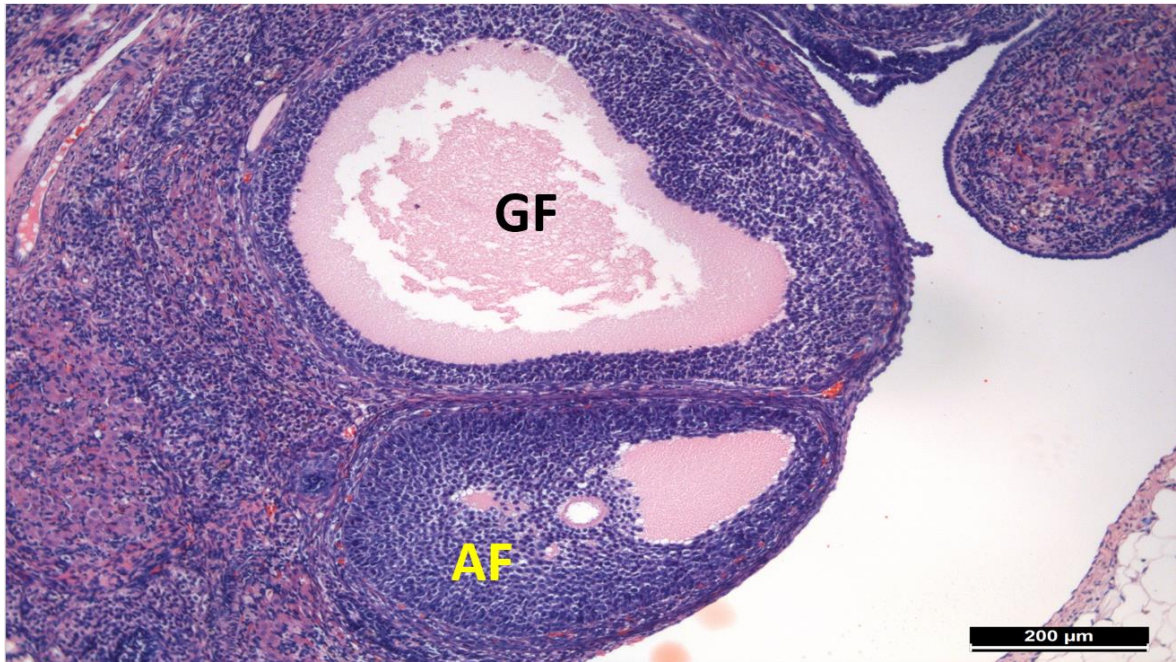
Resim 4.9. CAG grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), preantral folikül (PAF), antral folikül (AF), kistik folikül (CF), foliküler atrezi (FA), vasküler dilatasyon (\*) ve Medulla (M) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40).



Resim 4.10. CAG grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), tunika albuginea (↑, sarı), primordiyal folikül (→, sarı), preantral folikül (PAF), antral folikül (AF), zona pellusida (»), granüloza hücre katmanı ({}), teka folikülü (∇, mavi), vasküler dilatasyon (\*) ve medulla (M) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40).



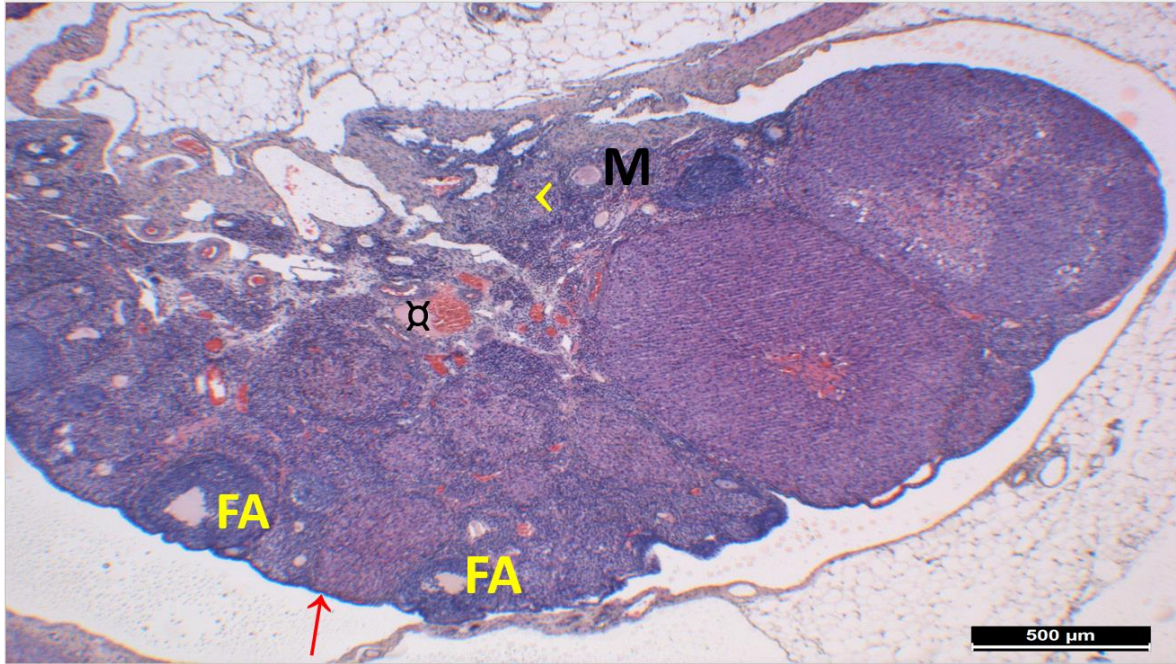
Resim 4.11. CAG grubu over kesitinde primordiyal folikül (→, sarı), antral folikül (AF), zona pellusida (»), kırmızı), teka folikülü (↘, mavi), foliküler atrezi (FA) ve vasküler dilatasyon (\*) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100).



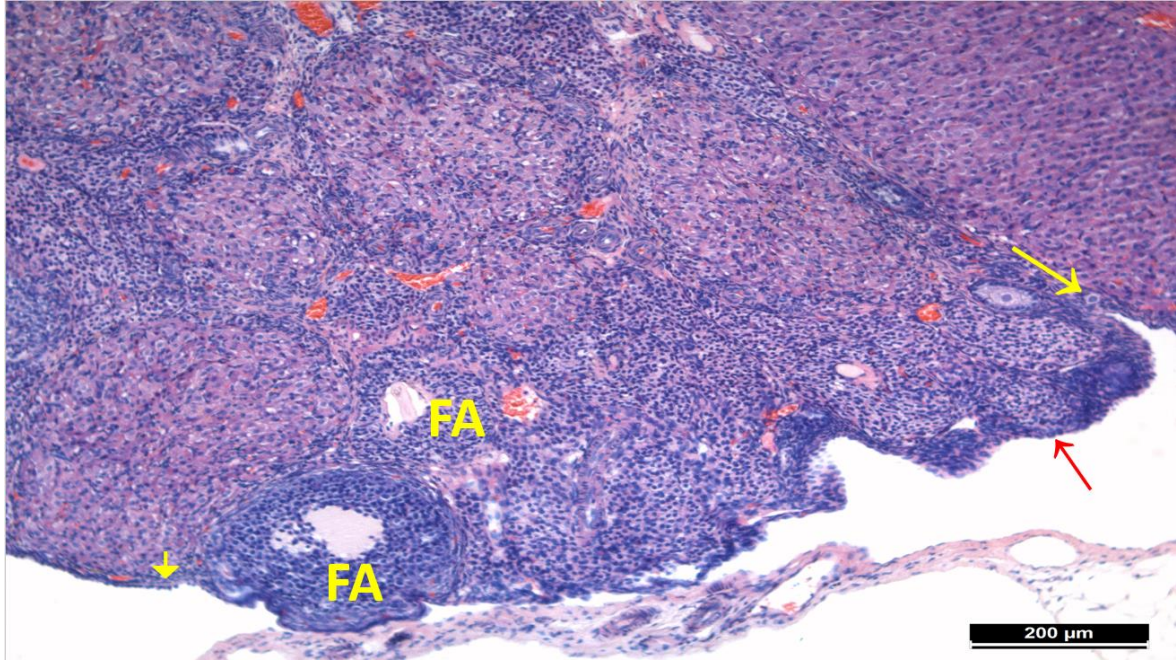
Resim 4.12. CAG grubu over kesitinde antral folikül (AF) ve kistik folikül (CF) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100).

Cisplatin verilen grupta, kontrol grubuna benzer şekilde germinal epitel tek katlı alçak boylu pirizmatikten yassı epitele değişen şekildeyken (Resim 4.13), kontrol grubundan ayrıcalı olarak epitelin hemen altında yer alan tunika albugineanın oldukça incelmış olduğu ilgiyi

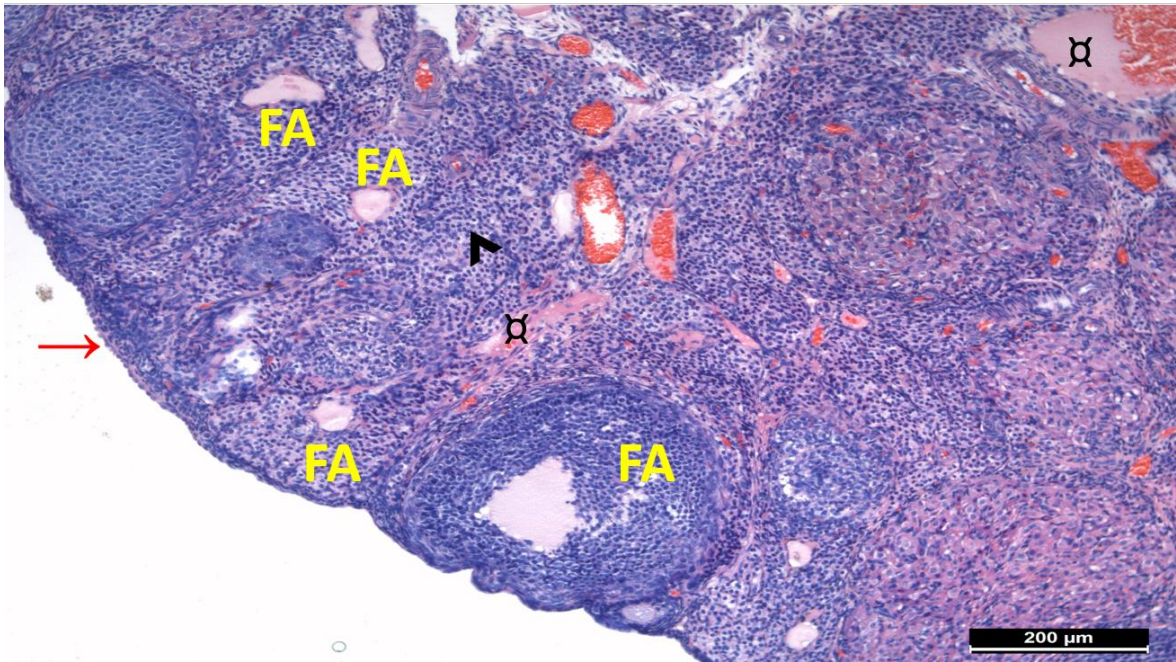
çaktı (Resim 4.14). Bu grupta primordiyal foliküllerde dejenerasyon izlenirken, primordiyal folikül sayılarının hem kontrol grupları ile ve hem de sikloastrogenol verilen grupla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi (Şekil 4.1) ( $p < 0,001$ ,  $p = 0,015$  Mann-Whitney Testi). (Resim 4.16). Primer ve sekonder foliküllerde zona pellusidanın ve oositin oldukça dejenere olduğu ve çoğunun atreziye uğradığı, granüloza hücreleri arasında piknotik hücrelerin sayısında artış ve vakualizasyon olaylandığı tespit edildi (Resim 4.16). Kontrol grupları ile kıyaslandığında primer folikül sayılarının azaldığı görüldü ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı seviyede olmadığı belirlendi (Şekil 7) ( $p = 0,1$  Mann-Whitney Testi). Sikloastrogenol verilen grupla kıyaslandığında ise istatistiksel olarak anlamlı seviyede azalma görüldü ( $p < 0,001$ , Mann-Whitney Testi). Sekonder folikül sayıları ise kontrol grupları ile kıyaslandığında azalmış seviyede idi ancak bu azalış istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edilmedi (Şekil 4.2) ( $p = 0,1$  Mann-Whitney Testi). Kortekste ayrıca infiltrasyon ve ödem ilgiyi çaktı (Resim 4.15 ve Resim 4.16). Medullada ise hilar hücre hiperplazisi görüldü (Resim 4.13). Bu grupta diğer gruplardan ayrıcalıklı olarak atreziye giden folikül sayısı artış göstermekteydi ve bu artış kontrol grupları ve sikloastrogenol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede idi (Şekil 4.3) ( $p < 0,05$ ).



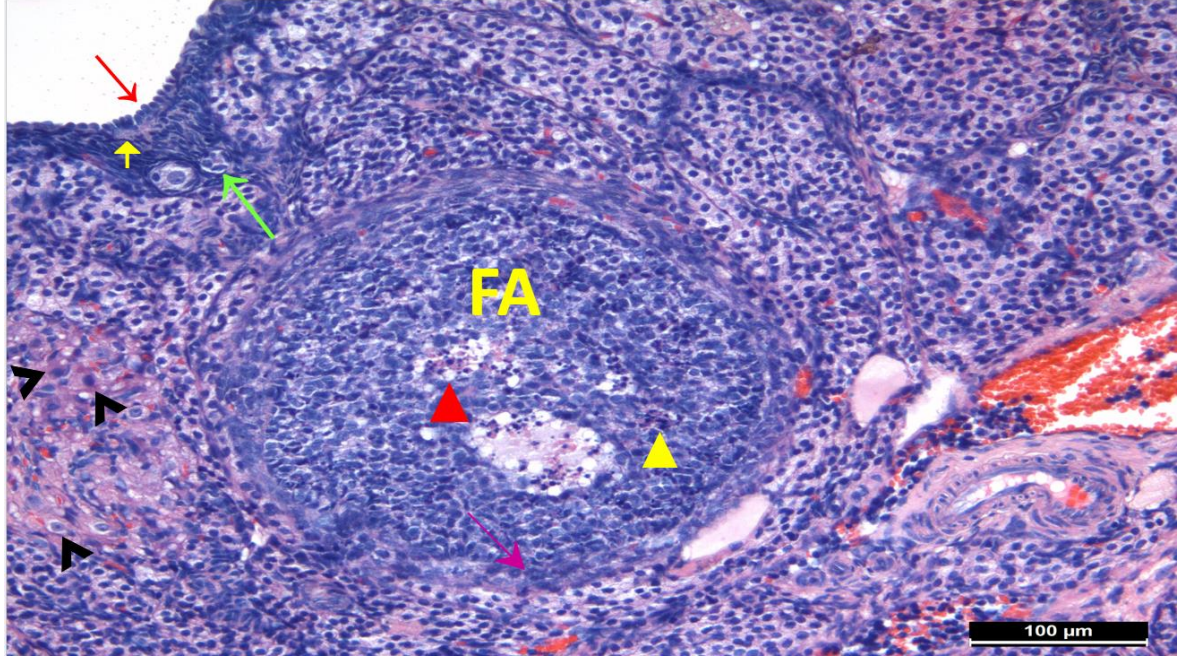
Resim 4.13. Cisplatin grubu over kesitinde, germinal epitel (→, kırmızı), foliküler atrezi (FA), hilar hücrelerinde hiperplazi (↖, sarı) ve ödem (α) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40).



Resim 4.14. Cisplatin grubu over kesitinde primordiyal folikül (→, sarı), germinal epitel (→, kırmızı), tunika albuginea (↑, sarı) ve foliküler atrezi (FA) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100).



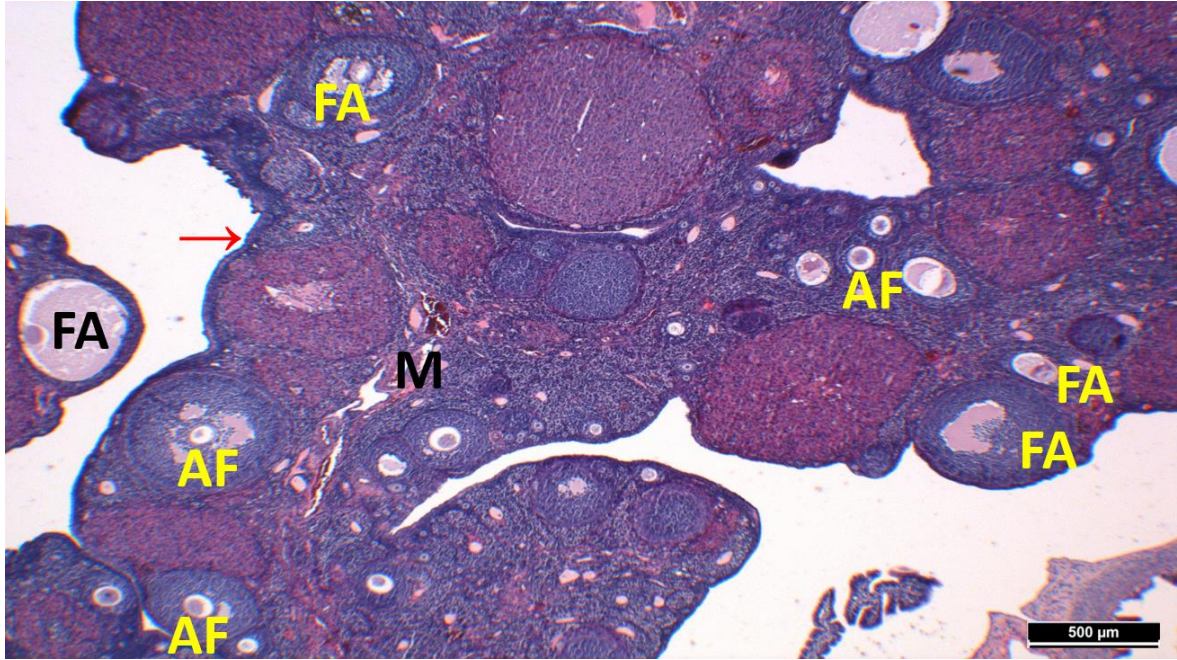
Resim 4.15. Cisplatin grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), foliküler atrezi (FA), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (>) ve ödem (⊘) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100).



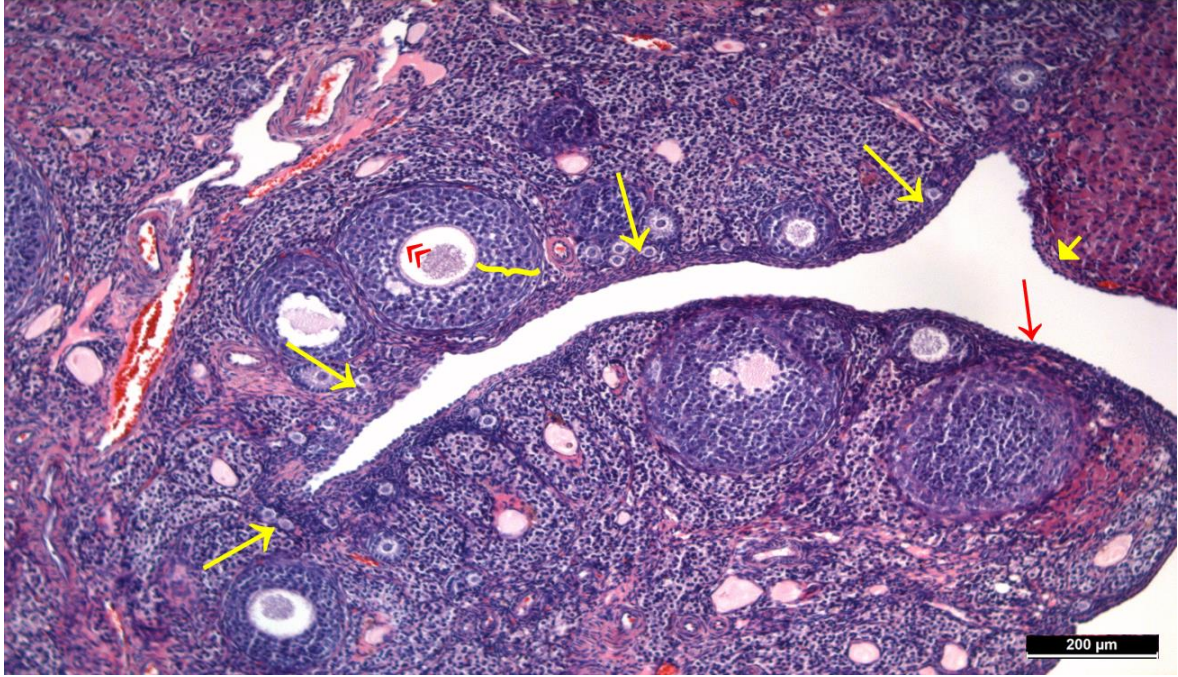
Resim 4.16. Cisplatin grubu over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), primordiyal folikülde dejenerasyon (→, yeşil), foliküler atrezi (FA), tunika albuginea (↑), piknotik granüloza hücreleri (▲), granüloza hücrelerinde vakuolizasyon (▲, kırmızı), inflamatuvar hücre infiltrasyonu (>) ve teka tabakalarında dejenerasyon (↘, pembe) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200).

Cisplatin ve sikloastrogenol uygulanan grupta, germinal epitel tek katlı alçak boylu prizmatik (kübik) epitelden tek katlı yassı epitele değişen şekildeydi (Resim 4.17.). Tunika albuginea kontrol grubuna benzer şekilde izlendi (Resim 4.18). Küçük büyütme mikroskop görüntülerinde çok sayıda primordiyal ve primer folikül ilgiyi çekerken, büyük büyültmeye geçildiğinde ise kortekste, kontrol grubuna kıyasla primordiyal folikül sayılarında fark çıkmazken ( $p=0,1$ , Mann-Whitney Testi), cisplatin grubuna kıyasla primordiyal folikül sayılarında artış olduğu görüldü (Şekil 4.1) ( $p<0,001$ , Mann-Whitney Testi). (Resim 4.18, Resim 4.19). Primer ve sekonder foliküllerde zona pellusida parlak renkte ve kompakt şekilde izlendi (Resim 4.18). Primer folikül sayıları kontrol grubuyla ve cisplatin grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak artmış seviyedeydi (Şekil 4.2) ( $p=0,009$ ,  $p<,001$  Mann-Whitney Testi). Sekonder folikül sayılarında ise kontrol grubuyla ve cisplatin grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık görülmedi (Şekil 4.3) ( $p=1$ ,  $p=1$  Mann-Whitney Testi). Atreziye giden folikül sayılarında kontrol grubuyla istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken ( $p=0,104$  Mann-Whitney Testi), sikloastrogenol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı seviyede artış tespit edildi (Şekil 4.3) ( $p=0,031$ , Mann-Whitney Testi) ancak bu artış cisplatin grubuna ait artış kadar fazla

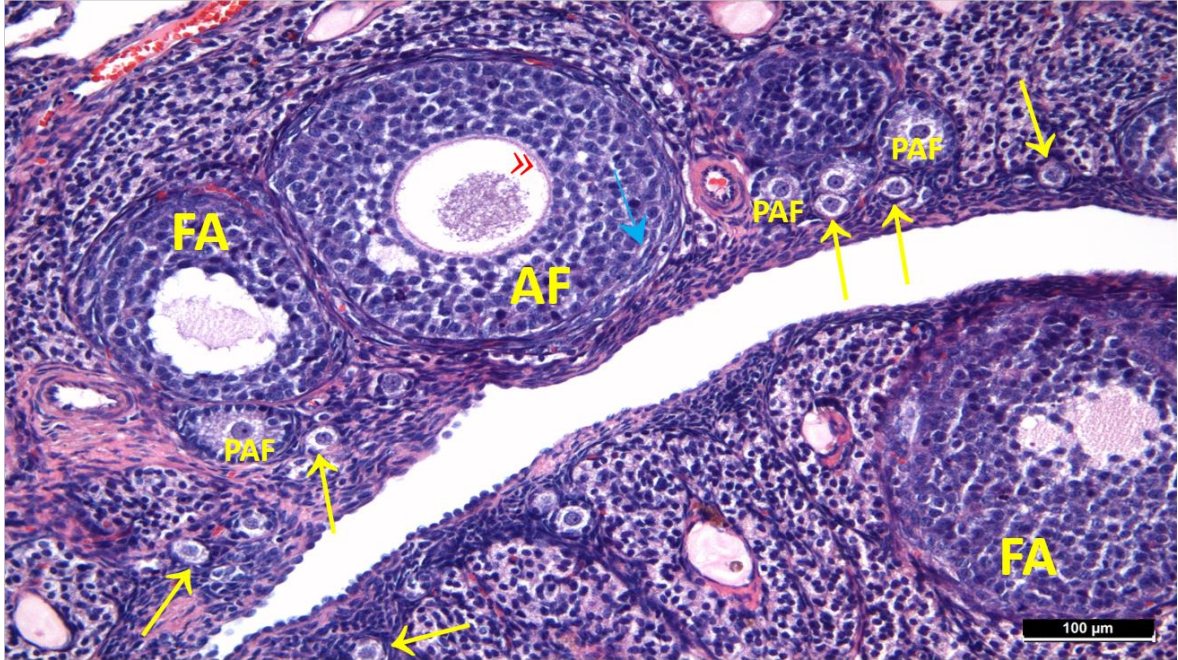
değildi ve atreziye giden folikül sayıları cisplatin grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ( $p=1$ , Mann-Whitney Testi) (Şekil 4.3). Granüloza hücreleri düzenli şekildeki dizilmeleri ile karakterizeydi (Resim 4.17). Teka interna ve eksterna ayırt edilebilir durumdaydı (Resim 4.18, Resim 4.19). Cisplatin grubuna benzer şekilde bu grupta da bağ dokusu hücrelerinin infiltrasyonu görüldü. Ancak cisplatin grubuna kıyasla azalmış düzeydeydi (Resim 4.20).



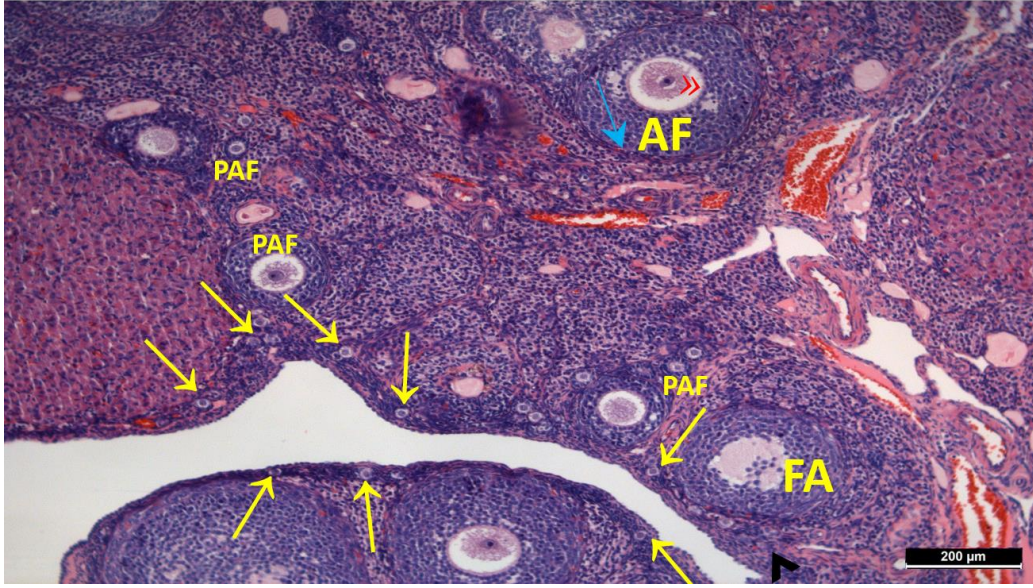
Resim 4.17. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), foliküler atrezi (FA), antral folikül (AF) ve medulla (M) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x40).



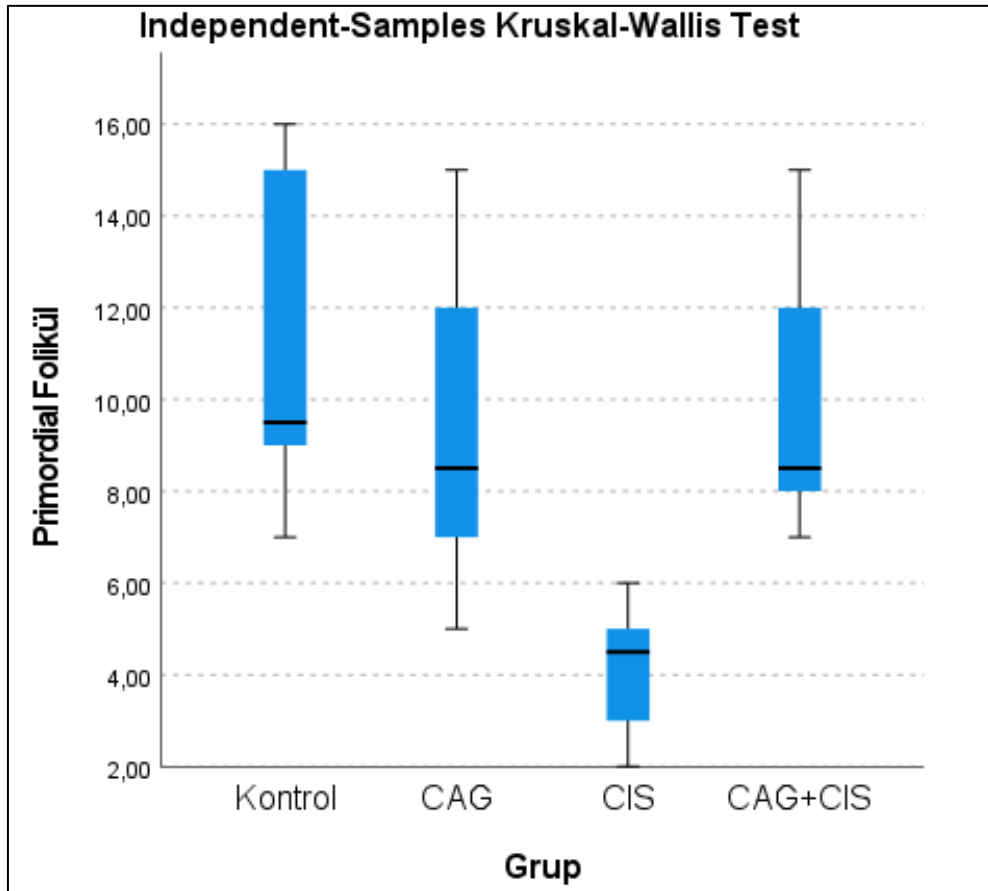
Resim 4.18. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait over kesitinde germinal epitel (→, kırmızı), tunika albuginea (↑, sarı), primordiyal folikül (→, sarı), zona pellusida (») ve granüloza hücreleri ( { ) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100).



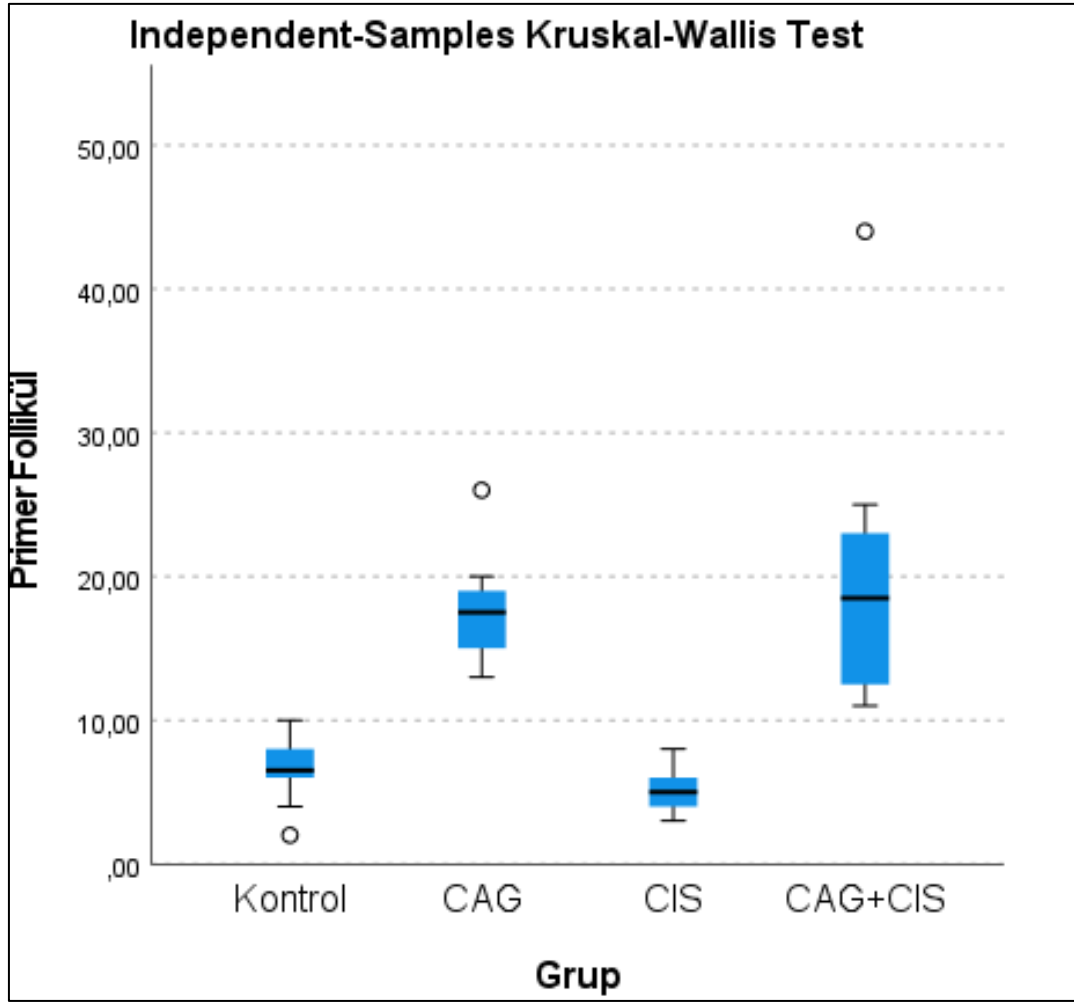
Resim 4.19. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait over kesitinde primordiyal folikül (→, sarı), antral folikül (AF), preantral folikül (PAF), zona pellusida (»), teka folikülü (↘, mavi) ve foliküler atrezi (FA) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x200).



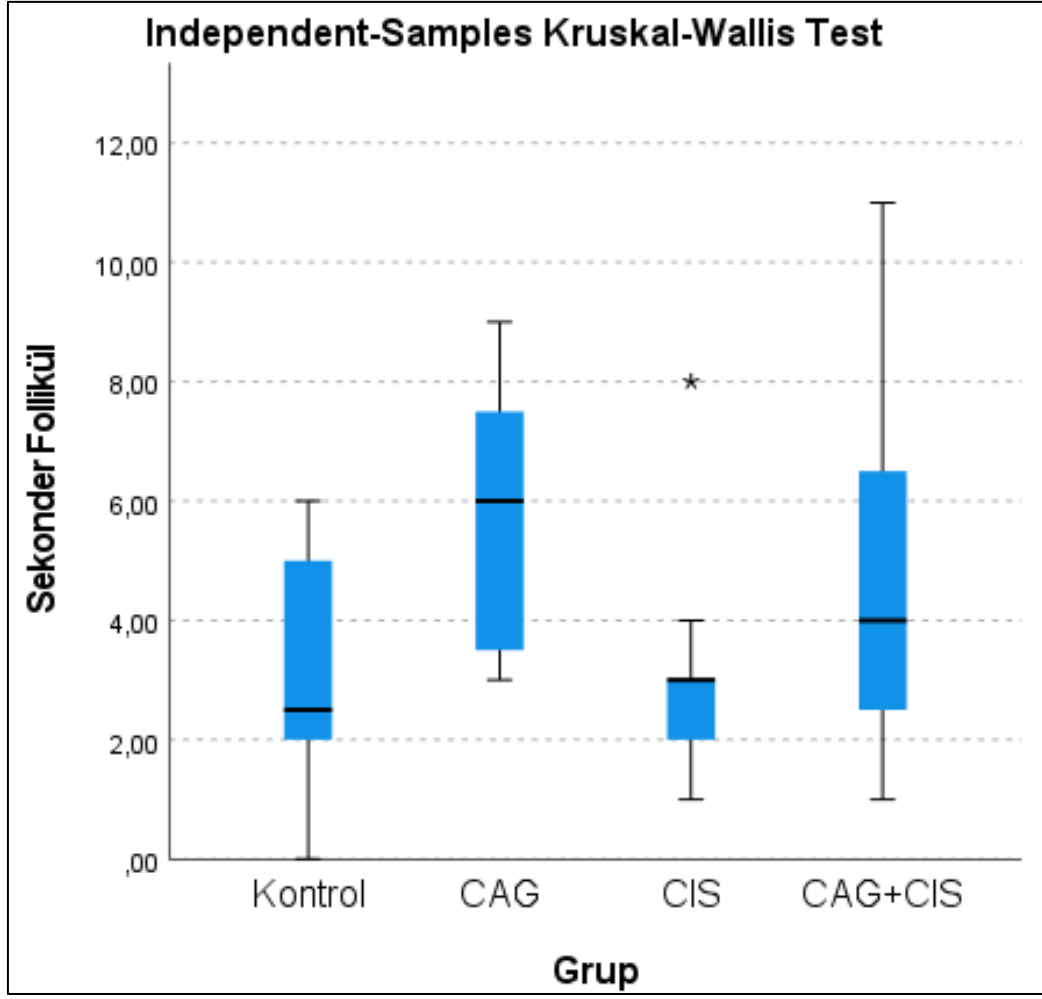
Resim 4.20. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait over kesitinde primordiyal folikül ( $\rightarrow$ , sarı), antral folikül (AF), preantral folikül (PAF), infiltrasyon ( $>$ ), foliküler atrezi (FA), zona pellusida ( $\gg$ ) ve teka folikülü ( $\searrow$ , mavi) izleniyor (Hematoksilen-Eozin x100).



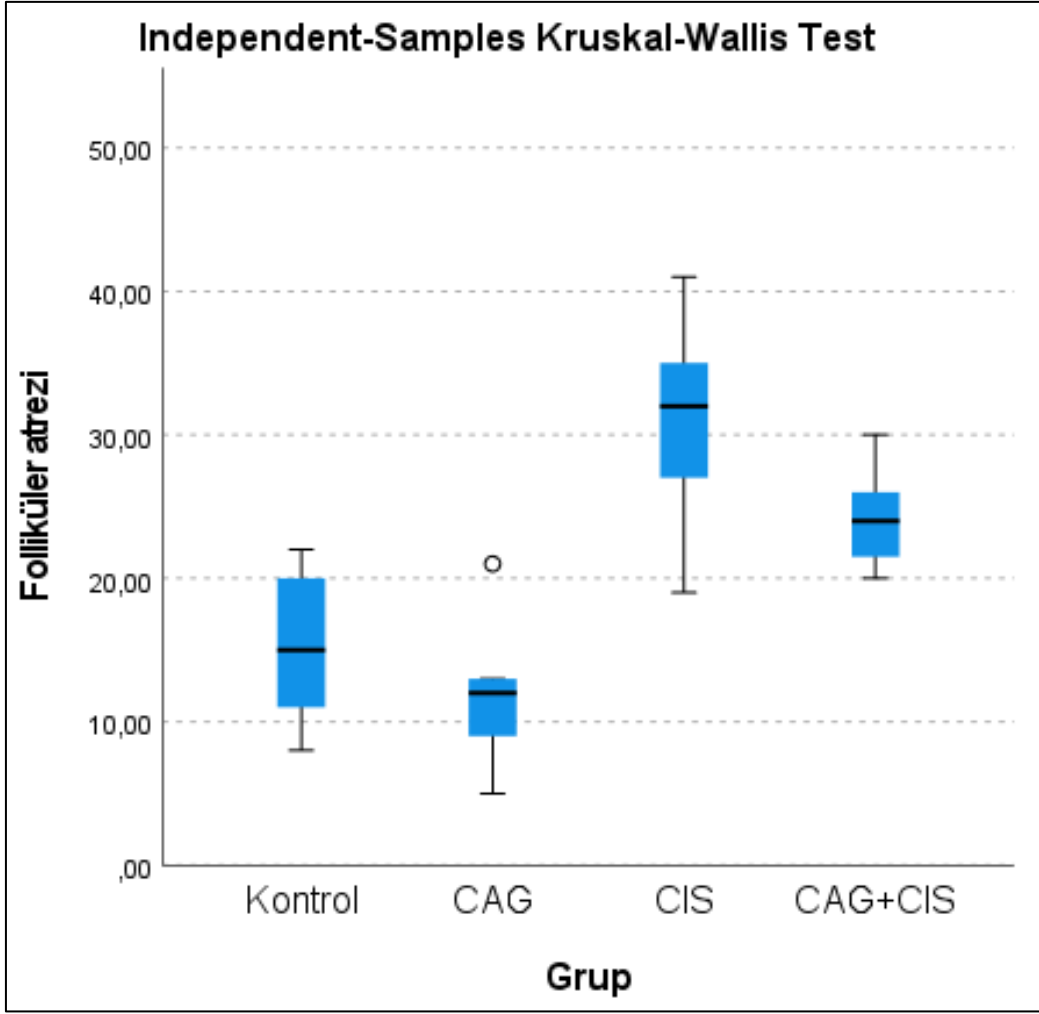
Şekil 4.1. Gruplar arası primordiyal folikül sayısı grafiği.



Şekil 4.2. Gruplar arası primer folikül sayısı grafiği.



Şekil 4.3. Gruplar arası Sekonder folikül sayısı grafiği.

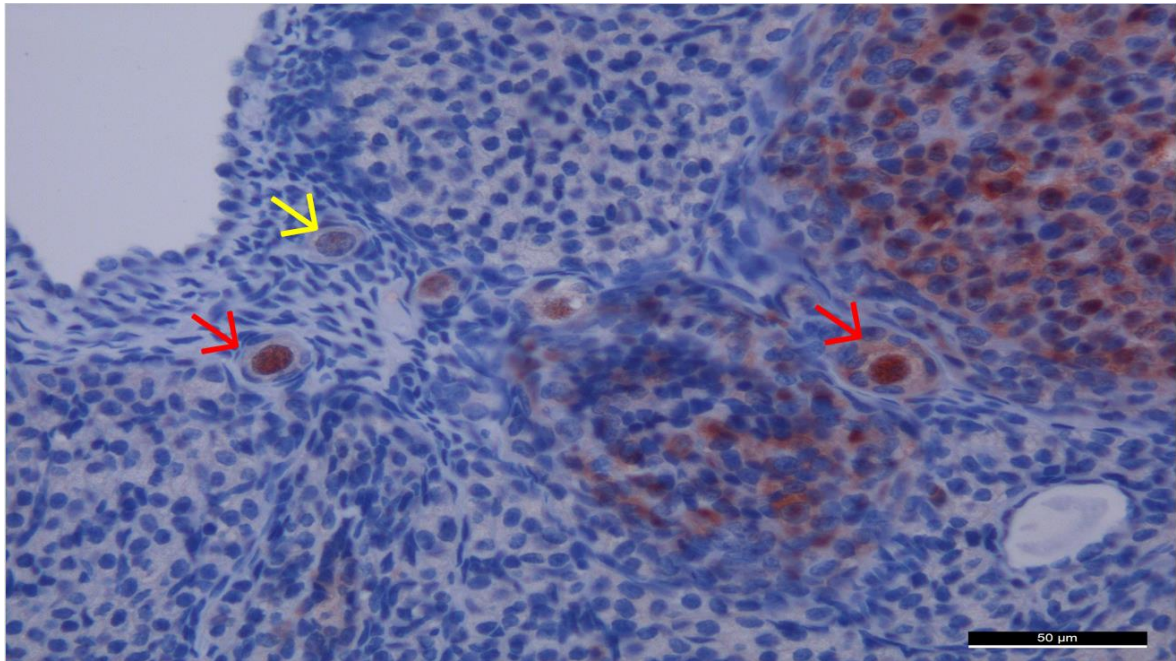


Şekil 4.4. Gruplar arasında atreziye giden folikül sayıları.

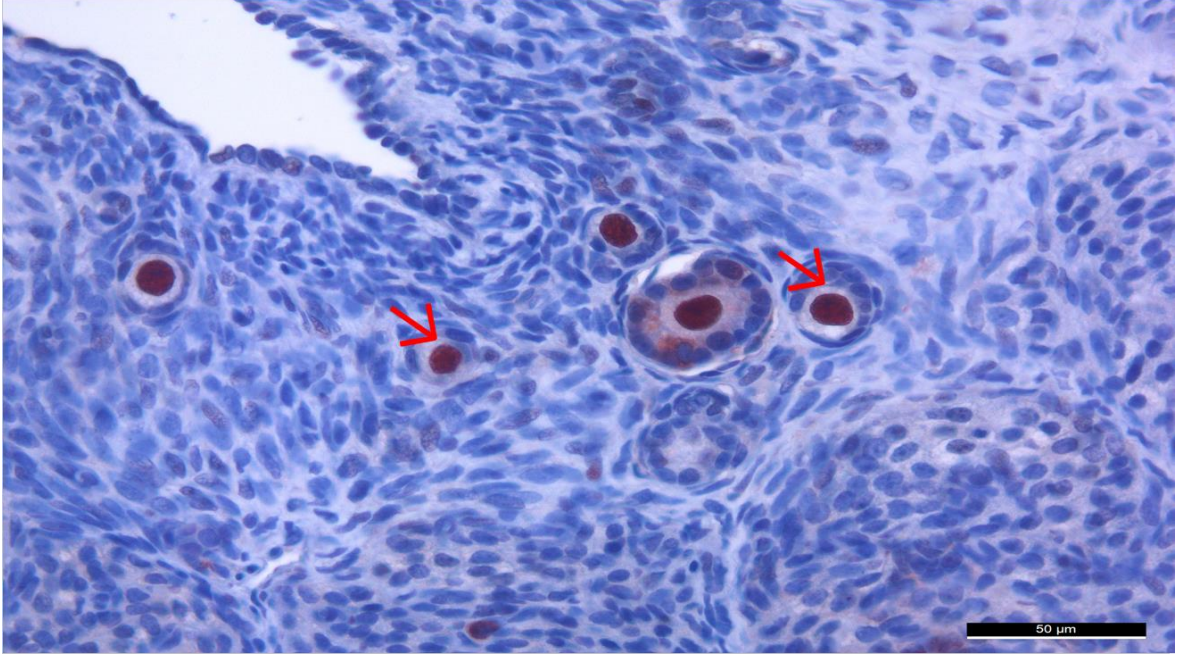
#### 4.2. PCNA İmmünohistokimya Boyama Bulguları

DNA'ya bağlanarak etki gösteren bir proliferasyon işaretleyicisi olan anti-PCNA antikoru ile yaptığımız immunohistokimya boyamaları neticesinde; her iki kontrol grubunda da, bütün foliküler evrelerde hem oosit ve hem de granüloza hücre nükleuslarında pozitif tutulum olduğu tespit edildi (Resim 4.21, Resim 4.22.). Sikloastrogenol verilen gruptaki PCNA immünreaktivitesinin kontrol gruplarına benzerlik gösterirken istatistiksel olarak bu iki grupta da tutulum farkı gözlemlenmedi ( $p=1$ , Mann-Whitney Testi) (Şekil 4.5) ancak bu grupta negatif tutulum gösteren primordiyal foliküllerin varlığı da ilgiyi çekti ve (Şekil 4.5) (Resim 4.23) bu durum, sikloastrogenolün primordiyal folikülerde dormansiyi desteklediği şeklinde yorumlandı. Cisplatin verilen grupta ise, preantral folikülerde oosit nükleuslarında diğer gruplara kıyasla görece oldukça az sayıda hücrede pozitif immünreaktivite olduğu görüldü ve kontrol grubu ve sikloastrogenol grubu ile

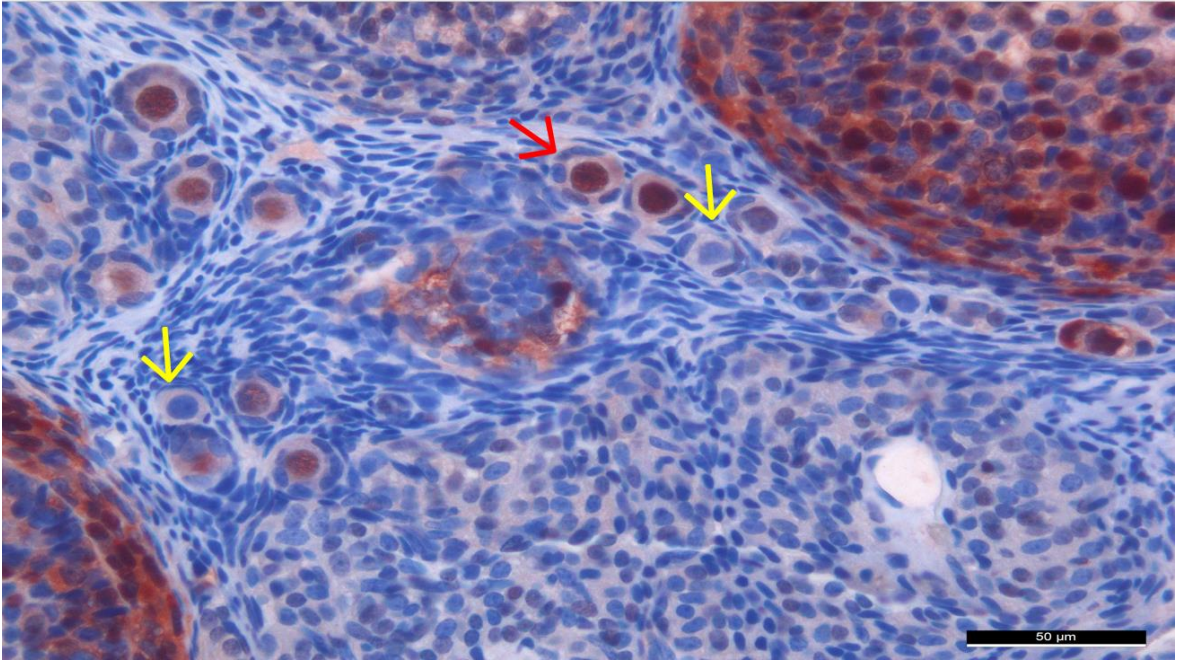
kıyaslandığında bu grupta PCNA pozitif hücre sayısı istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmış seviyeleri ile tespit edildi ( $p=,008$ ,  $p=,006$ , Mann-Whitney testi) (Şekil 4.5, Resim 4.24). Cisplatin ile birlikte sikloastrogenol verilen grupta, kontrol grubuna benzer şekilde preantral folikül evrelerinde hem oosit ve hem de granüloza hücre nükleuslarında pozitif immünreaktivite görülürken, hiç tutulum olmayan primordiyal foliküllerin varlığı bu grupta da ilgiyi çekti (Resim 4.25). Bu grupta cisplatin grubuyla kıyaslandığında PCNA pozitif hücre sayısında artış olsada bu artış istatistiksel olarak anlamlı seviyelerde değildi ( $p=1$ , Mann-Whitney Testi) (Şekil 4.5).



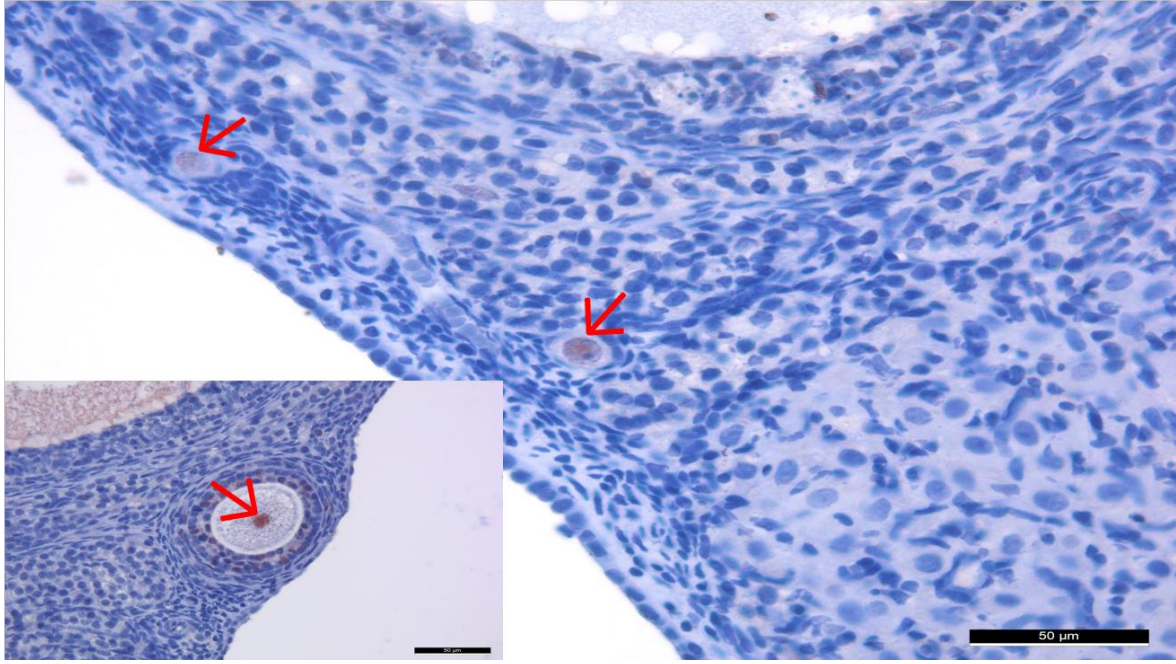
Resim 4.21. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde PCNA immün reaktivite görüntüsü. Pozitif tutulum (→, kırmızı), negatif tutulum (→, sarı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



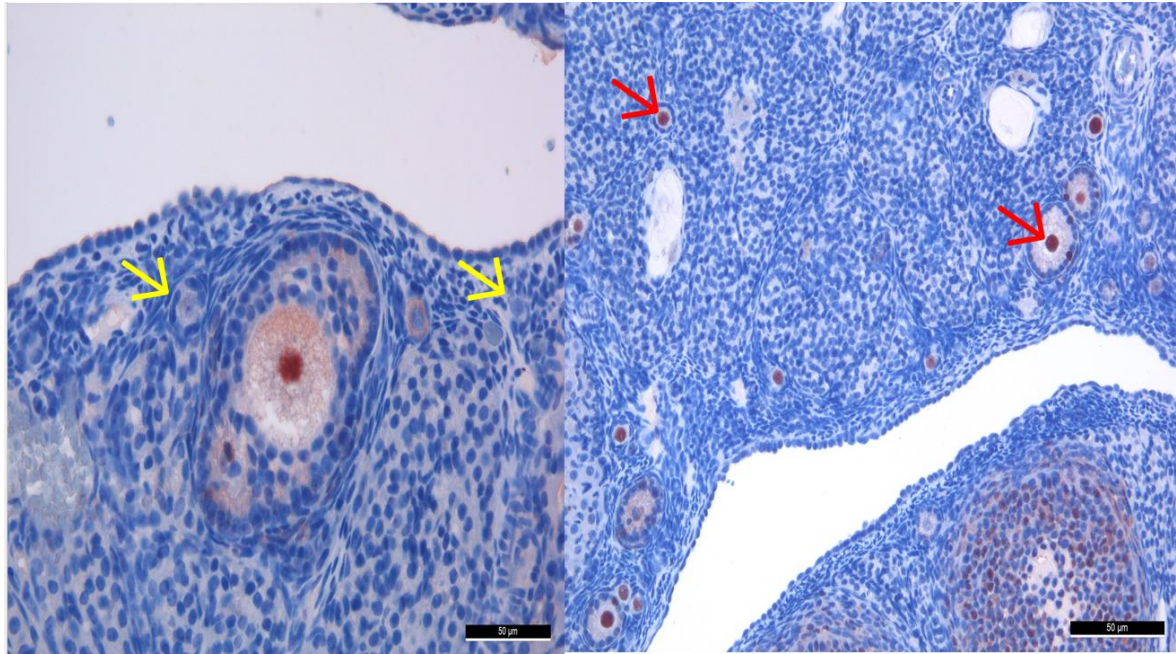
Resim 4.22. İ.p. stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde PCNA immün reaktivite görüntüsü. Pozitif tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



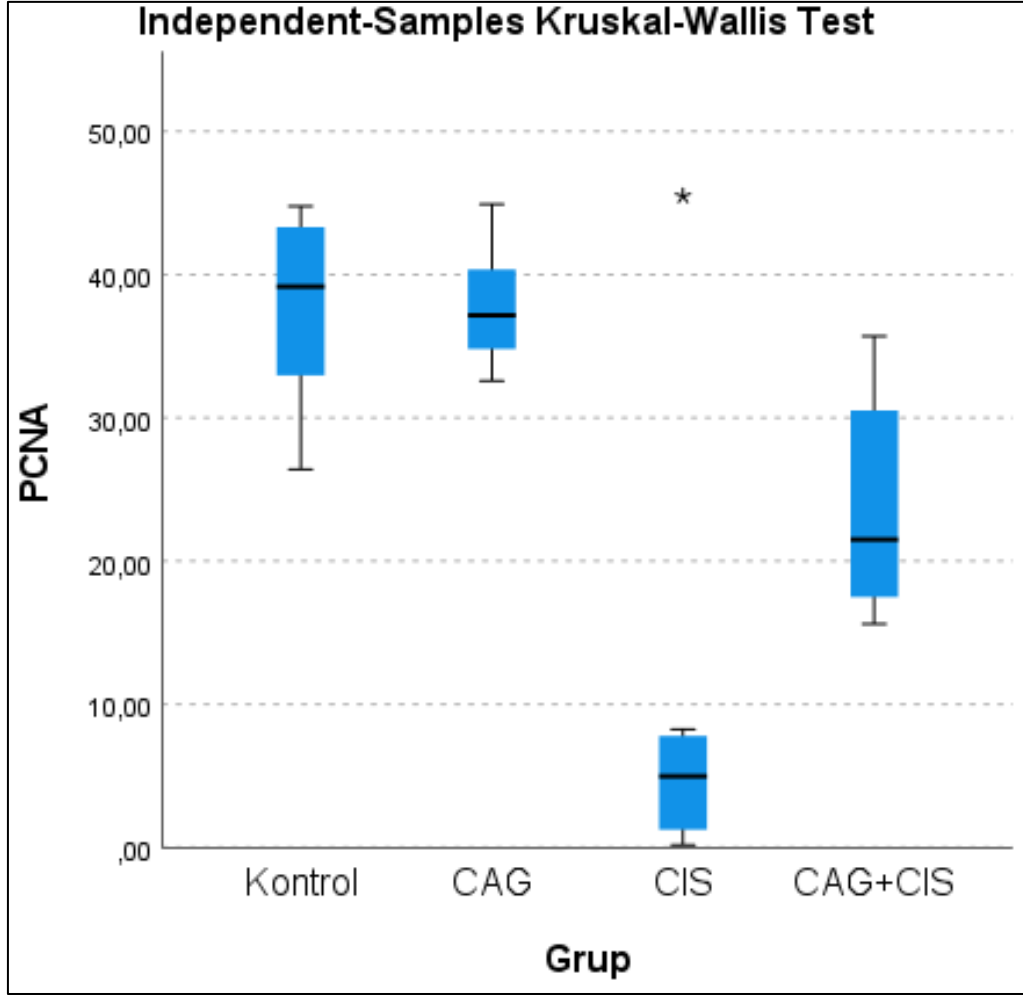
Resim 4.23. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde PCNA immün reaktivite görüntüsü. Pozitif tutulum (→, kırmızı), negatif tutulum (→, sarı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



Resim 4.24. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde PCNA immün reaktivite görüntüsü. Pozitif tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



Resim 4.25. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde PCNA immün reaktivite görüntüsü. Pozitif tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).

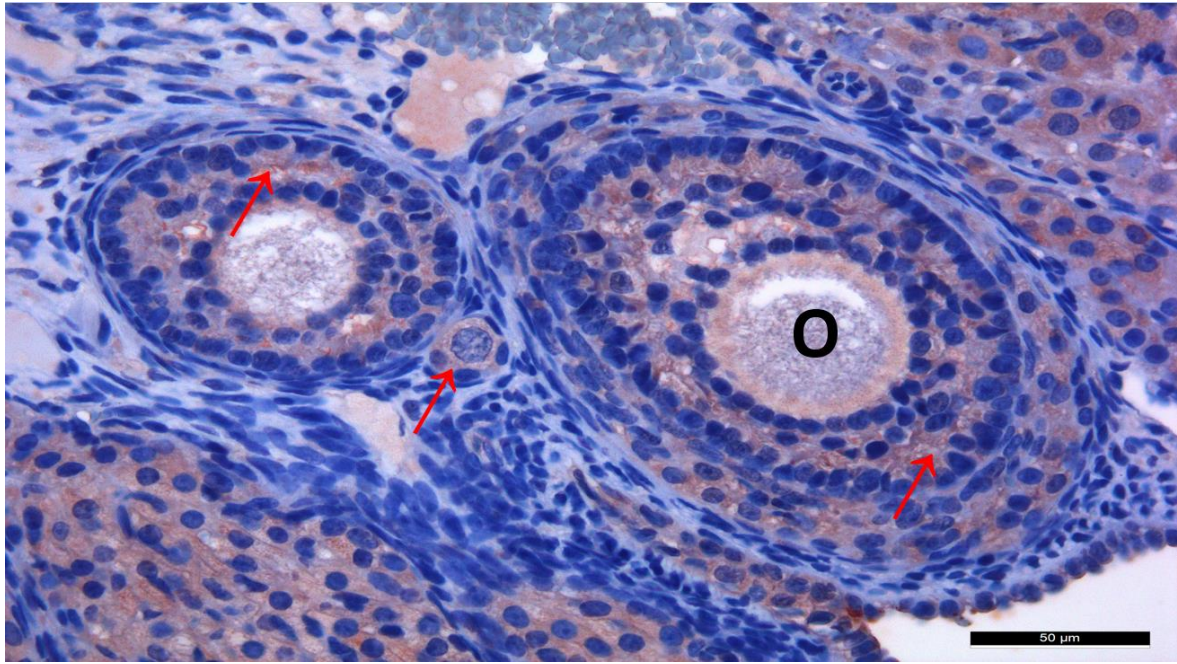


Şekil 4.5. PCNA immünreaktivitesinin gruplar arasında ki dağılımı.

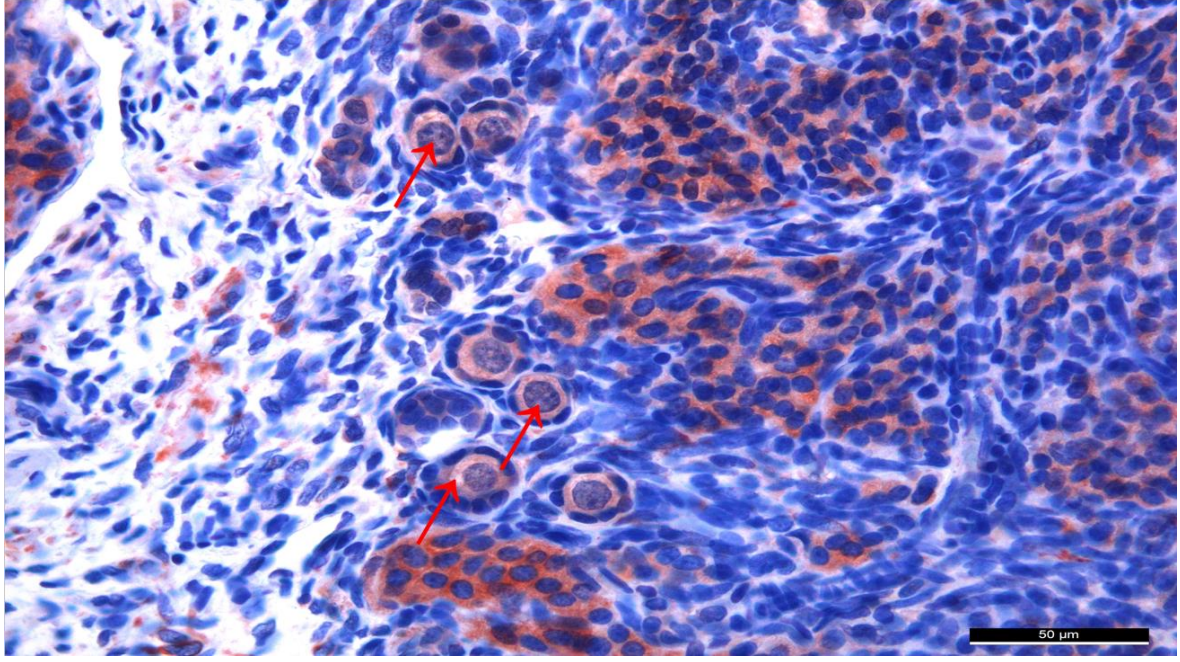
### 4.3. FOXO3a İmmünohistokimya Boyama Bulguları

Cisplatinin uzun dönem uygulamasının neden olduğu, apoptozis temelli primordiyal foliküler havuzdaki kaybın moleküler mekanizmasını aydınlatmak adına yaptığımız anti-FOXO3a immün reaktivitesi deneyinde amacımız, foliküler aktivasyonda görev alan bu molekülün intraselüler lokasyonunu belirlemek ve reaksiyon derecelerindeki olası farklılığı gözlemlemektir. Sağlıklı folikülogenezise giren foliküllerde hem sitoplazmada ve hem de nükleusta FOXO3a tutulumu söz konusudur. Yapılan değerlendirmeler sonucunda; kontrol gruplarında özellikle primordiyal ve primer folikül aşamasındaki oosit ve granüloza hücre düzeyindeki tutulumun, nükleusta ve sitoplazmada orta derecede olduğu görülürken (Resim 4.26, Resim 4.27), sikloastrogenol uygulanan grupta da kontrol grubuna benzer sonuçlara ulaşıldı, bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=1$ , Mann-Whitney Testi) (Şekil 4.6) (Resim 4.28). Ancak cisplatin uygulanan grupta bu gruplardan farklı olarak

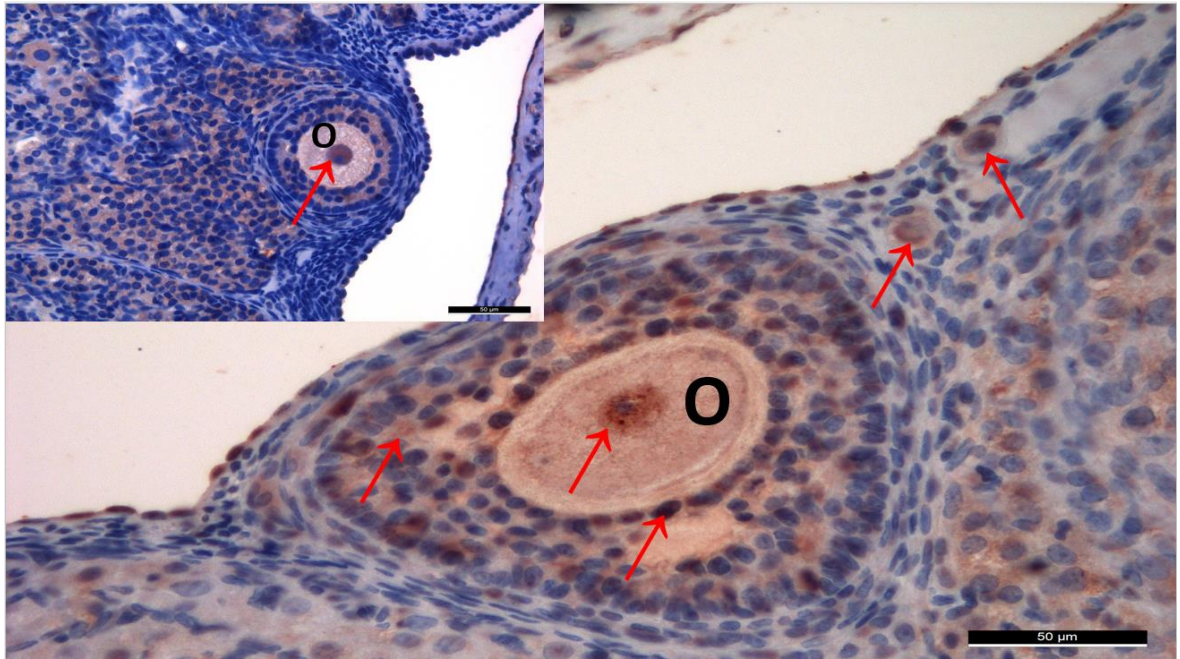
nükleer tutulumun yok denecek kadar az ve sitoplazmik reaksiyonların çok zayıf olduğu görüldü ve cisplatin grubunda ki bu azalış kontrol grubu ve sikloastrogenol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı seviyedeydi ( $p<,001$ ,  $p<,001$ , Mann-Whitney Testi) (Şekil 4.7, Resim 4.29). Hem cisplatin hem de sikloastrogenol uygulanan grupta ise; hem primordiyal hem de primer foliküllerde, hem nükleusta ve hem de sitoplazmada cisplatin grubuna kıyasla artış olduğu tespit edildi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildi ( $p=,293$ ) (Şekil 4.7, Resim 4.30).



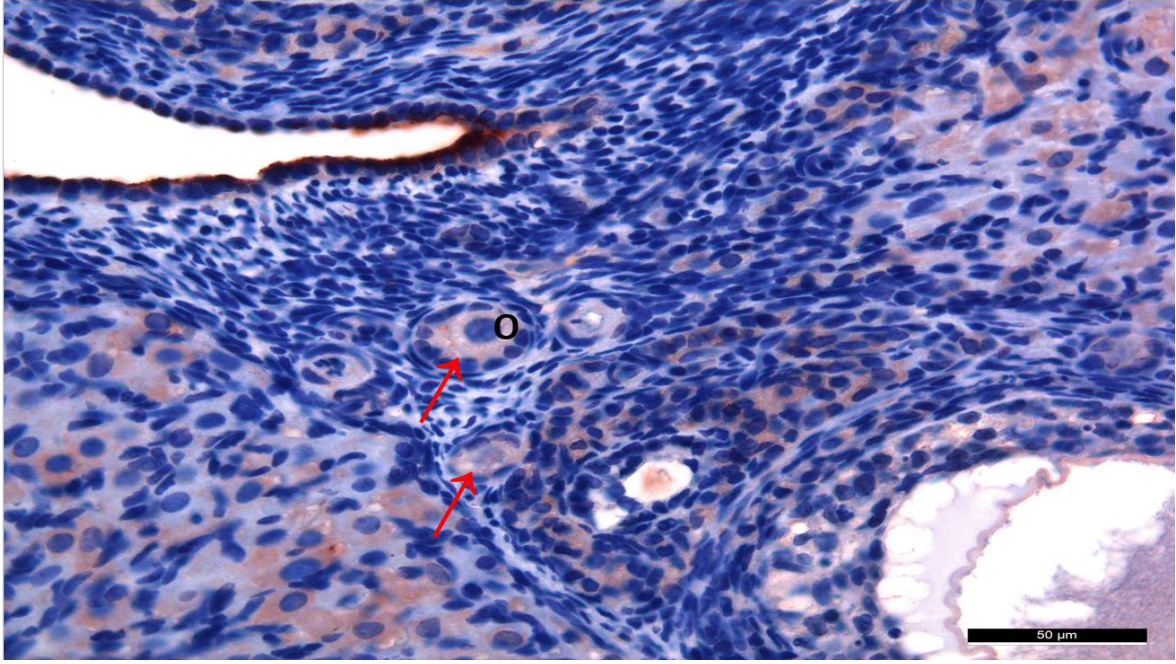
Resim 4.26. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde FOXO3a immün reaktivite görüntüsü. Oosit (O), FOXO3a tutulumu (→, kırmızı), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



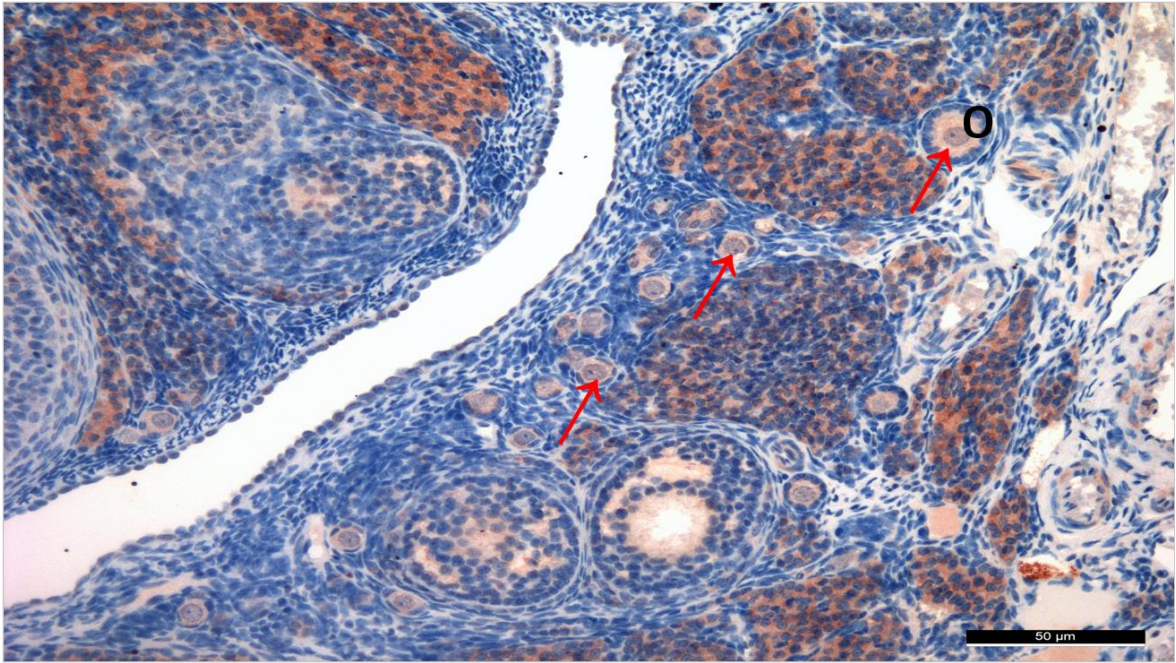
Resim 4.27. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde FOXO3a immün reaktivite görüntüsü. FOXO3a tutulumu (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



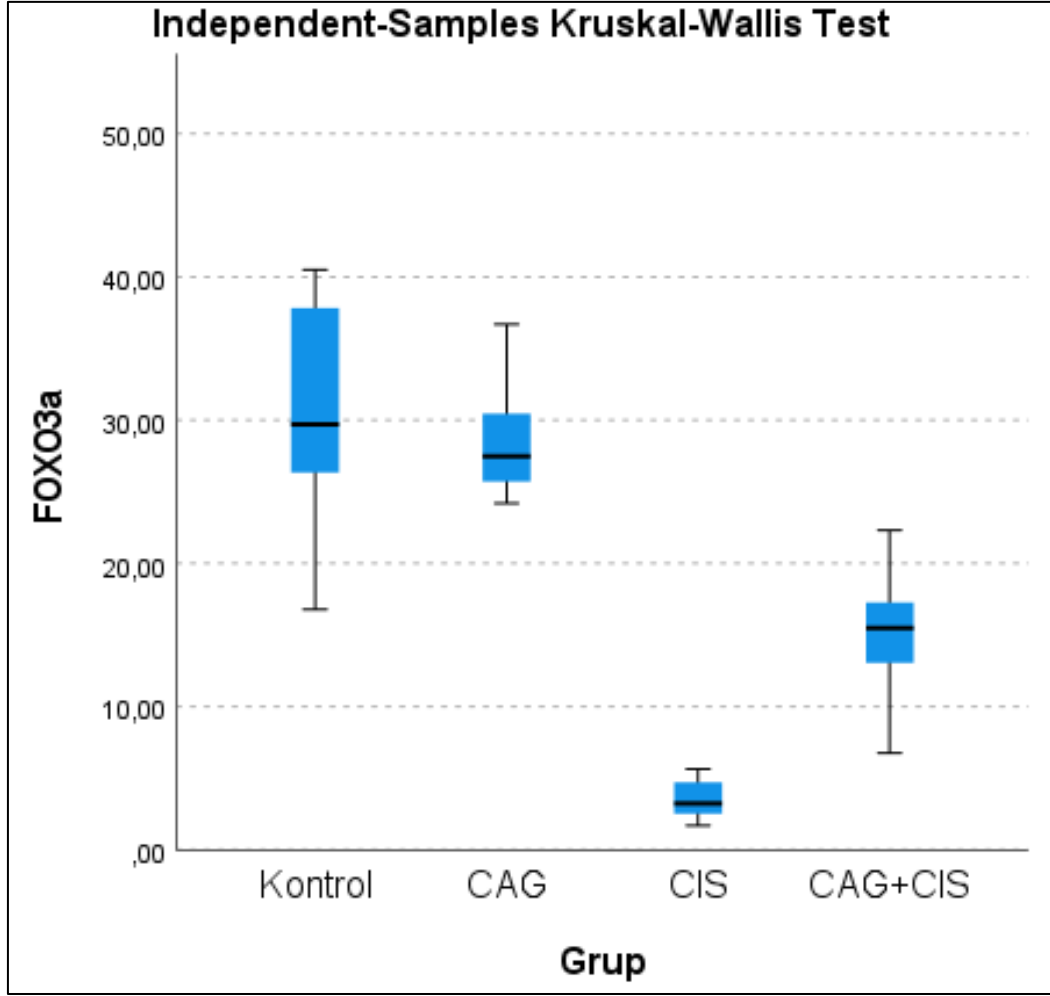
Resim 4.28. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde FOXO3a immün reaktivite görüntüsü. Oosit (O), FOXO3a tutulumu (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



Resim 4.29. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde FOXO3a immün reaktivite görüntüsü. Oosit (O), FOXO3a tutulumu (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



Resim 4.30. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde FOXO3a immün reaktivite görüntüsü. Oosit (O), FOXO3a tutulumu (→, kırmızı), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



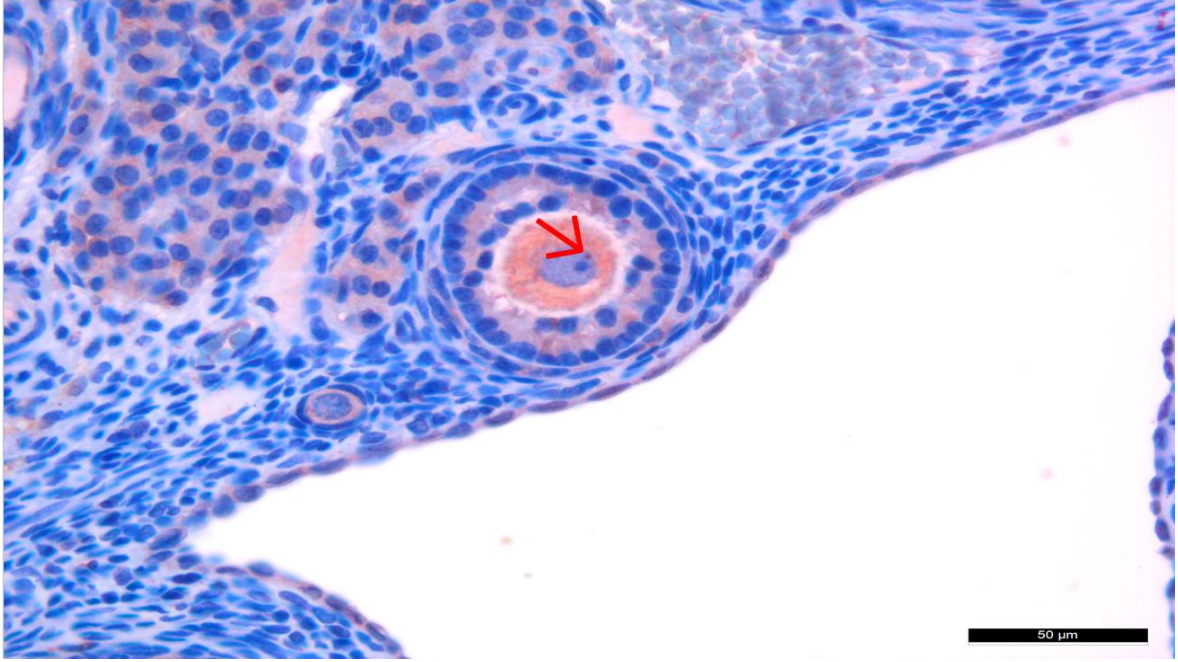
Şekil 4.6. FOXO3a immünreaktivitesinin gruplar arasında ki dağılımı.

#### 4.4. mTOR İmmünohistokimya Boyama Bulguları

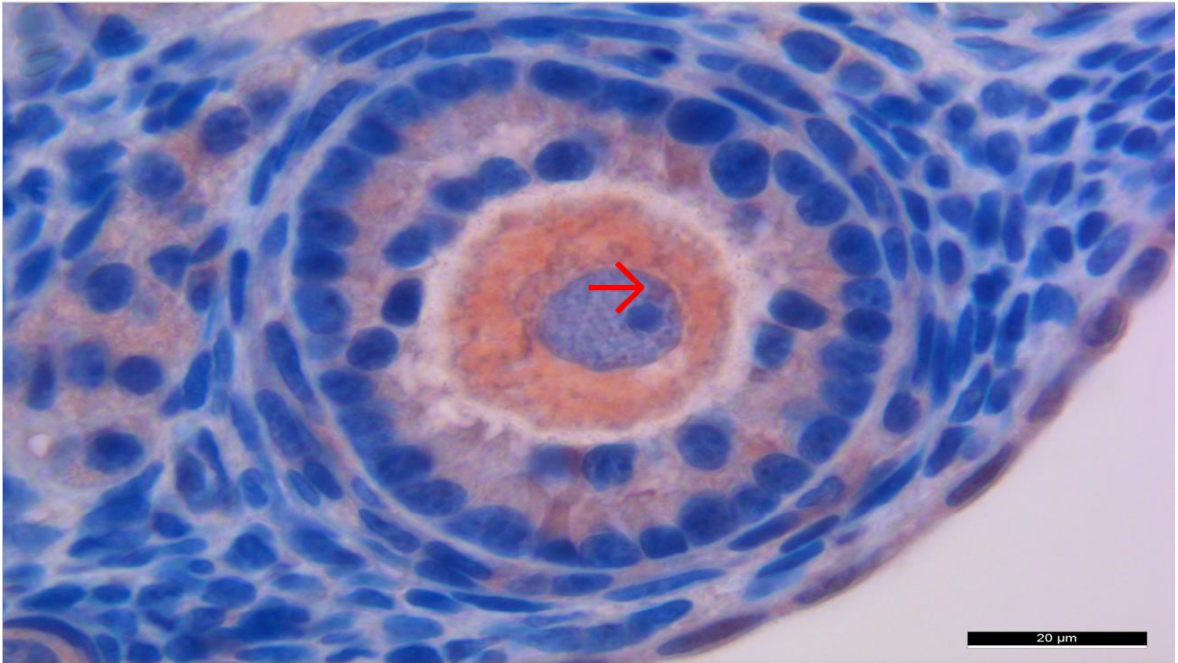
Anti-mTOR antikoru ile yaptığımız immunohistokimya boyamaları neticesinde, mTOR immünreaktivitesinin her iki kontrol grubunda da primer oosite ait ooplazmada orta, granüloza hücre sitoplazmalarında ise zayıf immünreaktivite gösterdiği tespit edildi. Bu grup oosit nukleusuna ait vezikülde tutulum ayırt edildi ancak immünreaktivite gösteren vezikül sayısı bir adet olarak tespit edildi (Resim 4.31, Resim 4.32, Resim 4.33, Resim 4.34). Sikloastrogenol uygulanan grupta mTOR immünreaktivitesi değerlendirildiğinde, ooplazma ve granüloza hücre sitoplazmasına ait tutulumların her iki kontrol grubu ile eşdeğer olduğu izlenirken, kontrol gruplarından ayrıcalık olarak oosit nukleusuna ait çok sayıda vezikülde tutulum ayırt edildi ve reaksiyon derecesinde istatistiksel olarak, kontrol grubuyla anlamlı bir fark bulunmadığı izlendi ( $p=1$ , Mann-Whitney Testi) (Şekil 4.7) (Resim 4.35, Resim 4.36). Cisplatin uygulanan grupta ooplazmada şiddetli, granüloza hücre sitoplazmalarında

ise orta şiddetli immünreaktivite görülürken, sitoplazmik immünreaktivitenin kontrol ve sikloastrogenol gruplarına kıyasla arttığı izlendi ve bu artış istatistiksel olarak anlamlı derecedeydi ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$ ) (Şekil 4.7). Buna karşılık bu gruptaki en dikkat çekici bulgu; oosit nukleusuna ait veziküllerin yapıcı bozularak, nukleusun periferinde veziküler yapıda değil dağınık yerleşim göstererek konumlanması olarak tespit edildi. mTOR tutulumu ise bu bölgede zayıf olarak nitelendirildi (Resim 4.37, Resim 4.38). Cisplatin ve sikloastrogenolün birlikte uygulandığı grupta ooplazma ve granüloza hücre sitoplazmasına ait immünreaktivitenin yeniden kontrol grupları ve sikloastrogenol grubu ile eşdeğer bir hal aldığı ve reaksiyon derecelerinde anlamlı bir fark olmadığı ( $p = 0,891$ ,  $p = 0,358$ ) (Şekil 4.7), ooplazmada orta ve granüloza hücre sitoplazmasında ise zayıf tutulum görüldüğü, ayırt edildi. Buna karşılık, bu gruba ait oositlerin nuklear veziküllerinde tutulum gösteren vezikül sayısının görece yeniden arttığı ve periferik yerleşimin bozularak, yeniden merkezi ve veziküler yapıda konumlandığı dikkati çekti (Resim 4.39, Resim 4.40).

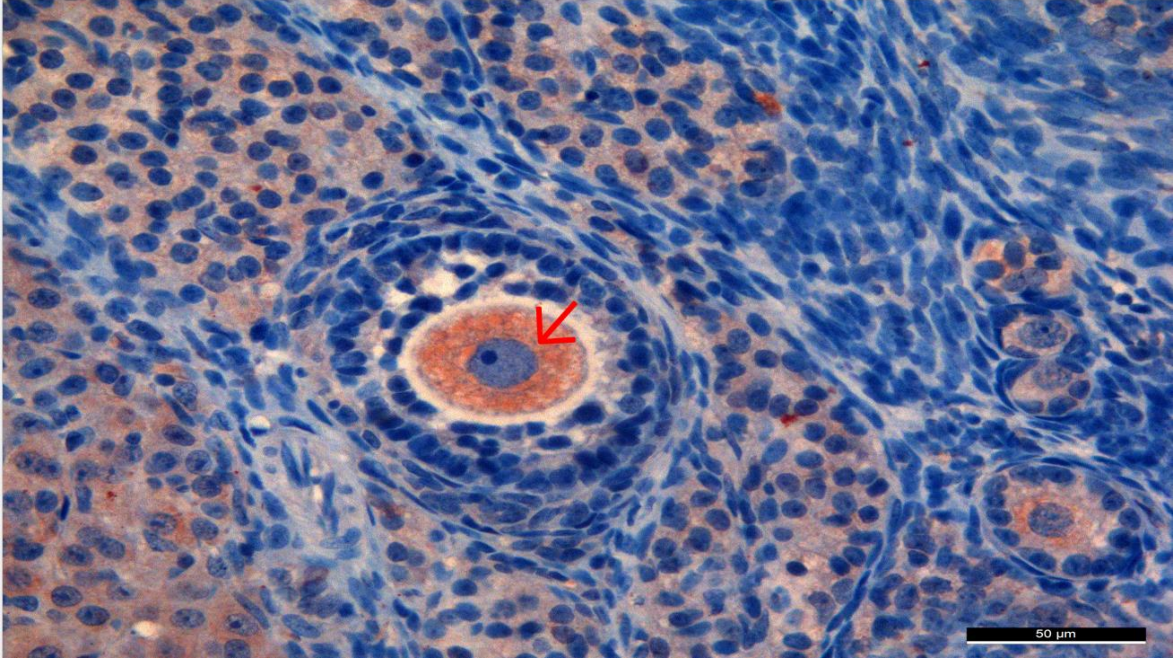
Bu bulgular doğrultusunda, mTOR immünreaktivitesinin cisplatin uygulaması ile birlikte oosit ve granüloza hücre düzeyinde artarak foliküllerin atretik süreçlerini indüklediği, bu hücrelerdeki immünreaktivite artışının ise temelde nuklear veziküllerde bozulmaya yol açarak, protein sentezini bloke etmesi üzerinden gerçekleştirdiği düşünüldü. Uygulanan sikloastrogenolün ise, veziküler sağ kalım ve protein sentezini yeniden inşa ederek, folikülleri apoptotik sürece götüren sitoplazmik mTOR immünreaktivitesini düşürdüğü ve bu anlamda cisplatine karşın mTOR yolağı üzerinden foliküllerde koruyucu etki gösterdiği tespit edildi.



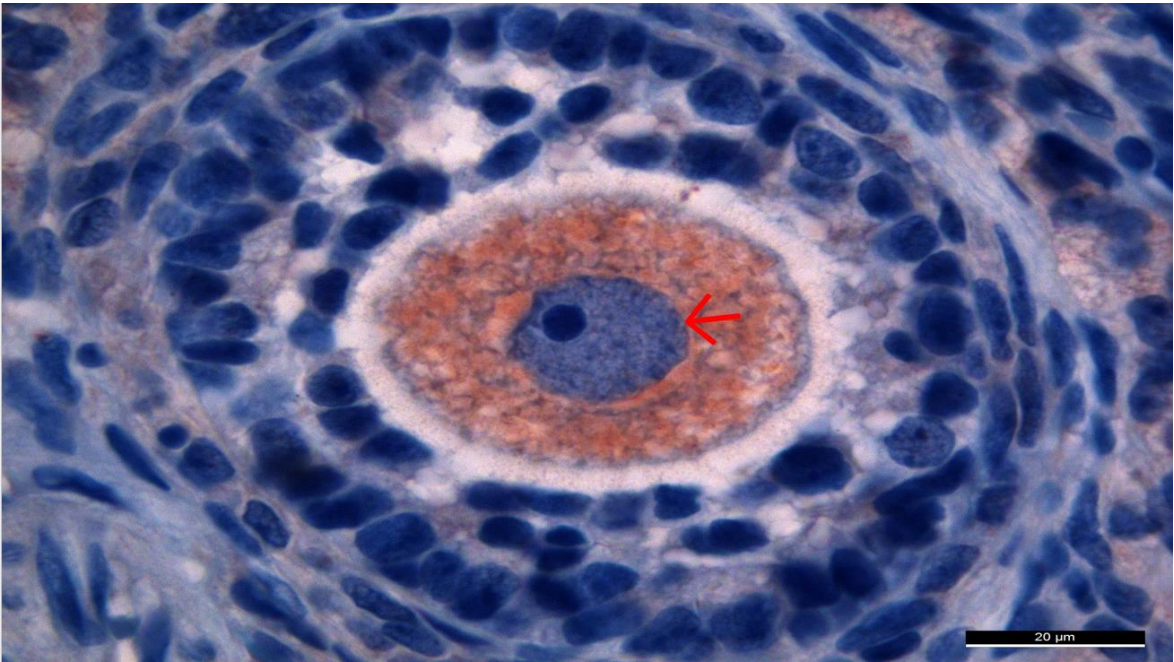
Resim 4.31. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



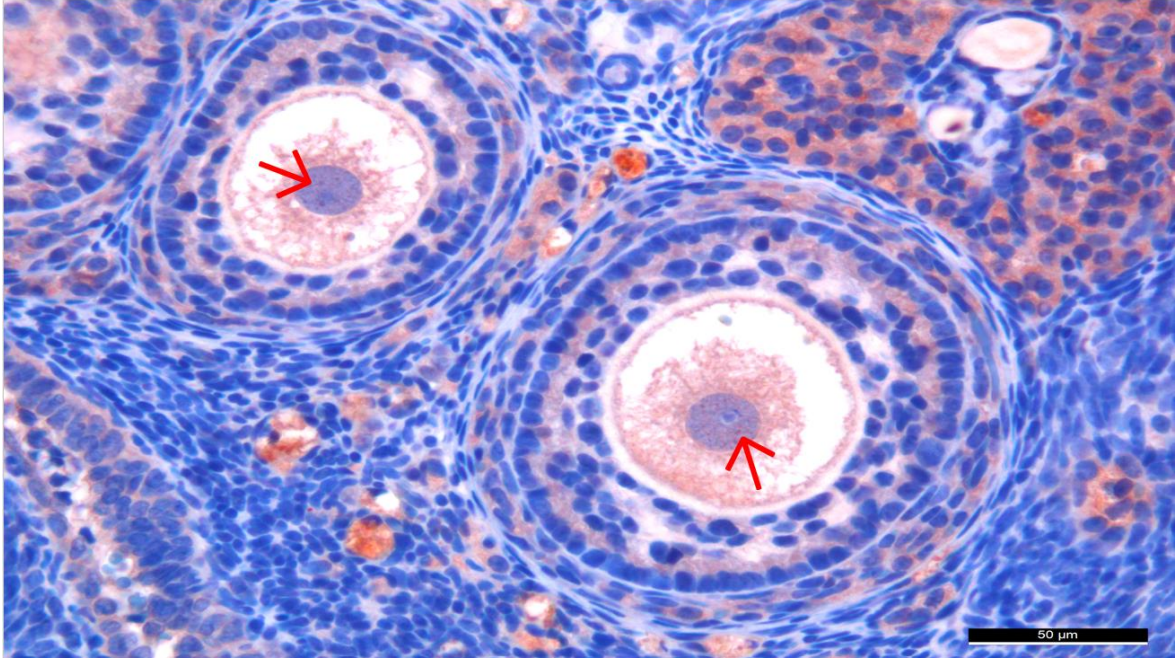
Resim 4.32. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000).



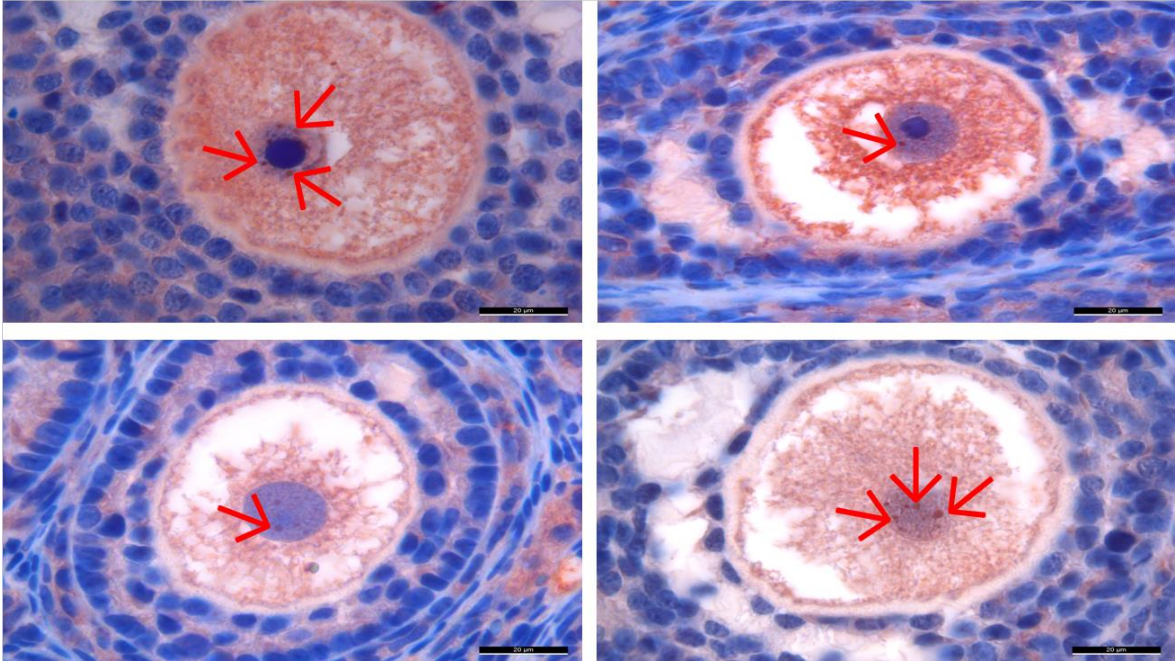
Resim 4.33. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



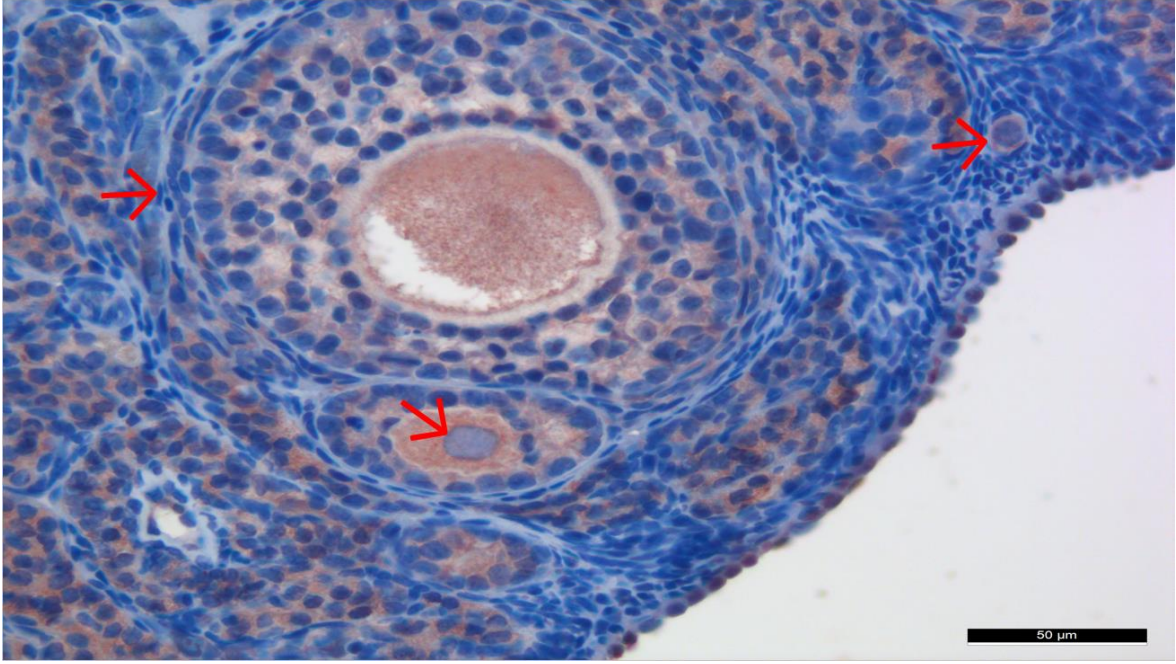
Resim 4.34. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000).



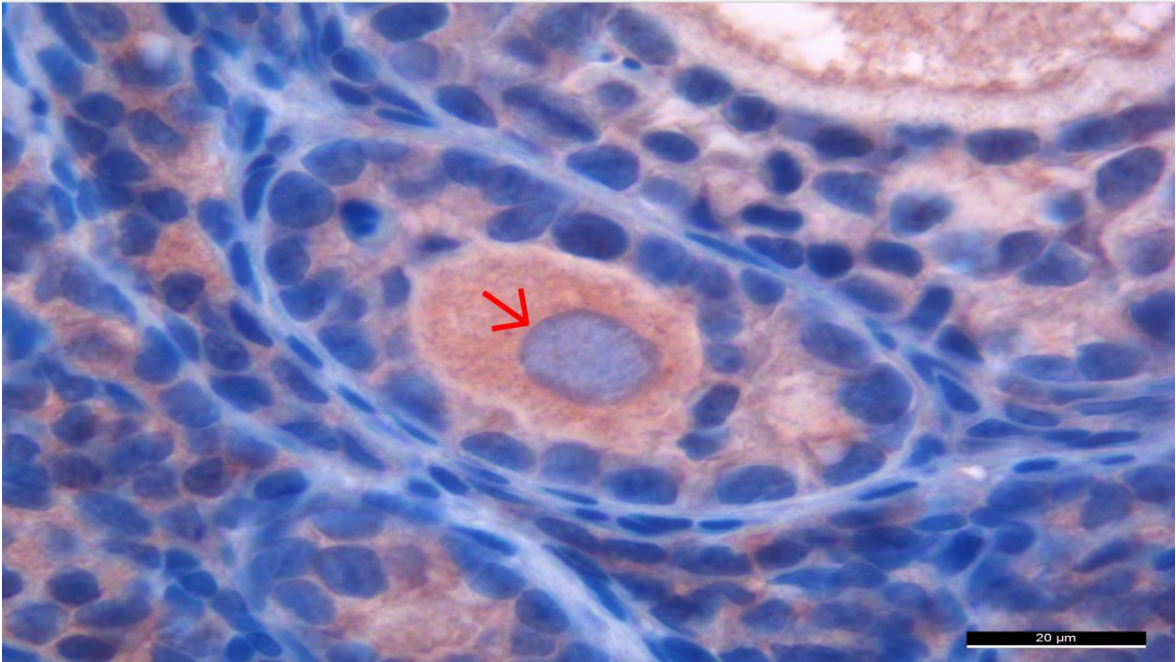
Resim 4.35. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



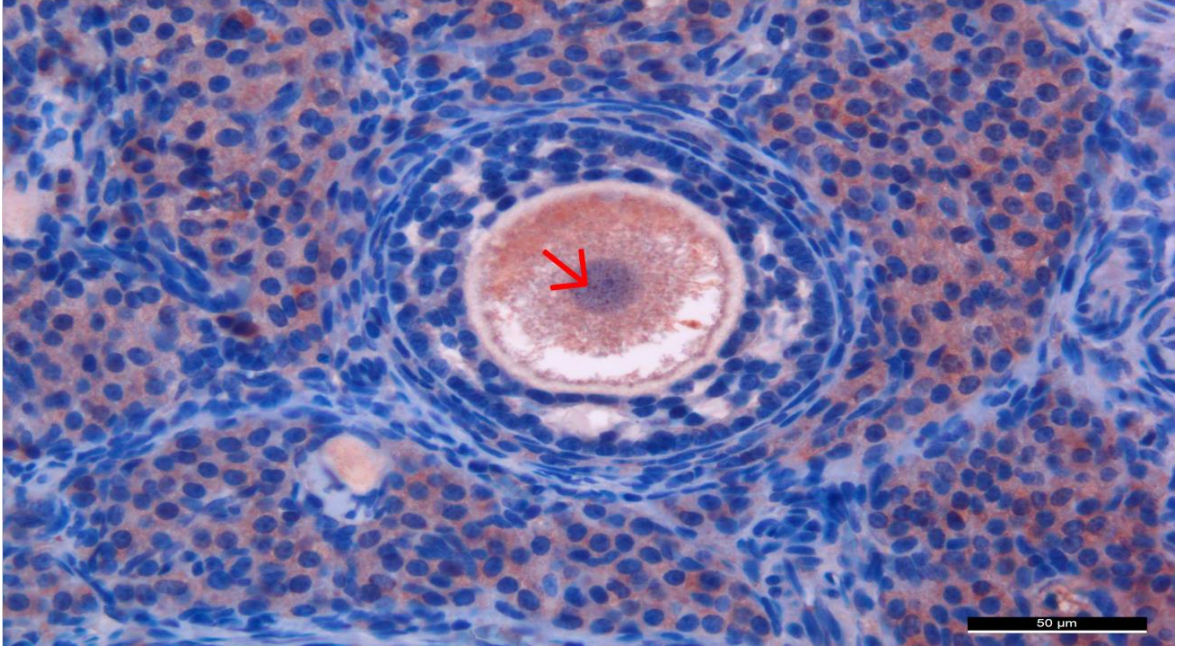
Resim 4.36. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000).



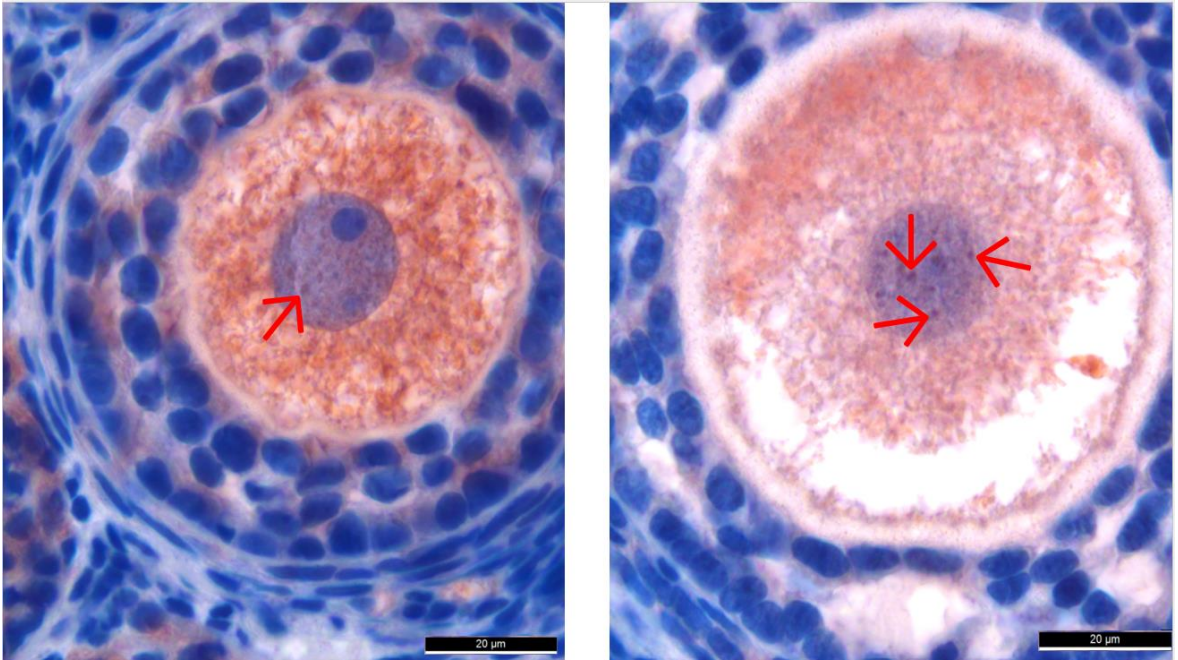
Resim 4.37. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



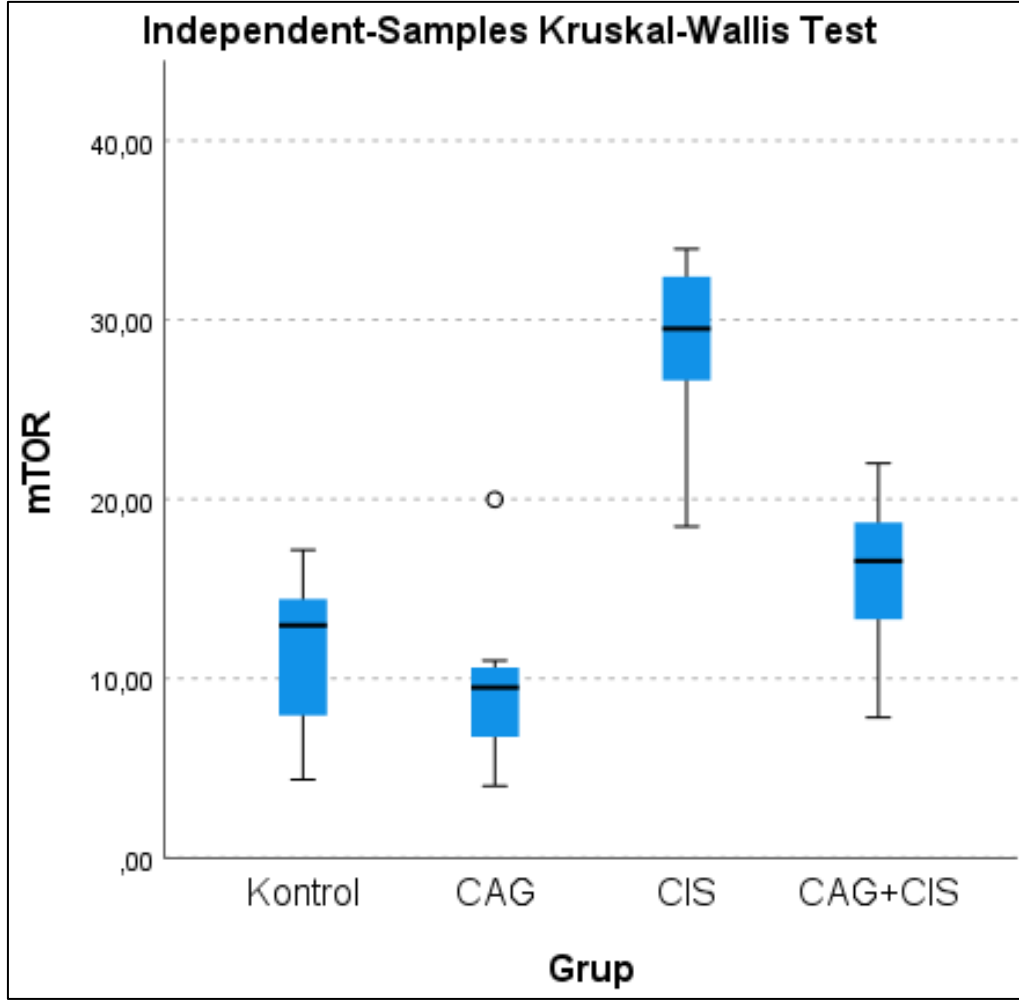
Resim 4.38. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000).



Resim 4.39. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



Resim 4.40. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde mTOR immün reaktivite görüntüsü. Veziküler tutulum (→, kırmızı) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x1000).

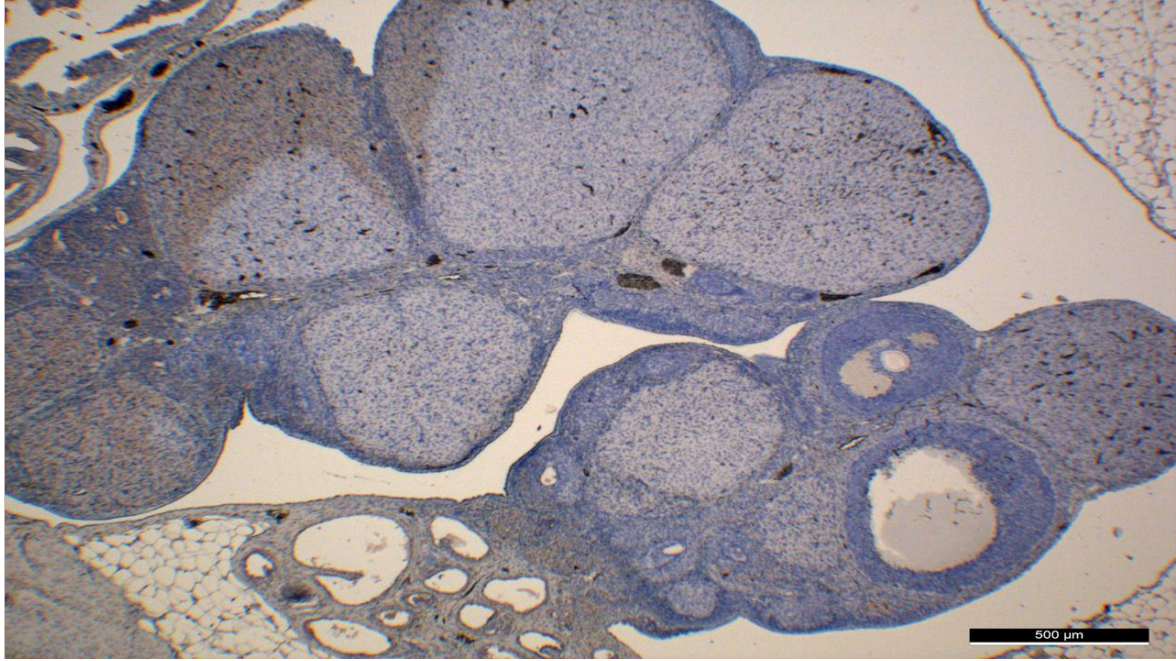


Şekil 4.7. mTOR immünreaktivitesinin gruplar arasında ki dağılımı.

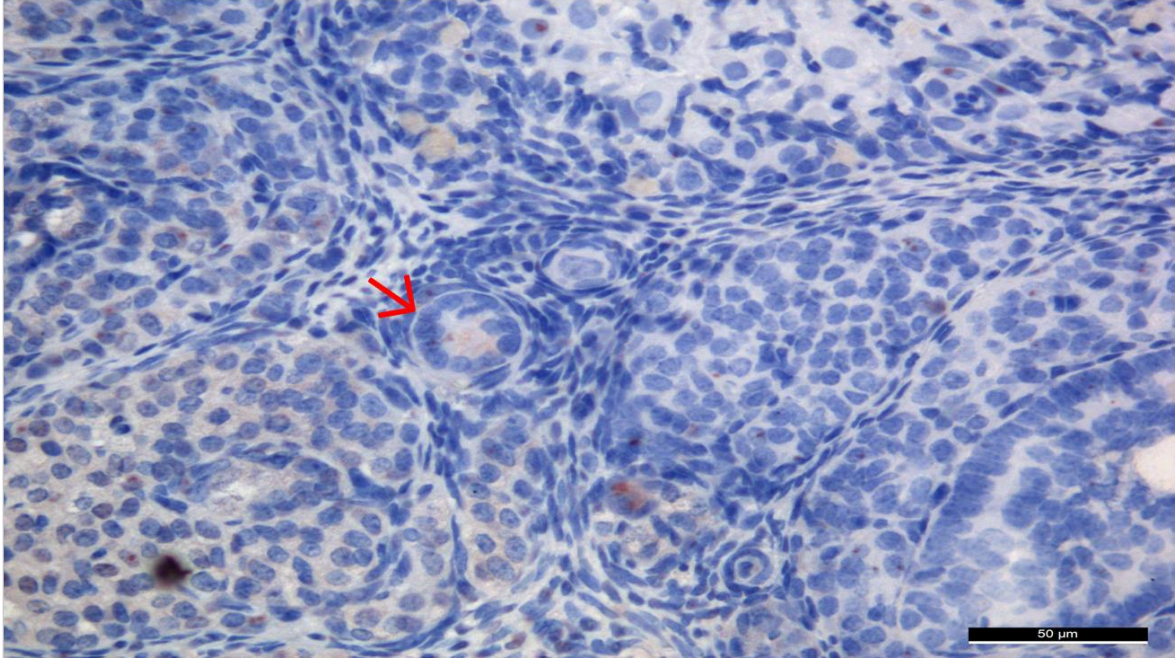
#### 4.5. Caspaz-3 İmmünohistokimya Boyama Bulguları

Anti-Caspaz 3 antikoruna ile yaptığımız immunohistokimya boyamaları neticesinde, her iki kontrol grubu ile sikloastrogenol verilen gruplarda, primordiyal folikülere ait primer oosit ooplazması ve granuloza hücrelerinde, sitoplazmik düzeyde çok zayıf düzeyde immünreaktivite gözlenirken (Resim 4.41, Resim 4.42., Resim 4.43, Resim 4.44, Resim 4.45, Resim 4.46) (Şekil 4.8), sikloastrogenol verilen grupta bazı primer foliküllerde oosit sitoplazmasında zayıftan ortaya değişen immünreaktivite tespit edildi ve bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ( $p=1$ , Mann-Whitney Testi) (Resim 4.45, Resim 4.46) (Şekil 4.8). Cisplatin verilen grupta tüm foliküler evrelerde; ooplazmada sitoplazmik düzeyde ve şiddetli, granuloza hücrelerinde ise sitoplazmik düzeyde zayıftan ortaya değişen düzeyde immünreaktivite izlendi. Bu değişim kontrol grubu ve sikloastrogenol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede artmıştı

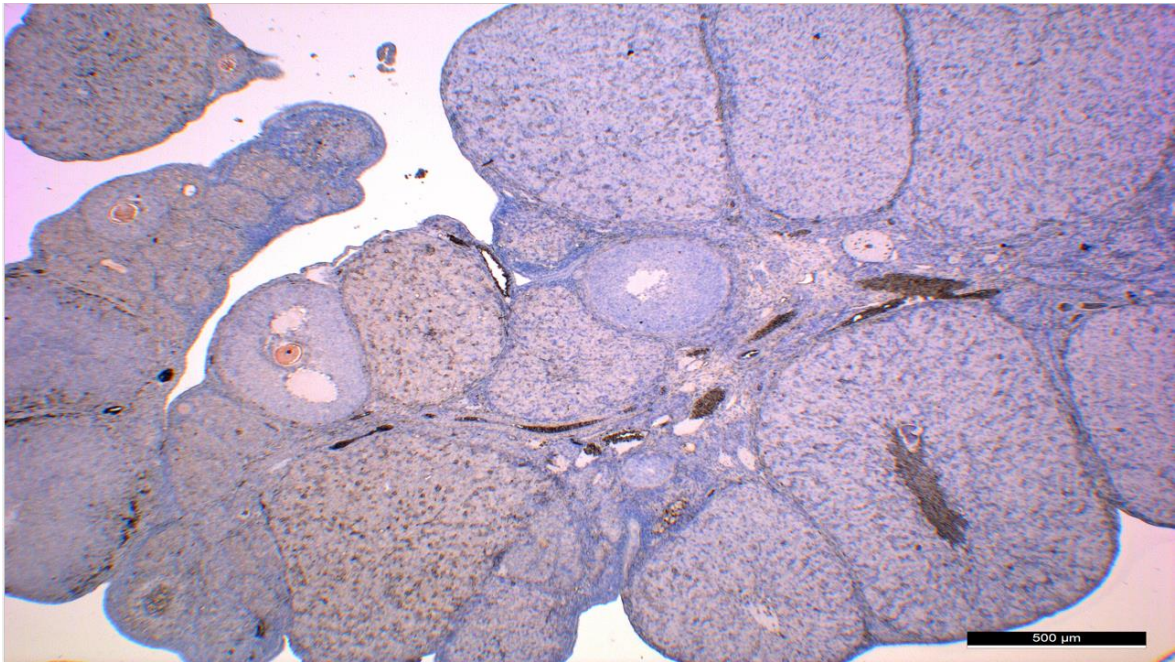
( $p < ,001$ ,  $p = ,004$  Mann-Whitney Testi) (Resim 4.48, Resim 4.49) (Şekil 4.8). Cisplatin ve sikloastrogenol verilen grupta ise tutulum, ooplazmada ortadan şiddetliye değişen düzeyde ve sitoplazmik, buna karşılık granüloza hücre sitoplazmasında ise zayıf düzeyde ayırt edildi (Resim 4.50, Resim 4.51). Bu gruptaki artış kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede (p=,048 Mann-Whitney Testi), sikloastrogenol uygulanan grupla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede değildi (p=,440, Mann-Whitney Testi) (Şekil 4.8). Cis grubuyla kıyaslandığında ise tutulum derecesinin azaldığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı seviyede olmadığı görüldü (p=,931, Mann-Whitney Testi) (Şekil 4.8).



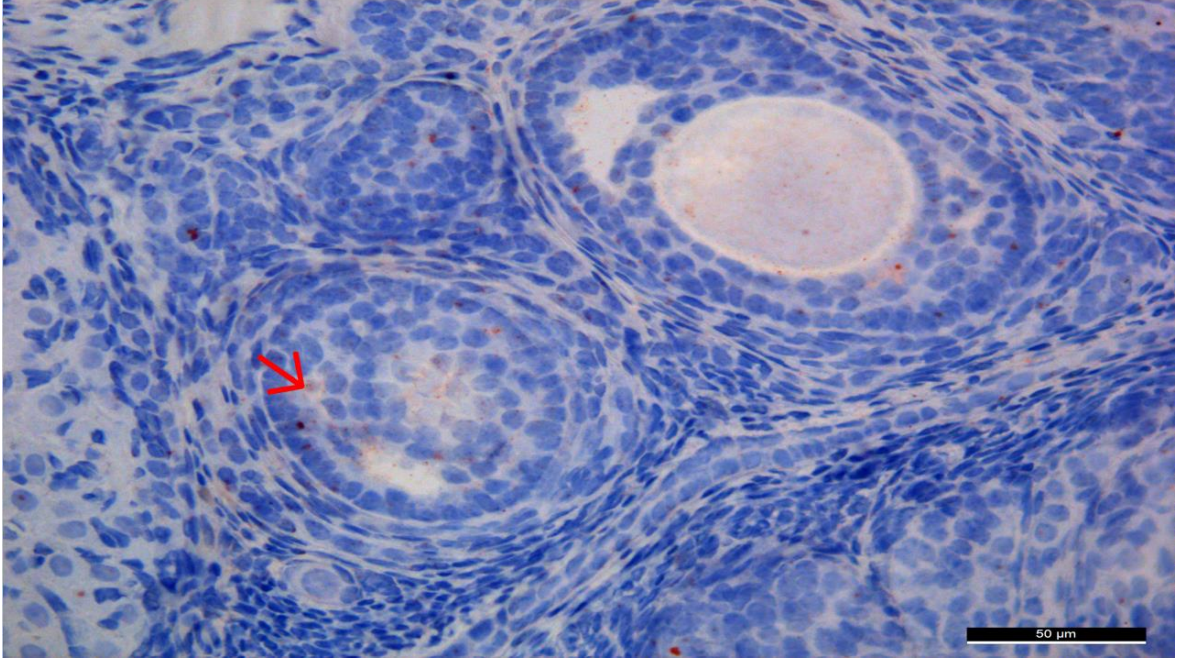
Resim 4.41. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x40).



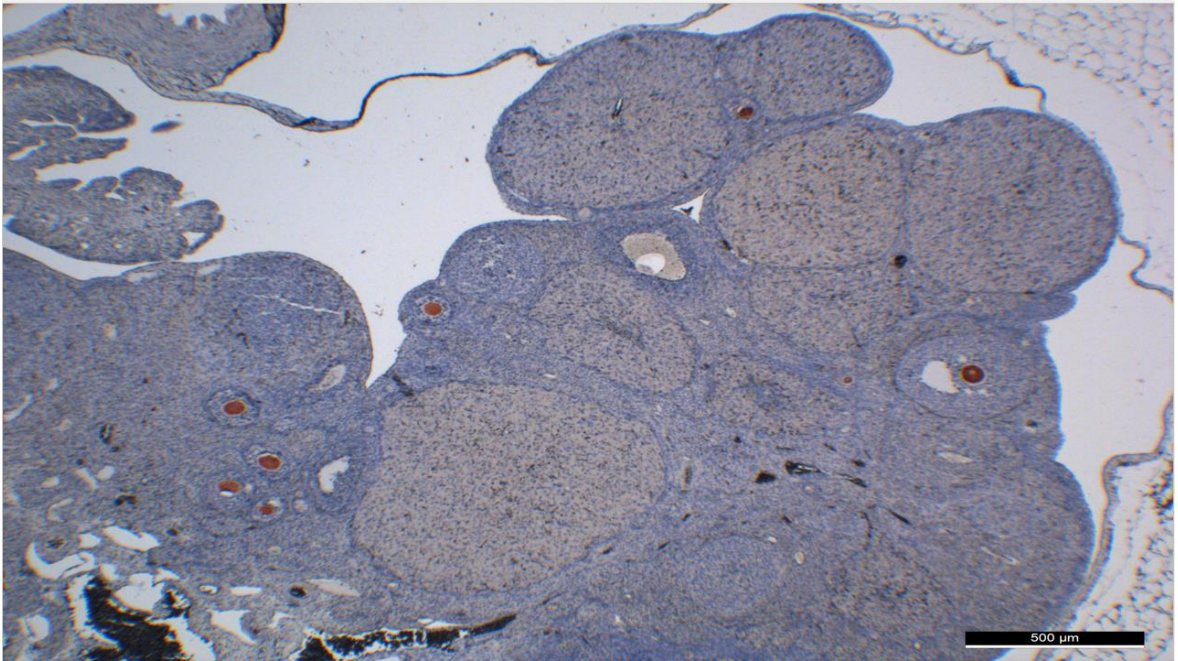
Resim 4.42. Gavaj stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü. İmmünreaktivite gösteren foliküller (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



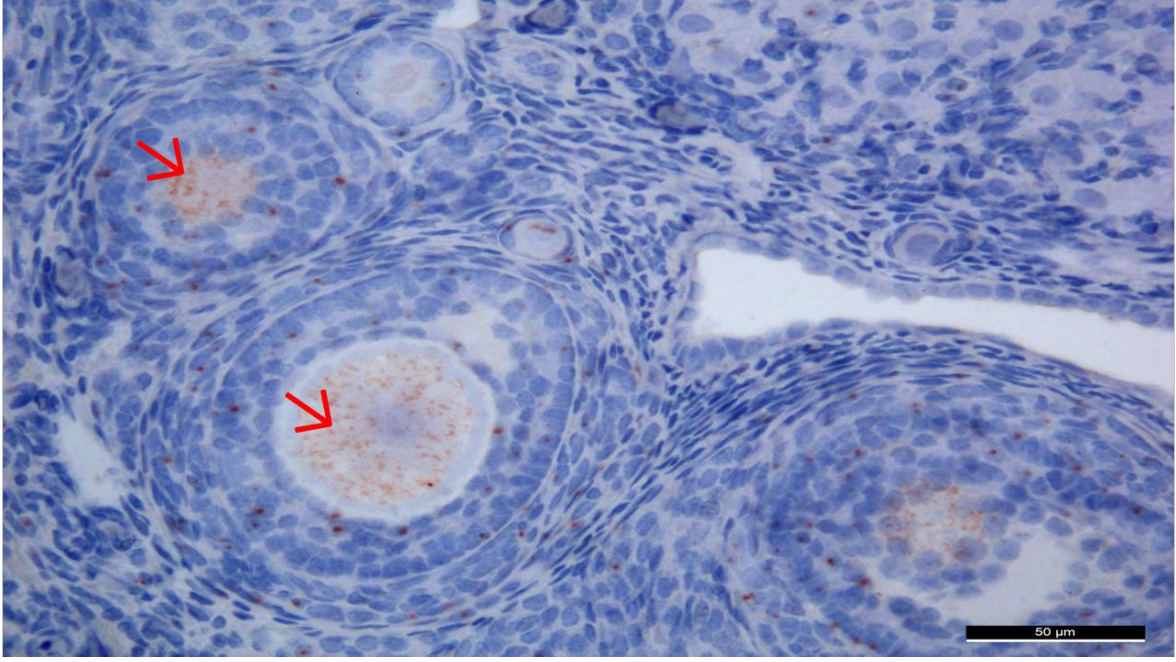
Resim 4.43. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x40).



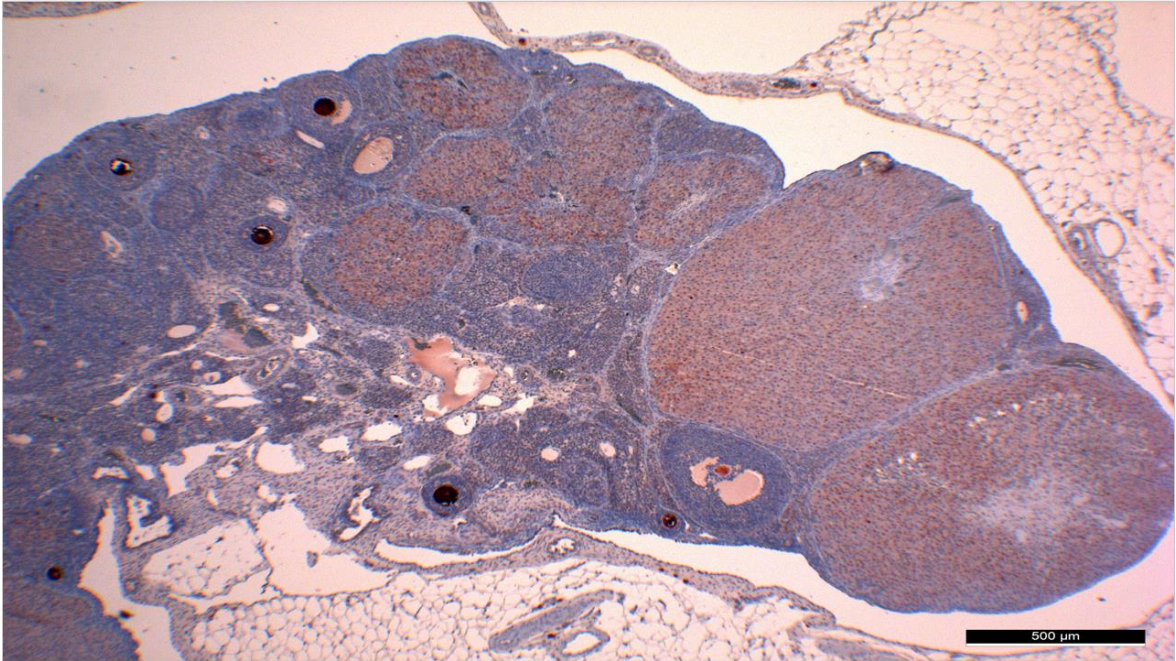
Resim 4.44. İ.p. enjeksiyon stresi uygulanan çözücü grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü. İmmünreaktivite gösteren foliküller (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



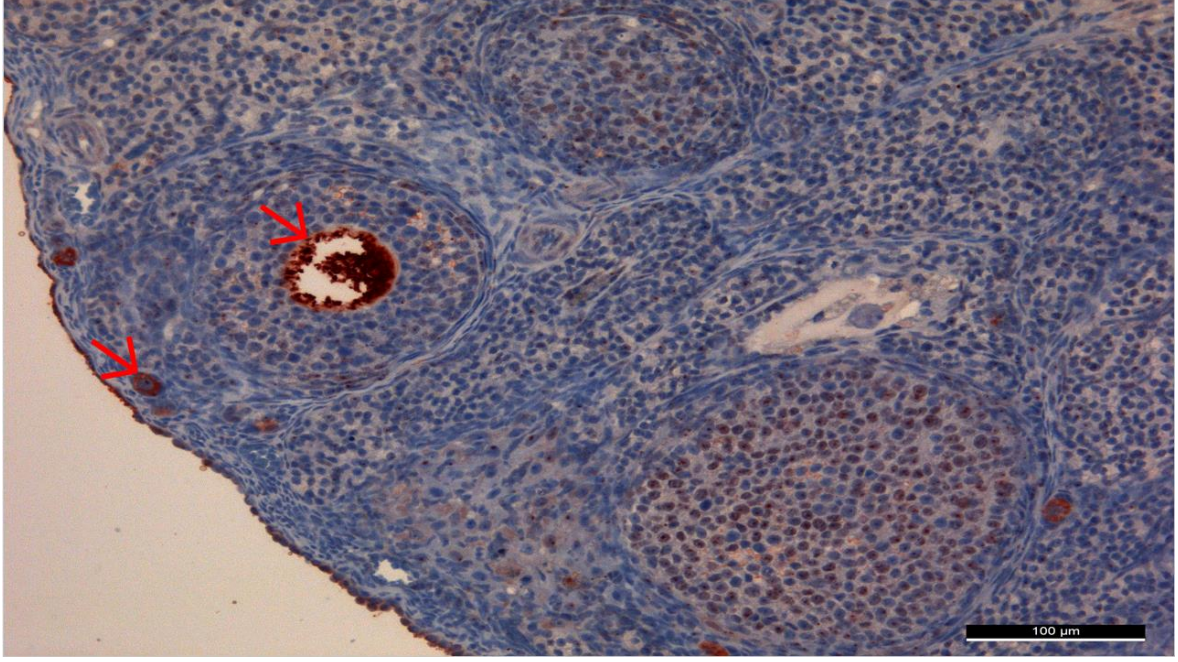
Resim 4.45. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x40).



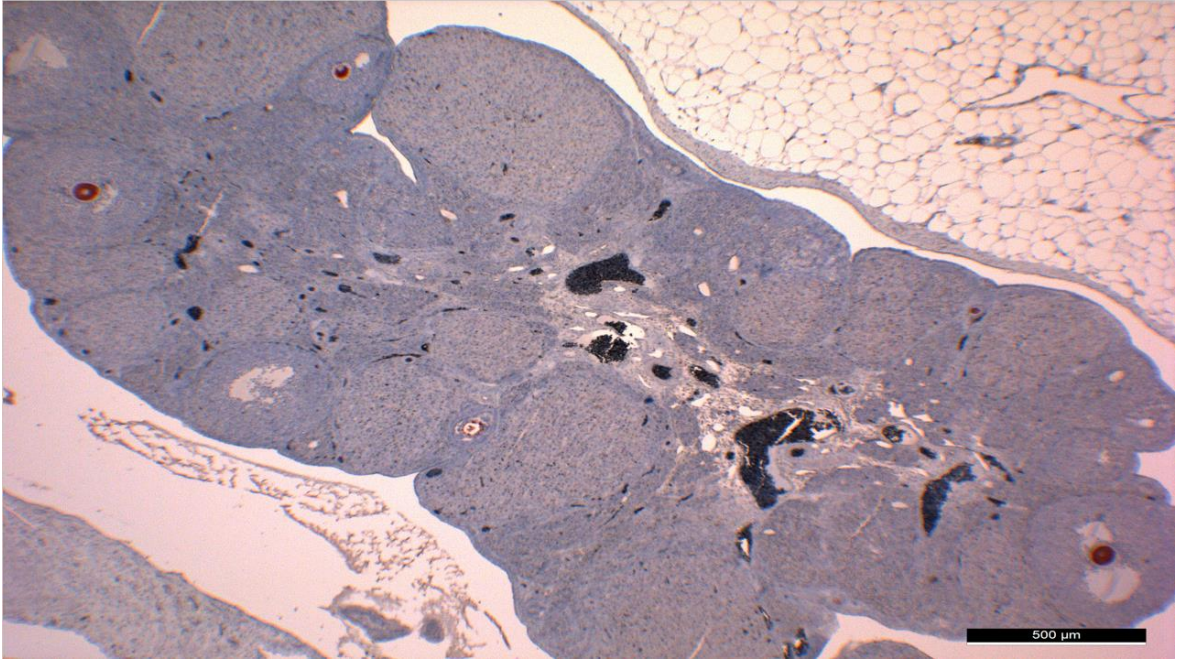
Resim 4.46. Sikloastrogenol grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü. İmmünreaktivite gösteren foliküller (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



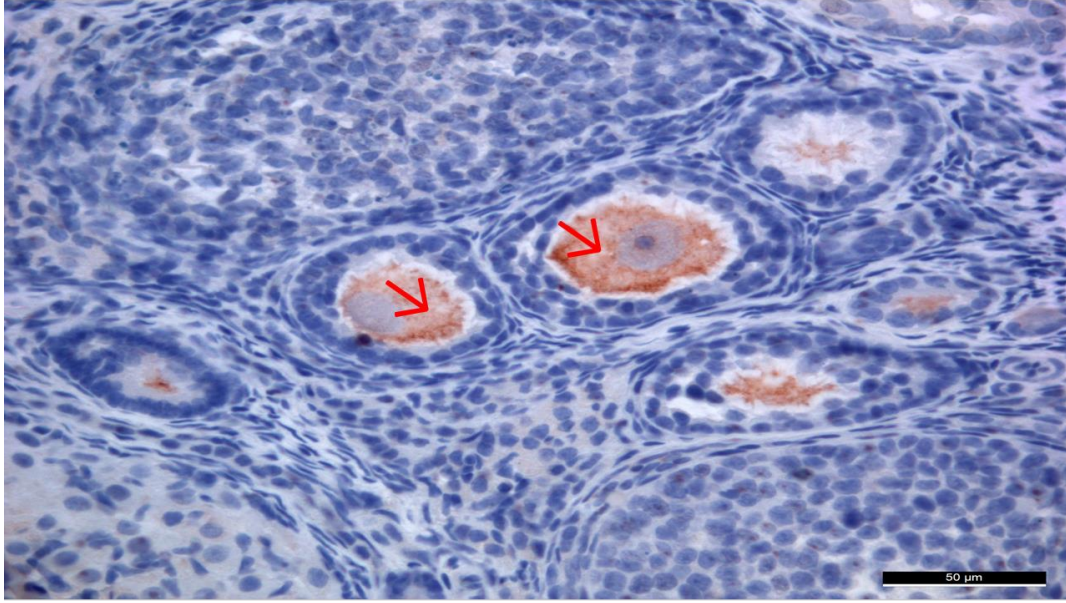
Resim 4.47. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x40).



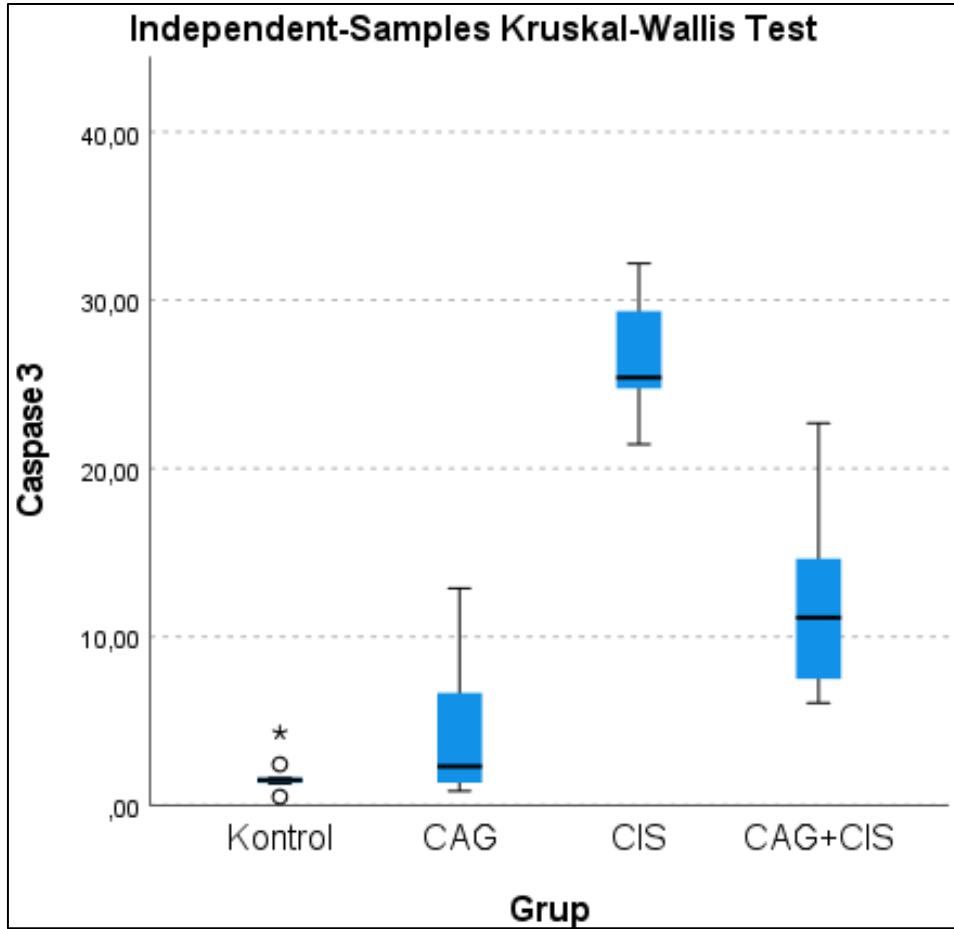
Resim 4.48. Cisplatin grubu ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü. İmmünreaktivite gösteren foliküller (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



Resim 4.49. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x40).



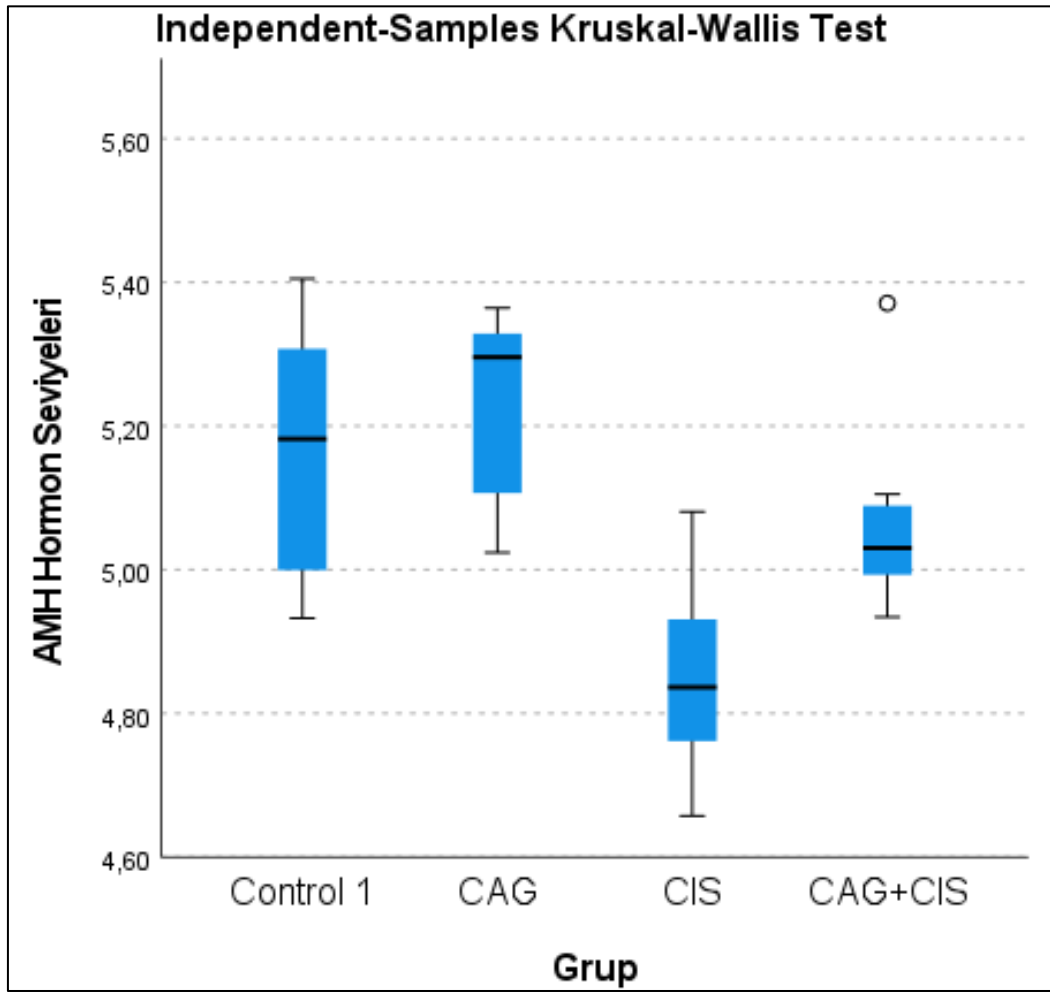
Resim 4.50. Cisplatin ve sikloastrogenol verilen gruba ait ovaryum kesitinde Caspaz-3 immün reaktivite görüntüsü. İmmünreaktivite gösteren foliküller (→) (İmmünperoksidaz-Hematoksilen x400).



Şekil 4.8. Caspaz 3 immünreaktivitesinin gruplar arasında ki dağılımı.

#### 4.6. AMH ELİZA Bulguları

Cisplatinin ovaryum dokusunda foliküler havuza verdiği hasarı tespit etmek için yaptığımız ELİZA deneyi sonucunda cisplatin verilen grupta AMH seviyelerindeki azalma kontrol grubu ve sikloastrogenol verilen grupta kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı tespit edildi ( $p=0,03$ ,  $p<0,001$  Mann-Whitney Testi). Cisplatin ve sikloastrogenolün birlikte uygulandığı deney grubunda ise AMH seviyesinin, cisplatin verilen gruba kıyasla arttığı, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi ( $p=0,07$ ) (Şekil 4.9).

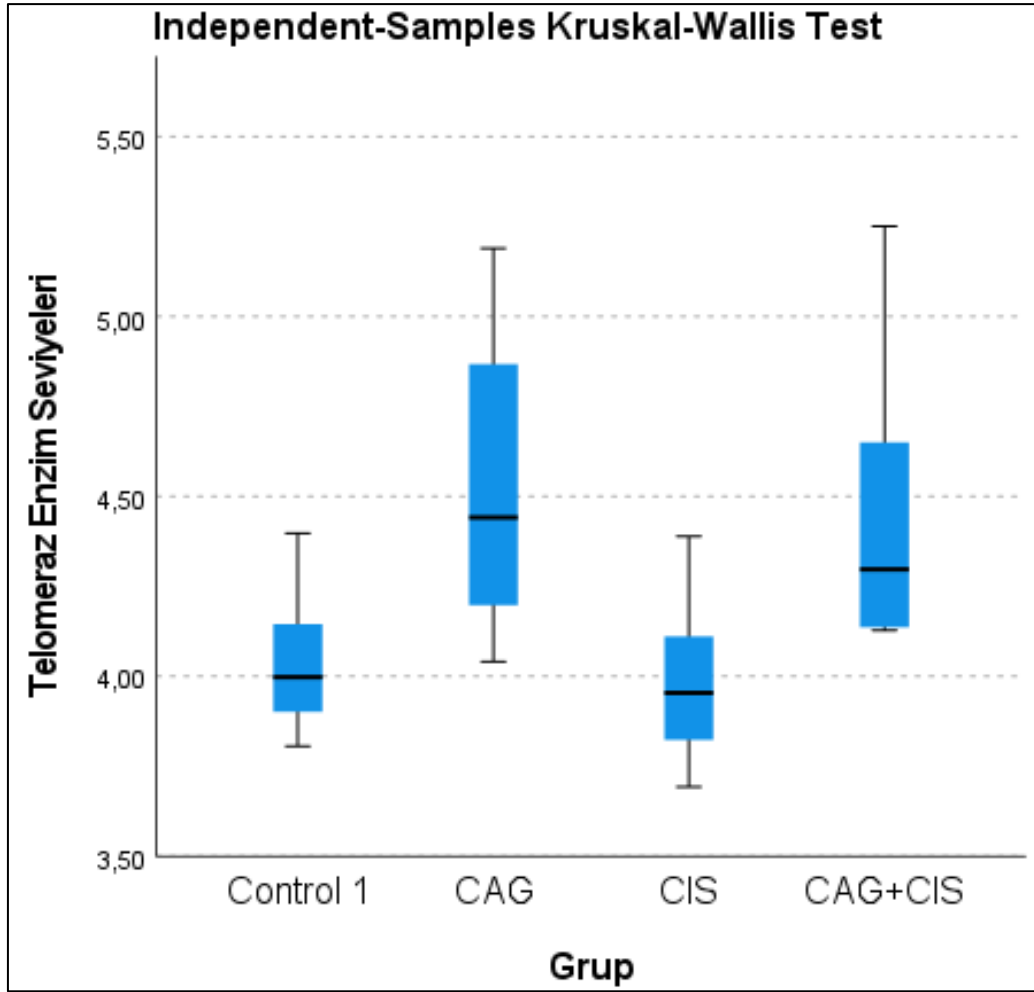


Şekil 4.9. Independent-Samples Kruskal-Wallis test sonucuna göre, Serum AMH seviyeleri ölçümü (ng/ml).

#### 4.7. Telomeraz Enzimi ELİZA Bulguları

Telomeraz enzimini ölçmek için yaptığımız ELİZA analizleri sonucunda; telomeraz aktivatörü olan sikloastrogenol verilen grupta, kontrol gruplarına kıyasla enzim miktarında

istatistiksel olarak anlamlı artış tespit edilirken ( $p=0,012$  Mann-Whitney Testi ), cisplatin grubunda kontrol gruplarına kıyasla azalma olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı izlendi ( $p=0.1$ , Mann-Whitney Testi). Cisplatin ve sikloastrogenolün birlikte verildiği grupta enzim seviyesinde kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmezken ( $p=0.06$ , Mann-Whitney Testi), cisplatin grubuna karşı istatistiksel olarak anlamlı seviyede artışı görüldü ( $p=0,017$ , Mann-Whitney Testi) (Şekil 4.10).

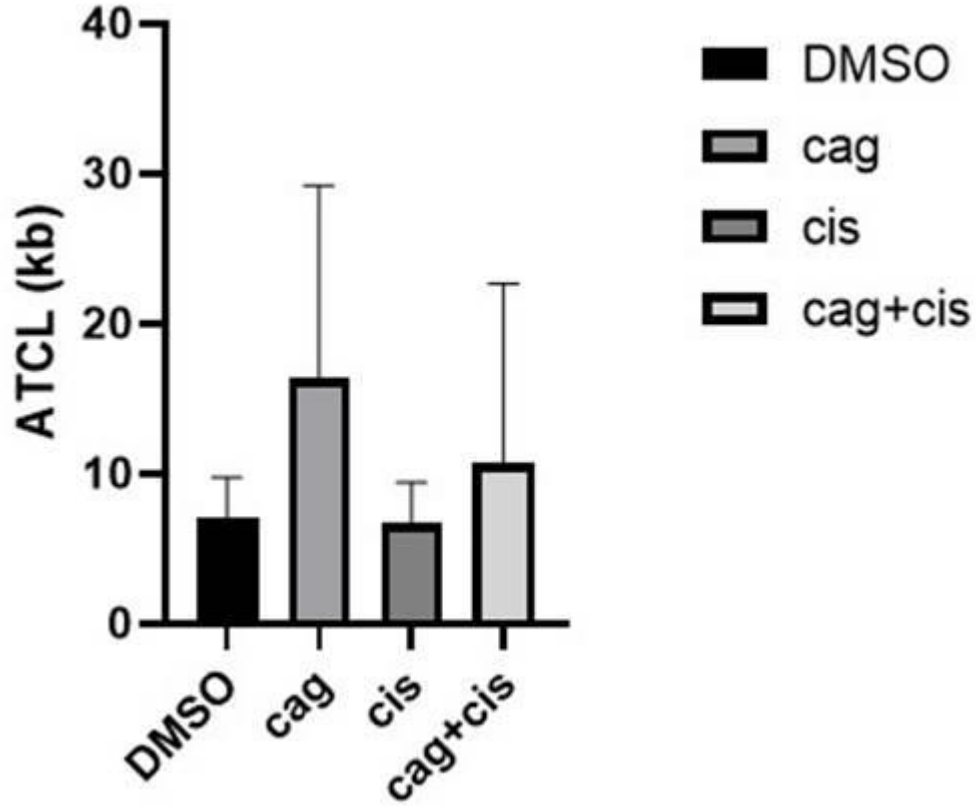


Şekil 4.10. Independent-Samples Kruskal-Wallis test sonucuna göre, telomeraz enzim seviyeleri ölçümü (ng/ml).

#### 4.8. Real Time PCR ile Telomer Uzunluğu Ölçümü

Telomeraz enzim aktivatörünün, telomeraz enzimi aracılığıyla telomer uzunluğuna etkisini araştırmak için yaptığımız Real-Time PCR analizleri sonucunda; telomer uzunluğunun cisplatin ve DMSO gruplarında, sikloastrogenol grubuna kıyasla azaldığı, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edildi ( $p<0,05$ ). Cisplatin ve

sikloastrogenolün birlikte verildiği grupta ise telomer uzunluğunun , DMSO grubu ve cisplatin grubuna kıyasla arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ayırt edildi ( $p>0.05$ ) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Gruplar arası telomer uzunluğu Real – Time PCR grafiği.

## 5. TARTIŞMA

Ciplatin, cisplatinum veya *cis*-diamminedichloroplatinum (II), iyi bilinen çok sayıda çalışmaya konu olmuş bir kanser ilacıdır. İnsanlarda mesane, baş, boyun, akciğer, testis ve ovaryum gibi organların ve özellikle germ hücresi kökenli kanserlerin, lenfoma ve sarkomların tedavisinde kullanılmaktadır [6]. Molekül DNA'daki pürin baz çiftine bağlanarak DNA hasarına neden olmakta ve böylece kanser hücrelerinde apoptozis mekanizmasını aktive etmektedir [6]. Ancak zamanla molekülün oluşturduğu ilaç direnci böbrek hasarı, alerjik reaksiyonlar, immünyetede azalma ve enfeksiyonlarda artış, gastrointestinal problemler, hemoraji ve özellikle gençlerde işitme kaybına neden olduğu bildirilmiştir [6]. Bu etken madde ile birlikte verilen destekleyici uygulamalarda hedef, ilaç direncini aşmak ve ilaç toksisitesini azaltmak üzerine belirlenmektedir. Cisplatinin neden olduğu DNA hasarı, ERK yolağı ve ATM yolağını aktive ederek, ROS türlerini artırıp, GSH'yi azaltarak hücre döngüsünde duraksamalara neden olmaktadır [6]. Hücre ölümü ve aktive ettiği çok sayıdaki yolak, ovaryum gibi foliküler bir havuza sahip olan organda, bu foliküller havuzun hasar görmesine neden olabilmektedir. Özellikle bu molekülün uzun dönem kullanımı, infertiliteye ve foliküler kayba yol açmaktadır. Cisplatinin neden olduğu DNA hasarı, DNA dizisi olan telomer dizilerine de hasar vermektedir [164]. Bu veriler doğrultusunda biz de çalışmamızda cisplatin ile ovaryum hasarı oluşturarak, telomeraz aktivatörü olan sikloastrogenolün foliküler aktivasyon, proliferasyon ve apoptoz yolağına etkisine bakmayı hedefledik. Bu amaçla, foliküler havuzun bir belirteci olan AMH enzim seviyeleri ölçümlerimiz neticesinde cisplatinin AMH seviyelerini azaltarak foliküler havuzu hasarladığını ve telomeraz aktivatörünün ise cisplatinin neden olduğu AMH seviyelerindeki bu azalmayı regüle ettiğini gözlemledik. Bu bulgumuz, caspaz-3 immünohistokimya boyama bulgularımız ile desteklenir nitelikteydi.

Yoon ve ark.'nın 2020 yılında cisplatinin ovaryum dokusunda neden olduğu hasarı azaltmak amacıyla fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, 2 mg/kg cisplatin deneklere 10 gün boyunca intraperitoneal olarak uygulamışlar ve ovaryumda hasarı azaltmak için deneyin 12. gününde kuyruk veninden mezenkimal kök hücre vermişlerdir. Araştırmacılar, 5. günde deneklerde kilo kaybı olduğunu gözlemleyip, folikül sayılarında azalma olduğunu ve cisplatinin ovaryumlarda hasara neden olduğunu göstermişler ve kök hücre uygulamasının bu hasarı azalttığını ifade etmişlerdir [165].

Cisplatin DNA'ya bağlanıp, reaktif oksijen türlerini artırarak etki gösteren bir anti-neoplastik ajandır [166]. Hücrel oksidatif stresi azaltan moleküllerin cisplatinle birlikte uygulandığı hayvan modeli çalışmalarında, ovaryumlarda büyüyen foliküllerin kaybının azaldığı tespit edilmiştir [166]. Araştırmacılar özellikle granüloza hücreleri gibi aktif hücre büyüme özelliği gösteren hücrelerde, cisplatinin sitotoksik etkilere neden olduğunu bildirmektedirler [166].

Huang ve diğerleri, 2020 yılında, BALB/c-nu farelerle yaptıkları deneysel bir çalışmada; cisplatinin, kanserli hücre hattı verilen ve verilmeyen denek gruplarındaki sitotoksik etkilerini melatonin ile azaltılmayı hedeflemişlerdir. Araştırmacılar deney gruplarına PBS, cisplatin (5 mg/kg, haftada bir), 10 mg/kg melatonin (günlük) ve hem cisplatin hem de melatonin intraperitoneal olarak verdikleri gruplar şeklinde 3 hafta süresince uygulamışlar ve melatoninin folikül havuzu ile gebelik oranlarına potansiyel etkilerini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Çalışma sonunda araştırmacılar cisplatinin ovaryumlarda hasara neden olduğunu, melatoninin cisplatinin anti-kanser etkisini güçlendirmekle kalmayıp aynı zamanda ovaryumlardaki sitotoksik etkisini de azalttığını tespit etmişlerdir [167].

Gursoy ve diğerleri, 2022 yılında yaptıkları bir çalışmada, cisplatinin ovaryum hasarı ve bu hasara diosminin etkilerini araştırmayı hedeflemişlerdir. Araştırmacılar prematüre ovaryan yetmezlik yapmak için 1,5 mg/kg cisplatin 10 gün süresince, diosmini ise 100 mg/kg olarak 10 gün süresince intraperitoneal olarak uygulamışlardır. Deney sonucunda cisplatin uygulanan grupta, superoksit dismutaz, AMH ve östradiol seviyelerinde ve folikül sayılarında azalma olduğunu ve cisplatinin ovaryumlarda hasara neden olduğunu bildirmişlerdir [168].

Morgan ve diğerleri, 2013 yılında yaptıkları çalışmada cisplatin ve doksorubisinin ovaryum ve foliküler havuz üzerine olan etkilerini karşılaştırmayı hedefledikleri çalışmalarında; her iki kanser ilacının da foliküllerdeki hasarı arttırdığını, sağlıklı folikül sayılarını azalttığını, hedeflerinde primordiyal foliküller olduğunu ve özellikle cisplatinin sağlıklı olan primordiyal folikül sayısında azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmacılar yalnızca oosit gördükleri, yalnızca foliküler hücreler gördükleri veya her ikisini de dejenere gördükleri folikülleri sağlıklı foliküller olarak tanımlamışlardır. Deney sonunda her iki molekülün de tüm folikül seviyelerinde kayba neden olduğunu bulmuşlardır [169]. Sonuç olarak her iki kemoterapi ilacının da foliküler kayba neden olduğunu ancak aktivasyon

yolaklarının farklı olduğunu tespit etmişlerdir. Cisplatinin, özellikle DNA'ya bağlanarak hücre ölümüne neden olan yolağı aktive ettiğini ve bu özelliği ile cisplatinin germ hücrelerini hedef haline getirdiğini bildirmişler, bununla ilişkili olarak da ovaryumlarda foliküler havuzda azalmaya sebep olduklarını tespit etmişlerdir [170]. Araştırmaya göre bu kayıp özellikle primordiyal ve primer foliküllerde olaylanmaktadır. Bu foliküler kayıp, çalışmada AMH seviyelerindeki azalma ile de gösterilmiştir. Cisplatin hücrelerde sitokrom c'nin sitoplazmaya salınmasına neden olarak hem apoptoza ve hem de endoplazmik retikulum stresine neden olmaktadır [170]. Tüm bunların yanında cisplatin hücrelerde DNA hasarına ve oksidatif strese artışla ilişkili olarak da apoptozise artışa neden olmasının yanısıra tümör hücrelerinde yaşlanmayı da indüklemektedir [171].

Çalışmamızda, mevcut literatür bilgisi ile uyumlu şekilde cisplatinin özellikle preantral folikül sayılarında azalmaya ve atretik folikül sayılarında artışa neden olduğunu gözlemledik. Anti-apoptotik etkilerinin yanısıra hücrede çok sayıda fosforillenme yolağında görev alan sikloastrogenolün, cisplatin verilen grupta telomeraz enzim seviyelerini ve ilişkili olarak telomer uzunluğunu arttırarak, foliküler havuzdaki kaybı ve ovaryum dokusundaki söz konusu hasarı azalttığını tespit ettik. Sikloastrogenolün; bizim de çalışmamızdaki veriler doğrultusunda tespit ettiğimiz, cisplatinin neden olduğu DNA hasarının onarılmasını hedefleyen bu etkilerini, telomeraz enzimi ile ilişkili DNA tamir mekanizmalarını da aktive ederek gerçekleştirdiği düşünülmektedir [172]. Tekrarlı DNA dizleri olan telomerler çok sayıda pürin baz çifti içerdiğinden ve cisplatin özellikle DNA'da pürin baz çiftlerine bağlanarak etki gösterdiğinden, bu durumun telomerleri cisplatinin hedef bölgesi haline getirdiğini düşünmekteyiz. Yaptığımız çalışmaya göre, telomer uzunluğunu arttıran sikloastrogenol ise cisplatinin telomerler üzerinde dejeneratif etkisini azaltmaktadır. Biz de telomer uzunluğu ve telomeraz enzimi üzerine yaptığımız deneylerimiz neticesinde sikloastrogenolün hem telomeraz enzim aktivitesini arttırdığını ve hem de telomerlerde uzamaya neden olduğunu gözlemledik. Ancak telomer uzunluğu ölçümünde, örneklem büyüklüğünün ve ilaç dozunun arttırılmasının istatistiksel olarak anlamlı farka neden olacağını düşünmekteyiz.

Ikram ve diğerleri, 2021 yılında cycloastrogenolün nötrofik faktör disfonksiyon, nöroinflamasyon ve apoptoz üzerine etkisini araştırmayı hedefleri çalışmada, deney hayvanlarına 6 hafta boyunca her gün 20 mg/kg doz sikloastrogenol uygulanmıştır. Araştırmacılar indüklediği deney modelinde sikloastrogenolün oksidatif stresi, LPO ve ROS

seviyelerini azaltarak düzenlediğini, Nrf2 ekspresyon seviyelerini artırdığını ve MAPK aracılı nöroinflamasyonu ve apoptotik hücre ölümünü düzenlediğini göstermişlerdir [173].

Zhu ve çalışma ekibinin 2022 yılında yaptıkları çalışmada CAG'ü kalp, deri ve karaciğer hastalıkları için anti-inflamuar etki gösteren bir molekül olarak olarak tanımlamış ve astım bronşitteki etkilerini araştırmayı hedeflemişlerdir. Bu amaçla deney hayvanlarında indükledikleri AHR modelinde, 31 mg/kg, 62,5 mg/kg ve 125 mg/kg doz CAG uygulayarak akciğer histolojisi değerlendirmesi, IL-5 ve IL-13 ü içeren inflamatuar sitokin ve immünglobulin ölçümü gerçekleştirmişlerdir. Araştırmacılar CAG'ın inflamatuar hücre infiltrasyonunu ve goblet hücrelerinin sekresyonunu baskıladığını, göstermişlerdir ve CAG'ın otofajiyle ilişkili mikrotübül- 4 proteininin hafifi zincir 3 kompleksine bağlandığını göstermişlerdir. Ve CAG uygulamasıyla birlikte otofajiyle ilişkili protein ekspresyon seviyelerinde azalma olduğunu ve orta ve yüksek doz CAG'ın astımdaki anti-inflamuar etkilerinin akciğer hücrelerinde meydana gelen otofaji yolağını düzenlemesiyle ilişkili olduğunu bulmuşlardır [174].

Wang ve ark 2018 yılında yaptıkları çalışmada, deneysel kardiyak hasar oluşturdukları ratlarda, CAG'ın AKT1-RPS6KB1 sinyalleme sinin inhibisyonu yoluyla miyokardiyal otofajiyi sağlayarak kalp hasarını iyileştirdiğini tespit etmişlerdir ve CAG'ın matrix metalloproteinaz 2 ve MMP-9 ekspresyonlarını inhibe ettiğini bulmuşlardır.. Araştırmacılar deney modellerine 10 mg/kg, 30 mg/kg ve 90 mg/kg dozunda CAG uygulamışlar ve hem in vivo hem de in vitro yaptıkları deneylerinde CAG'ın miyokardiyal otofajiyi desteklediğini ve kardiyositlerdeki hipertrofiyi azalttığını, ve 90 mg/kg CAG dozunun daha etkili olduğunu göstermişlerdir [175].

Luangmonkong ve çalışma ekibinin 2023 yılında yaptıkları çalışmada, deney hayvanlarında karbon-tetrakloridle oluşturdukları karaciğer hasarı modelinde, CAG'ın karaciğeri koruyucu bir etki gösterdiğini bulmuşlardır. Araştırmacılar 200 mg/kg CAG dozunun anti fibrotik bir etki göstererek kollajen birikimde azalma sağladığını, Tip 1 kollajen mRNA ekspresyonunu azalttığını ve toplam kollajen miktarında bir azalma sağladığını bulmuşlardır [176].

Idrees ve ark 2023 yılında yaptıkları çalışmada, CAG'ın telomeraz aktivitesini artırdığı ve yaşlanmayla ilişkili  $\beta$ -klotho gen ekspresyon seviyeleri ve ovaryumlarda yaşlanmayla ilişkili hasarı azalttığını göstermişlerdir. Araştırmacılar hem in vivo hem de in vitro modellerle

çalışmış ve CAG'ın telomeraz enzim aktivatörü olduğunu moleküler kenetlenme modellemesiyle göstermişlerdir. Ovaryumlarda hasar meydana getirmek için Doxorubisin kullanmışlar ve 20 mg/kg dozda DOX'u 7 gün boyunca her gün uygulamışlardır. Yaşlanma modeli oluşturmak içinde 200 mg/kg D-Galaktozu 42 gün süresince intraperitoneal olarak uygulamışlar ve bu gruba aynı zamanda 28 gün boyunca 20 mg/kg CAG uygulamışlardır. Araştırmacılar, CAG verdikleri deney grubunda, hem telomeraz enziminin katalitik bölgesinin gen ekspresyon seviyelerinde hem de telomeraz enzim seviyelerinde artış olduğunu göstermişlerdir. Bu artışın telomer uzunluğuna da yansıdığını ifade etmişlerdir. Sonuç olarak ise, CAG'ın hem telomerlerle olan ilişkisi hem de B-Kloth gen ekspresyonunu artırmasıyla olan ilişkisi neticesinde, ovaryumlarda meydana gelen yaşlanmadan ovaryumları koruduğu sonucuna varmışlardır [27].

Yu ve diğerleri, 2020 yılında D-galaktoz ile oluşturdukları kemik yaşlanma modelinde CAG'ın yaşla ilişkili kemik kaybından koruduğunu, kemik formunun yeniden oluşmasını sağladığını, osteoklast sayılarında azalmaya neden olduğunu, kemik mikro yapısındaki kayıplardan koruduğunu bulmuşlardır. D-galaktoz verdikleri ratlarda, 3 mg/kg, 7 mg/kg ve 14 mg/kg CAG uygulamasını yine 20 hafta süresince uygulamışlardır araştırmacılar aynı zamanda doğal yaşlanma modeli oluşturdukları 51 haftalık dişi sıçanlarda da aynı dozlarda 33 hafta boyunca CAG uygulaması yapmışlardır. Ve sonuç olarak D-Gal ile model oluşturulan ratlarda serumda kemik resorpsiyon markırı (TRACP) seviyesinin arttığını CAG'ın ise her üç doz içinde bu markır seviyesini azalttığını ve oksidatif strese neden olduğunu bulmuşlardır. CAG'ın kemiğin kompakt yapısında ki bozulmalardan koruduğunu ve maksimum dayanıklılık ve yüklenme seviyelerini artırdığını bulmuşlardır [159].

Bizde çalışmamızda, oldukça maliyetli bir etken madde olan CAG'ın deney gruplarımıza uygulanma dozu olarak (7 mg/kg) Yu ve çalışma ekibinin yaptıkları çalışmayı temel aldık. Ancak literatürde 200 mg /kg doz gibi oldukça yüksek doz uygulamalarının da söz konusu olması bize düşük doz CAG uygulaması yaptığımızı düşündürmektedir. Ve Real-Time PCR deneylerinde ölçtüğümüz telomer uzunluğunun gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı çıkmaması da bu düşüncemizi doğrular niteliktedir. Bu ölçümlerimizde ayrıca denek sayısının az olmasının da etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Telomeraz enzim seviyelerinin gruplar arasında ki anlamlı olarak farklı çıkması Idrees ve çalışma ekibinin sonuçlarıyla uyumludur.

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), DNA replikasyonu ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Du ve ark. cisplatin ile indükledikleri ovaryum hasarında yaptıkları çalışmada, cisplatinin ovaryum hücrelerinde yaşlanmayı indükleyerek; primordiyal, preantral ve antral folikül sayılarında ve PCNA pozitif hücre sayısında azalmaya neden olduğunu, buna karşın atretik folikülerde ve apoptotik hücre sayısında artışa yol açtığını göstermişlerdir [171]. Ayrıca çalışma ekibi cisplatin uygulanan grubun elektron mikroskopik incelemelerinde, cisplatinin granüloza hücrelerinin subselüler yapısında hasara, perinükleer alanda genişlemeye, kromatin dağılımında heterojeniteye ve plasmarhexis adı verilen polipeptidde ölüme ve mitokondrilerin kristallerinde ayrılmalara neden olduğunu bulmuşlardır [171].

Barberino ve diğerleri, 2017 yılında yaptıkları çalışmada cisplatinin ovaryumların hasarına neden olduğunu ve cisplatin verilen grupta PCNA pozitif hücre sayısında azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca foliküler morfoloji üzerine yaptıkları değerlendirmede intakt bir oositi bulunan ve piknotik nükleusu olmayıp düzenli şekilde organize olmuş bütün folikülleri sağlıklı foliküller olarak sınıflandırırken; vakuloe nükleusu bulunan, disorganize şekilde sıralanmış, bazal membrandan ayrılmış folikülleri ise atretik foliküller olarak tanımlamışlardır. Araştırmacılar ayrıca cisplatin ve kaspaz-3 (pro-apoptotik) protein etkisini açıklayabilmek içinde yaptıkları deneylerde cisplatinin kaspaz-3 tutulumunda artışa neden olduğunu bulmuşlardır [177].

Du ve çalışma ekibinin yaptıkları çalışmada, cisplatin ile ovaryum hasarı oluşturulan ratlarda senoterapinin etkilerini araştırmayı hedeflemişlerdir. Araştırmacılar cisplatinin senesens mekanizmalarını aktive ederek ovaryum hücrelerini yaşlandırdığını ve antisenolitik ilaçların bu süreçte bir aksamaya neden olacağı hipotezini test etmişlerdir. Bu amaçla PCNA da dahil olmak üzere çok sayıda proliferasyon genini araştırmışlardır. Araştırmacılar cisplatin verdikleri deney gruplarında PCNA pozitif hücre sayısında azalma olduğunu görürken, antisenolitik ilaç verdikleri gruplarında ise artış olduğunu bulmuşlardır. Bu doğrultuda, antisenolitik ilaçların cisplatinin neden olduğu hasardan dokuyu koruduğunu ifade etmişlerdir [171].

Gouveia ve çalışma grubu cisplatin verdikleri deneylerinde; PCA'nın farklı dozlarının neden olduğu etkiyi araştırmak için yaptıkları çalışmada, PCNA'nın etkilerini de araştırmışlardır. Araştırmacılar cisplatinin PCNA pozitif hücre sayısında azalmaya neden olurken, PCA'nın

bu azalmayı tolere ederek kontrol grubuna yakın seviyelerde artış sağladığını bulmuşlardır [25].

Çalışmamızda telomeraz aktivitesi ve foliküler proliferasyon ilişkisini test etmek için FOXO3a'nın hücresel lokasyonunu (nuklear veya sitoplazmik) belirlemek adına, immünohistokimya metodu ile analizler gerçekleştirdik. Normal koşullarda inaktive durumda olan FOXO3a, büyüme faktörleri yokluğunda nukleusta lokalize olmakta ve transkripsiyonel olarak aktive duruma geçmektedir. Ciplatin ise FOXO3a'nın fosforilasyonunu Akt inhibisyonu yolu ile azaltmaktadır [178].

PTEN fosforilasyonu hücre proliferasyonunu etkileyerek hücre döngüsünü inhibe etmekte ve apoptozisi indüklemektedir. Down regülasyonu ise PI3K yolağının aktive olmasıyla FOXO3a'nın fosforilasyonuna, fosforile olan FOXO3a'nın ise sitoplazmaya transferine neden olmaktadır. Lins ve diğerleri, 2020 yılında yaptıkları çalışmada cisplatinin ovaryumlarda neden olduğu hasara quercetin-3-O-rutinoside isimli antioksidanın (rutin) PTEN ve FOXO3a yolağındaki etkilerini araştırmayı hedeflemişlerdir. Çalışma grubu bu amaçla, kontrol grupları (intraperitoneal ve oral yolla saline uygulanan gruplar), 5 mg/kg cisplatin uygulanan grup (15 mg/kg), farklı dozlarda rutin uygulanan grup ve hem rutin hem de cisplatin uygulanan grup olmak üzere 6 deney grubu tasarlamışlardır. Cisplatin uygulanan grupta normal folikül sayısında azalma olduğu görülmesinin yanısıra atretik folikül sayısında artış olduğu belirlenmiştir. Rutin uygulanan gruplarda apoptoziste azalma, foliküler sağlıkta ise artma görülmüştür. Cisplatin verilen grupta FOXO3a'nın fosforilasyonunda azalma olduğu ve bununla ilişkili olarak foliküler aktivasyonda azalma olduğu tespit edilmiştir [179].

Gouveia ve diğerleri, 2021 yılında yaptığı bir çalışmada, cisplatin ile indüklenen ovaryum hasarına protokatekuik asit'in (PCA) FOXO3a ve PTEN yolağı üzerinden etkilerini incelemeyi hedeflemişlerdir. Araştırmacılar deney gruplarını kontrol grubu, cisplatin grubu ve hem cisplatin hem de PCA grubu şeklinde planlamışlardır. Bu amaçla histokimyasal, immunohistokimyasal (kaspaz 3, PCNA, p-PTEN, p-FOXO3a) ve reaktif oksijen türleri ölçümüne dair analizler (glutathione ve aktif mitokondrium düzeyi) uygulamışlardır. İlk olarak cisplatinin, Morgan ve diğerleri'nin çalışma sonuçları ile uyumlu olacak şekilde sağlıklı folikül sayılarında azalmaya neden olduğunu tespit etmişlerdir [180]. Cisplatin grubunda var olan foliküllerin çoğunlukla atreziye uygun morfolojide olduğunu ve PCNA

pozitif hücrelerin sayılarının özellikle cisplatin uygulanan grupta en düşük olduğunu bildirmişlerdir. PCA ile tedavinin P-PTEN ekspresyon seviyelerini azaltırken, FOXO3a'nın nükleustaki ekspresyonunun arttırdığını tespit etmişler ve sonuç olarak PCA'nın ROS üretimini azalttığını, GSH seviyelerini ise arttırdığını ve bunu da PTEN ve FOXO3a yoluyla üzerinden yaptığını bildirmişlerdir [25].

Jang ve diğerleri, yaptıkları deneysel çalışmada, cisplatinin ovaryumlarda neden olduğu hasarı ve primordiyal havuzdaki kayıp üzerine melatoninin etkilerini, PTEN/AKT/FOXO3a yoluyla üzerinden araştırmayı hedeflemişlerdir. PI3K sinyal yolunda moleküler denge primordiyal folikül havuzundaki hayatta kalma, aktifleşme, büyüme ve havuzun devamlılığı için çok önemlidir. Bu yolaktaki baskılanma veya yolğun aktivasyonu POF ve infertilite açısından primordiyal foliküllerin kaderini belirlediği için önemlidir. Bu yolğun baskılanması PDK1'de azalmaya ve ovaryumlarda yaşlanmayı indükleyerek primordiyal foliküllerin çoğunun kaybolmasına neden olmaktadır. AKT yolunda FOXO3a foliküler havuzun korunmasında kilit moleküllerden biridir. PTEN null farelerde yapılan deneylerde hiperfosforile olmuş FOXO3a'nın nükleustan sitoplazmaya diffüze olduğu görülmüştür. Araştırmacılar yalnızca cisplatin verdikleri deney gruplarında FOXO3a'nın fosforilasyonunda yaklaşık 1.2-2.5 kat artış olduğunu ve cisplatinin primordiyal foliküllerde bu yolak üzerinden aktivasyona neden olduğunu, ancak melatoninin bu yolaktaki aşırı fosforilasyonu durdurarak protektif bir etki gösterdiğini ifade etmişlerdir [181].

Li ve diğerleri, 2012 yılında FOXO3a ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, FOXO3a'nın NF- $\kappa$ B'yı aktive ederek bir tümör baskılayıcı olarak davrandığını bulmuşlardır. Araştırmacılar FOXO3a'nın knockdown ekspresyonlarının hücre apoptozisini indüklediğini ve molekülü özellikle kanser tedavilerinde bir hedef haline getirdiğini ifade etmişlerdir [178].

FOXO3a, aktif haldeyken nükleusta lokalize olmaktadır ve hedefi transkripsiyonel genler olan bir proteindir. Molekülün regülasyonu, asetilasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlarla gerçekleşmektedir [131]. İlginç şekilde inaktif haldeki FOXO3a, fosforlanmış şekildedir ve sitoplazmada lokalize olmaktadır [127]. Sitoplazmada pol-ubiquitinasyona uğrayan FOXO3a proteozomlar tarafından yıkılmaktadır [131]. Folikülogenezis boyunca oosit ve foliküler hücreler arasında iki taraflı sinyal iletimi meydana gelmektedir ve bu iki yönlü sinyalizasyon mekanizmaları foliküler gelişimin temelini oluşturmaktadır. FOXO3a sağlıklı ovaryumlarda primordiyal ve primer foliküllerde

nükleusta tutunmaktadır [182]. FOXO3a, büyüme faktörlerinin stimülasyonu ile fosforlanarak nükleustan sitoplazmaya diffüze olmasıyla, DNA'ya bağlanma özelliğini kaybetmektedir ve FOXO3a'nın farelerdeki sürekli ekspresyonu oosit büyümesinde gecikmeye neden olmasının yanı sıra, rüptüre olmamış folikülerde lüteinizasyona neden olmaktadır [182]. Yapılan çalışmalar FOXO3a nakavt farelerin aşırı derecede primordiyal folikül aktivasyonuna sahip olduğunu, ilişkili olarak foliküllerin hemen tükendiğini ve sekonder infertilitenin meydana geldiğini göstermişlerdir [183].

Al-Shahat ve çalışma ekibin yaptığı çalışmada tek doz 7 mg /kg doz cisplatin uygulamış ve cisplatinin olası dejeneratif etkilerine karşı melatoninin etki mekanizmalarını, PI3K/AKT sinyal yolağı, hormon seviyeleri ve apoptozis yolağı üzerinden değerlendirmeyi hedeflemişlerdir. Araştırmacılar tek doz uygulanan cisplatinin FOXO3a ekspresyon seviyesini artırdığını bulmuşlardır ve bunu cisplatinin kısa dönem ve bir sefer uygulanması ile açıklamışlardır [19].

FOXO3a ve foliküler gelişim ile ilişkili mekanizması halen tam olarak anlaşılmamıştır ve bu mekanizma FOXO3a'nın ovaryum içi yolağının, foliküler gelişimle mi ilişkili yoksa ekzojen sinyal molekülleri ile mi ilişkili sorularına cevap verildiğinde aydınlanacağı öngörülmektedir. FOXO3a'nın cisplatin ve sikloastrogenol uygulamaları koşullarında foliküler gelişim ve telomerler ile ilişkisini açıklamak adına yaptığımız immünohistokimya deneyleri neticesinde, DNA'da hasara neden olan cisplatin verilen grupta FOXO3a'nın sitoplazmaya diffüze olduğunu ve cisplatinin FOXO3a ekspresyon seviyelerini oldukça azalttığını tespit ettik. Bu durumu, cisplatinin DNA'da hasara neden olarak apoptozis ile ilişkili mekanizmayı aktifleştirerek protein sentez mekanizmasını dejenere hale getirmesi ile ilişkilendirdik. Sikloastrogenol verilen grupta ise primordiyal foliküllerde yalnızca nükleusta tutulum olan dormant foliküllerin varlığını gözlemlerken, primer foliküllerde ise hem oosit nükleusunda hem de granüloza hücrelerinde sitoplazmada ve nükleusta tutulum olduğunu gözlemledik. Hem cisplatin hem de sikloastrogenol verdiğimiz grupta ise preantral foliküllerde nükleuslarda hafif sitoplazmada ise orta dereceli tutulum olduğunu gördük, bunu sikloastrogenolün anti-apoptotik aktivitesi ile ilişkilendirdik.

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, oosit ovaryum foliküllerinin gelişiminde ki orkestra şefidir ve foliküler gelişim hızı, oosite ve oositten salgılanan intrinsik faktörlere bağlıdır. Bu hücre içi yollarda otofaji-ilişkili proteinler (Atgs) ve mTOR gibi çok sayıda protein

yer almaktadır [184]. TOR'un inaktive olduğu hücrelerde protein sentezinin azaldığı, TOR'un aktive olduğu hücrelerde ise protein sentezinde artış olduğu görülmektedir. TOR proteini, protein sentezi ve degradasyonu arasında bir denge sağlamaktadır [16]. TOR proteini, hücreSEL büyümeYi kontrol eden proteinlerinden biridir ve ribozom biyogenezinde de görev almaktadır [185].

Xie ve diğErleri, yaptıkları çalışmada, in vivo ve in vitro cisplatin uyguladıkları gruplarda, rapamisin'in etkilerini araştırmayı hedeflemişler ve cisplatin verdikleri deney grubuyla kontrol grubu arasında mTOR ekspresyon sevieleri arasında anlamlı bir fark olmadığını görmüşlerdir [17].

Idrees ve diğErleri, yaptıkları çalışmada, telomeraz aktivatörü olan sikloastrogenolün ovaryumlarda yaşla birlikte meydana gelen hasarı PI3K/AKT/mTOR yolağı üzerinden araştırmayı hedeflemişler ve sikloastrogenolün tek başına uygulandığı deney grubunda p-AKT ve p-mTOR ekspresyon seviyelerini artırdığını görmüşlerdir. Bu yolağın fosforlanması aynı zamanda östradiol sentez yolağını da direkt etkilediğı için önemli bulunmuştur [27, 186].

Al-Shahat ve diğErleri, yaptıkları çalışmada, cisplatin ile indüklenen ovaryum hasarına (7mg/kg tez doz) melatonin etkileri araştırmışlardır ve yalnızca cisplatin verdikleri grupta cisplatinin mTOR ekspresyon seviyelerini azalttığını, melatonin verilen grupta ise arttığını görmüşlerdir [19].

Bu çalışma grubunu destekler şekilde Eldani ve diğErleri, da yaptıkları çalışmada 2 mg/kg dozda 15 gün süresince sürekli uygulanan cisplatinin primordiyal folikül havuzunda foliküler aktivasyon olmadan kalıcı bir kayba neden olduğunu göstermişlerdir ve araştırmacılar uzun dönem cisplatin uyguladıkları deney gruplarında, AKT/mTOR, ve PTEN ekspresyon seviyelerinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir [187].

Chen ve çalışma grubunun yaptıkları deneysel çalışmada, cisplatinin, kanserli ve hepatit B virüsü enfekte olan hastalarda virüsü yeniden aktive hale getirdiğini ve bu aktivasyonu da otofajik yolağı aktive ederek yaptığını görmüşlerdir. Araştırmacılar bu yolda mikrotübül-ilişkili protein 1 hafif zincir 3 (LC3)-II proteine, p62 degradasyonuna ve RFP-GFP-LC3

protein ekspresyon seviyelerine bakmışlardır. Sonuç olarak, cisplatinin ROS/JNK ve AKT/mTOR yolağı aracılığıyla replikasyonu ve otofajiyi indüklediğini görmüşlerdir [188].

Peng ve çalışma grubunun yaptıkları çalışmada, araştırmacılar cisplatin uygulamasıyla artan mTOR ekspresyon seviyelerine ve ilaç direncine odaklanmışlardır ve insan ovaryum kanser hücrelerinde uzun dönem cisplatin uygulamasının Akt/mTOR yolağını aktive ederek bu yolağın PI3K inhibitörü LY294002 tarafından inhibe edildiğini göstermişlerdir [189].

AKT/mTOR yolağı; hücre proliferasyonu, transkripsiyonun başlatılması, protein degradasyonu, membran trafiği ve aktin organizasyonu, farklılaşma, apoptozis, otofaji ve ribozom biyogenezinde görev almaktadır [16]. AKT'nin hiperfosforile olması mTOR'un ekspresyonunu azaltan yolağı aktive ederek PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağında disregülasyona neden olmakta ve mTOR ile indüklenen hücre ölümünü ve apoptozis yolağını aktive ederek, POF'u indüklemektedir. mTOR'un RNA biyogenezini arttırması ise tümörögenезis mekanizmasının aktifleşmesine de neden olmaktadır [16]. Biz de deneylerimiz neticesinde uzun dönem cisplatin verdiğimiz grupta mTOR ekspresyon seviyelerinde artış olduğunu tespit ederken, telomeraz aktivatörü olan sikloastrogenolun verildiği grupta nükleus sitoplazmasında veziküllerde de artış ve pozitif reaksiyon olduğunu belirledik ve bu durumu sikloastrogenolün ribozom biyogenezini ve protein sentezini arttırmasıyla ilişkilendirdik. Bu bulgumuza benzer şekilde Walden ve diğerleri, 2014 yılında yaptıkları çalışmalarında, mTOR'un ribozom biyogenezinde görev alarak Pol.I ve rRNA III'ü uyararak ribozomal proteinlerin nükleustan taşınmasını sağladığını ifade etmişlerdir [190].

Henkels ve diğerleri, 1999 yılında yaptıkları çalışmada cisplatinin apoptozisi indükleyerek kanserli hücre hatlarında proteolitik degradasyona neden olduğunu göstermişlerdir. Ve araştırmacılar bu aktivasyonu sitoplazmaya salınan sitokrom-c protein seviyeleri ile de göstermişlerdir [191].

Al-Shahat ve çalışma ekibinin yaptıkları çalışmada, cisplatin ile ovaryum hasarı oluşturulan ratlarda melatoninin olası etkilerini araştırmayı hedeflemişlerdir ve cisplatin uyguladıkları gruplarda apoptozis yolağı indikatörü olan kaspaz-3'ün pozitif olduğu hücre sayısının, kontrol ve melatonin uygulanan gruplarına göre oldukça arttığını ayırt ederken, melatoninin cisplatinin bu dejeneratif etkilerini azalttığını göstermiştir [19].

Kaushal ve diğerkleri, yaptıkları çalışmada cisplatinin neden olduğu renal túbüler epitel hücrelerinin hasarında kaspaz aktivasyonun etkisini araştırmayı hedeflemişlerdir, kaspazın hücre ölüm yolağında bir şelatör olduğunu, cisplatin uygulanan grupta kaspazın hücre ölüm mekanizmasını indükleyerek DNA tamir enzimlerinde harabiyete neden olduğunu göstermişlerdir [192].

Cisplatin DNA'da ki pürin baz çiftinin N7-bölgelerine bağlaması sitotoksik etkisinin nedenidir ve bu etkisi çok sayıda hücreyel yolakta aşırı aktivasyon etkisi yaratmaktadır [193]. Apoptozis yolağı da buradaki söz konusu olan önemli yollardan biridir. Kaspaz-3 apoptozis yolağının şelatörlerindedir ve bu etkisi DNA tamir mekanizması enzimlerinin şelatlanması da içermektedir. Biz de çalışmamızda hipotezimizi test etmek için yaptığımız kaspaz-3 immünohistokimya sonuçları neticesinde, cisplatin verdiğimiz grupta kaspaz-3 pozitif olan oosit ve granüloza hücre sayısında diğerk gruplara kıyasla artış olduğunu gördük. Hem cisplatin ve hem de sikloastrogenol verdiğimiz grupta ise preantral foliküllerde hem oositte ve hem de granüloza hücrelerinde kaspaz-3 pozitif hücre sayısında azalma olduğunu izlerken, antral foliküllerde oosit sitoplazmasında orta derecede kaspaz-3 tutulumunun olduğunu tespit ettik. Buradan yola çıkarak sikloastrogenolün cisplatinin neden olduğu apoptozisi; özellikle preantral folikül evresinde azaltırken, antral folikül evresinde ise granüloza hücrelerindeki pozitif hücre sayısında azalmayı tetiklediğini izledik. Bu durumu, Regan ve diğerkleri, yaptıkları çalışmaya benzer şekilde, sikloastrogenolün artık gonadotropin stimülasyonundan bağımsız olan preantral foliküllerdeki anti-apoptotik etkisiyle ovaryum rezervinin korunmasına yardım etmesi şeklinde yorumladık [194]. Benzer şekilde, bu deney sonucumuz, Idrees ve ark.'nın yaptıkları çalışmada [27], sikloastrogenol ve doxorubisin verilen deney gruplarında, sikloastrogenolün DNA ve telomer içeren mitokondriyal hasarı da mitokondriyal telomerler üzerine etki ederek azalttığının görüldüğü çalışma ile de uyumlu olarak tespit edildi [27].

Biz de çalışmamızda DNA çift zincir sarmalında harabiyete neden olan cisplatinin PCNA pozitif hücrelerin sayısında azalmaya neden olduğunu ancak telomeraz aktivatörü olan sikloastrogenolün cisplatinin toksik etkilerini hafifleterek PCNA pozitif hücre sayısında artışa neden olduğunu gözlemledik. Bu bulgularımızı, foliküler aktivasyonu apoptozis yolağı üzerinden indükleyen cisplatinin toksik etkilerinin, telomeraz aktivatörü olmasının yanısıra çok sayıda fosforilasyon ve protein sentez yolağında görev alan sikloastrogenol tarafından regüle edildiği şeklinde yorumladık.

## 6. SONUÇ

Cisplatin uygulamasının deneklerin ovaryumlarında çeşitli gelişim aşamalarındaki foliküllerde dejenerasyona neden olduğu, özellikle primordiyal ve primer foliküllerde atreziye yol açtığı tespit edildi. Tek başına sikloastrogenol uygulamasının, primer foliküllerde artışa neden olduğu tespit edilirken, cisplatin ile birlikte uygulandığında ise cisplatinin neden olduğu foliküler atreziyi, özellikle primer folikül düzeyinde, azalttığı ve foliküllerde gerek oosit ve gerekse granüloza hücrelerindeki dejenerasyonları kompanse edebildiği ayırt edildi. FOXO3a ve PCNA immünohistokimya boyamaları sonucunda cisplatinin ekspresyonlarını azalttığı ve bu bağlamda folikülogeneziste bozulmaya yol açtığı, cisplatin ile uygulanan sikloastrogenolün ise ilgili antikörlerin ekspresyonlarını arttırdığı ancak bu artışın istatistiksel seviyede anlamlı olmadığı izlendi. Kaspaz-3 immünohistokimya boyamaları sonucunda elde edilen veriler ise, PCNA ve FOXO3a boyamaları ile zıt ancak ekspresyon anlamlılığı açısından paralel seyretmekteydi. Yapılan mTOR immünohistokimya analizleri sonucunda, cisplatin uygulamasının bu yolak üzerinden etkin olduğu ve cisplatinin oosit nukleusunda veziküler yıkım ve disorganizasyona yol açarak protein sentezini bozduğu, bu bozulma üzerinden de folikülleri atreziye ve dejenerasyona götürdüğü belirlendi. Cisplatin ile birlikte uygulanan CAG'ın ise veziküler sağ kalımı yeniden inşa ederek atretik folikül sürecini düzenlemiş olabileceği kanısına varıldı. Bu veriler ile uyumlu şekilde, ELİZA analizleri sonucu ortaya konulan serum AMH değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde cisplatin ile birlikte azaldığı ancak istatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte CAG uygulaması sonucu arttığı görüldü. Gerek ELİZA analizleri ile izlenen telomeraz enzim miktarının ve gerekse RT-PCR deneyleri ile ortaya çıkan telomer enzim uzunluklarının da birbirleri ile örtüşecek şekilde; cisplatin uygulaması ile birlikte azaldığı ve cisplatin ile CAG'ın birlikte uygulanması sonucunda ise cisplatin grubuna göre arttığı izlendi.

Sonuç olarak; ilk defa araştırılan düşük doz cisplatin ve kısa süreli CAG uygulamasının dahi ovaryum dokusunda etkili olduğu; cisplatinin düşük dozda dahi ovaryum morfolojisi ile folikül sayısında ve yapısında dejeneratif etki gösterdiği, kısa dönem uygulanan CAG'ın ise profiltik özellik sergilediği saptandı. Ancak uygulanan CAG'ın daha yüksek dozlarda ve daha uzun sürelerde koruyucu etkisinin daha yüksek olabileceği kanısına varıldı.



## KAYNAKLAR

1. Li, Z., Qi, H., Li, Z., Bao, Y., Yang, K. and Min, Q. (2023). Research progress on the premature ovarian failure caused by cisplatin therapy. *Frontiers in Oncology*, 13, 1276310.
2. Spears, N., Lopes, F., Stefansdottir, A., Rossi, V., De Felici, M., Anderson, R. A. and Klinger, F. G. (2019). Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Human Reproduction Update*, 25(6), 673-693.
3. Lambertini, M., Moore, H. C. F., Leonard, R. C. F., Loibl, S., Munster, P., Bruzzone, M., Boni, L., Unger, J. M., Anderson, R. A., Mehta, K., Minton, S., Poggio, F., Albain, K. S., Adamson, D. J. A., Gerber, B., Cripps, A., Bertelli, G., Seiler, S., Ceppi, M., Partridge, A. H. and Del Mastro, L. (2018). Gonadotropin-releasing hormone agonists during chemotherapy for preservation of ovarian function and fertility in premenopausal patients with early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of individual patient-level data. *Journal of Clinical Oncology*, 36(19), 1981-1990.
4. Yimit, A., Adebali, O., Sancar, A. and Jiang, Y. (2019). Differential damage and repair of DNA-adducts induced by anti-cancer drug cisplatin across mouse organs. *Nature Communications*, 10(1), 309.
5. Song, M., Cui, M. and Liu, K. (2022). Therapeutic strategies to overcome cisplatin resistance in ovarian cancer. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 232, 114205.
6. Dasari, S. and Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacol*, 740, 364-78.
7. Kerr, J. B., Hutt, K. J., Cook, M., Speed, T. P., Strasser, A., Findlay, J. K. and Scott, C. L. (2012). Cisplatin-induced primordial follicle oocyte killing and loss of fertility are not prevented by imatinib. *Nature Medicine*, 18(8), 1170-2.
8. Chang, E. M., Lim, E., Yoon, S., Jeong, K., Bae, S., Lee, D. R., Yoon, T. K., Choi, Y. and Lee, W. S. (2015). Cisplatin induces overactivation of the dormant primordial follicle through PTEN/AKT/FOXO3a pathway which leads to loss of ovarian reserve in mice. *PLoS One*, 10(12), e0144245.
9. Kaygusuzoglu, E., Caglayan, C., Kandemir, F. M., Yıldırım, S., Kucukler, S., Kilinc, M. A. and Saglam, Y. S. (2018). Zingerone ameliorates cisplatin-induced ovarian and uterine toxicity via suppression of sex hormone imbalances, oxidative stress, inflammation and apoptosis in female wistar rats. *Biomed Pharmacother*, 102, 517-530.
10. Bai, X. and Wang, S. (2022). Signaling pathway intervention in premature ovarian failure. *Frontiers in Medicine*, 9, 999440.
11. Pelosi, E., Omari, S., Michel, M., Ding, J., Amano, T., Forabosco, A., Schlessinger, D. and Ottolenghi, C. (2013). Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice. *Nature Communications*, 4, 1843.

12. Guo, Z. and Yu, Q. (2019). Role of mTOR signaling in female reproduction. *Frontiers in Medicine*, 10, 692.
13. Wang, Z. P., Mu, X. Y., Guo, M., Wang, Y. J., Teng, Z., Mao, G. P., Niu, W. B., Feng, L. Z., Zhao, L. H. and Xia, G. L. (2014). Transforming growth factor- $\beta$  signaling participates in the maintenance of the primordial follicle pool in the mouse ovary. *Journal of Biological Chemistry*, 289(12), 8299-311.
14. Lu, X., Guo, S., Cheng, Y., Kim, J. H., Feng, Y. and Feng, Y. (2017). Stimulation of ovarian follicle growth after AMPK inhibition. *Reproduction*, 153(5), 683-694.
15. Ersahin, T., Tuncbag, N. and Cetin-Atalay, R. (2015). The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Molecular BioSystems*, 11(7), 1946-1954.
16. Mayer, C. and Grummt, I. (2006). Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene*, 25(48), 6384-6391.
17. Xie, Y., Li, S., Zhou, L., Lin, H., Jiao, X., Qiu, Q., Liang, Y. and Zhang, Q. (2020). Rapamycin preserves the primordial follicle pool during cisplatin treatment in vitro and in vivo. *Molecular Reproduction & Development*, 87(4), 442-453.
18. Liu, J., Yang, Y., He, Y., Feng, C., Ou, H., Yang, J., Chen, Y., You, F., Shao, B., Bao, J., Guan, X., Chen, F. and Zhao, P. (2023). Erxian decoction alleviates cisplatin-induced premature ovarian failure in rats by reducing oxidation levels in ovarian granulosa cells. *Journal of Ethnopharmacol*, 304, 116046.
19. Al-Shahat, A., Hulail, M. A. E., Soliman, N. M. M., Khamis, T., Fericean, L. M., Arisha, A. H. and Moawad, R. S. (2022). Melatonin mitigates cisplatin-induced ovarian dysfunction via altering steroidogenesis, inflammation, apoptosis, oxidative stress, and PTEN/PI3K/Akt/mTOR/AMPK signaling pathway in female Rats. *Pharmaceutics*, 14(12), 2769.
20. Said, R. S., Mantawy, E. M. and El-Demerdash, E. (2019). Mechanistic perspective of protective effects of resveratrol against cisplatin-induced ovarian injury in rats: emphasis on anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 392(10), 1225-1238.
21. Afifi, N. M. and Reyad, O. N. (2013). Role of mesenchymal stem cell therapy in restoring ovarian function in a rat model of chemotherapy-induced ovarian failure: a histological and immunohistochemical study. *The Egyptian Journal of Histology*, 36, 114-126.
22. Sogaard, C. K., Blindheim, A., Røst, L. M., Petrović, V., Nepal, A., Bachke, S., Liabakk, N. B., Gederaas, O. A., Viset, T., Arum, C. J., Bruheim, P. and Otterlei, M. (2018). "Two hits - one stone"; increased efficacy of cisplatin-based therapies by targeting PCNA's role in both DNA repair and cellular signaling. *Oncotarget*, 9(65), 32448-32465.
23. Olaisen, C., Müller, R., Nedal, A. and Otterlei, M. (2015). PCNA-interacting peptides reduce Akt phosphorylation and TLR-mediated cytokine secretion suggesting a role of PCNA in cellular signaling. *Cell Signal*, 27(7), 1478-87.

24. Xu, B., Hua, J., Zhang, Y., Jiang, X., Zhang, H., Ma, T., Zheng, W., Sun, R., Shen, W. and Sha, J. (2011). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) regulates primordial follicle assembly by promoting apoptosis of oocytes in fetal and neonatal mouse ovaries. *PLoS One*, 6(1), e16046.
25. Gouveia, B. B., Barberino, R. S., Dos Santos Silva, R. L., Lins, T., da Silva Guimarães, V., do Monte, A. P. O., Palheta, R. C., Jr. and de Matos, M. H. T. (2021). Involvement of PTEN and FOXO3a proteins in the protective activity of protocatechuic acid against cisplatin-induced ovarian toxicity in mice. *Reproductive Sciences*, 28(3), 865-876.
26. He, M., Wang, K., Che, H., Wang, H., Yang, K., Zhang, G., Yao, J. and Wang, J. (2022). A comprehensive review of cycloastragenol: Biological activity, mechanism of action and structural modifications. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 5, 100060.
27. Idrees, M., Kumar, V., Khan, A. M., Joo, M. D., Lee, K. W., Sohn, S. H. and Kong, I. K. (2023). Cycloastragenol activation of telomerase improves  $\beta$ -Klotho protein level and attenuates age-related malfunctioning in ovarian tissues. *Mechanisms of Ageing and Development*, 209, 111756.
28. Pertynska-Marczewska, M. and Diamanti-Kandarakis, E. (2017). Aging ovary and the role for advanced glycation end products. *Menopause*, 24(3), 345-351.
29. Vasilopoulos, E., Fragkiadaki, P., Kalliora, C., Fragou, D., Docea, A. O., Vakonaki, E., Tsoukalas, D., Calina, D., Buga, A. M., Georgiadis, G., Mamoulakis, C., Makrigiannakis, A., Spandidos, D. A. and Tsatsakis, A. (2019). The association of female and male infertility with telomere length (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(2), 375-389.
30. Ross, M. H. and Pawlina, W. (2006). *Histology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 830-848.
31. Carlson, B. M. (2018). *Human embryology and developmental biology*. New York: Elsevier Health Sciences, 54-62.
32. Sadler, T. W. (2011). *Langman's medical embryology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 22-32.
33. Moore, K. L., Persaud, T. V. N. and Torchia, M. G. (2011). *The developing human E-Book*. New York: Elsevier Health Sciences, 45-52.
34. Sadler, T. W. (2022). *Langman's medical embryology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 29-48.
35. Dudek, R. W. (2009). *Embryology BRS*. New York: LWW, 32-38.
36. Block, E. (1952). Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. *Cells Tissues Organs*, 14(1-2), 108-123.
37. Gardner, D. K. and Simón, C. (2017). *Handbook of in vitro fertilization*. New York: CRC Press, 45-52.

38. Markstrom, E., Svensson, E., Shao, R., Svanberg, B. and Billig, H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis--dependence on follicle differentiation. *Reproduction*, 123(1), 23-30.
39. Ozan, H. (2005). *Anatomi*. Ankara: Klinisyen Tıp Kitabevleri, 45-52.
40. Gartner, L. P. and Hiatt, J. L. (2012). *Color atlas and text of histology*. New York: Lippincott Williams & Wilkins, 82-92.
41. Gupta, S. K. (2018). The human egg's zona pellucida. *Current Topics in Developmental Biology*, 130, 379-411.
42. Chakravarti, D., LaBella, K. A. and DePinho, R. A. (2021). Telomeres: history, health, and hallmarks of aging. *Cell*, 184(2), 306-322.
43. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.
44. Wright, W. E., Piatyszek, M. A., Rainey, W. E., Byrd, W. and Shay, J. W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Developmental Genetics*, 18(2), 173-179.
45. Calado, R. T. and Young, N. S. (2009). Telomere diseases. *New England Journal of Medicine*, 361(24), 2353-2365.
46. Jaskelioff, M., Muller, F. L., Paik, J.-H., Thomas, E., Jiang, S., Adams, A. C., Sahin, E., Kost-Alimova, M., Protopopov, A. and Cadinanos, J. (2011). Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature*, 469(7328), 102-106.
47. Creighton, H. B. and McClintock, B. (1931). A correlation of cytological and genetical crossing-over in *Zea mays*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 17(8), 492-497.
48. Muller, H. (1938). *The remaking of chromosomes*. New York: Springer, 13.
49. Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 37, 614-36.
50. Hayflick, L. and Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25, 585-621.
51. Olovnikov, A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology*, 41(1), 181-90.
52. Watson, J. D. (1972). Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New Biology*, 239(94), 197-201.
53. Blackburn, E. H. and Gall, J. G. (1978). A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of Molecular Biology*, 120(1), 33-53.

54. Greider, C. W. and Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*, 43(2 Pt 1), 405-13.
55. Chan, S. R. and Blackburn, E. H. (2004). Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1441), 109-122.
56. Harley, C. B., Futcher, A. B. and Greider, C. W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, 345(6274), 458-60.
57. Lingner, J., Hughes, T. R., Shevchenko, A., Mann, M., Lundblad, V. and Cech, T. R. (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*, 276(5312), 561-7.
58. Harrington, L., McPhail, T., Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Program, A. E., Bass, M. B., Arruda, I. and Robinson, M. O. (1997). A mammalian telomerase-associated protein. *Science*, 275(5302), 973-977.
59. Chang, S., Multani, A. S., Cabrera, N. G., Naylor, M. L., Laud, P., Lombard, D., Pathak, S., Guarente, L. and DePinho, R. A. (2004). Essential role of limiting telomeres in the pathogenesis of Werner syndrome. *Nature Genetics*, 36(8), 877-882.
60. Rudolph, K. L., Chang, S., Lee, H.-W., Blasco, M., Gottlieb, G. J., Greider, C. and DePinho, R. A. (1999). Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice. *Cell*, 96(5), 701-712.
61. Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Müller, F. L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A. J. and Walkey, C. (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature*, 470(7334), 359-365.
62. Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C.-P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S. and Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, 279(5349), 349-352.
63. Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W. and Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, 400(6743), 464-468.
64. Lee, H.-W., Blasco, M. A., Gottlieb, G. J., Horner, J. W., Greider, C. W. and DePinho, R. A. (1998). Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature*, 392(6676), 569-574.
65. Wong, K.-K., Maser, R. S., Bachoo, R. M., Menon, J., Carrasco, D. R., Gu, Y., Alt, F. W. and DePinho, R. A. (2003). Telomere dysfunction and *Atm* deficiency compromises organ homeostasis and accelerates ageing. *Nature*, 421(6923), 643-648.
66. Hong, J. and Yun, C.-O. (2019). Telomere gene therapy: polarizing therapeutic goals for treatment of various diseases. *Cells*, 8(5), 392.
67. Roake, C. M. and Artandi, S. E. (2020). Regulation of human telomerase in homeostasis and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(7), 384-397.

68. Kwapisz, M. and Morillon, A. (2020). Subtelomeric Transcription and its Regulation. *Journal of Molecular Biology*, 432(15), 4199-4219.
69. Hug, N. and Lingner, J. (2006). Telomere length homeostasis. *Chromosoma*, 115, 413-425.
70. Greider, C. W. (1999). Telomeres do D-loop-T-loop. *Cell*, 97(4), 419-22.
71. Eguchi, A., Gonzalez, A., Torres-Bigio, S. I., Koleckar, K., Birnbaum, F., Zhang, J. Z., Wang, V. Y., Wu, J. C., Artandi, S. E. and Blau, H. M. (2023). TRF2 rescues telomere attrition and prolongs cell survival in Duchenne muscular dystrophy cardiomyocytes derived from human iPSCs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 120(6), e2209967120.
72. Necasová, I., Janoušková, E., Klumpler, T. and Hofr, C. (2017). Basic domain of telomere guardian TRF2 reduces D-loop unwinding whereas Rap1 restores it. *Nucleic Acids Research*, 45(21), 12170-12180.
73. Georgaki, A., Strack, B., Podust, V. and Hübscher, U. (1992). DNA unwinding activity of replication protein A. *FEBS Letters*, 308(3), 240-244.
74. Van Steensel, B., Smogorzewska, A. and De Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, 92(3), 401-413.
75. Schepers, A. G., Vries, R., Van Den Born, M., Van De Wetering, M. and Clevers, H. (2011). Lgr5 intestinal stem cells have high telomerase activity and randomly segregate their chromosomes. *The EMBO Journal*, 30(6), 1104-1109.
76. Colla, S., Ong, D. S. T., Ogoti, Y., Marchesini, M., Mistry, N. A., Clise-Dwyer, K., Ang, S. A., Storti, P., Viale, A. and Giuliani, N. (2015). Telomere dysfunction drives aberrant hematopoietic differentiation and myelodysplastic syndrome. *Cancer Cell*, 27(5), 644-657.
77. Artandi, S. E. and DePinho, R. A. (2010). Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis*, 31(1), 9-18.
78. Pech, M. F., Garbuzov, A., Hasegawa, K., Sukhwani, M., Zhang, R. J., Benayoun, B. A., Brockman, S. A., Lin, S., Brunet, A. and Orwig, K. E. (2015). High telomerase is a hallmark of undifferentiated spermatogonia and is required for maintenance of male germline stem cells. *Genes & Development*, 29(23), 2420-2434.
79. Feng, J., Funk, W. D., Wang, S.-S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C.-P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C. and Yu, J. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science*, 269(5228), 1236-1241.
80. Toupance, S., Fattet, A. J., Thornton, S. N., Benetos, A., Guéant, J. L. and Koscinski, I. (2021). Ovarian Telomerase and Female Fertility. *Biomedicines*, 9(7), 45-52.
81. Blackburn, E. H. and Collins, K. (2011). Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(5), a003558.

82. Weng, N.-P., Levine, B. L., June, C. H. and Hodes, R. J. (1996). Regulated expression of telomerase activity in human T lymphocyte development and activation. *The Journal of experimental Medicine*, 183(6), 2471-2479.
83. Shay, J. W. and Wright, W. E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. In *Seminars in Cancer Biology* (pp. 349-353). New York: Academic Press.
84. Egan, E. D. and Collins, K. (2012). Biogenesis of telomerase ribonucleoproteins. *RNA*, 18(10), 1747-1759.
85. Zhao, Y., Sfeir, A. J., Zou, Y., Buseman, C. M., Chow, T. T., Shay, J. W. and Wright, W. E. (2009). Telomere extension occurs at most chromosome ends and is uncoupled from fill-in in human cancer cells. *Cell*, 138(3), 463-475.
86. Teixeira, M. T., Arneric, M., Sperisen, P. and Lingner, J. (2004). Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase-extendible and nonextendible states. *Cell*, 117(3), 323-335.
87. Greider, C. W. (2016). Regulating telomere length from the inside out: the replication fork model. *Genes & development*, 30(13), 1483-1491.
88. Lavranos, T. C., Mathis, J. M., Latham, S. E., Kalionis, B., Shay, J. W. and Rodgers, R. J. (1999). Evidence for ovarian granulosa stem cells: telomerase activity and localization of the telomerase ribonucleic acid component in bovine ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 61(2), 358-366.
89. Goto, H., Iwata, H., Takeo, S., Nisinonso, K., Murakami, S., Monji, Y. and Kuwayama, T. (2013). Effect of bovine age on the proliferative activity, global DNA methylation, relative telomere length and telomerase activity of granulosa cells. *Zygote*, 21(3), 256-264.
90. Russo, V., Berardinelli, P., Martelli, A., Giacinto, O. D., Nardinocchi, D., Fantasia, D. and Barboni, B. (2006). Expression of telomerase reverse transcriptase subunit (TERT) and telomere sizing in pig ovarian follicles. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 54(4), 443-455.
91. Clément, F., Gruet, M., Monget, P., Terqui, M., Jolivet, E. and Monniaux, D. (1997). Growth kinetics of the granulosa cell population in ovarian follicles: an approach by mathematical modelling. *Cell Proliferation*, 30(6-7), 255-270.
92. Kosebent, E. G., Uysal, F. and Ozturk, S. (2018). Telomere length and telomerase activity during folliculogenesis in mammals. *Journal of Reproduction and Development*, 64(6), 477-484.
93. Liu, J.-P. and Li, H. (2010). Telomerase in the ovary. *Reproduction*, 140(2), 215.
94. Rosenberg, B., Vancamp, L. and Krigas, T. (1965). Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205, 698-9.
95. Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 7(8), 573-84.

96. Agarwal, R. and Kaye, S. B. (2003). Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(7), 502-16.
97. Lynch, H. T., Casey, M. J., Snyder, C. L., Bewtra, C., Lynch, J. F., Butts, M. and Godwin, A. K. (2009). Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Molecular Oncology*, 3(2), 97-137.
98. Gottesman, M. M., Fojo, T. and Bates, S. E. (2002). Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. *Nature Reviews Cancer*, 2(1), 48-58.
99. Shen, D. W., Pouliot, L. M., Hall, M. D. and Gottesman, M. M. (2012). Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Reviews*, 64(3), 706-21.
100. Florea, A. M. and Büsselberg, D. (2011). Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*, 3(1), 1351-71.
101. Desoize, B. and Madoulet, C. (2002). Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 42(3), 317-25.
102. Ozben, T. (2007). Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy. *Journal of Pharmacy Science*, 96(9), 2181-96.
103. Martindale, J. L. and Holbrook, N. J. (2002). Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *Journal of Cellular Physiology*, 192(1), 1-15.
104. Hampton, M. B. and Orrenius, S. (1997). Dual regulation of caspase activity by hydrogen peroxide: implications for apoptosis. *FEBS Letter*, 414(3), 552-6.
105. Shrivastava, A., Kuzontkoski, P. M., Groopman, J. E. and Prasad, A. (2011). Cannabidiol induces programmed cell death in breast cancer cells by coordinating the cross-talk between apoptosis and autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(7), 1161-72.
106. Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell*, 91(4), 443-6.
107. Johnson, G. L. and Lapadat, R. (2002). Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science*, 298(5600), 1911-2.
108. DeHaan, R. D., Yazlovitskaya, E. M. and Persons, D. L. (2001). Regulation of p53 target gene expression by cisplatin-induced extracellular signal-regulated kinase. *Cancer Chemother Pharmacol*, 48(5), 383-8.
109. Moldovan, G.-L., Pfander, B. and Jentsch, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell*, 129(4), 665-679.
110. Bell, S. P. and Dutta, A. (2002). DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*, 71, 333-74.

111. González-Magaña, A. and Blanco, F. J. (2020). Human PCNA structure, function and interactions. *Biomolecules*, 10(4).
112. Majka, J. and Burgers, P. M. (2004). The PCNA-RFC families of DNA clamps and clamp loaders. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 78, 227-60.
113. Slade, D. (2018). Maneuvers on PCNA rings during DNA replication and repair. *Genes (Basel)*, 9(8).
114. Shen, M., Young, A. and Autexier, C. (2021). PCNA, a focus on replication stress and the alternative lengthening of telomeres pathway. *DNA Repair (Amst)*, 100, 103055.
115. Dilley, R. L., Verma, P., Cho, N. W., Winters, H. D., Wondisford, A. R. and Greenberg, R. A. (2016). Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature*, 539(7627), 54-58.
116. Zhang, J.-M. and Zou, L. (2020). Alternative lengthening of telomeres: from molecular mechanisms to therapeutic outlooks. *Cell & Bioscience*, 10(1), 30.
117. Petermann, E., Lan, L. and Zou, L. (2022). Sources, resolution and physiological relevance of R-loops and RNA-DNA hybrids. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(8), 521-540.
118. Maffia, A., Ranise, C. and Sabbioneda, S. (2020). From R-loops to G-quadruplexes: emerging new threats for the replication fork. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(4).
119. Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M. N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-84.
120. Gangloff, Y.-G., Mueller, M., Dann, S. G., Svoboda, P., Sticker, M., Spetz, J.-F., Um, S. H., Brown, E. J., Cereghini, S. and Thomas, G. (2004). Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Molecular and Cellular Biology*, 24(21), 9508-9516.
121. Paplomata, E. and O'Regan, R. (2014). The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 6(4), 154-66.
122. Porta, C., Paglino, C. and Mosca, A. (2014). Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 4, 64.
123. Peng, D. J., Wang, J., Zhou, J. Y. and Wu, G. S. (2010). Role of the Akt/mTOR survival pathway in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(3), 600-5.
124. Brazil, D. P. and Hemmings, B. A. (2001). Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in Biochemical Sciences*, 26(11), 657-64.
125. Küçüköner, M. (2013). Kanser tedavisinde mTOR sinyal yolağı ve mTOR inhibitörleri. *Dicle Tıp Dergisi*, 40(1), 156-160.

126. Chen, H., Zhang, L., Zuo, M., Lou, X., Liu, B. and Fu, T. (2023). Inhibition of apoptosis through AKT-mTOR pathway in ovarian cancer and renal cancer. *Aging (Albany NY)*, 15(4), 1210-1227.
127. Cui, C., Han, S., Yin, H., Luo, B., Shen, X., Yang, F., Liu, Z., Zhu, Q., Li, D. and Wang, Y. (2019). FOXO3 is expressed in ovarian tissues and acts as an apoptosis initiator in granulosa cells of chickens. *BioMed Research International*, 2019, 6902906.
128. Jünger, M. A., Rintelen, F., Stocker, H., Wasserman, J. D., Végh, M., Radimerski, T., Greenberg, M. E. and Hafen, E. (2003). The Drosophila forkhead transcription factor FOXO mediates the reduction in cell number associated with reduced insulin signaling. *Journal of Biology*, 2, 1-17.
129. Accili, D. and Arden, K. C. (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 117(4), 421-426.
130. Daitoku, H., Sakamaki, J. and Fukamizu, A. (2011). Regulation of FoxO transcription factors by acetylation and protein-protein interactions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813(11), 1954-60.
131. Zhang, H., Lin, F., Zhao, J. and Wang, Z. (2020). Expression regulation and physiological role of transcription factor FOXO3a during ovarian follicular development. *Frontiers in Physiology*, 11, 595086.
132. Jang, H., Na, Y., Hong, K., Lee, S., Moon, S., Cho, M., Park, M., Lee, O. H., Chang, E. M., Lee, D. R., Ko, J. J., Lee, W. S. and Choi, Y. (2017). Synergistic effect of melatonin and ghrelin in preventing cisplatin-induced ovarian damage via regulation of FOXO3a phosphorylation and binding to the p27(Kip1) promoter in primordial follicles. *Journal of Pineal Research*, 63(3), 122-135.
133. Kaldis, P. (2007). Another piece of the p27Kip1 puzzle. *Cell*, 128(2), 241-244.
134. Salvador, L., Singaravelu, G., Harley, C. B., Flom, P., Suram, A. and Raffaele, J. M. (2016). A natural product telomerase activator lengthens telomeres in humans: a randomized, double blind, and placebo controlled study. *Rejuvenation Research*, 19(6), 478-484.
135. Yung, L. Y., Lam, W. S., Ho, M. K., Hu, Y., Ip, F. C., Pang, H., Chin, A. C., Harley, C. B., Ip, N. Y. and Wong, Y. H. (2012). Astragaloside IV and cycloastragenol stimulate the phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase in multiple cell types. *Planta Medica*, 78(02), 115-121.
136. He, M., Wang, K., Che, H., Wang, H., Yang, K., Zhang, G., Yao, J. and Wang, J. (2022). A comprehensive review of cycloastragenol: biological activity, mechanism of action and structural modifications. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 100060.
137. Fitzpatrick, A. L., Kronmal, R. A., Gardner, J. P., Psaty, B. M., Jenny, N. S., Tracy, R. P., Walston, J., Kimura, M. and Aviv, A. (2006). Leukocyte Telomere Length and Cardiovascular Disease in the Cardiovascular Health Study. *American Journal of Epidemiology*, 165(1), 14-21.

138. Epel, E. S., Merkin, S. S., Cawthon, R., Blackburn, E. H., Adler, N. E., Pletcher, M. J. and Seeman, T. E. (2009). The rate of leukocyte telomere shortening predicts mortality from cardiovascular disease in elderly men. *Aging (Albany NY)*, 1(1), 81.
139. Yeh, J.-K. and Wang, C.-Y. (2016). Telomeres and telomerase in cardiovascular diseases. *Genes*, 7(9), 58.
140. Georgin-Lavialle, S., Aouba, A., Mouthon, L., Londono-Vallejo, J. A., Lepelletier, Y., Gabet, A.-S. and Hermine, O. (2010). The telomere/telomerase system in autoimmune and systemic immune-mediated diseases. *Autoimmunity Reviews*, 9(10), 646-651.
141. Shen, C. Y., Jiang, J. G., Yang, L., Wang, D. W. and Zhu, W. (2017). Anti-ageing active ingredients from herbs and nutraceuticals used in traditional Chinese medicine: pharmacological mechanisms and implications for drug discovery. *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1395-1425.
142. Saretzki, G. (2018). Telomeres, telomerase and ageing. *Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science*, 221-308.
143. Liu, J., Gao, D., Dan, J., Liu, D., Peng, L., Zhou, R. and Luo, Y. (2019). The protective effect of cycloastragenol on aging mouse circadian rhythmic disorder induced by D-galactose. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(10), 16408-16415.
144. Chiu, C.-P. and Harley, C. B. (1997). Replicative Senescence and Cell Immortality: The Role of Telomeres and Telomerase. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 214(2), 99-106.
145. Richardson, G. D., Breault, D., Horrocks, G., Cormack, S., Hole, N. and Owens, W. A. (2012). Telomerase expression in the mammalian heart. *The FASEB Journal*, 26(12), 4832-40.
146. Xu, L., Idrees, M., Joo, M. D., Sidrat, T., Wei, Y., Song, S. H., Lee, K. L. and Kong, I. K. (2021). Constitutive expression of TERT enhances  $\beta$ -klotho expression and improves age-related deterioration in early bovine embryos. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(10), 78-92.
147. Urakawa, I., Yamazaki, Y., Shimada, T., Iijima, K., Hasegawa, H., Okawa, K., Fujita, T., Fukumoto, S. and Yamashita, T. (2006). Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. *Nature*, 444(7120), 770-4.
148. Arulselvan, P., Fard, M. T., Tan, W. S., Gothai, S., Fakurazi, S., Norhaizan, M. E. and Kumar, S. S. (2016). Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 5276130.
149. Deng, G., Chen, W., Wang, P., Zhan, T., Zheng, W., Gu, Z., Wang, X., Ji, X. and Sun, Y. (2019). Inhibition of NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in macrophage by cycloastragenol contributes to amelioration of imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice. *International Immunopharmacology*, 74, 105682.

150. Mohamed, I. N., Hafez, S. S., Fairaq, A., Ergul, A., Imig, J. D. and El-Remessy, A. B. (2014). Thioredoxin-interacting protein is required for endothelial NLRP3 inflammasome activation and cell death in a rat model of high-fat diet. *Diabetologia*, 57(2), 413-23.
151. Miglio, G., Veglia, E. and Fantozzi, R. (2015). Fumaric acid esters prevent the NLRP3 inflammasome-mediated and ATP-triggered pyroptosis of differentiated THP-1 cells. *International Immunopharmacology*, 28(1), 215-9.
152. Kim, J. and Krueger, J. G. (2015). The immunopathogenesis of psoriasis. *Dermatologic Clinics*, 33(1), 13-23.
153. Tao, J. H., Zhao, M., Wang, D. G., Yang, C., Chen, G. T., Zhao, X., Pu, X. L. and Jiang, S. (2015). UPLC-Q-TOF/MS-based screening and identification of two major bioactive components and their metabolites in normal and CKD rat plasma, urine and feces after oral administration of *Rehmannia glutinosa* Libosch extract. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 1001, 98-106.
154. Özdemir, Z. and Karakurt, A. (2016). İlaç metabolizması ve farmasötik kimyada önemi. *Annals of Health Sciences Research*, 5(2), 35-46.
155. Zhu, J., Lee, S., Ho, M. K., Hu, Y., Pang, H., Ip, F. C., Chin, A. C., Harley, C. B., Ip, N. Y. and Wong, Y. H. (2010). In vitro intestinal absorption and first-pass intestinal and hepatic metabolism of cycloastragenol, a potent small molecule telomerase activator. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 25(5), 477-486.
156. Ma, P. K., Wei, B. H., Cao, Y. L., Miao, Q., Chen, N., Guo, C. E., Chen, H. Y. and Zhang, Y. J. (2017). Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of cycloastragenol, a potent telomerase activator in rats. *Xenobiotica*, 47(6), 526-537.
157. Harley, C. B., Liu, W., Flom, P. L. and Raffaele, J. M. (2013). A natural product telomerase activator as part of a health maintenance program: metabolic and cardiovascular response. *Rejuvenation Research*, 16(5), 386-95.
158. Szabo, N. J. (2014). Dietary safety of cycloastragenol from *Astragalus* spp.: subchronic toxicity and genotoxicity studies. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 322-34.
159. Yu, Y., Wu, J., Li, J., Liu, Y., Zheng, X., Du, M., Zhou, L., Yang, Y., Luo, S., Hu, W., Li, L., Yao, W. and Liu, Y. (2020). Cycloastragenol prevents age-related bone loss: Evidence in d-galactose-treated and aged rats. *Biomed Pharmacother*, 128, 110304.
160. Crowe, A. R. and Yue, W. (2019). Semi-quantitative Determination of Protein Expression using Immunohistochemistry Staining and Analysis: An Integrated Protocol. *Bio-Protocol*, 9(24), 62-82.
161. Ulug, P. and Oner, G. (2014). Evaluation of the effects of single or multiple dose methotrexate administration, salpingectomy on ovarian reserve of rat with the measurement of anti-Müllerian hormone (AMH) levels and histological analysis. *The European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 81, 205-9.

162. Williams, C. J., & Erickson, G. F. (2015). *Morphology and physiology of the ovary*. South Dartmouth: MDText, 48-52.
163. Celestino, J. J. d. H., Chaves, R. N., Matos, M. H. T., Saraiv, M. V. A., Bruno, J. B., Maia-Júnior, J. E., Silva, J. R. V. and Figueiredo, J. R. d. (2009). Mechanisms of atresia in ovarian follicles. *Animal Reproduction*, 6, 495-508.
164. Ishibashi, T. and Lippard, S. J. (1998). Telomere loss in cells treated with cisplatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), 4219-23.
165. Yoon, S. Y., Yoon, J. A., Park, M., Shin, E. Y., Jung, S., Lee, J. E., Eum, J. H., Song, H., Lee, D. R., Lee, W. S. and Lyu, S. W. (2020). Recovery of ovarian function by human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in cisplatin-induced premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1), 255.
166. Li, X., Yang, S., Lv, X., Sun, H., Weng, J., Liang, Y. and Zhou, D. (2013). The mechanism of mesna in protection from cisplatin-induced ovarian damage in female rats. *Journal of Gynecologic Oncology*, 24(2), 177-85.
167. Huang, J., Shan, W., Li, N., Zhou, B., Guo, E., Xia, M., Lu, H., Wu, Y., Chen, J., Wang, B., Xi, L., Ma, D., Chen, G., Li, K. and Sun, C. (2021). Melatonin provides protection against cisplatin-induced ovarian damage and loss of fertility in mice. *Reprod Biomed Online*, 42(3), 505-519.
168. Gursoy, A. and Sade, A. G. (2022). Effects of Diosmin Administration on Cisplatin-Induced Premature Ovarian Failure in a Rat Model. *Journal of Contemporary Medicine*, 12(6), 912-916.
169. Morgan, S., Lopes, F., Gourley, C., Anderson, R. A. and Spears, N. (2013). Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. *PLoS One*, 8(7), e70117.
170. Morgan, S., Anderson, R. A., Gourley, C., Wallace, W. H. and Spears, N. (2012). How do chemotherapeutic agents damage the ovary?. *Human Reproduction Update*, 18(5), 525-35.
171. Du, D., Tang, X., Li, Y., Gao, Y., Chen, R., Chen, Q., Wen, J., Wu, T., Zhang, Y., Lu, H., Zhang, J. and Wang, S. (2022). Senotherapy Protects against Cisplatin-Induced Ovarian Injury by Removing Senescent Cells and Alleviating DNA Damage. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 9144644.
172. Adams Martin, A., Dionne, I., Wellinger, R. J. and Holm, C. (2000). The function of DNA polymerase alpha at telomeric G tails is important for telomere homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 20(3), 786-96.
173. Ikram, M., Jo, M. H., Choe, K., Khan, A., Ahmad, S., Saeed, K., Kim, M. W. and Kim, M. O. (2021). Cycloastragenol, a triterpenoid saponin, regulates oxidative stress, neurotrophic dysfunctions, neuroinflammation and apoptotic cell death in neurodegenerative conditions. *Cells*, 10(10), 102-108.

174. Zhu, X., Cao, Y., Su, M., Chen, M., Li, C., Yi, L., Qin, J., Tulake, W., Teng, F., Zhong, Y., Tang, W., Wang, S. and Dong, J. (2021). Cycloastragenol alleviates airway inflammation in asthmatic mice by inhibiting autophagy. *Molecular Medicine Reports*, 24(5), 182-193.
175. Wang, J., Wu, M. L., Cao, S. P., Cai, H., Zhao, Z. M. and Song, Y. H. (2018). Cycloastragenol ameliorates experimental heart damage in rats by promoting myocardial autophagy via inhibition of AKT1-RPS6KB1 signaling. *Biomed Pharmacother*, 107, 1074-1081.
176. Luangmonkong, T., Puphancharoensuk, P., Tongsongsang, V., Olinga, P. and Parichatikanond, W. (2023). Hepatoprotective Efficacy of Cycloastragenol Alleviated the Progression of Liver Fibrosis in Carbon-Tetrachloride-Treated Mice. *Biomedicines*, 11(1).
177. Barberino, R. S., Menezes, V. G., Ribeiro, A. E. A. S., Palheta Jr, R. C., Jiang, X., Smitz, J. E. J. and Matos, M. H. T. (2017). Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity†. *Biology of Reproduction*, 96(6), 1244-1255.
178. Li, Z., Zhang, H., Chen, Y., Fan, L. and Fang, J. (2012). Forkhead transcription factor FOXO3a protein activates nuclear factor  $\kappa$ B through B-cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10) protein and promotes tumor cell survival in serum deprivation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(21), 17737-17745.
179. Lins, T., Gouveia, B. B., Barberino, R. S., Silva, R. L. S., Monte, A. P. O., Pinto, J. G. C., Campinho, D. S. P., Palheta, R. C. and Matos, M. H. T. (2020). Rutin prevents cisplatin-induced ovarian damage via antioxidant activity and regulation of PTEN and FOXO3a phosphorylation in mouse model. *Reprod Toxicol*, 98, 209-217.
180. Morgan, S., Anderson, R. A., Gourley, C., Wallace, W. H. and Spears, N. (2012). How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Human Reproduction Update*, 18(5), 525-535.
181. Jang, H., Lee, O. H., Lee, Y., Yoon, H., Chang, E. M., Park, M., Lee, J. W., Hong, K., Kim, J. O., Kim, N. K., Ko, J. J., Lee, D. R., Yoon, T. K., Lee, W. S. and Choi, Y. (2016). Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. *Journal of Pineal Research*, 60(3), 336-47.
182. Liu, L., Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Jagarlamudi, K., Shen, Y., Gunnarsson, D., Selstam, G., Boman, K. and Liu, K. (2007). Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Journal of Biologists*, 134(1), 22-32.
183. Castrillon, D. H., Miao, L., Kollipara, R., Horner, J. W. and DePinho, R. A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*, 301(5630), 215-8.
184. Ryter, S. W., Koo, J. K. and Choi, A. M. (2014). Molecular regulation of autophagy and its implications for metabolic diseases. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 17(4), 329-37.

185. Schmelzle, T. and Hall, M. N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell*, 103(2), 253-62.
186. Alayev, A., Salamon, R. S., Berger, S. M., Schwartz, N. S., Cuesta, R., Snyder, R. B. and Holz, M. K. (2016). mTORC1 directly phosphorylates and activates ER $\alpha$  upon estrogen stimulation. *Oncogene*, 35(27), 3535-43.
187. Eldani, M., Luan, Y., Xu, P. C., Bargar, T. and Kim, S. Y. (2020). Continuous treatment with cisplatin induces the oocyte death of primordial follicles without activation. *The FASEB Journal*, 34(10), 13885-13899.
188. Chen, X., Hu, Y., Zhang, W., Chen, K., Hu, J., Li, X., Liang, L., Cai, X., Hu, J., Wang, K., Huang, A. and Tang, N. (2019). Cisplatin induces autophagy to enhance hepatitis B virus replication via activation of ROS/JNK and inhibition of the Akt/mTOR pathway. *Free Radical Biology and Medicine*, 131, 225-236.
189. Peng, D.J., Wang, J., Zhou, J.Y., & Wu, G.S. (2010). Role of the Akt/Mtor survival pathway in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 394(3), 600-605.
190. Walden, F. (2014). *Ribosome biogenesis during skeletal muscle hypertrophy*, Sweden: Karolinska Institutet, 45-62.
191. Henkels, K. M. and Turchi, J. J. (1999). Cisplatin-induced apoptosis proceeds by caspase-3-dependent and -independent pathways in cisplatin-resistant and -sensitive human ovarian cancer cell lines. *Cancer Research*, 59(13), 3077-83.
192. Kaushal, G. P., Kaushal, V., Hong, X. and Shah, S. V. (2001). Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells. *Kidney International*, 60(5), 1726-36.
193. Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, 22(47), 7265-79.
194. Regan, S. L. P., Knight, P. G., Yovich, J. L., Leung, Y., Arfuso, F. and Dharmarajan, A. (2018). Granulosa Cell Apoptosis in the Ovarian Follicle-A Changing View. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 9, 61.



**EKLER**

## EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 01.02.2022-E.276005



T.C.  
GAZİ ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : E-66332047-604.01.02-276005  
Konu : Değerlendirme ve Onay

01.02.2022

Sayın Prof. Dr. Gülnur KAPLANOĞLU (TAKE)  
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Gülnur TAKE KAPLANOĞLU, Gökçe Nur ARIK EROL ve Atiye Seda YAR SAĞLAM'dan oluşan, G.Ü.ET-22.018 kod numaralı ve "*Sisplatin ile Oluşturulan Ovaryum Hasarında, Telomeraz Aktivatörü Olan Sikloastrogenal'ün (CAG) Foliküler Proliferasyon ve Ovaryan Yaşlanması ile İlişkisi*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-22.018 and entitled "*The Relationship of Telomerase Activator Cycloastrogenol (CAG) With Follicular Proliferation and Ovarian Aging in Ovarian Damage Induced by Cisplatin*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Sprague Dawley  
Hayvan Sayısı : 40

Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ  
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

## EK-1. (devam) Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 01.02.2022-E.276005

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ**  
**HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM**  
**LİSTESİ**

TOPLANTI TARİHİ : 27/08/2021		TOPLANTI SAYISI : 06	
ADI-SOYADI		İMZA	
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)			
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)			
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU			
Prof.Dr.Tuncay PEKER			
Prof.Dr.Fatma AKAR			
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIÇIK			
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ			
Prof.Dr.İpek SÜNTAR			
Doç.Dr.Emre BARIŞ			
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR			
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER			
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM			
Vet.Hek.Burcu AVCI			
Osman İÇ			

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ARIK EROL, Gökçe Nur  
Uyruğu : T.C.

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet yılı
Doktora	Gazi Üniversitesi	
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi	
Lisans	Cumhuriyet Üniversitesi	

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2015	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

### Yabancı Dil

İngilizce



*GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..*

