MANİSA CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı

DENEYSEL PREMATÜR OVARYEN YETMEZLİĞİ MODELİNDE KULLANILAN ANTİOKSİDANLARIN MİTOFAJİ PROTEİNLERİ VE BUNLARLA İLİŞKİLİ MİCRORNA'LAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Duygu UÇAR KARTAL

Tez Danışmanı

Prof Dr. Naci Kemal KUŞÇU

Manisa, 2023

ÖNSÖZ

Asistanlığım boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşan saygıdeğer hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Naci Kemal Kuşçu'ya ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Yıldız UYAR'a;

Asistanlık süresi boyunca tecrübe, beceri ve bilgilerini bizlere aktaran sayın hocalarım Prof. Dr. Semra Oruç Koltan, Prof. Dr. Tevfik Güvenal, Prof. Dr. Aslı Göker, Prof. Dr. Burcu Artunç Ülkümen ve Doç. Dr. Pınar Solmaz Hasdemir'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanış aşamasında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Kemal Özbilgin'e ve Araş. Gör. Muhammed Yusuf Pekmezci'ye;

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum Araş. Gör. Müge Ayça İbiş'e ve Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalında görevli tüm doktor arkadaşlarıma;

Rotasyonlarım sırasında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan tüm hocalarıma, uzman ve asistan meslektaşlarıma;

Uzmanlık eğitimim süresince desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen tüm hemşire arkadaşlarıma, poliklinik ve servisimizdeki tüm tıbbi sekreter ve yardımcı sağlık personellerimize içten teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca sevgi ve desteklerini daima yanımda hissettiğim, bugünlere gelmemde sonsuz emek, özveri ve fedakârlıkların sahibi canım aileme ve sevgili eşim Anıl Kartal'a tüm içtenliğimle ayrı ayrı teşekkürlerimi sunuyorum.

Dr. Duygu UÇAR KARTAL

TABLO DİZİNİ

Tablo 1 : Prematür Ovaryen Yetmezlik ile ilişkilendirilmiş Patolojiler 13
Tablo 2 : Prematür Ovaryen Yetmezlikte Klinik Belirtiler 15
Tablo 3 : Parafin Takibi Prosedürü 24
Tablo 4 : Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü 25
Tablo 5 : İmmunohistokimya Prosedürü 26
Tablo 6: MirRna CDNA Sentezi İçin Kullanılan RT-Stemloop Primerler 29
Tablo 7 : PCR için kullanılan ileri(F) ve geri(R) primerler..... 30
Tablo 8 : Deney Gruplarındaki Follikül Yüzdeleri..... 32
Tablo 9 : Parkin Primer Antikoru ile Boyanan Grupların H-Skor Dağılımları 35
Tablo 10 : FUNDC1 Primer Antikoru ile Boyanan Grupların H-Skor Dağılımları 38
Tablo 11 : BNIP3L Primer Antikoru ile Boyanan Grupların H-Skor Dağılımları 40
Tablo 12 : BNIP1 Primer Antikoru ile Boyanan Grupların H-Skor Dağılımları 43

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1 : Deney Gruplarındaki Follikül Türlerinin Toplam Follikül Sayısına Yüzdeleri 33
Şekil 2 : Kontrol (a, c, e) ve Siklofosfamid (b, d, f) Gruplarının Parkin İmmunoreaktivitesi 44
Şekil 3 : Kurkumin I (a, c, e) ve Kuersetin I (b, d, f) Gruplarının Parkin İmmunoreaktivitesi 45
Şekil 4 : Kurkumin II (a, c, e) ve Kuersetin II (b, d, f) Gruplarının Parkin İmmunoreaktivitesi 46
Şekil 5 : Kontrol (a, c, e) ve Siklofosfamid (b, d, f) Gruplarının FUNDC1 İmmunoreaktivitesi 47
Şekil 6 : Kurkumin I (a, c, e) ve Kuersetin I (b, d, f) Gruplarının FUNDC1 İmmünoreaktivitesi 48
Şekil 7 : Kurkumin II (a, c, e) ve Kuersetin II (b, d, f) Gruplarının FUNDC1 İmmünoreaktivitesi 49
Şekil 8 : Kontrol (a, c, e) ve Siklofosfamid (b, d, f) gruplarının BNIP3L İmmunoreaktivitesi 50
Şekil 9 : Kurkumin I (a, c, e) ve Kuersetin I (b, d, f) Gruplarının BNIP3L İmmünoreaktivitesi 51
Şekil 10 : Kurkumin II (a, c, e) ve Kuersetin II (b, d, f) Gruplarının BNIP3L İmmünoreaktivitesi 52
Şekil 11 : Kontrol (a, c, e) ve Siklofosfamid (b, d, f) Gruplarının BNIP1 İmmünoreaktivitesi 53
Şekil 12 : Kurkumin I (a, c, e) ve Kuersetin I (b, d, f) Gruplarının BNIP1 İmmünoreaktivitesi 54
Şekil 13 : Kurkumin II (a, c, e) ve Kuersetin II (b, d, f) Gruplarının BNIP1 İmmünoreaktivitesi 55
Şekil 14 : MiR-181a'nın Deney Gruplarındaki İfadesi 56
Şekil 15 : MiR-137'nin Deney Gruplarındaki İfadesi 57
Şekil 16 : MiR-30a'nın Deney Gruplarındaki İfadesi 57
Şekil 17 : MiR-302/367'nin Deney Gruplarındaki İfadesi 58

Şekil 18 : Parkin'in Deney Gruplarındaki İfadesi..... 59
Şekil 19 : FUNDC1'in Deney Gruplarındaki İfadesi 60
Şekil 20: BNIP3L'nin Deney Gruplarındaki İfadesi 61
Şekil 21 : BNIP1'in Deney Gruplarındaki İfadesi 62

KISALTMALAR

AMH: Anti-Müllerian Hormon

DM: Diabetes Mellitus

E2: Östradiol

ER: Endoplazmik Retikulum

FMR1: Fragile X Mental Retardasyon 1

FSH: Follikül Stimüle Edici Hormon

KT: Kemoterapi

LH: Lüteinize Edici Hormon

miRNA: MicroRNA

mtDNA: Mitokondriyal DNA

mtRNA: Mitokondriyal RNA

PKOS: Polikistik Over Sendromu

POY: Prematür Ovaryen Yetmezlik

RT: Radyoterapi

ROS: Reaktif Oksijen Türleri

SLE: Sistemik Lupus Eritematozus

SOD: Serbest Oksijen Radikalleri

İÇİNDEKİLER:

ÖNSÖZ ..... **I**

TABLO DİZİNİ ..... **II**

ŞEKİL DİZİNİ ..... **III**

KISALTMALAR ..... **V**

İÇİNDEKİLER: ..... **VI**

I.GİRİŞ VE AMAÇ **8**

II. GENEL BİLGİLER **10**

2.1 Prematür Ovaryen Yetmezlik 10

2.1.1 Tarihçe ve Tanı Kriterleri 10

2.1.2 Patofizyoloji 11

2.1.3 Klinik Komponent ve Tedavi 14

2.2 Mitofaji Proteinleri ve MicroRNA'lar 16

2.3 Kurkumin 17

2.4 Kuersetin 18

2.5 Siklofosfamid ve Over Üzerindeki Etkisi 19

III. GEREÇ VE YÖNTEM **21**

3.1. Deneysel Çalışmanın Yeri ve Deneklerin Türü: 21

3.2. Deneysel POY Modeli Oluşturulması ve İlaç Uygulamaları: 22

3.3. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Analizler 23

3.4. Moleküler Biyolojik Analizler 28

3.4.1. Total RNA Sentezi 28

3.4.2. cDNA sentezi 28

3.4.3. qPCR analizi 29
3.5. Follikül Sayımları 30
3.7. İstatistiksel Değerlendirme: 31
IV. BULGULAR 32
4.1. Follikül Sayımı Bulguları 32
4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular: 33
4.2.1. Parkin İmmünoreaktivitesi 33
4.2.2. FUNDC1 İmmünoreaktivitesi 36
4.2.3. BNIP3L İmmünoreaktivitesi 38
4.2.4. BNIP1 İmmünoreaktivitesi 41
4.3. Işık Mikroskobik Bulgular 44
4.4. qPcr Bulguları 56
4.4.1 MiRNA Bulguları 56
4.5. mRNA Bulguları 59
4.5.1. Parkin mRNA ölçümleri 59
4.5.2. FUNDC1 mRNA ölçümleri 60
4.5.3. BNIP3L (NIX) mRNA ölçümleri 61
4.5.4. BNIP1 mRNA ölçümleri 62
V. TARTIŞMA 63
VI. SONUÇ 73
VII.ÖZET 75
VIII. ABSTRACT 76
IX. KAYNAKLAR 77

I.GİRİŞ VE AMAÇ

Prematür ovaryen yetmezlik (POY) kadınlarda amenore ile seyreden ve kırk yaşından önce overlerin fonksiyon kaybıyla izlenen bir hastalıktır. Hastalarda sıcak basmaları, doğurganlık kaybı ve uyku bozuklukları ile kendini gösterebilir. Ayrıca uzun vadede osteoporoz ve kardiyovasküler hastalıklar açısından risk taşımaktadır. Kadınların yaklaşık %1-2'sinde görülen bu rahatsızlığın patogenezi tam olarak aydınlatılamamıştır. Tek gen mutasyonları ve bazı kromozomal anormallikler POY ile ilişkilendirildiğinden beri çalışmalar bu konu üzerinde yoğunlaşmaktadır. POY ile ilişkilendirilen mutasyonların birçoğu mitokondri içerisinde işlev görmektedir.

Mitokondrinin lipid sentezi, nükleik asit ile protein biyogenezi, kalsiyum metabolizması ile homeostaz, hücre döngüsünün düzenlenmesi, reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretimi ve antioksidan koruma gibi birçok önemli hücresel işlevi mevcuttur. Hücre içi ROS'nin başlıca üreticileri olan mitokondrilerin POY'nde rolü olduğu anlaşıldığından beri mitokondri hedefli antioksidanlar üzerine yoğunlaşılmıştır. Tanımlanmış bazı genlerdeki mutasyonların mitokondriyal DNA (mtDNA), mitokondriyal RNA (mtRNA) ve mitokondriyal protein sentezi ile ilişkili olabileceği ve mitokondriyal fonksiyon bozukluğu üzerinden over yetmezliğine sebebiyet verebileceği düşünülmektedir. Eksojen antioksidanlar arasından birer flavanoid olan kurkumin ve kuersetinin mitokondri hedefli antioksidan olarak kullanılabilecekleri güncel tartışmalar arasındadır.

Mitokondriyal kalitenin sürdürülebilmesi ve optimal enerji üretimine devam edilebilmesi için işlevsiz mitokondrinin ortadan kaldırılması gerekmektedir. Hasarlı mitokondriler mitokondriyal dış zar proteinlerini ortadan kaldıran ubikitin-proteazom yolu ya da tüm organellerde bozulma ile giden otofaji-lizozom yolu ile ortadan kaldırılır. Otofaji-lizozom yolunda mitofaji adı verilen spesifik bir yol aracılığıyla hasarlı mitokondriyi seçici olarak dışlanır. Son birkaç yılda yapılan çalışmalar, microRNA'ların (miRNA) otofaji de dahil olmak üzere çok çeşitli biyolojik süreçleri düzenlediğini göstermiştir.

Pek çok çalışma bu otofajik aşamanın aydınlatılmasında farklı miRNA'lar üzerinde durmuştur. Bunlardan miR-181a yeni bir mitofaji inhibitörü olarak tanımlanmıştır. Bir başka çalışma hipoksiye duyarlı bir miRNA olan miR-137'nin, iki mitofaji reseptörü olan FUNDC1 ve NIX'i hedefleyerek hipoksiye bağlı mitofajiyi inhibe ettiğini bildirmiştir. PINK1 ve Parkin de mitokondriyal kalite kontrolünde ve mitofajide çok önemli roller oynar. PINK1 / Parkin yoluna ek olarak mitokondriyal proteinler de mitokondriyal klirensi düzenleyerek mitofajiyi tetiklemede görev alırlar. BNIP3L / Nix ve FUN14 alan içeren protein 1 (FUNDC1), memeli hücrelerinde mitofaji reseptörleri olarak tanımlanmıştır. Son çalışmalarla bir mitokondriyal dış zar proteini olan FUNDC1'in, otofagozomları çalıştırdığını ve hasarlı mitokondride mitofaji için bir reseptör olduğunu ileri sürüldü.

MiR-30e, miR-30 ailesinin bir üyesidir. Bu ailenin de aynı miR-302/367 gibi kök hücrelerinin kendini yenileme ve yeniden programlama gibi çeşitli biyolojik süreçlerde rol aldığı ve apoptozu düzenleyebildiği düşünülmektedir.

Alkilleyici bir ajan olan siklofosfamid; granüloza hücrelerinde DNA'nın çapraz bağlanmasına müdahale ederek hücre bölünmesine dahil olur ve mitokondri üzerinden Bcl-2 ekspresyonunu düzenleyerek apoptozu tetikler.

Mitokondrinin POY'deki rolünün aydınlatılabilmesi ve bu sayede POY tedavisinde önemli bir terapötik hedefi temsil edip etmediğinin gösterilebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu açıktır.

Bu çalışmada siklofosfamid ile mitokondriler üzerinden ovaryen yetmezliğe sokulan sıçanlardaki parkin bağımlı ve bağımsız mekanizmaların kuersetin ve kurkuminin ile ortaya çıkan değişiklikleri; follikül sayımı, immunohistokimyasal proteinler, mRNA'lar ve bunlarla ilişkili miRNA'lar aracılığıyla incelenerek, kuersetin ve kurkuminin POY'nde koruyucu ve tedavi edici etkilerinin araştırılması amaçlandı.

II. GENEL BİLGİLER

2.1 Prematür Ovaryen Yetmezlik

2.1.1 Tarihçe ve Tanı Kriterleri

Her kadında gelişen oosit sayısı farklılık göstermekle birlikte 20. Gebelik haftasında yaklaşık 6-7milyon kadar germ hücresi vardır. Bu hücrelerin doğuma kadar yalnızca yaklaşım 1-2 milyonu kalır. Daha doğmadan azalmaya başlayan oosit havuzu ergenliğe kadar 300.000'e kadar düşer. Follikül sayısının 1000'e düşmesi menopoz için kritik değer olarak kabul edilmiştir (1–3).

Üreme fonksiyonlarının yitirilme zamanı kadınlarda oldukça değişkenlik gösterir. Menopozun ortaya çıkış zamanlamasındaki bu değişkenliğin başlangıçtaki oosit havuzundaki miktardan mı yoksa tükenme sürecindeki farklılıklardan mı kaynaklandığı net olarak bilinmemektedir. Menopoz yaşı yaklaştıkça erken folliküler gelişim nedeni ile adet döngüsünün süresi kısalır ve onu adet düzensizliği izler. Son olarak üreme fonksiyonunun tam olarak yitirildiği menopoz sonrası dönem başlar (4).

Kadınların yaklaşık %1 kadarını etkileyen ve 40 yaşından önce over fonksiyon kaybı ile kendini gösteren POY literatürde ilk kez 1942 yılında Fuller Albright tarafından tanımlanmıştır. Primordial follikül havuzunun erken tükenmesiyle ortaya çıkan bu hipergonadotropik hipogonadizm tablosu, hastada düzensiz adet görme ya da adet görememe yakınmasına neden olur. Over fonksiyonlarının erken kaybı sıklıkla subfertilite veya infertilite ile sonuçlanabilmektedir. Ayrıca ortaya çıkan hipoöstrojenik tablo erken menopozun bir sonucu olarak sıcak basması, gece terlemesi, uyku bozuklukları, libido azalması, kemik erimesi ve kardiyovasküler problemler gibi semptomlara neden olmaktadır (5).

Tanı menstrüel yakınmaların laboratuvar sonuçları ile doğrulanmasına dayanır. Semptomlar detaylı biçimde sorgulanmalı, gonodotoksik maruziyet ve aile geçmişine özellikle dikkat edilmelidir. Diğer endokrinopatiler açısından da hasta mutlaka sorgulanmalıdır. Fizik muayene ile otoimmün hastalık belirteçleri ile hipoöstrojenite bulguları aranmalıdır. Radyolojik görüntüleme şart olmamakla birikte düşük antral follikül sayısının izlenmesi, ince bir endometriyal eko ile serum anti-müllerian hormon seviyelerinde belirgin düşüş saptanması POY tablosu ile tutarlılık gösterir (6).

Biyokimyasal doğrulamanın yapılabilmesi için serum follikül uyarıcı hormon (FSH) ve östradiol (E2) seviyeleri en az bir ay süreyle iki kez ölçülmelidir. Düşük E2 seviyesine eşlik eden 25 IU/L'den yüksek FSH değerleri tanıyı destekler (7). POY teşhisi için aşağıdaki 3 kriterin varlığı değerlendirilir;

- 4 ay veya daha uzun süre devam eden sekonder amenore
- 40 yaşından genç olmak
- Birer ay ara ile 2 kez bakılan FSH değerinin 40 mIU/mL'dan büyük olması

POY kliniği zamanla kendini gösterir. Hastalarda ara ara over fonksiyonlarının geri dönebileceği ve spontan mentrüasyon olabileceği unutulmamalıdır. Geçici remisyon sebebiyle ender de olsa gebeliğin oluşabileceği bu durumda spontan gebelik olasılığı %10 olarak bildirilmiştir (8). Bu sebeple tanının gecikmemesi için adet düzensizliğinin varlığı ileri değerlendirmeyi hak eder, amenore şartı aranmaz.

2.1.2 Patofizyoloji

Yumurtalık rezervinin temelini primordial folliküller oluşturmaktadır ve düzenli olarak uyuyan folliküllerin uyarılması ile birlikte folliküler gelişim meydana gelir. Doğurganlık için temel kaynak olan primordiyal folikül havuzu tükendiğinde, kısırlığa neden olabilecek ovaryen yaşlanma meydana gelir. POY temel olarak primordial havuzdaki kayıpla ilişkilidir (9). POY

çoğunlukla kendini idiopatik olarak göstermektedir. Tanımlanabilir nedenler arasında genetik, otoimmün, enfeksiyonal, metabolik ve iyatrojenik sebepler bulunmaktadır.

Metabolik sebeplere galaktozemi, 17-α hidroksilaz ve aromataz eksikliği örnek olarak verilebilir. Otozomal resesif bir hastalık olan galaktozemiye POY eşlik etme oranı %80-90 olarak bildirilmiştir. Tartışmalı olmakla birlikte bazı enfeksiyonlardan sonra POY gelişebilir. Bunlara kabakulak ooforiti, tüberküloz, sıtma, şigelyoz, suçiçeği ve sitomegalovirüs enfeksiyonu örnek olarak verilebilir. (10).

İyatrojenik nedenler içerisinde yaşam şartları, çevresel koşullar ve toksinler yer alır. Sigara kullanımı içerisinde yer alan nikotin ve polisiklik aromatik hidrokarbon gibi toksik maddeler apoptoz aracılığı ile folliküler atreziye neden olarak menopoz yaşını erkene çekebilir (11). 4-Vinilsiklohekzen plastik sanayi, böcek ilaçları ve lastik gibi maddelerde bulunan kimyasalın primordial ve primer folliküllere zarar vererek overler için toksik olduğu düşünülmektedir(12).

Histerektomiye eşlik eden bilateral ooferektomi gibi iyatrojenik nedenler de POY'ne neden olur. Malignite tedavisi sırasında gonodotoksik radyoterapi veya kemoterapi maruziyeti bir başka iyatrojenik nedendir(13). Radyoterapinin tipine ve maruz kalınan doz miktarına bağlı olarak over üzerindeki etkisi değişmektedir. Tekrar eden düşük dozlamanın bir defalık yüksek doz verilmesine göre daha güvenli olduğu bulunmuştur (14). Kemoterapinin de over üzerindeki toksik etkisi ajanın tipine, dozuna göre farklılık göstermektedir. Özellikle alkilleyici ajanların gonodotoksik özellikte olduğu bilinmektedir. Siklofosfamid hem malignite tedavisinde hem de deneysel çalışmalarda öne çıkan alkilleyici bir kematerapötiktir. Mitotik aktivitenin yoğun olduğu dokuları hedefleyen kemoterapötik ajanlar folliküllerden önce stromal hasara neden olurlar (15). Kemoterapi ile birlikte radyoterapi alınması POY gelişme riskini çok daha fazla artıracaktır.

Genetik nedenlerde ise Turner sendromu, Trizomi X ve Frajil X sendromu öncelikli olarak karşımıza çıkar. Hastaların yaklaşık %15'inde tek gen mutasyonu ya da patogenezde rol oynayan kromozomal bir anomali

tanımlanmıştır (16). Bu anomaliler çoğunlukla X kromozom kaynaklıdır. Ayrıca deneysel model çalışmaları follikül gelişim ve oogenez sürecince BMP15, NR5A1, FSHR, CYP17 ve CYP17 gibi genlerin etkin rol oynayabileceği sonucuna varmıştır (17). POY oluşumuna, yumurtalık gelişimi ve işlevi için kritik olan; DNA onarımı, mayoz, germ hücre alımı ve steroidogenez dahil olmak üzere bir dizi yolda fonksiyon genlerin bozukluğu neden olabilmektedir.

POY'ne eşlik edebilen durum ve patolojiler Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1 : Prematür Ovaryen Yetmezlik ile ilişkilendirilmiş Patolojiler

Genetik Sebepler	**Metabolik Sebepler**	**Otoimmün Sebepler**	**İyatrojenik Sebepler**
Turner Sendromu	Galaktozemi	Vitiligo	Çevresel Faktörler ve Toksinler
Trizomi X	17-α hidroksilaz eksikliği	Otoimmün hemolitik anemi	Radyoterapi
X Kromozom delesyonları	Aromataz eksikliği	SLE	Kemoterapi
FMR1 Gen Mutasyonları		Romatoid artrit	Cerrahi İşlem
İsokromozomlar		Crohn Hastalığı	
		Sjögren Sendromu	
		Tip- 1 DM	

Altta yatan patofizyolojinin ve yolakların net olarak aydınlatılabilmesini hedefleyen çalışmalar günümüzde hala devam etmektedir. Mitokondriler hücrelerin yaşam döngüleri içerisinde birçok hayati öneme sahip roller üstlenirler. Mitokondrilerce gerçekleştirilen oksidatif fosforilasyonun bir ürünü olan ROS zararlı gibi görünse de, aşırı üretilmediği takdirde antimikrobiyal işleve sahiptir ve sinyal molekülü olarak görev alarak otofajiyi düzenler (18). ROS aynı zamanda hücresel sinyalleşmede ikincil haberci olarak görev alır ve mayoz bölünme, ovülasyon ve folliküler gelişmede görevlidir (19).

Hücre döngüsünde önemli bir rol oynaması ve over yetmezliğine neden olabilmesi sebebiyle mitokondriyel fonksiyon bozukluğunun aydınlatılması bu sebeple büyük önem taşımaktadır. Hasarlı mitokondriler ubikuitin-proteazom sistemi ve otofaji-lizozom sistemi olmak üzere iki ana yolak üzerinden ortadan kaldırıldığı bilinmektedir. Otofaji lizozom yolağı mitofaji adı verilen özel bir sistemi içerir. Bu yolak üzerindeki motifajinin spesifik düzenleyicileri POY patogenezinin aydınlatılmasında özel önem taşımaktadırlar (20). Mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun belirtileri enerjinin çokça ihtiyaç duyulduğu kalp, beyin ve kas hücrelerinde görülebildiği gibi; hipogonadizm, diyabet, guatr ve adrenal disfonsiyon ile de gösterebilir (21,22).

Hipogonadizme neden olan mitokondriyal fonksiyon bozukluğu mutasyonları mtDNA, mtRNA ve mitokondriyal protein sentez ile ilgilidirler. Bu yolakta yer alan monogenik mutasyonların POY'in patogenezinde rol aldığı düşünülmektedir (23).

2.1.3 Klinik Komponent ve Tedavi

Hafif klinik tablo ve farkındalık eksikliği sebebiyle hastaların tanı alması gecikebilir. Aynı zamanda POY'e neden olan patolojiye özgü semptomlarla da kendini gösterebilir. Otoimmün hastalıklarla birlikteliği göz önüne alındığında eşlik eden otoimmün patolojilerin teşhisi için adrenal ve tiroid fonksiyonlar mutlaka gözden geçirilmelidir (24). Sistematik proinflamatuar durumlar yumurtalık homeostazına olumsuz etki ederek POY tablosu oluşumuna sebep olabilir. POY olan kadınların yaklaşık %5'inde otoimmün ooforit olduğu düşünülmektedir (25).

Gonodal disgenezilerin aksine POY olan kadınların overleri yüksek doz gonodotropinlere dirençli olmalarına rağmen follikül içerirler. Ancak bu direnç nedeni ile oosit bağışı olmadan spontan gebelik şansı son derece azdır (13).

Sıcak basması, amenore gibi erken menopozun sebebiyet verdiği klinik tablonun yanı sıra daha az bildirilmekle birlikte göz kuruluğu, saç dökülmesi ve

idrar inkontinansı ile de kendini gösterebilir (26). Bu semptomların bir özeti Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2 : Prematür Ovaryen Yetmezlikte Klinik Belirtiler

Menstrüel Düzensizlikler
Kardiyovasküler Problemler
Bilişsel Değişiklikler
Eklem Ağrısı
Enerji Azalması
Hiperpigmentasyon-Adrenak Yetmezlik (otoimmün)
Anksiyete/Depresyon
Osteoporoz
Guatr (otoimmün)
Vitiligo (otoimmün)
Sıcak Basması/Soğun intoleransı
Subferitilite/İnfertilite

Hastalara tedavi planlanırken kapsamlı bir psikolojik destek sağlanmalı ve hipogonadizmin olası kötü sonuçlarından korunmak amaçlanmalıdır. Düşük östrojen değerleri osteoporoz ve kardiyovasküler hastalıklar için risk teşkil etmektedir. Ayrıca hastanın menopozal semptomlar nedeniyle azalan yaşam kalitesine çözüm sunulmalıdır. Bu amaçla fizyolojiye uygun bir progesteron ile desteklenmiş östrojen tedavisi başlanabilir. Hormon replasman tedavisi planlanan hastalarda anamnez detaylandırılmalı ve ailesel kanser öyküsü mutlaka sorgulanmalıdır (27).

2.2 Mitofaji Proteinleri ve MicroRNA'lar

Mitokondri hücre için hayati öneme sahip metabolik işlevleri gerçekleştirirken aynı zamanda hücre için sitotoksik olan oksidatif stres ürünleri ortaya çıkarmakta ve mitokondriyal hasara sebep olmaktadırlar. Ortaya çıkan bu hasar daha fazla ROS üretilmesine, hücresel işlev kaybına ve hücresel yaşalanmaya sebep olabilmektedir (28). Mitokondriyal otofaji seçilmiş işlevsiz mitokondrileri ortadan kaldıran mitokondriyal regülasyonun ve kalite kontrolünün önemli bir parçasıdır. Hasarlı mitokondriyi ortadan kaldıran mitofaji yanıtına PINK1/Parkın yolu ile mitokondriyel proteinlerin doğrudan LC3 ile etkileşime girmesi aracılık etmektedir.

Mitokondriyal stres sensörü olarak görev alan PINK1 sağlıklı mitokondrilerde dış zar üzerinde yer alır. İşlevsiz mitokondrilerin ortadan kaldırılmasını sağlayan bu sistemde aktifleşmiş PINK1 ubiquitin ve Parkin'i fosfarilleyerek Parkin molekülünün mitokondriye girişini sağlar. Parkinin mitokondriye girişinin ardından E3 ubiquitin ligaz aktivitesi yolu ile mitokondriyal membran ve matris proteinlerinin denatürasyonunu sağlar (29).

Mitokondriyal fisyon ve füzyon aracılığı ile mitokondriyal dinamikler yeniden düzenlenerek mitofajik yolaklarla birlikte mitokondriyal kalite kontrolünde görev alırlar (30). Parkin molekülünün içeriye alınmasına mitokondriyal füzyondaki ciddi bir kusur da sebep olabilir.

FUNDC1 mitokondriyel klirensi düzenleyen bir mitofaji reseptörüdür. Üzerinde BNIP3L/Nix ve FUN14 alanları bulunmaktadır. FUNDC1 reseptörlerinin fosforile ya da defosforile hale gelmesi ile LC3 ve diğer otofaji proteinleri ile etkileşimleri artar ve mitofaji yolağı tetiklenir (31). BNIP3L/NIX'in ise mitokondriyal membran potansiyel kaybını tetikleyerek mitokondriyel bozulmayı tetiklediği düşünülmektedir (32). Bir dış zar proteini olan NIX BCL-2 ile birlikte retikülositlerdeki mitokondrilerin ortadan kaldırılmasında görev almaktadır. NIX de aynı FUNDC1 gibi LC3 için etkileşim bölgesi içerir ve mitokondriyi otofagozom için işaretleyen reseptör görevi görür.

MikroRNA'lar, 20-22 nt uzunluğundaki küçük kodlamayan RNA'lardan oluşan bir grup, 3′ çevrilmemiş bölgeleri (UTR'ler) ile etkileşime girerek hedef genleri düzenler. Mitokondriyel mitofajide ve apoptozda önemli roller alan microRNA'ların (miRNA) aynı zamanda tümör proliferasyonu, invazyon ve metastazda da rol aldığı çalışmalar tarafından gösterilmiştir (33,34). Organ gelişimi ve doku farklılaşması gibi çeşitli biyolojik süreçlerde yer aldığı gibi follikülogenez aşamasında da görev alırlar. Follikül oluşum ve gelişim döngüsündeki fonksiyonel rollerini ortaya çıkarmak patogenezi aydınlatmak açısından önem taşımaktadır. POY ile ilişkilendirilmiş miRNA'ların mitokondriyal otofajiyi düzenleyebildiği düşünülmektedir (13). MiRNA'ların otofajik modülasyonda yer aldığının anlaşılmasının ardından çalışmaların yönü değişmiştir. MiR-137'nin mitofaji reseptörü olarak tanımlanan FUNDC1 ve NIX üzerinden hipoksi kaynaklı mitofajiyi inhibe ettiği düşünülmektedir (35). Aynı zamanda yine bir otofaji reseptörü olarak tanımlanan miR-181a'nın ATG5'i hedefleyerek otofaji inhibitörü olarak çalıştığı gösterilmiştir (36,37).

Hücre döngüsünün düzenlenmesinde, hücresel kendini yenilemede, farklılaşma ve hücresel çoğalmada önemli roller üstlenen miR-302/367'nin de aynı miR-30'e gibi apoptozu düzenleyerek hücresel yeniden programlama da rol aldığı düşünülmektedir (38).

2.3 Kurkumin

Zerdeçal olarak da bilinen curcuma longa bitkisi Güneydoğu Asya'ya özgü bir baharattır. Kök kısmının kurutulmuş sapından elde edilen fitokimyasal haline kurkumin denmektedir. Anti-inflamatuar, antimikrobiyal, kemoteropatik ve antioksidan özellikleri keşfedildiğinden beri kurkumine olan ilgi artmış durumdadır.

Lipofilik bir madde olan kurkumin midenin asidik pH'ında oldukça kararlı bir polifenol bileşiğidir. Suda çözünmez ve bağırsaklar yoluyla emilerek tetrahidrokurkumin adlı metabolite dönüşür. Tetrahidrokurkumin tüm vücuda

yayılarak safra yoluyla atılır. Oral kullanımda biyoyararlanım oldukça düşüktür ve gaita yoluyla büyük oranda vücuttan uzaklaştırılır(39,40). Biyoyararlanımı oldukça düşük olmasına rağmen oral yol ile uygulanan 200 mg/kg'lık ve 600mg/kg'lık oral dozunun karaciğer inflamasyonu ve hiperplazisini etkin bir şekilde inhibe ettiği bildirilmiştir (41).

Gıda renklendirici, katkı maddesi, tatlandırcı ve kozmetik ürünlerde renk verici olarak kullanımı olduğu gibi geleneksel tıpta da uzun süredir tedavi edici amaçlarla yer bulmaktadır (42).

Antioksidan özelliğini nitrik oksit sentezini baskılayarak ya da primer metoboliti olan tetrahidrokurkumin aracılığı ile yapar. Serbest oksijen radikallerine SOD, katalaz, glutatyon peroksidaz ve glutatyon-S-transferaz gibi antioksidanların aktivitelerini artırarak etki gösterir (43).

Kurkuminin anti-inflamatuar etki göstererek apoptozu ve nekroza uğrayan folliküler hücre sayısını azalttığı ve mayotik olgunlaşmayı iyileştirdiği, buna bağlı olarak da deneysel yolla bozulmuş olan ovaryan fonksiyonları olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (44). Kurkuminin ayrıca konak makrofajları, doğal öldürücü hücreler ve lenfasit aracılı fonksiyonlar üzerine immünomodülatör etkisi olduğu gösterilmiştir (45).

2.4 Kuersetin

Kuersetin yeşil yapraklı sebzeler ile turunçgiller, elma, üzüm, kiraz gibi meyvelerde bol miktarda bulunan ve çeşitli biyoaktif özellikler sergileyen bir polifenol flavanoiddir. Latince adı quercetumdur ve sarı bir pigment maddesi olarak bulunur (46).

Antioksidan ve antiviral etkinliğinin yanı sıra, hücre döngüsünü ve apoptozisi düzenleyici rölü de bulunmaktadır. Yapısındaki C3 konumunda bulunan OH ve katekol düzeneği sayesinde serbest oksijen radikallerini zararsız hale getirerek antioksidan özellik gösterir (47). Ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ederek reaktif oksijen türlerine karşı etki eder, vücudu iskemi

reperfüzyon hasarından koruyarak kardiyoprotektif etki gösterir. Aynı zamanda antibakteriyel, antiprotozoal ve nöroprotektif etkilere sahiptir (48).

Protein kinaz C inhibisyonu ile anjigonezis inhibisyonu yaparak antikanserojen etki gösterir(49). Literatürde mide, meme, akciğer, nazofaringeal, kolorektal, prostat, böbrek, pankreas ve over kanseri gibi pek çok kanser türünde olumlu yönde etkili olduğu bildirilmiştir (50–52).

Gastrointestinal kanaldan emilimi azdır ve ilk geçiş metabolizması, gastrointestinal kararsızlığı nedeniyle zayıf biyoyararlanıma sahiptir. Günlük 1g'lık oral doza kadar güvenli kabul edilmiştir. Zayıf emilimi ve yaklaşık %2'lik biyoyararlanıma sahip olması nedeniyle terapötik etkinliğin artırılabilmesi için iyileştirilmiş oral formlara ihtiyaç vardır (53,54).

2.5 Siklofosfamid ve Over Üzerindeki Etkisi

Alkilleyici bir ajan olan siklofosfomid kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan oldukça etkili bir kemoterapatiktir. Gonadlar üzerindeki toksit etkiyi glutatyon tükenmesini takiben ROS üreten aktif metabolitleri aracılığıyla gösterir. Oksidatif strese neden olur, DNA hasarını indükler ve granüloza hücre apoptozunu başlatır (55). Siklofosfamid sitokrom p450 enzimlerince 4-hidroksisiklofosfamide çevrilir. 4-hidroksisiklofosfamid ise kendiliğinden gonodotoksik form olan aktif metabolite ayrışır. Aktif siklofosfamid metobolitleri DNA hasarı sonucunda apoptotik yolakların uyarılması ile hızlı çoğalan hücrelerde yıkıma neden olur (56).

Granüloza hücreleri folliküler büyüme açısından oldukça önemlidir. Folliküler büyüme için gerekli hormon takviyesinde bulunurlar. Yüksek mitotik aktiviteleri sebebiyle granüloza hücreleri siklofosfamid için hedef hücre haline gelmektedirler. Siklofosfamide bağlı oluşan hasarın geri döndürülebilir olması maruziyetin süresine, dozuna, yumurtalık rezervine ve hastanın yaşına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (57,58).

Artmış folliküler atrezi ve apoptoz POY patogenezinde önemli bir mekanizmadır. Siklofosfamidin neden olduğu yumurtalık toksisitesinin, yumurtalığın hem yapısal hem de fonksiyonel özelliklerinde, özellikle primordial ve antral foliküllerin yıkımında ve baskılanmış E2 üretiminde geçici değişiklikler olarak sergilendiği düşünülmektedir (59). Siklofosfamid gibi kemoterapatik ajanlar mitokondriyal membran potansiyelini azaltarak hücre sitoplazmasında sitokrom c birikmesine sebep olur. Bu durum kaspaz yolağını aktif ederek mitokondri üzerinden apoptoz mekanizmasını başlatır. Proapoptotik bir protein olan Bax proteininde de artış olduğu görülmüştür. Bax mitokondri zarına bağlanarak zar potansiyelini azaltır ve kaspaz yolağı üzerinden hücre ölümü gerçekleşir (60). Yapılan çalışmalar siklofosfamid tedavisinin overlere iki yönlü bir mekanizma ile etki ettiğini gösterdi. Siklofofamid bölünen hücreler için toksik etki ederek aktif olarak büyüyen foliküllerini öldürürken, aynı zamanda hareketsiz follikülleri de harekete geçirerek büyümelerini ve çoğalmalarını sağlar. Bu da onları ilacın etkilerine karşı daha duyarlı hale getirir. Bu şekilde siklofosfamid tedavisi ovaryen rezervi tüketerek erken yumurtalık yetmezliğine ve infertiliteye yol açar (61).

Hayvan deneylerinde kullanılan tek bir 20 mg/kg'lık siklofosfamid dozunun bile primordial folliküllere toksik etki ettiği bildirilmiştir. Siklofosfamidin 200 mg/kg tek bir doz ile 72 saat sonra primordial folliküllerde %72'lık bir azalmaya sebep olduğu kaydedilmiştir (56,62).

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 20.09.2022, 239 numaralı onayı ile yapıldı. Çalışmada kullanılan malzemeler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2021-064 nolu proje ile desteklenmiştir.

3.1. Deneysel Çalışmanın Yeri ve Deneklerin Türü:

Çalışmamızda sıçanlar üzerinde deneysel POY modeli oluşturuldu. Çalışma için 36 adet dişi, 8 haftalık, 180-260gr arasında wistar tipi erişkin sıçan kullanıldı. Hayvanlar çelik kafeslerde çiftler halinde, oda sıcaklığı (22 ± 2 ° C) olacak şekilde 12: 12 saat aralığında aydınlık ve karanlık oda da (saat 07: 00-7: 00) tutulacak; suya ve yiyeceğe istenildiği kadar erişimleri sağlandı.

Her grupta 6 sıçan olmak üzere 6 gruptan toplamda 36 sıçan kullanılacaktır. POY oluşturulmak üzere 6 gruba ayrılmış olan sıçanlardan kontrol grubu dışında kalan diğer beş grup 1. günde 70 mg / kg siklofosfamidin intraperitonal enjeksiyonu ve ardından toplam 5 kez üç günde bir olacak şekilde 30 mg / kg ile indüklendi. Kontrol grubuna yalnızca flavanoidleri çözdürmek için kullanılacak madde olan propilen glikol verildi. Çalışma toplam 6 grup halinde yürütüldü;

1. Grup: Kontrol grubu

2. Grup (Cyp): Deneysel POY oluşturulan grup

3. Grup (Kurkumin I): Deneysel POY oluşturulurken kurkumin verilen grup

4. Grup (Kuersetin I): Deneysel POY oluşturulurken kuersetin verilen grup

5. Grup (Kurkumin II): Deneysel POY oluşturulduktan sonra kurkumin verilen grup

6. Grup (Kuersetin II): Deneysel POY oluşturulduktan sonra kuersetin verilen grup

3.2. Deneysel POY Modeli Oluşturulması ve İlaç Uygulamaları:

Grup I (Kontrol) : Bu gruptaki deneklere (n=6) 4 hafta boyunca propilen glikol verildi. 6 saat aç bırakıldıktan sonra sakrifiye edilerek sağ overleri histolojik inceleme için, %10 formalin solüsyonuna, sol overleri moleküler analizler için sıvı azota alındı ve -80°C'de saklandı.

Grup II (Cyp) : Bu gruptaki deneklere (n=6) POY modeli oluşturmak için 1. günde 70 mg / kg ve ardından toplam 5 kez üç günde bir olacak şekilde 30 mg/kg siklofosfamidin intraperitonal injeksiyonu uygulandı. Ardından 3 hafta boyunca hiçbir işlem uygulanmadı. Ardından sakrifiye edilerek sağ overleri histolojik inceleme için, %10 formalin solüsyonuna, sol overleri moleküler analizler için sıvı azota alındı ve -80°C'de saklandı.

Grup III (Kurkumin I) : Bu gruptaki deneklere (n=6) POY modeli oluşturmak için 1. günde 70 mg/kg ve ardından toplam 5 kez üç günde bir olacak şekilde 30 mg/kg siklofosfamidin intraperitonal injeksiyonu uygulandı. Ardından 3 hafta POY modelinin oluşması için dinlendirildi. Ardından 4 hafta boyunca orogastrik kanül ile 100 mg/kg/gün kurkumin uygulaması yapıldı. Süreç sonunda sakrifiye edilen sıçanların sağ overleri histolojik inceleme için, %10 formalin solüsyonuna, sol overleri moleküler analizler için sıvı azota alındı ve -80°C'de saklandı.

Grup IV (Kuersetin I) : Bu gruptaki deneklere (n=6) POY modeli oluşturmak için 1. günde 70 mg/kg ve ardından toplam 5 kez üç günde bir olacak şekilde 30 mg/kg siklofosfamidin intraperitonal injeksiyonu uygulandı. Kuersetinin koruyucu etkisinin ortaya konabilmesi için siklofosfamid uygulamasının ilk gününden itibaren deneklere 4 hafta boyunca orogastrik kanül ile 30 mg/kg/gün propilen glikolde çözdürülmüş kuersetin çözeltisi uygulandı. Ardından denekler sakrifiye edildikten sonra sağ overleri histolojik inceleme

için, %10 formalin solüsyonuna, sol overleri moleküler analizler için sıvı azota alındı ve -80°C'de saklandı.

Grup V (Kurkumin II): Bu gruptaki deneklere (n=6) POY modeli oluşturmak için 1. günde 70 mg/kg ve ardından toplam 5 kez üç günde bir olacak şekilde 30 mg / kg siklofosfamidin intraperitonal injeksiyonu uygulandı. Ardından 3 hafta POY modelinin oluşması için dinlendirildi. Ardından 4 hafta boyunca orogastrik kanül ile 100 mg/kg/gün propilen glikolde çözdürülmüş kurkumin çözeltisi uygulaması yapıldı. 10. hafta sonunda denekler sakrifiye edildikten sonra sağ overleri histolojik inceleme için, %10 formalin solüsyonuna, sol overleri moleküler analizler için sıvı azota alındı ve -80°C'de saklandı.

Grup VI (kuersetin II) : Bu gruptaki deneklere (n=6) POY modeli oluşturmak için 1. günde 70 mg/kg ve ardından toplam 5 kez üç günde bir olacak şekilde 30 mg/kg siklofosfamidin intraperitonal injeksiyonu uygulandı. Ardından 3 hafta POY modelinin oluşması için dinlendirildi. Ardından 4 hafta boyunca orogastrik kanül ile 30 mg/kg/gün propilen glikolde çözdürülmüş kuersetin çözeltisi uygulaması yapıldı. 10. hafta sonunda denekler sakrifiye edildikten sonra sağ overleri histolojik inceleme için, %10 formalin solüsyonuna, sol overleri moleküler analizler için sıvı azota alındı ve -80°C'de saklandı.

3.3. Histokimyasal ve İmmünohistokimyasal Analizler

Sakrifiye edilen hayvanlardan alınan dokuların parafin takip süreci Tablo 3'deki sürelere göre uygulanmıştır.

Tablo 3 : Parafin Takibi Prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin	48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	%70 Etanol	1 gece
Dehidratasyon	% 70 etil alkol	30 dakika
	% 80 etil alkol	30 dakika
	% 95 etil alkol	1 Saat x 2
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Emdirme 60oC etüv	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Parafin kasetlere gömülen over dokular mikrotom ile 4 mikrometre kalınlıkta kesit olarak lam üzerine alınmış ve Tablo 4'deki prosedüre göre hematoksilen ve eosin boyamaları yapılmıştır.

Tablo 4 : Hematoksilen-Eozin Boyama Prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60˚C etüvde	1 saat
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	Yıkama
	% 80 alkol	Yıkama
	% 70 alkol	Yıkama
Yıkama	Akar su	10 dakika
Boyama	Hematoksilen	4 dakika
Yıkama	Akar su	10 dakika
Boyama	Eosin	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
	% 80 alkol	1 yıkama
	% 95 alkol	1 yıkama
Şeffaflaştırma	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
Kapama	Entellan	

Parafin kasetlere gömülen over dokular mikrotom ile 4 mikrometre kalınlıkta kesit olarak lam üzerine alınmış ve Tablo 5'teki prosedüre göre immünohistokimya boyamaları yapılmıştır.

Tablo 5 : İmmunohistokimya Prosedürü

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60˚C etüvde	30 dakika
Deparafinizasyon	Ksilol (3 değişim)	20 dakika
Dehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Hidrofobik kalem	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Antijen Retrieval	Sitrat Tamponu	100°C'de 20 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Endojen Peroksit İnaktivasyonu	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika

Bloklama	Protein-Blok	1 saat
Antikor ile inkübasyon	Anti-Parkin, Anti-Fundc1, Anti-BNIP3L(NIX), Anti-BNIP1	1 gece +4˚C
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Biotinlenmiş sekonder antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin-HRP	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kromojen	DAB	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Artalan Boyama	Harris' hematoksilen	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Kapama	Entellan	

3.4. Moleküler Biyolojik Analizler

3.4.1. Total RNA Sentezi

RNA izolasyonunda Hybrid R Total RNA izolasyon kiti Hybrid-R™ (GeneAll 305-101) kullanılmış ve aşağıdaki yönergelere göre izolasyon gerçekleştirilmiştir.

1000 µl Trizol (RiboEx, 301-001) mikrosantrifüj tübüne koyuldu. Ovaryum dokuları sıvı azot içinde havanda mortar ile ezilerek toz haline getirildi ve donuk doku tozu trizolün içine aktarıldı. 5 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12.000 G'de 10 dk +4°C santrifüj edildi ve süpernatantı temiz tüpe aktarıldı. Sıvı hacminin 1/5 hacminde kloroform eklendi ve kuvvetlice çalkalandı. Sonrasında 12.000 G'de 15 dk +4°C'de santrifüj edildi. Sıvı fazı yeni tüpe aktarıldı. 1 Hacim RBI buffer eklenerek çalkalandı. Tip-F minikolona 700µl kadar karışımı eklendi ve 12.000G'de 30 sn santrifüj edildi. Altta kalan sıvıyı dökerek minikolona 500 µl SWI buffer koyuldu. 12.000G'de 30 sn santrifüj edildi. Bu defa minikolona 500 µl RNW buffer koyularak 12.000G'de 30 sn santrifüj edildi. RNAz-free suyu kolonun ortasına ekleyerek (50-100 µl) 1 dk inkübe edildi ve 1 dk 12.000G'de santrifüj edilerek RNA elüe edilmiş oldu. Örnekler etiketleyip -80°'de saklandı.

3.4.2. cDNA sentezi

RNA'dan cDNA sentezi için Roche Transcriptor first strand kiti (Roche, 04897030001) kullanıldı. Her bir örnek için 1500 ng RNA kullanıldı. 4,0 µl 5X reaksiyon bufferdan, 0,5 µl RNAz inhibitörü, 2,0 µl dNTP mix, 0,5 µlreverse transcriptaz ile 1500 ng'a karşılık gelecek total RNA PCR tüpüne aktarılmıştır. miRNA cDNA sentezi için Tablo 6'daki RT primerlerden 1,0 µl kullanılırken mRNA cDNA sentezi için kit ile temin edilen 1,0 ul polyT primeri kullanılmıştır. Karışım 20µl'ye ddH2O ile tamamlanmış ve thermal cycler cihazında 25°C 5

dk, 42ºC 60 dk ve 85ºC 5 dk inkübe edilmiş ve elde edilen cDNAlar -20ºC'de saklanmıştır.

Tablo 6: MirRna CDNA Sentezi İçin Kullanılan RT-Stemloop Primerler

miR-181a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTCAACA
miR-137-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACGGAAAT
miR-30a-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAGAAGG
miR-302/367-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACAACC

3.4.3. qPCR analizi

qPCR işlemleri sırasında her bir örnek için 10 µl WizPure qPCR Master (SYBR) (WizBio, W1711), 1,5 µl 10 µM'lık forward ve reverse primer karışımı (tablo 5) (500 nmol) ve 2 µl cDNA eklenerek toplam hacim 20 µl olacak şekilde geri kalan kısım ddH2O ile tamamlandı. Tüm işlemler buz üzerinde yapıldı. Her bir gen için hazırlanan karışımlar MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Kat. No: 4346906) üzerindeki kuyucuklara her örnek 3'er tekrarlı olarak aktarıldı ve Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Kat. No: 4360954) ile kaplandı. PCR döngüsü 1x 95oC – 1 dk, 45 x (95ºC-10sn, 60ºC-15 sn, 72ºC-15sn), 72ºC-5 dk, 40oC-10 sn şeklinde programlandı ve LC480 (Roche) cihazında reaksiyon gerçekleşti. qPCR işlemi sonunda gen ifadelerindeki değişikliklerinin miktarını (kat cinsinden) belirlemek amacıyla GAPDH(mRNA) ve u6 (miRNA) referans genleri kullanılarak relatif kantitasyon 2-ΔΔCt yöntemine göre hesaplandı.

Tablo 7 : PCR için kullanılan ileri(F) ve geri(R) primerler

U6-F	CTCGCTTCGGCAGCACA
U6-R	AACGCTTCACGAATTTGCGT
miR-181a-F	TAGCTTATCAGACTGATGGGC
miR-137-F	ATCACATTGCCAGGGATTGA
miR-30a-F	ACTGCCCTAAGTGCTCATAC
miR-302/367-F	TGGCAGTGTCTTAGCTACG
GAPDH-F	GCATCTTCTTGTGCAGTGCC
GAPDH-R	GATGGTGATGGGTTTCCCGT
Fundc1-F	AGTAATGGGTGGCGTGACTG
Fundc1-R	GCAAAAAGCCTCCCACGAAG
Bnip3L-F	CAGCTGTGTGAGGGACAGAC
Bnip3L-R	GTGCACCGTGTAGGTTGCTA
Bnip1-F	CCTGGAGGTGAAGGCACTTAT
Bnip1-R	CAGGAGAGTCCGTGAAGAGC
Parkin-F	ACGCTCAACTTGGCTACTCC
Parkin-R	GGTGTTTCCCATGAGGTCGT

3.5. Follikül Sayımları

Parafine gömülü ovaryum dokuları mikrotom ile (Leica; 149MULTI0C1) 5 µm kalınlığında seri kesit alındı. Her 10 kesitten birisi lam üzerine alınarak dokunun tamamı işlendi. Hematoksilen ve eosin ile boyanan dokular üzerinde primordiyal follikül, primer follikül, atretik ve normal sekonder ve tersiyer folliküller ve korpus luteumlar ayrı ayrı sayıldı.

Follikül evreleri, Pedersen & Peters (63) morfolojik kriterlerine göre primordiyal follikül (tek katlı yassı granüloza hücreleri ile çevrili bir oosit) primer follikül (tek katlı küboidal granüloza hücreleri tabakası ile çevrili bir oosit) sekonder follikül (iki veya daha fazla küboidal granüloza hücresi tabakası ve antrum oluşumu belirtisi) ve tersiyer (büyük antral boşluk içeren çoklu granüloza hücre tabakaları) tanımlandı. Ayrıca, bu folliküller, küçülmüş oosit, granüloza hücre tabakasının düzensizliği, kondense nükleer kromatin ve/veya hücre şişmesi gibi açık bir dejenerasyon belirtisi kaydedilmemişse morfolojik olarak normal kabul edildi. Art arda gelen kesitte bulunan folliküller ikinci kez sayılmadan toplam follikül sayıları kaydedildi ve her bir follikül cinsinin toplam folliküller arasındaki yüzdesi hesaplandı.

3.7. İstatistiksel Değerlendirme:

Gruplar arası farklılık Sidak'ın çoklu kıyaslama testi ile, gruplar arasındaki farklılığın hangi gruptan kaynaklandığı ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi. İstatistiksel analiz için, GraphPad Prism 9 programı kullanıldı. $p<0.05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

4.1. Follikül Sayımı Bulguları

Follikül sayım analizine göre kontrol grubundaki tüm folliküllerden %64.62'si primordiyal folliküllerden oluşurken atretik sekonder ve tersiyer oranları ancak %0.47 seviyesindedir. Siklofosfamid grubunda ise primordiyal follikül oranı dramatik bir azalışla %29,1 iken tam tersine atretik sekonder follikül oranı ciddi bir artışla %8.98, atretik tersiyer oranı %5.26 seviyelerinde ölçülmüştür.

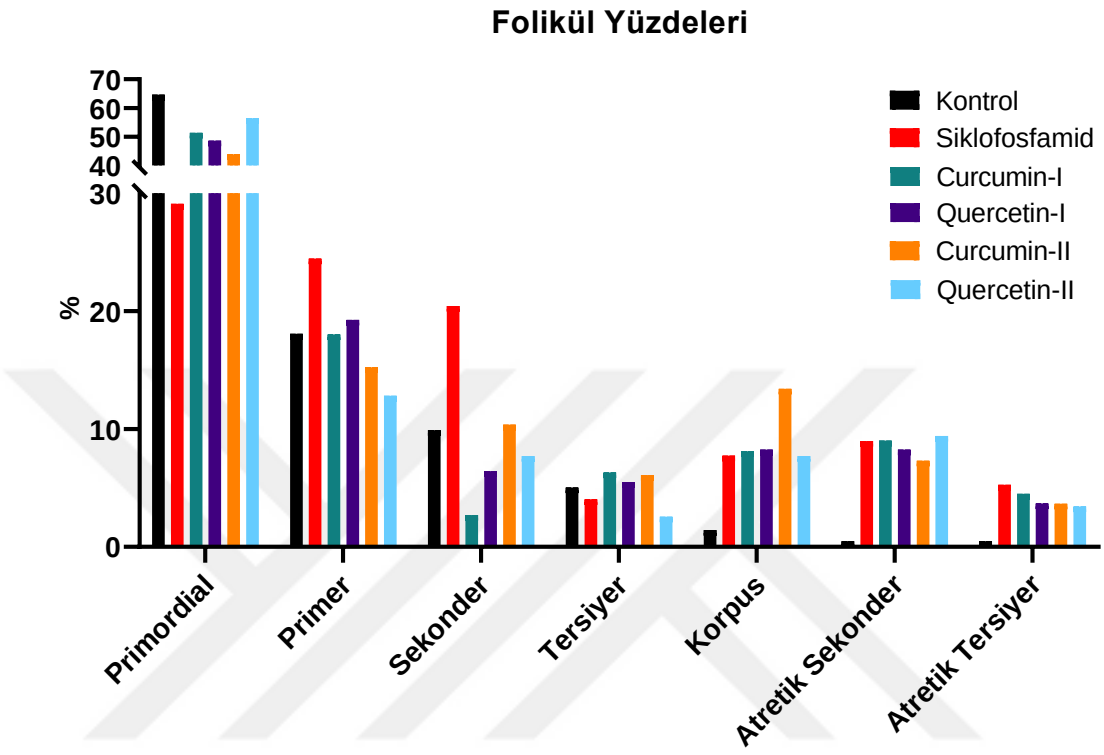
Tablo 8 : Deney Gruplarındaki Follikül Yüzdeleri

	Prim. Fol.	Primer Fol.	Sek. Fol	Ter. Fol.	KL	Atretik Sek. Fol.	Atretik Ter. Fol.
Kontrol	64,62	18,08	9,91	5,03	1,42	0,47	0,47
Cyp	29,10	24,46	20,43	4,02	7,74	8,98	5,26
Kurkumin-I	51,35	18,02	2,70	6,31	8,11	9,01	4,50
Kuersetin-I	48,62	19,27	6,42	5,50	8,26	8,26	3,67
Kurkumin-II	43,90	15,24	10,37	6,10	13,41	7,32	3,66
Kuersetin-II	56,41	12,82	7,69	2,56	7,69	9,40	3,42

Prim: Primordial, Sek: Sekonder, Ter: Tersiyer KL: Korpus Luteum, Fol: follikül.

Diğer dikkat çekici değişim korpus luteum oranlarındadır, kontrol grubunda korpus luteum oranı %1,42 ile siklofosfamid grubunda %7,74 oranındadır.

Buna karşın Siklofosfamid grubunda primer ve sekonder follikül oranları kontrol grubuna kıyasla daha yüksek sayılmıştır.



Şekil 1 : Deney Gruplarındaki Follikül Türlerinin Toplam Follikül Sayısına Yüzdeleri

4.2. İmmunohistokimyasal Bulgular:

Tüm gruplara ait dişi sıçanlardan alınan over dokularının immünohistokimyasal inceleme sonuçları değerlendirildi.

4.2.1. Parkin İmmünoreaktivitesi

Kontrol grubuna ait doku örneklerinin parkin primer antikoru ile boyanması sonucunda primer, sekonder ve tersiyer folliküllerdeki boyanmanın oldukça az olduğu tespit edildi (sırasıyla 109,2 ± 4,71, 134,6 ± 10,6, 119 ± 8,1). Buna ilave

olarak atretik sekonder (174,67 ± 7,55) ve tersiyer (185 ± 8,17) folliküllerde parkin immünoreaktivitesinin primer, sekonder ve tersiyer folliküllere göre daha fazla olduğu gözlendi.

Siklofosfamid uygulanan grupta, sağlıklı az sayıda primer, sekonder ve tersiyer follikül (sırasıyla 120,6 ± 6,75, 133,8 ± 3,71, 127,8 ± 10,65) varlığı gözlendi, bu folliküllerdeki parkin immünoreaktivitesi kontrol grubu ile benzerlik gösterdiği tespit edildi. Buna karşılık sekonder ve tersiyer atretik folliküllerdeki parkin immünoreaktivitesinin oldukça yüksek olması dikkat çekici bulundu (sırasıyla 284 ± 18,55, 305 ± 17,33).

Siklofosfamid uygulaması ile beraber kurkumin verilen grupta (Kurkumin I) tersiyer normal folliküllerde (153 ± 4) biraz fazla olmasına rağmen, parkin immünoreaktivitesi primer ve sekonder folliküllerde kontrol grubu ile benzerlik gösteriyordu (sırasıyla 112 ± 2,2; 139 ± 5,84). Kurkumin I grubunda sekonder (108,34± 2,36) ve tersiyer atretik follikül (120 ± 4,09) grubunda, parkin immünoreaktivitesi tüm gruplara göre oldukça düşük olması dikkat çekici bulundu.

Siklofosfamid uygulaması ile beraber kuersetin verilen grupta (Kuersetin I) primer, sekonder ve tersiyer sağlıklı folliküllerde parkin immünoreaktivitesi kontrol grubuna (205 ± 10,96; 210 ± 6,33; 228 ± 9,28) göre artmış gözlenirken, atretik sekonder (192 ± 7,49) ve tersiyer (225 ± 8,95) folliküllerde parkin immünoreaktivitesinin belirgin azalması dikkat çekici bulundu.

Siklofosfamid uygulaması ile POY modeli oluşturulduktan sonra Kurkumin (Kurkumin II) verilen grupta, parkin immünoreaktivitesinin sağlıklı primer sekonder ve tersiyer folliküllerde (sırasıyla 134 ± 10,68; 178 ± 18,78; 157 ± 12,89) kontrol grubuna göre artmış olduğu, sağlıklı sekonder folliküllerde bu artışın daha belirgin olduğu tespit edildi. Kurkumin I grubuna ait doku örneklerinde atretik sekonder folliküllerde parkin immünoreaktivitesinin (186 ± 8,61) olukça yüksek olduğu tersiyer folliküllerde (127 ± 104,2) immünoreaktivitenin daha az düzeyde olduğu gözlendi.

Siklofosfamid uygulanarak POY modeli oluşturulduktan sonra kuersetin verilen grupta (Kuersetin II), sağlıklı tüm folliküllerde parkin immünoreaktivitesinin (Pr:204 ± 16,56; Sek: 208 ± 10,3; Ter: 118 ± 96,42) Kuersetin I grubuna benzer biçimde oldukça yüksek olduğu tespit edildi. Atretik follikülerin incelenmesinde sekonder folliküllerde artmış parkin immünoreaktivitesi (234 ± 14,63) izlenirken, tersiyer folliküllerde artışın (101 ± 82,85) daha az olduğu tespit edildi.

Tüm grupların korpus luteumlarının parkin immünoreaktivitesinin incelendiğinde kontrol grubunda belirgin immnünoreaktivite gözlenirken (187,8 ± 14,27), siklofosfamid (157 ± 7,78) ve Kurkumin I grubunda (150 ± 3,17) immünoreaktivitenin kontrol grubuna göre azalmış olduğu tespit edildi. Kuersetin I grubunda (216 ± 9,7) en belirgin olmak üzere Kurkumin II (204 ± 8,61) ve Kuersetin II (194 ± 5,84) gruplarında immünoreaktivitenin artmış olduğu gözlendi.

Parkin primer antikoru ile boyanmış gruplarda izlenmiş olan H-Skor dağılımları Tablo 5'de gösterildi.

Tablo 9 : Parkin Primer Antikoru ile Boyanan Grupların H-Skor Dağılımları

Parkin	Kontrol	CYP	Cu-I	Que-I	Cu-II	Que-II
Primer	109,2 ± 4,71	120,6 ± 6,75	112 ± 2,2	205 ± 10,96	134 ± 10,68	204 ± 16,56
Sekonder	134,6 ± 10,6	133,8 ± 3,71	139 ± 5,84	210 ± 6,33	178 ± 18,78	208 ± 10,3
Tersiyer	119 ± 8,1	127,8 ± 10,65	153 ± 4	228 ± 9,28	157 ± 12,89	118 ± 96,42
Atretik Sekonder	174,67 ± 7,55	284 ± 18,55	108,34 ± 2,36	192 ± 7,49	186 ± 8,61	234 ± 14,63
Atretik Tersiyer	185 ± 8,17	305 ± 17,33	120 ± 4,09	225 ± 8,95	127 ± 104,2	101 ± 82,85
Corpus Luteum	187,8 ± 14,27	157 ± 7,78	150 ± 3,17	216 ± 9,7	204 ± 8,61	194 ± 5,84

4.2.2. FUNDC1 İmmünoreaktivitesi

Kontrol grubuna ait doku örneklerinin FUNDC1 primer antikoru ile boyanması sonucunda primer, sekonder ve tersiyer folliküllerdeki immünoreaktivitenin (sırasıyla 109,4 ± 3,14; 110,8 ± 4,12 108,6 ± 2,66) oldukça az olduğu tespit edildi. Atretik sekonder folliküllerde FUNDC1 immünoreaktivitesinin (185 ± 8,17) ve atretik tersiyer folliküllerde (113,2 ± 10,84) ise olduğu olduğu tespit edildi.

Siklofosfamid uygulanan grupta, FUNDC1 immünoreaktivitesinin sağlıklı primer (114,2 ± 2,64), sekonder (104,6 ± 1,36) ve tersiyer (106,8 ± 2,79) folliküllerde, kontrol grubu ile benzer özelikler gösterdiği tespit edildi. FUNDC1 immünoreaktivitesinin atretik folliküllerde de düşük düzeyde devam ettiği, atretik sekonder folliküllerde (110 ± 5,48) azalmanın kontrol grubuna göre daha belirgin olduğu, tersiyer folliküllerde (117,2 ± 5,12) ise kontrol grubu ile benzer olduğu gözlendi.

Siklofosfamid uygulaması ile beraber Kurkumin verilen grupta (Kurkumin I) FUNDC1 immünoreaktivitesinin tüm folliküllerde kontrol grubundan yüksek olduğu (Pr:125,6 ± 2,25; sek:124,8 ± 3,19; ter: 119 ± 1,55) atretik sekonder folliküllerde (110 ± 5,48) FUNDC1 immünoreaktivitesinin azalma gösterdiği, tersiyer atretik folliküllerde (121,67 ± 6,24) olduğu gözlendi.

Siklofosfamid uygulaması ile beraber Kuersetin verilen grupta (Kuersetin I) primer, sekonder ve tersiyer normal folliküllerde FUNDC1 immünoreaktivitesinin (sırasıyla 123,8 ± 5,64; 128,4 ± 4,76; 124,2 ± 7,03) kontrol grubuna göre artmış gözlenirken, atretik sekonder (141,67 ± 6,24) ve atretik tersiyer folliküllerde (130,34 ± 13,92) FUNDC1 immünoreaktivitesinin daha belirgin olması dikkat çekici bulundu.

Siklofosfamid uygulanarak POY modeli oluşturulduktan sonra kurkumin verilen grupta (Kurkumin II), FUNDC1 immünoreaktivitesi sağlıklı primer (112,5 ± 2,5) ve tersiyer (106,8 ± 1,84) folliküllerde oldukça düşük iken, sekonder folliküllerde (132,8 ± 6,74) daha belirgin olduğu gözlendi. FUNDC1

immünoreaktivitesinin atretik sekonder (119,67 ± 3,3) ve tersiyer folliküllerde (115 ± 4,09) düşük düzeyde varlığı tespit edildi.

Siklofosfamid uygulanarak POY modeli oluşturulduktan sonra, kuersetin (Kuersetin II) verilen grupta, FUNDC1 immünoreaktivitesinin sağlıklı primer folliküllerde (121,5 ± 3,5), sekonder folliküllerde (124,8 ± 3,19) ve tersiyer folliküllerde (105 ± 1,27) kontrol grubu ile benzer boyanma gözlendi. Atretik follikülerin incelenmesinde sekonder (125 ± 4,09) folliküllerde kontrol grubuna göre daha fazla bir azalma gözlendi. Atretik tersiyer folliküllerde (110,4 ± 3,27) immünoreaktivitenin kontrol grubuna benzer biçimde düşük düzeyde devam ettiği tespit edildi.

Tüm grupların korpus luteumlarının FUNDC1 immünoreaktivitesinin incelendiğinde, kontrol grubunda belirgin immnünoreaktivite (136,2 ± 5,35) gözledi. FUNDC1 immünoreaktivitesinin siklofosfamid (141 ± 6,96), Kurkumin I (129 ± 3,75) ve Kuersetin II (108 ± 2,45) gruplarında benzer olarak gözlendi. FUNDC1 immünoreaktivitesi Kuersetin I grubunda (158 ± 11,67) en fazla gözlenirken, Kurkumin II grubunda (131,2 ± 3,43) immnünoreaktivite kontrol grubuna benzer değerde bulundu.

FUNDC1 primer antikoru ile boyanmış gruplarda izlenmiş olan H-Skor dağılımları Tablo 6'de gösterildi.

Tablo 10 : FUNDC1 Primer Antikoru ile Boyanan Grupların H-Skor Dağılımları

FUNDC1	Kontrol	CYP	Cu-I	Que-I	Cu-II	Que-II
Primer	109,4 ± 3,14	114,2 ± 2,64	125,6 ± 2,25	123,8 ± 5,64	112,5 ± 2,5	121,5 ± 3,5
Sekonder	110,8 ± 4,12	104,6 ± 1,36	124,8 ± 3,19	128,4 ± 4,76	132,8 ± 6,74	124,8 ± 3,19
Tersiyer	108,6 ± 2,66	106,8 ± 2,79	119 ± 1,55	124,2 ± 7,03	106,8 ± 1,84	105 ± 1,27
Atretik Sekonder	185 ± 8,17	110 ± 5,48	110 ± 5,48	141,66 ± 6,24	119,67 ± 3,3	125 ± 4,09
Atretik Tersiyer	113,2 ± 10,84	117,2 ± 5,12	121,67 ± 6,24	130,34 ± 13,92	115 ± 4,09	110,4 ± 3,27
Corpus Luteum	136,2 ± 5,35	141 ± 6,96	129 ± 3,75	158 ± 11,67	108 ± 2,45	131,2 ± 3,43

4.2.3. BNIP3L İmmünoreaktivitesi

BNIP3L primer antikoru ile boyanan preparatların incelenmesinde sağlıklı primer (109 ± 3,41), sekonder (107,6 ± 3,2) ve tersiyer (106,4 ± 3,08) folliküllerdeki boyanmanın tüm gruplarda az miktarda, benzer değerlerde olduğu tespit edildi. Buna karşılık, BNIP3L immünoreaktivitesinin atretik sekonder (123 ± 2,83) ve tersiyer (122 ± 1,42) folliküllerde çok belirgin artış gösterdiği tespit edildi.

Siklofosfamid uygulanan grupta, BNIP3L immünoreaktivitesinin (105,6 ± 2,34), sekonder (107,6 ± 2,06) ve tersiyer (106,6 ± 1,86) folliküllerdeki boyanmanın düşük düzeyde olduğu tespit edildi. atretik sekonder (221 ± 7,73) ve tersiyer (215 ± 8,93) folliküllerde BNIP3L immünoreaktivitesinin çok belirgin artış gösterdiği dikkat çekici bulundu.

Siklofosfamid uygulaması ile beraber kurkumin verilen grupta (Kurkumin I), kuersetin verilen grupta (Kuersetin I) BNIP3L immünoreaktivitesinin primer, sekonder ve tersiyer normal folliküllerde (sırasıyla 108,6 ± 1,96; 110 ± 3,17; 116,6 ± 2,58) kontrol grubuna göre benzer olduğu gözlendi. Atretik sekonder (136,67 ± 4,72) ve atretik tersiyer folliküllerde (138,34 ± 6,24) BNIP3L immünoreaktivitesinin belirgin olarak artış olduğu tespit edildi.

Siklofosfamid uygulanarak POY modeli oluşturulduktan sonra Kuersetin verilen grupta (Kuersetin I), Bnp3L immünoreaktivitesi sağlıklı primer (106,4 ± 1,96), sekonder (105 ± 1,27) ve tersiyer (107,4 ± 2,25) folliküllerde oldukça düşük olduğu gözlendi. BNIP3L immünoreaktivitesinin atretik sekonder (141,67 ± 6,24) folliküllerde belirgin olarak arttığı, tersiyer folliküllerde (116,34 ± 0,48)ise daha düşük düzeyde varlığı tespit edildi.

Siklofosfamid uygulanarak POY modeli oluşturulduktan sonra kurkumin verilen grupta (Kurkumin II), BNIP3L immünoreaktivitesi sağlıklı primer (108,4 ± 2,06), sekonder (116,8 ± 2,79) ve tersiyer (115,6 ± 3,83) folliküllerde oldukça düşük olduğu gözlendi. BNIP3L immünoreaktivitesinin atretik sekonder (135 ± 4,09) ve tersiyer folliküllerde (124,67 ± 4,5) artmış olduğu, atretik sekonder folliküllerde artışın en yüksek düzeyde olduğu gözlendi.

BNIP3L primer antikoru ile boyanmış gruplarda izlenmiş olan H-Skor dağılımları Tablo 7'de gösterildi.

Tablo 11 : BNIP3L Primer Antikoru ile Boyanan Grupların H-Skor Dağılımları

BNIP3L	Kontrol	CYP	Cu-I	Que-I	Cu-II	Que-II
Primer	109 ± 3,41	105,6 ± 2,34	108,6 ± 1,96	106,4 ± 1,96	108,4 ± 2,06	104 ± 0,9
Sekonder	107,6 ± 3,2	107,6 ± 2,06	110 ± 3,17	105 ± 1,27	116,8 ± 2,79	108,8 ± 3,97
Tersiyer	106,4 ± 3,08	106,6 ± 1,86	116,6 ± 2,58	107,4 ± 2,25	115,6 ± 3,83	107 ± 2,76
Atretik Sekonder	123 ± 2,83	221 ± 7,73	136,67 ± 4,72	141,67 ± 6,24	135 ± 4,09	104,4 ± 3,93
Atretik Tersiyer	122 ± 1,42	215 ± 8,93	123 ± 19,4	116,34 ± 0,48	124,67 ± 4,5	138,34 ± 6,24
Corpus Luteum	114,4 ± 3,14	136 ± 4,78	143 ± 5,1	146 ± 15,63	122,8 ± 6,74	119 ± 3,75

Siklofosfamid uygulanarak POY modeli oluşturulduktan sonra, kuersetin (Kuersetin II) verilen grupta, BNIP3L immünoreaktivitesinin, sağlıklı primer folliküllerde (104 ± 0,9), sekonder folliküllerde (108,8 ± 3,97) ve tersiyer folliküllerde (107 ± 2,76) kontrol grubu ile benzer boyanma gözlendi. Atretik follikülerin incelenmesinde sekonder (107,34 ± 2,06) folliküllerde kontrol grubu ile benzer özellik gösterirken, atretik tersiyer folliküllerde (138,34 ± 6,24) immünoreaktivitenin kontrol grubuna göre belirgin artış gösterdiği tespit edildi.

Tüm grupların korpus luteumlarının BNIP3L immünoreaktivitesinin incelendiğinde, kontrol grubunda düşük immnünoreaktivite (114,4 ± 3,14) gözledi. BNIP3L immünoreaktivitesinin siklofosfamid (136 ± 4,78), Kurkumin I (143 ± 5,1) ve Kuersetin I (146 ± 15,63) gruplarında benzer biçimde yüksek gözlendi. BNIP3L immünoreaktivitesi Kurkumin II grubunda (122,8 ± 6,74) ve Kuersetin II grubunda (119 ± 3,75) kontrol grubuna benzer değerde bulundu.

4.2.4. BNIP1 İmmünoreaktivitesi

BNIP1 primer antikoru ile boyanan preparatların incelenmesinde sağlıklı primer (107,2 ± 2,49), sekonder (114 ± 2,61) ve tersiyer (120,8 ± 6,05) folliküllerdeki boyanmanın tüm gruplarda az miktarda, benzer değerlerde olduğu tespit edildi. Buna karşılık, BNIP1 immünoreaktivitesinin atretik sekonder (200 ± 4,09) ve tersiyer (270 ± 14,72) folliküllerde çok belirgin artış gösterdiği tespit edildi.

Siklofosfamid uygulanan grupta, BNIP1 immünoreaktivitesinin (126,2 ± 7,09), sekonder (104,4 ± 3,93) ve tersiyer (142 ± 10,3) folliküllerdeki boyanmanın düşük düzeyde olduğu tespit edildi. Atretik sekonder (255 ± 15,17) ve tersiyer (291 ± 9,7) folliküllerde BNIP1 immünoreaktivitesinin çok belirgin artış gösterdiği dikkat çekici bulundu.

Siklofosfamid uygulaması ile beraber kurkumin verilen grupta (Kurkumin I), kuersetin verilen grupta (Kuersetin I) BNIP1 immünoreaktivitesinin primer (143 ± 8,13) ve sekonder (167 ± 10,3) folliküllerde düşük düzeyde tespit edildi, tersiyer folliküllerde (260 ± 14,5) immünoreaktivite yüksek bulundu. Atretik sekonder (287 ± 10,78) ve atretik tersiyer folliküllerde (316 ± 14,63) BNIP1 immünoreaktivitesi belirgin olarak artmış olduğu tespit edildi.

Siklofosfamid uygulanarak POY modeli oluşturulduktan sonra kuersetin verilen grupta (Kuersetin I), Bnp1 immünoreaktivitesi sağlıklı primer (309 ± 16,56) folliküllerde belirgin olarak artmış gözlendi. Sağlıklı sekonder (228 ± 13,64) folliküllerde orta düzeyde tespit edilirken. Tersiyer (271 ± 14,97) folliküllerde Bnp1 immünoreaktivitesi daha yüksek olduğu gözlendi. BNIP1 immünoreaktivitesinin atretik sekonder (278 ± 16,92) folliküllerde orta derecede, tersiyer folliküllerde (358 ± 5,1) ise en yüksek düzeyde gözlendi.

Siklofosfamid uygulanarak POY modeli oluşturulduktan sonra kurkumin verilen grupta (Kurkumin II), BNIP1 immünoreaktivitesi sağlıklı primer (123,6 ± 5,82) folliküllerde düşük düzeyde, sekonder (251 ± 8,61) ve tersiyer (271 ± 15,94) folliküllerde orta düzeyde gözlendi. BNIP3L immünoreaktivitesinin

atretik sekonder (289 ± 14,29) artmış, tersiyer folliküllerde (230 ± 11,41) orta düzeye olduğu tespit edildi.

Siklofosfamid uygulanarak POY modeli oluşturulduktan sonra, kuersetin (Kuersetin II) verilen grupta, BNIP1 immünoreaktivitesinin, sağlıklı primer folliküllerde (327 ± 16,62) en yüksek düzeyde bulundu. Sekonder folliküllerde (211 ± 8,61) ve tersiyer folliküllerde (197 ± 11,23) orta düzeyde boyanma gözlendi. Atretik follikülerin incelenmesinde sekonder (255 ± 13,79) folliküllerde ve tersiyer folliküllerde (275 ± 19,5) immünoreaktivitenin kontrol grubuna göre belirgin düşük olduğu tespit edildi.

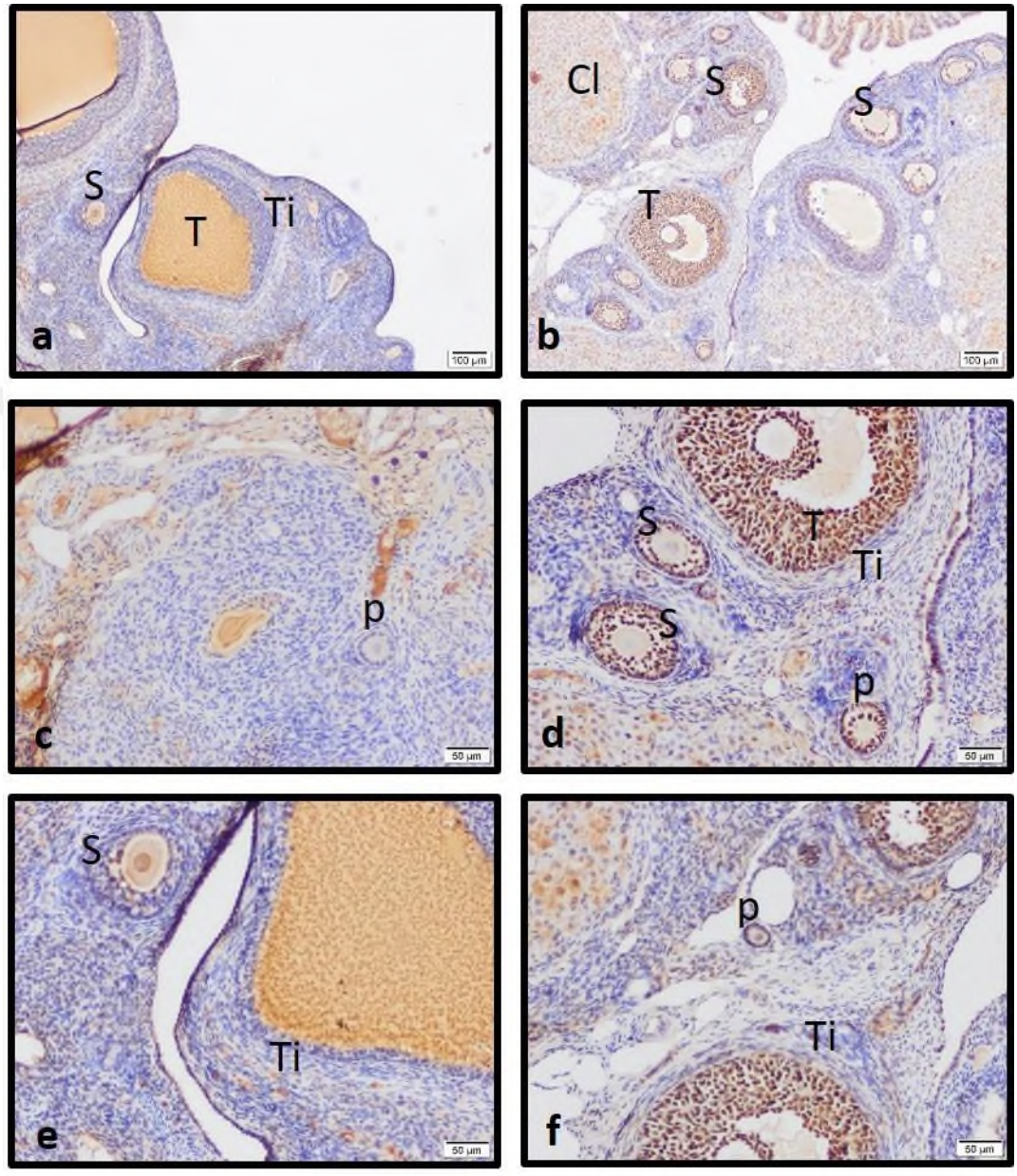
Tüm grupların korpus luteumlarının BNIP1 immünoreaktivitesinin incelendiğinde, kontrol grubunda düşük immnünoreaktivite (138,6 ± 6,92) gözledi. BNIP1 immünoreaktivitesinin siklofosfamid (237 ± 14,36), Kurkumin I (270 ± 10,49) ve Kuersetin I (258 ± 9,8) gruplarında benzer biçimde yüksek gözlendi. BNIP1 immünoreaktivitesi Kurkumin II grubunda (212 ± 12,89) ve Kuersetin II grubunda (224 ± 9,7) orta derecede gözlenirken kontrol grubundan yüksek düzeyde bulundu.

BNIP1 primer antikoru ile boyanmış gruplarda izlenmiş olan H-Skor dağılımları Tablo 8'de gösterildi.

Tablo 12 : BNIP1 Primer Antikoru ile Boyanan Grupların H-Skor Dağılımları

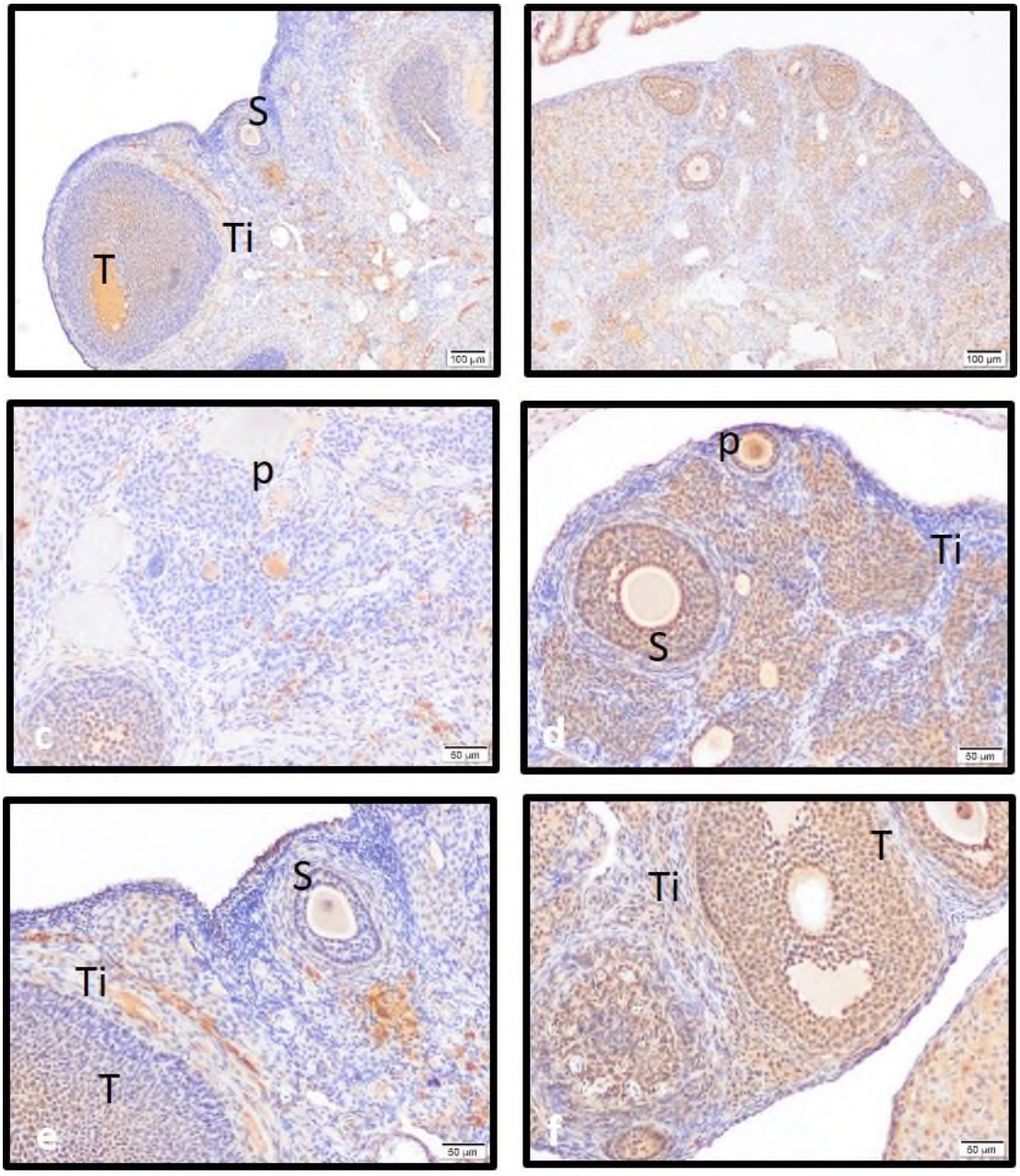
BNIP1	Kontrol	CYP	Cu-I	Que-I	Cu-II	Que-II
Primer	107,2 ± 2,49	126,2 ± 7,09	143 ± 8,13	309 ± 16,56	123,6 ± 5,82	327 ± 16,62
Sekonder	114 ± 2,61	104,4 ± 3,93	167 ± 10,3	228 ± 13,64	251 ± 8,61	211 ± 8,61
Tersiyer	120,8 ± 6,05	142 ± 10,3	260 ± 14,5	271 ± 14,97	271 ± 15,94	197 ± 11,23
Atretik Sekonder	200 ± 4,09	255 ± 15,17	287 ± 10,78	278 ± 16,92	289 ± 14,29	255 ± 13,79
Atretik Tersiyer	270 ± 14,72	291 ± 9,7	316 ± 14,63	358 ± 5,1	230 ± 11,41	275 ± 19,5
Corpus Luteum	138,6 ± 6,92	237 ± 14,36	270 ± 10,49	258 ± 9,8	212 ± 12,89	224 ± 9,7

4.3. Işık Mikroskobik Bulgular



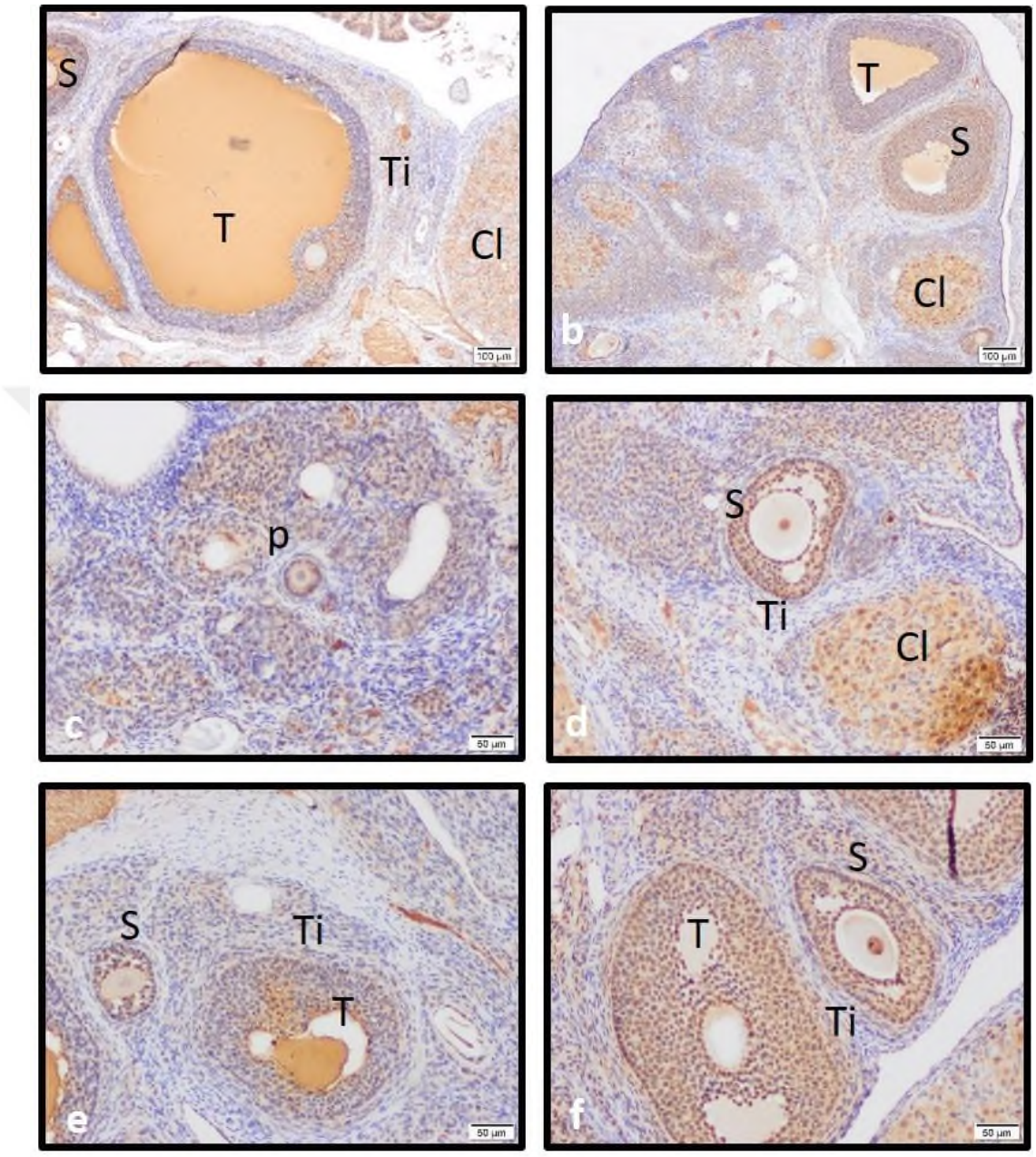
Şekil 2 : Kontrol (a, c, e) ve Siklofosfamid (b, d, f) Gruplarının Parkin İmmunoreaktivitesi

Kontrol grubunda primer (P), sekonder (S) ve tersiyer (T) folliküllerde immnünoreaktivite oldukça düşük iken, siklofosfamid grubu atretik folliküllerinde immünoreaktivitenin fazla olduğu izlenmektedir. Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.



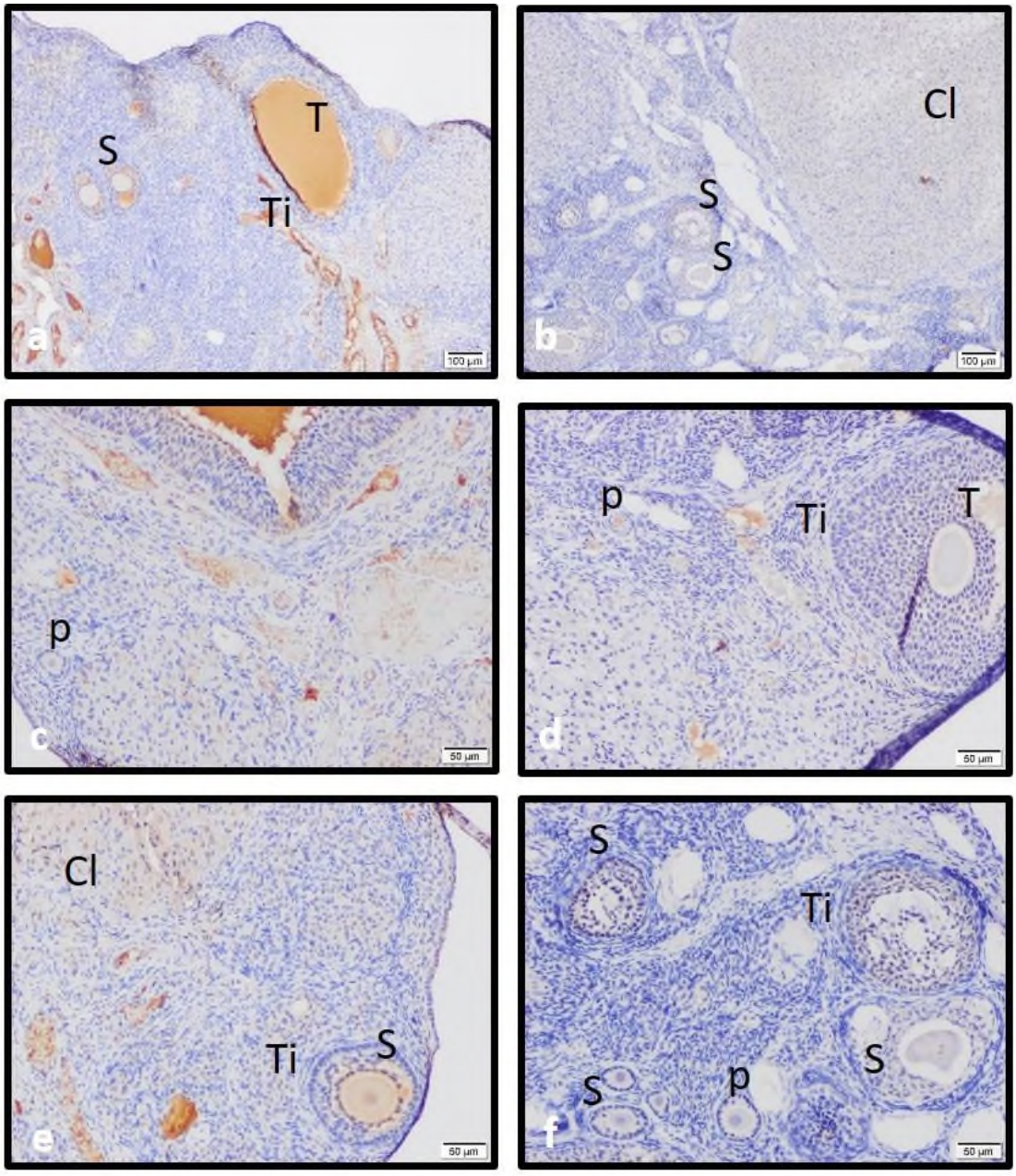
Şekil 3 : Kurkumin I (a, c, e) ve Kuersetin I (b, d, f) Gruplarının Parkin İmmunoreaktivitesi

Kurkumin I grubunda primer (P), sekonder (S) ve tersiyer (T) folliküllerde immnünoreaktivite oldukça daha az gözlenirken, kuersetin I grubu folliküllerinde immünoreaktivitenin fazla olduğu izlenmektedir. Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.



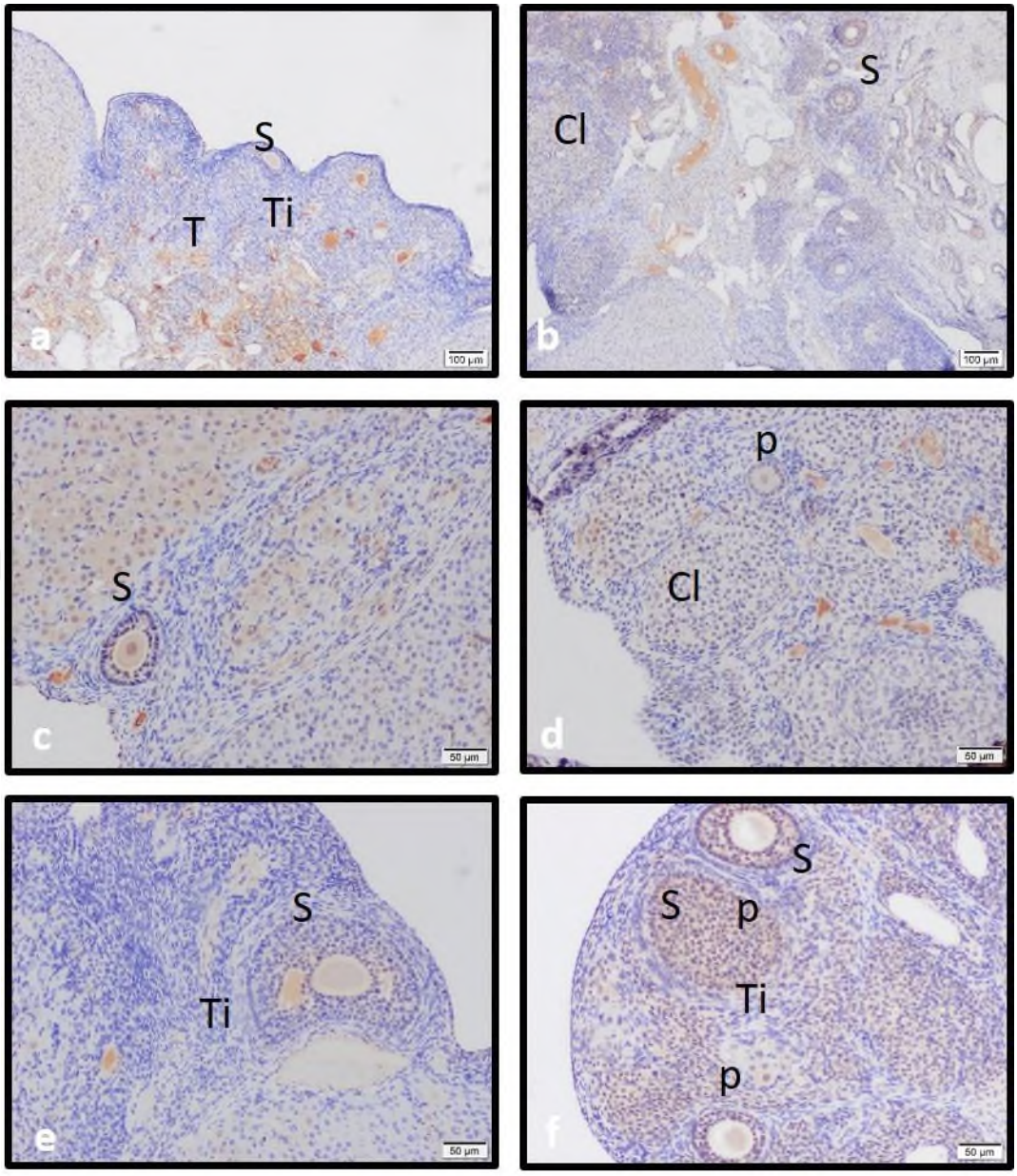
Şekil 4 : Kurkumin II (a, c, e) ve Kuersetin II (b, d, f) Gruplarının Parkin İmmunoreaktivitesi

Kurkumin II grubunda primer (P), sekonder (S) ve tersiyer (T) folliküllerde immnünoreaktivite oldukça daha az gözlenirken, kuersetin II grubu folliküllerinde immünoreaktivitenin fazla olduğu izlenmektedir. Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.



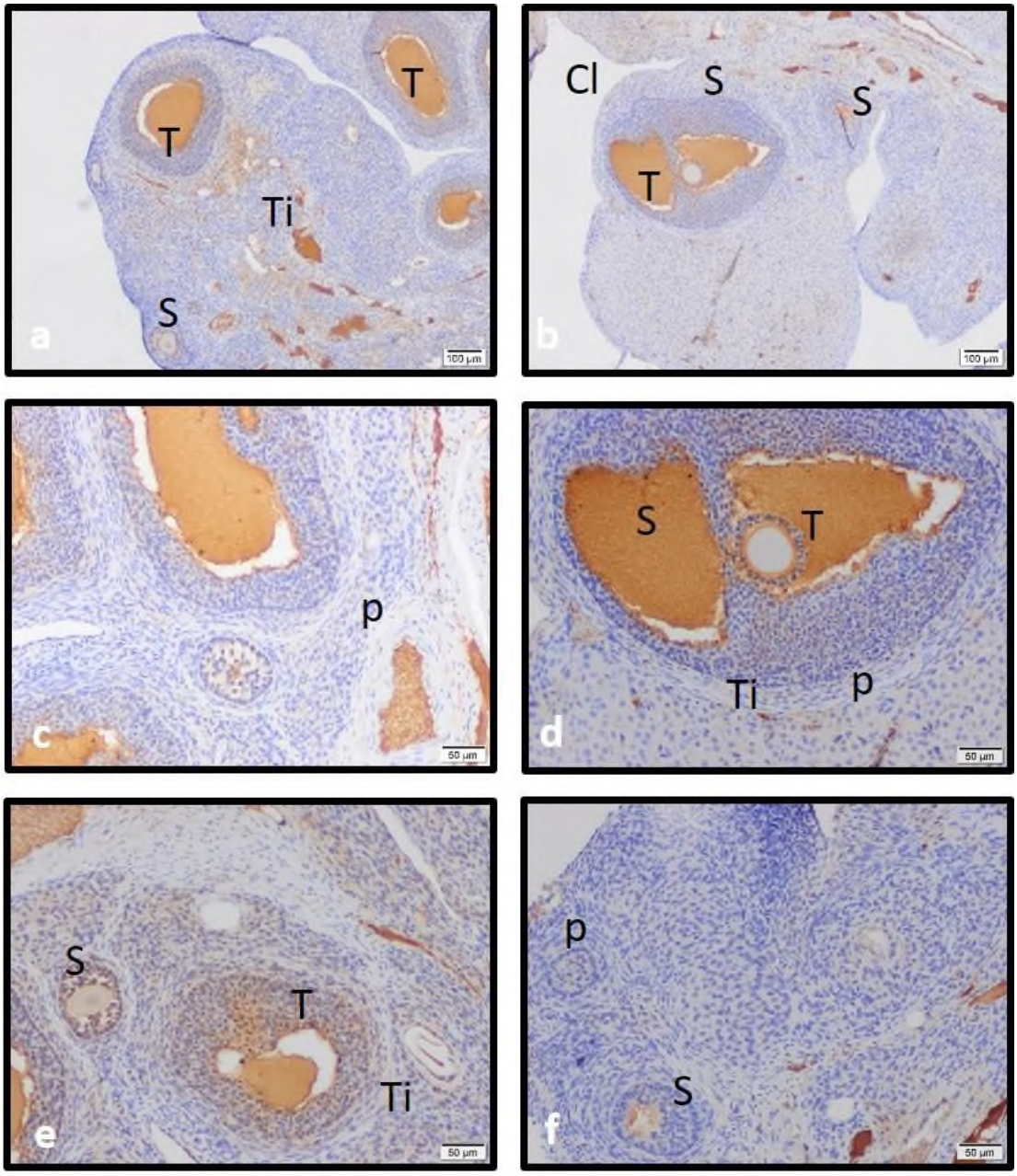
Şekil 5 : Kontrol (a, c, e) ve Siklofosfamid (b, d, f) Gruplarının FUNDC1 İmmunoreaktivitesi

Kontrol grubu atretik sekonder follikülerde belirgin boyanma gözlenmektedir. P: primer follikül, S:sekonder follikül, T: tersiyer follikül, Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.



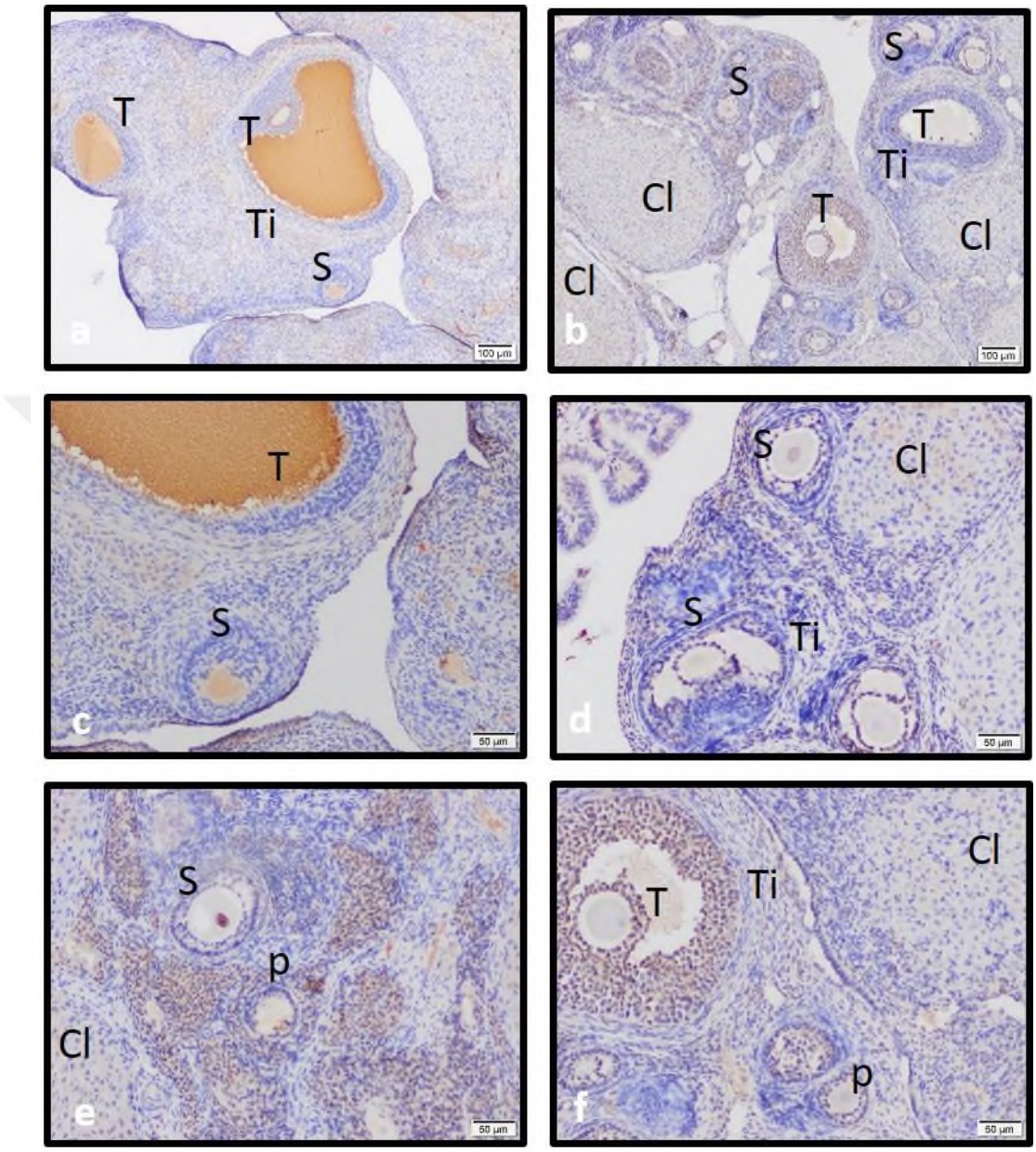
Şekil 6 : Kurkumin I (a, c, e) ve Kuersetin I (b, d, f) Gruplarının FUNDC1 İmmünoreaktivitesi

Kurkumin I ve Kuersetin I grubunda tüm follikülerde az ve benzer boyanma gözlenmektedir. P: primer follikül, S:sekonder follikül, T: tersiyer follikül, Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.



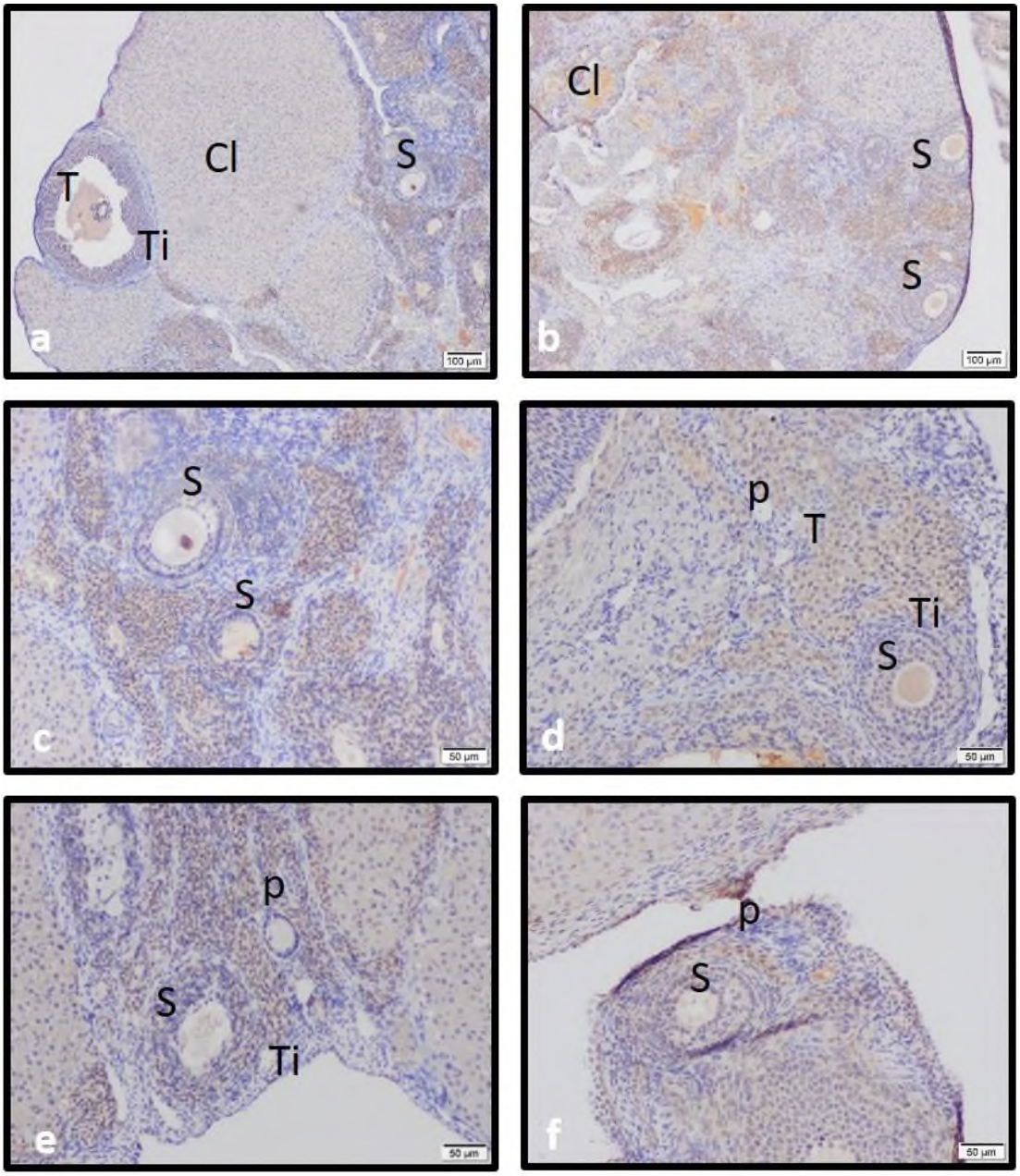
Şekil 7 : Kurkumin II (a, c, e) ve Kuersetin II (b, d, f) Gruplarının FUNDC1 İmmünoreaktivitesi

Kurkumin II ve Kuersetin II grubunda tüm follikülerde az ve benzer boyanma gözlenmektedir. P: primer follikül, S:sekonder follikül, T: tersiyer follikül, Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.



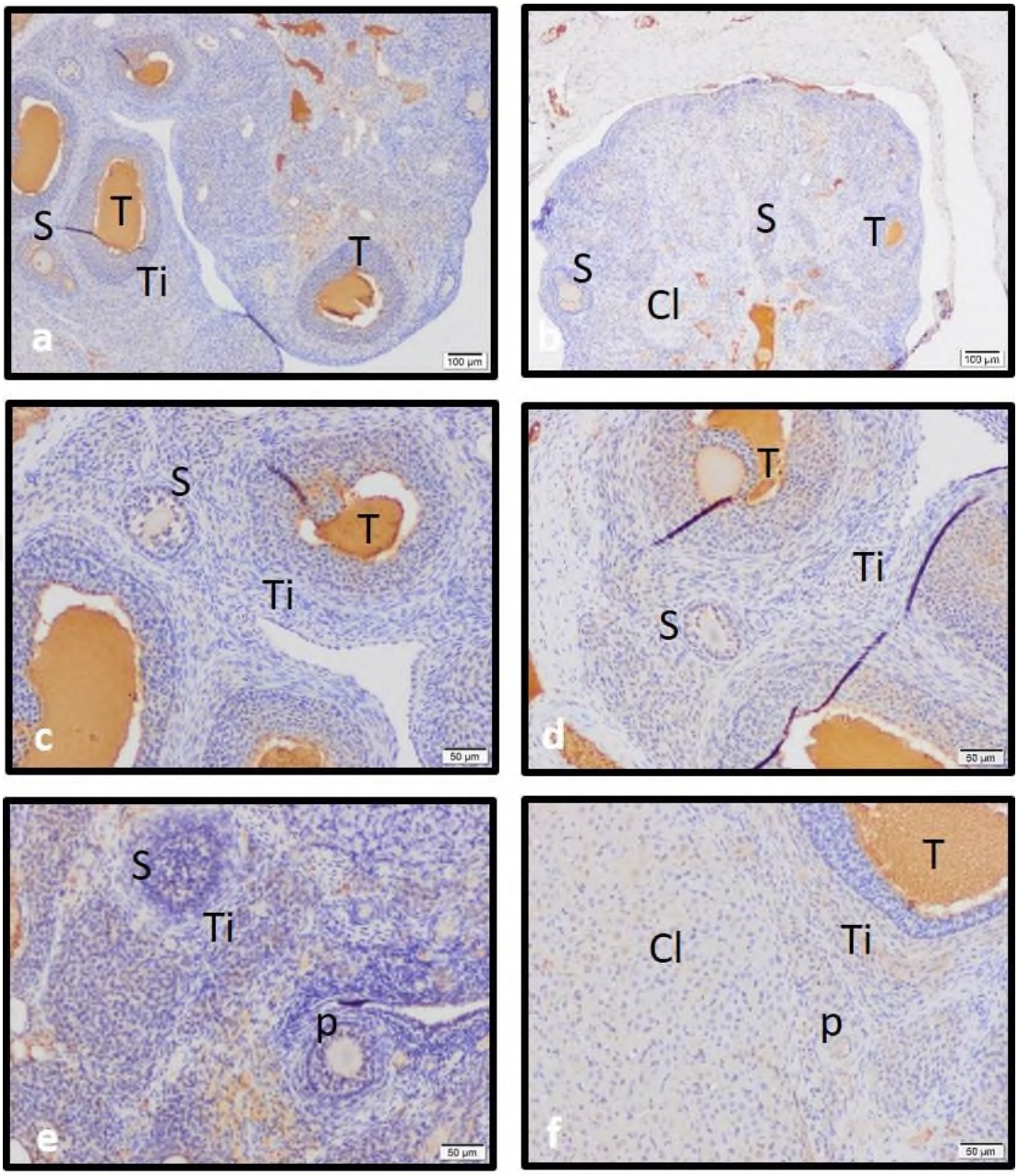
Şekil 8 : Kontrol (a, c, e) ve Siklofosfamid (b, d, f) gruplarının BNIP3L İmmunoreaktivitesi

Kontrol grubunda primer (P), sekonder (S) ve tersiyer (T) folliküllerde immnünoreaktivite oldukça düşük iken, siklofosfamid grubu atretik folliküllerinde immünoreaktivitenin fazla olduğu izlenmektedir. Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.



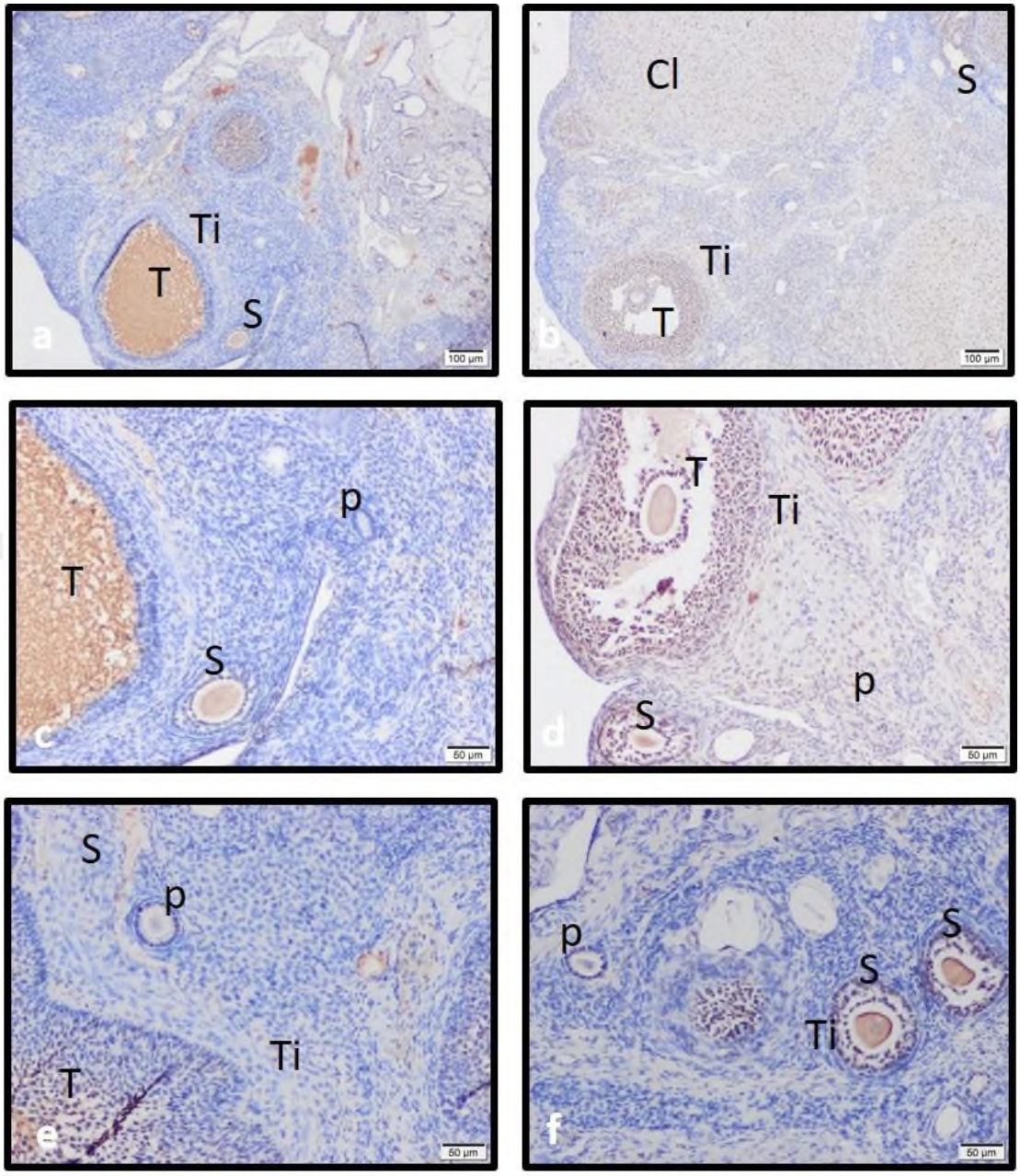
Şekil 9 : Kurkumin I (a, c, e) ve Kuersetin I (b, d, f) Gruplarının BNIP3L İmmünoreaktivitesi

Kurkumin I ve Kuersetin I grubunda atretik sekonder ve tersiyer follikülerde artmış immünoreaktivite gözlenmektedir. P: primer follikül, S:sekonder follikül, T: tersiyer follikül, Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.



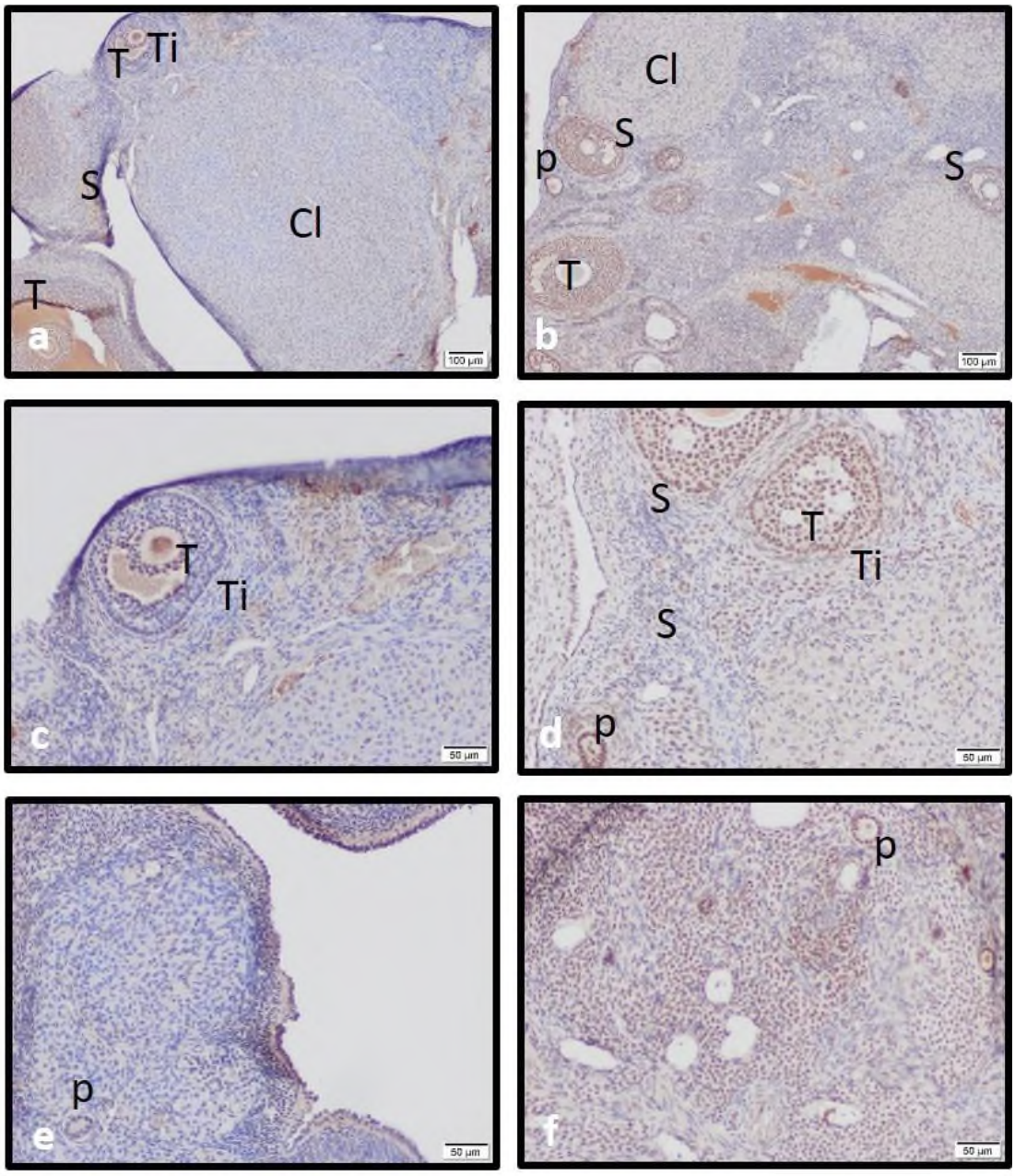
Şekil 10 : Kurkumin II (a, c, e) ve Kuersetin II (b, d, f) Gruplarının BNIP3L İmmünoreaktivitesi

Kurkumin II ve Kuersetin II grubunda tüm follikülerde az ve benzer boyanma gözlenmektedir. P: primer follikül, S:sekonder follikül, T: tersiyer follikül, Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.



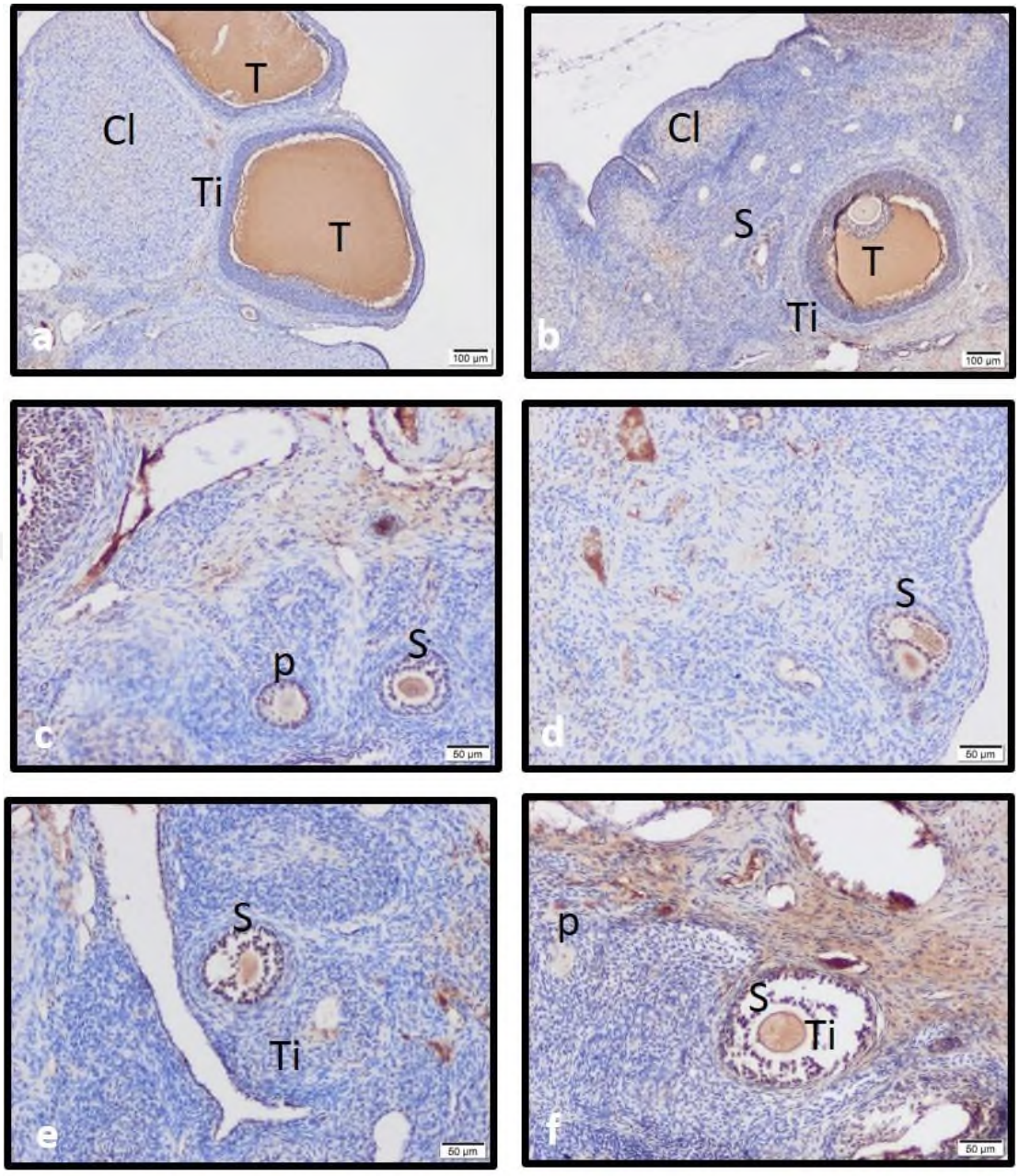
Şekil 11 : Kontrol (a, c, e) ve Siklofosfamid (b, d, f) Gruplarının BNIP1 İmmünoreaktivitesi

Her grubunda primer (P), sekonder (S) ve tersiyer (T) folliküllerde immnünoreaktivite oldukça düşük iken, siklofosfamid grubu atretik folliküllerinde immünoreaktivitenin fazla olduğu izlenmektedir. Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.



Şekil 12 : Kurkumin I (a, c, e) ve Kuersetin I (b, d, f) Gruplarının BNIP1 İmmünoreaktivitesi

Kurkumin I ve Kuersetin I gruplarında atretik sekonder ve tersiyer follikülerde artmış immnünoreaktivite gözlenmektedir. P: primer follikül, S:sekonder follikül, T: tersiyer follikül, Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.

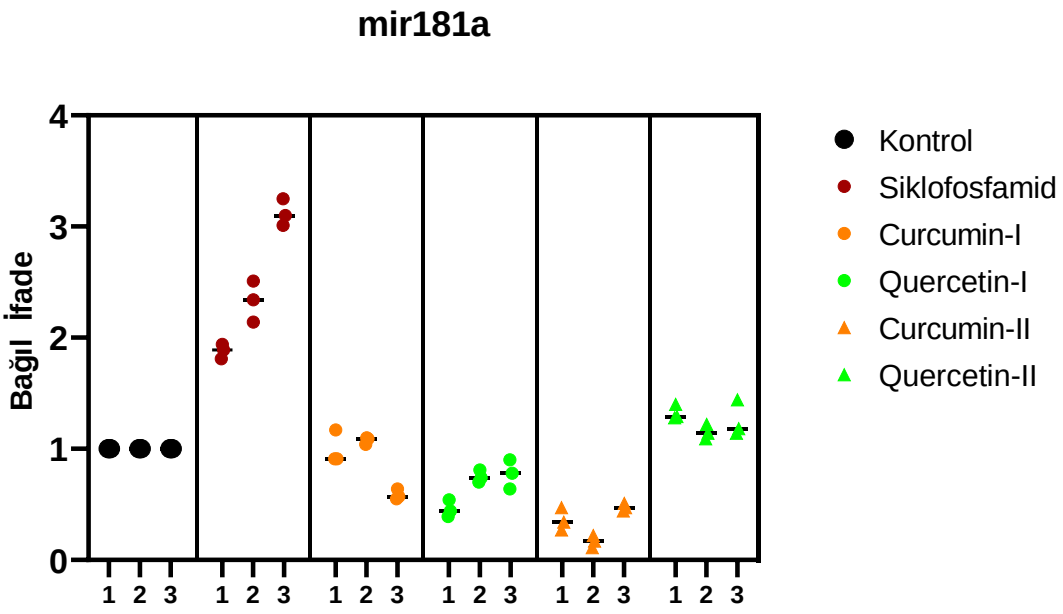


Şekil 13 : Kurkumin II (a, c, e) ve Kuersetin II (b, d, f) Gruplarının BNIP1 İmmünoreaktivitesi

Kurkumin II grubunda daha fazla olmak üzere yüksek BNIP1 immünoreaktivitesi gözlenmektedir. P: primer follikül, S:sekonder follikül, T: tersiyer follikül, Ti. Teka interna, C: Korpus luteum.

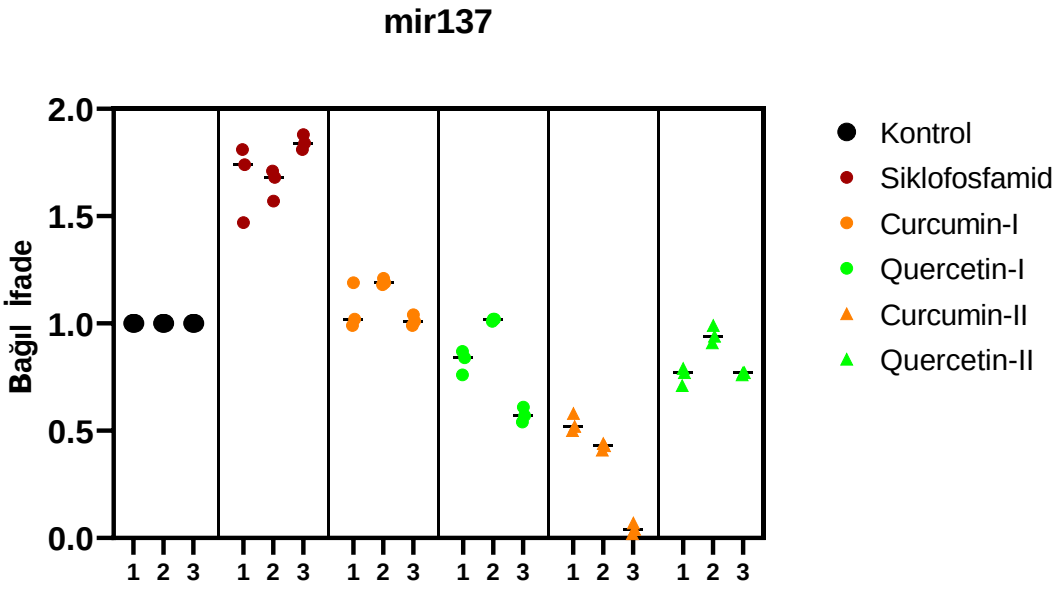
4.4. qPcr Bulguları

4.4.1 MiRNA Bulguları



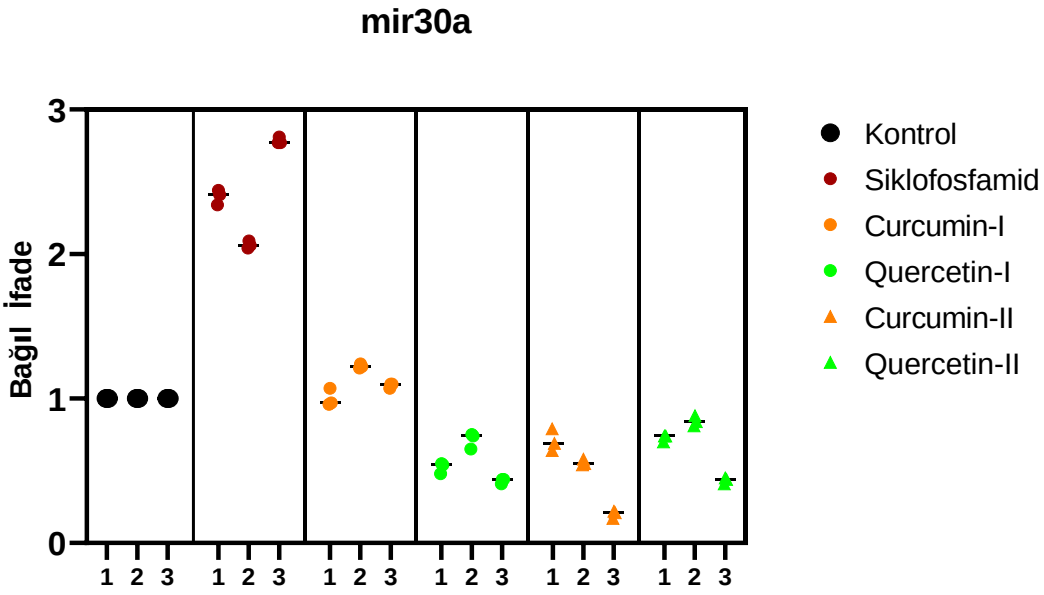
Şekil 14 : MiR-181a'nın Deney Gruplarındaki İfadesi

MiR181a ifadesinde siklofosfamid uygulamasıyla birlikte ortalama 2,5 katlık artış gözlenmiş olup, diğer gruplardaki ifade seviyeleri kontrole yakın tespit edilmiştir.



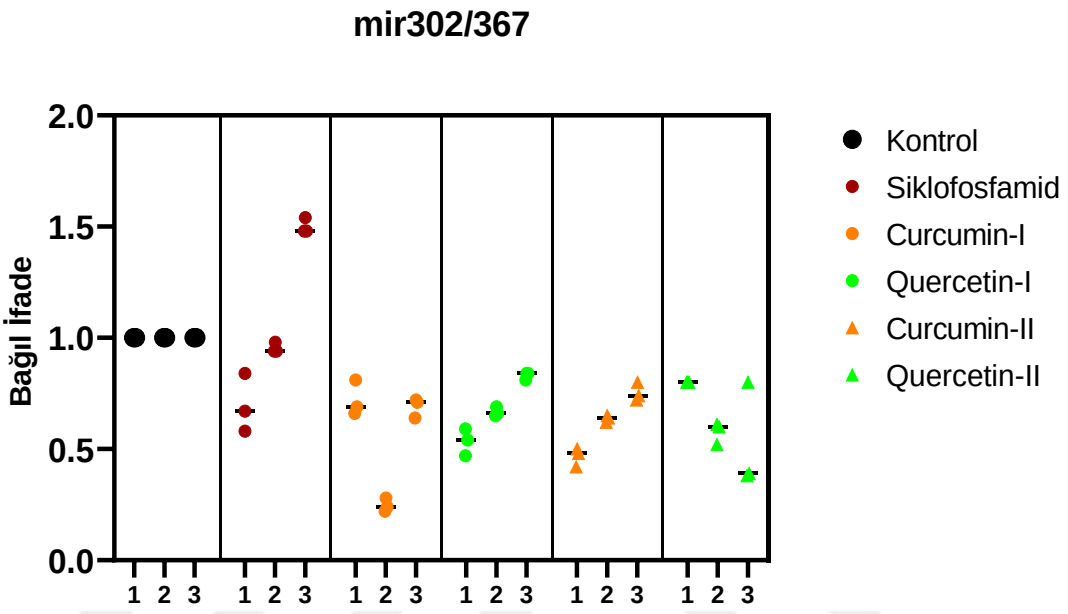
Şekil 15 : MiR-137'nin Deney Gruplarındaki İfadesi

MiR-137 ifadesinde siklofosfamid uygulamasıyla birlikte ortalama 1,7 katlık artış gözlenmiş olup, kurkumin-II grubunda ifadesinde anlamlı azalma gözlenmiş ancak diğer gruplardaki ifade seviyeleri kontrole yakın tespit edilmiştir.



Şekil 16 : MiR-30a'nın Deney Gruplarındaki İfadesi

MiR30a ifadesinde siklofosfamid uygulamasıyla birlikte ortalama 2,5 katlık artış gözlenmiş olup, kurkumin-I grubunda ifade seviyeleri kontrole yakın tespit edilmiş ancak diğer gruplarda ifade seviyesinde azalma ölçülmüştür.

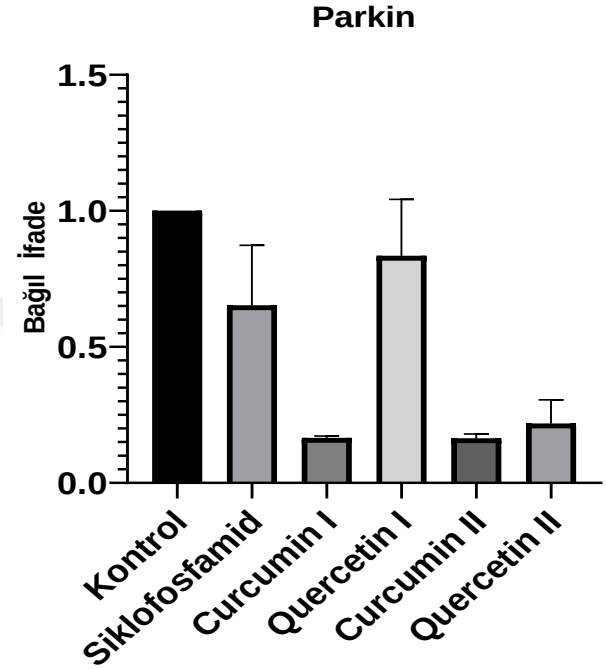


Şekil 17 : MiR-302/367'nin Deney Gruplarındaki İfadesi

MiR302/367 ifadesinde siklofosfamid uygulamasıyla birlikte anlamlı olmayan kısmi bir artış gözlenmiş olup diğer gruplardaki ifade seviyeleri azalmış olmakla birlikte anlamlı bir düşüş ölçülmemiştir.

4.5. mRNA Bulguları

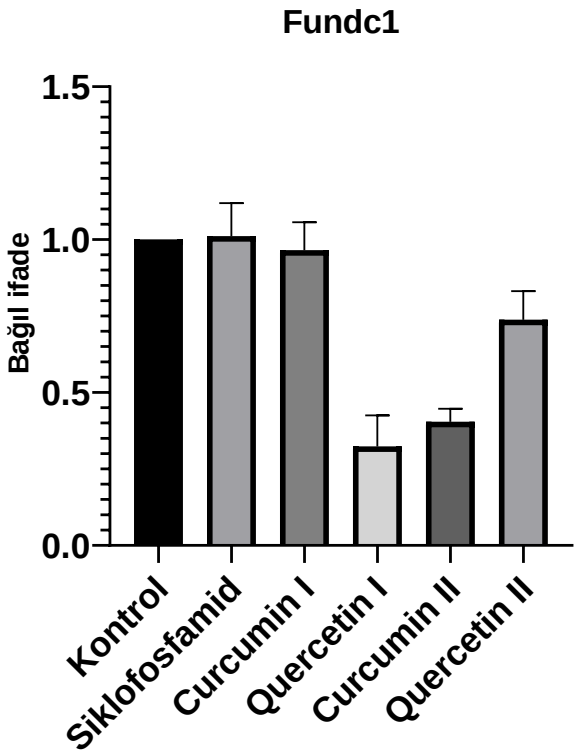
4.5.1. Parkin mRNA ölçümleri



Şekil 18 : Parkin'in Deney Gruplarındaki İfadesi

qPCR mRNA seviyeleri ölçümüne göre Siklofosfamid uygulamasıyla birlikte Parkin ifadesinde kısmi azalma gözlenirken, eş zamanlı siklofosfamid ve kurkumin uygulanan grupta (kurkumin I) dramatic bir azalma ölçülmüştür. Benzer şekilde siklofosfamid uygulamasını takip eden kurkumin ve kuersetin uygulanan gruplarda (Kurkumin II, Kuersetin II) önemli miktarda downregülasyon gözlenmiştir. Kuersetin I grubunda ise kontrol grubuna yakın değerlerde mRNA seviyeleri ölçülmüştür.

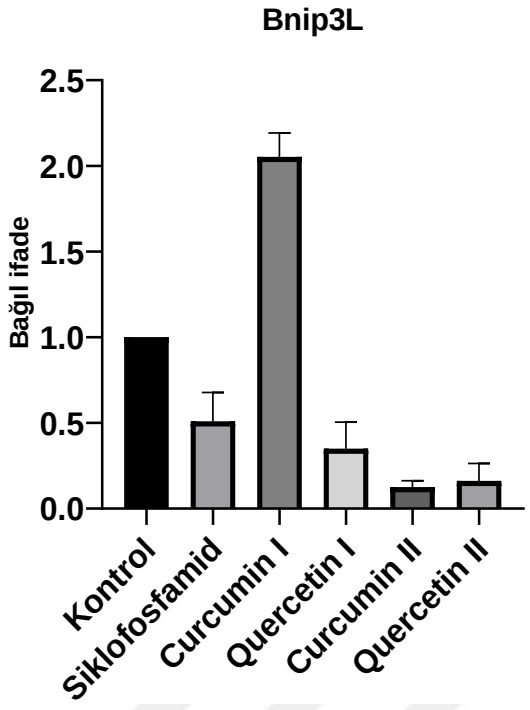
4.5.2. FUNDC1 mRNA ölçümleri



Şekil 19 : FUNDC1'in Deney Gruplarındaki İfadesi

mRNA seviyelerinin qPCR ile ölçümlerine göre Siklofosfamid ve Kurkumin I gruplarında kontrole kıyasla anlamlı değişiklik gözlenmezken, Kuersetin I, Kurkumin II ve Kuersetin II gruplarındaki ifadelerde anlamlı downregülasyon ölçülmüştür.

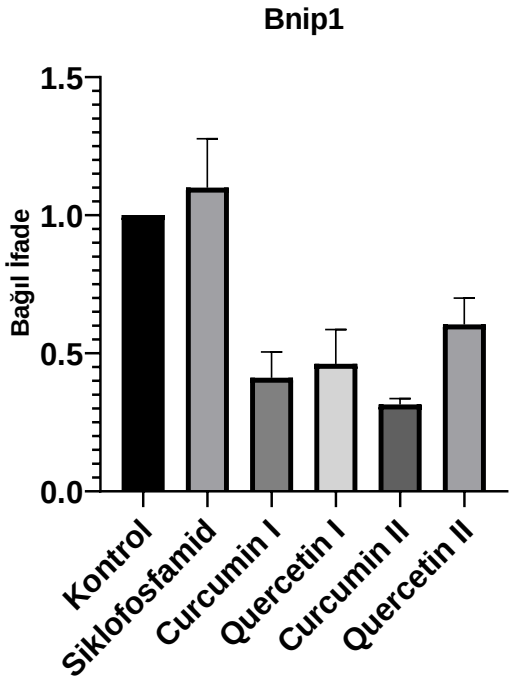
4.5.3. BNIP3L (NIX) mRNA ölçümleri



Şekil 20: BNIP3L'nin Deney Gruplarındaki İfadesi

qPCR sonucuna göre BNIP3L ifadesinde kontrole kıyasla yalnızca Kurkumin I grubunda anlamlı bir ifade artışı (2 kattan fazla) ölçülürken, diğer tüm gruplarda BNIP3L downregüle olmuştur.

4.5.4. BNIP1 mRNA ölçümleri



Şekil 21 : BNIP1'in Deney Gruplarındaki İfadesi

qPCR sonuçlarına göre kontrol grubu ve siklofosfamid grubu arasında anlamlı farklılık gözlenmezken, diğer tüm gruplarda BNIP1 ifadesinde downregülasyon gözlenmiştir.

V. TARTIŞMA

Prematür ovaryen yetmezlik üreme çağındaki kadınları etkileyen ve uzun dönem ciddi komplikasyonlar ile seyreden önemli bir rahatsızlıktır. Hasarlı mitokondrilerin ortadan kaldırılmasında rol oynayan mitofaji moleküllerinin POY gelişmesinde etkili olduğu düşünülmektedir. Ek olarak, mitokondriyal fonksiyonda yer alan birçok gendeki mutasyonlar POY'in nedenleri olarak da tanımlanmıştır. Mitokondriyal biyogenez süreci füzyon ve fisyon olaylarını içerir ve mitokondriyel çoğalma için gerekli malzemeleri üretmeye hizmet eden, nükleer ve mitokondriyal kodlanmış bir dizi transkripsiyon ve translasyon faktörleri tarafından düzenlenir (64). Mitokondrideki genetik mutasyonlara ek olarak, oositlerde yüksek ROS seviyeleri, azalmış antioksidan aktivite seviyeleri ve ATP üretimi de POY ile ilişkilendirilmektedir. Bununla beraber farelerde, mitokondriyal biyolojinin önemli fonksiyonlarında krebs döngüsünün bir ürünü olan koenzim Q10 ile tedavinin hem genetik hem de yaşlanmaya dayalı fare modellerinde POY'in başlamasını önlediği gösterilmiştir (65). Son yıllarda mitokondrial fonksiyon bozukluklarının over fonksiyonları ve follikül gelişimine etkilerini inceleyen birkaç çalışma olmasına rağmen POY modelinde mitofajinin rolü ve kuersetin ile kurkuminin mitofaji üzerinden etkileri tam olarak bilinmemektedir (66,67). Mitofajinin gerçekleşmesinde 3 mekanizma rol oynamasına karşın (68), Parkin aracılı mitofaji en bilinen yol olup, parkin bağımsız mitofaji mekanizmasında FUNDC1 ve BNIP3L de rol almaktadır.

Çalışmamızda Cyp grubunda primordial follikül sayısında kontrol grubuna göre dramatik bir düşüşle birlikte atretik folliküller sayısında anlamlı bir artış izlendi. Artan foliküler atrezinin, yumurtalık disfonksiyonuna yol açan foliküler tükenmeyi hızlandırmaktan sorumlu olduğuna inanılmaktadır. Daha önce yapılan birkaç çalışma, granüloza hücresi apoptozunun foliküler atrezi için tetikleyici olduğunu doğrulamıştır (69). Granüloza hücre apoptozunun folliküler atrezinin başlatıcısı olduğu düşünülmektedir. Granüloza hücrelerinin apoptozu oluşumu, folliküler atrezinin oluşumundan çok daha erken ortaya çıkar ve folliküler atrezi olgusu ancak follikülдeki apoptotik granüloza hücrelerinin belirli

bir düzeye ulaşmasıyla gözlemlenebilmektedir (70). POY hızlanmış atrezi ve primordial foliküllerin sürekli olarak büyük preovulatuar foliküllere dönüştüğü; bu sebeple primordiyal foliküllerin erken tükenmesine bağlı olarak doğurganlığın azalmasıyla seyreden organize ve karmaşık bir süreçtir (71). Daha önceki çalışmalarda siklofosfamid ile tedavi edilen kadınların overlerinin patolojik incelemesinde azalan primordial folikül havuzu, over kan damarlarında hasar ve over atrofisi saptandı. Bu değişikliklerin altında yatan mekanizmalar hala belirsizliğini korumakla birlikte çalışmalar kemoterapinin hem primordiyal foliküllerde hem de büyümekte olan foliküllerde önemli bir kayba neden olabileceğini göstermiştir. Bazı araştırmacılar ayrıca primordial havuzdaki folliküllerin artan aktivasyonunun folliküler atrezinin hızlanmasına yol açarak primordiyal follikül rezervinin erken tükenmesine neden olduğu hipotezini öne sürmüşlerdir (61). Hayvan deneyleri siklofosfamidin yumurtalıklardaki PTEN/Akt/FOXO3a proteinlerini modüle ederek farelerin primordial foliküllerinin aktivasyonunu hızlandırdığını gösterdi. Siklofosfamidin granüloza hücre apoptozunu artırdığı ve foliküler atreziyi indüklediği bulundu (72). Kalich-Philosoph ve ark. siklofosfamid kaynaklı yumurtalık rezervi kaybındaki mekanizmanın, bir tükenmişlik etkisi ve folikül tükenmesi ile sonuçlanan hızlandırılmış primordial folikül aktivasyonu olduğunu bulmuşlardır. Siklofofamid bir yandan bölünen hücreler için toksik etki ederken bir yandan da hareketsiz folliküllerı harekete geçirerek büyümelerini ve çoğalmalarını sağlar (61). Aynı zamanda siklofosfamidin, primordial folikülleri prematüre olarak büyüyen folikül havuzuna indükleyebileceğini ve sonunda yumurtalık rezervinin küçülmesine neden olabileceğini gösterilmiştir (73). Cyp grubunda primer, sekonder ve tersiyer folliküllerin toplam follikül havuzundaki artmış oranları siklofosfamid uygulaması altında folliküler gelişimin devam ettiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca Cyp grubunda görülen azalmış primordial follikül sayıları ile atrezik follikül sayılarındaki artış siklofosfamidin ovaryen doku üzerinde doğurganlık için temel havuz olan primordial folliküllerı tükettiğini ve atreziyi indüklediğini düşündürmektedir.

Kurkumin ve kuersetin uygulanan koruyucu ve tedavi gruplarında primordial follikül oranları Cyp grubuna göre anlamlı oranda yüksek izlendi.

Ayrıca atrezik tersiyer follikül oranlarının Cyp grubuna göre azaldığı tespit edildi. Doğurganlık için en önemli rezerv olan primordial folikül havuz sürekli olarak aktive edilerek büyüyen foliküllere dönüşürken geri kalanının hala uyku halinde olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, hareketsiz primordial foliküllerin korunmasının dişilerin üreme ömrünü belirleyebileceğine inanılmaktadır (9). Kurkumin ve kuersetin, yaygın olarak kullanılan fitokimyasallardır. Bu moleküllerin, analjezik, anti-kanserojen ve anti-inflamatuar etkilerinin olduğu bilinmektedir. Melekoğlu ve arkadaşlarının kurkumin ve kapsain ile yaptığı siklofosfamid uygulanarak oluşturulmuş POY'ndeki etkilerinin incelediği çalışmada, kurkumin ve kapsainin inoksidatif stress belirteçlerinin düzeyini azaltarak, over fonksiyonlarını düzelttiği sonucuna varmışlardır (74). Tedavi ve koruyucu gruplarda izlenen doğurganlık için en önemli kaynak olan primordial follikül havuzdaki belirgin artış ve atrezik tersiyer follikül oranlarındaki azalma kurkumin ve kuersetinin POY patogenezinde koruyucu ve tedavi edici rolleri olabileceğini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmada immunohistokimyasal olarak incelediğimiz preparatlarda parkin pimer antikoru ile boyanmış kesitlerde atrezik follikülerdeki ekspresyonun artmış olduğu gözlendi. Bu artış özellikle Cyp grubunda belirgindi. Siklofosfamid grubuna ait doku örneklerinin RT-PCR ile yapılan parkinin mRNA düzeyi incelenmesinde de kontrol grubuna göre mRNA miktarının düşük oluğu tespit edildi. Parkin ekspresyonun mRNA düzeyinde siklofosfamid uygulanması sonrası azalmış olması Cyp grubundaki follikül havuzunun azalmasına bağlı olabileceği düşünüldü. Parkinin mitokondri kalitesini kontrol eden ve hasarlı mitokondrilerin mitofaji yoluyla ortadan kaldırılmasını sağlayan bir molekül olduğu göz önüne alındığında, atrezik foliküllerin ortadan kaldırılmasında mitofajinin parkin üzerinden etkili olduğu ileri sürülebilir. PINK 1 in mitokondrial hasara bağlı olarak fazla üretildiği bilinmektedir (75). PINK1 ve Parkin proteinlerinin sağlıklı mitokondriyal döngü için mutlaka gerekli olduğu ve eksilmeleri durumunda mitokondriyal fonksiyon kaybına neden olarak kaslarda ve dopaminerjik nöronlarda dejenerasyona neden olduğu bildirilmiştir (76,77). Parkin etkisini PINK1 aracılığı ile gösterir. PINK1 üretilerek tüm mitokondrilere aktarılır. Sağlıklı mitokondriler proteoliz

yolu ile PINK1 hızlıca parçalanır ve çok düşük seviyelerde kalması sağlanır. Ancak hasarlı mitokondrilerde bu süreç sekteye uğrayarak PINK1'in birikimine ve parkinin PINK1 birikimli mitokondrilere alınmasına neden olur (78). Mitokondriyel depolarizasyonun bir sonucu olarak mitokondriyal dış zarda biriken PINK1, parkin fosforilasyonuna neden olarak sitozolden hasarlı mitokondriye parkin geçişini tetikler (75,79). Bu şekilde mitokondride biriken parkin E3 ubiquitin ligaz aktivitesi ile mitokondriyal membran ve matriks proteinlerinin bozulmasını destekler (80). Koentjoro ve ark.'ları da benzer sonuçlara ulaşarak; PINK1/Parkın aracılı yol ile mitofaji sırasında mitokondriyal membran potansiyelinin dağıldığını ve parkin'in PINK1'e bağlanarak mitokondriye alındığını gösterdiler. Böylece Parkin otofaji-lizozomal yol aracılığı ile mitokondriyal klirensi korumaktadır (81). Mitokondrinin lizozomlar ile kaynaşmasını sağlayan proteinleri çoğaltarak mitokondriyal kalite kontrolünün sağlanmasına aracılık eder. PINK1 ve Parkin ekspresyonunun obez farelerde beyaz yağ dokusunda arttığı ve mitokondriyal fonksiyonun korunmasında rol oynayabileceği iddia edilmiştir (82). Ayrıca Parkin'in bir hücrede hasarlı mitokondrilere seçici olarak yer değiştirebildiği ve aşırı ekspresyonunun mitofaji yoluyla hasarlı mitokondrileri ortadan kaldırabildiği gösterilmiştir (29). Yi ve ark. PKOS oluşturdukları over dokularında, granüloza hücrelerinde parkin ve PINK ekspresyonun kontrol grubuna göre artmış olduğunu bildirmişlerdir (83). Granüloza hücrelerini oksidatif hasarda mitofaji yolu ile korunduğunun inceldiği çalışmada, FSH uygulamasının PINK1-Parkin-mitofaji eksenini baskılayarak, mitofajik granüloza hücre ölümünü önlemede rol oynadığı bildirilmiştir (70). Çalışmamızdaki bulgular göz önüne alındığında özellikle atretik folliküllerdeki artmış parkin immünoreaktivitesi; bu folliküllerde parkin aracılı mitofajinin etkin olduğunu düşündürmektedir.

Kurkumin ve kuersetin uygulanan gruplarda Cyp grubuna göre primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde Kuersetin I ve Kuersetin II grubunda daha belirgin olmakla birlikte Kuersetin I, Kuersetin II ve Kurkumin II gruplarında artmış parkin immünrekativitesi tespit edildi. Kontrol ve tedavi gruplarındaki atrezik folliküllerde izlenen parkin immünreaktivitesi ise Cyp grubuna göre

belirgin azalma gösterdi. Jiang Y ve ark yaptıkları çalışmada granüloza hücrelerini kültür ortamında hidrojen peroksit ekleyerek oksidatif hasar oluşturmuşlar ve stres sırasında PINK1-Parkin düzeylerinin western blot analizinde ifadesinin önemli oranda artığını, PINK1-Parkin'i bloke edilmesi ile oksidatif stres sırasında mitokondriyal kütle kaybını önemli ölçüde azalttığını göstermişlerdir (84). Daha önce yapılan bir başka çalışmada kemotatik bir ajan olan sisplatinin PINK1 ve parkin seviyelerini arttırdığı ve proksimal kıvrımlı tübüllerden epitel hücrelerinde hasara neden olduğu gösterilmiştir. Mitofajinin hasarlı mitokondrileri ortadan kaldırarak hücre için mutlak olarak gerekli olan koruyucu bir mekanizma olduğu bilinmektedir. Ancak mitofajinin belirli bir düzeyin üzerinde tetiklenmesi ile birlikte hücresel otofajiyi indüklenmektedir. Aynı çalışmada proksimal kıvrımlı tübüllerden epitel hücrelerinde mitokondri içeren çok sayıda otofagozom gösterilmesi hasarın mitofajinin tetiklediği hücresel otofaji ile ilişkilendirilmiştir. Ayrıca kurkuminin eklenmesi ile birlikte mitofaji ile ilişkili proteinler olan PINK1 ve parkin seviyelerinde sisplatin kaynaklı artışın engellendiği bildirilmiştir (85). Bir başka çalışma kurkuminin, AMPK/PINK1/Parkin aracılı mitofajiyi teşvik ederek osteoartrite karşı koruyucu etki gösterdiğini bildirmiştir (86). Benzer şekilde kuersetinin, frataksin aracılı PINK1/Parkin-bağımlı mitofajiyi artırarak hepatik steatozu hafiflettiği gösterilmiştir (87). Ayrıca kuersetinin PINK1-Parkin üzerinden mitofajinin uyarılması yolu ile nörotoksisiteyi önlediği bildirilmiştir (88). Çalışmamızdaki Cyp grubundaki atretik folliküllerde izlenen yüksek parkin immünreaktivitesi benzer şekilde yüksek mitofaji ile tetiklenmiş hücresel otofajiye neden olabileceği düşünülmektedir. Kurkumin ve kuersetin uygulaması ile birlikte atretik folliküllerde parkin immünreaktivitesinde düşüş olduğu görüldü. Tedavi ve koruyucu gruplarda gösterilmiş olan primordial follikül havuzundaki artış ile birlikte değerlendirildiğinde kurkumin ve kuersetinin siklofosfamidin neden olduğu yüksek mitofajiyi dengeleyerek koruyucu düzeye indirgediği; primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde ise mitofajinin artması yoluyla mitokondriyel temizlenmeyi sağlayarak hücrenin canlılığını koruduğu ve ovaryen fonksiyon üzerinde olumlu etki gösterdiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda parkin ile ilişkili olan miR-181a ifadesi Cyp grubunda kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Koruyucu ve tedavi gruplarında ise kontrol grubuna yaklaşacak şekilde miR-181a ifadesinde azalma izlendi. Daha önce 19 ile 23 nükleotidden oluşan ve RNA kodlamayan miRNA türlerinden miR-181'in artış göstermesi, artan AKT fosforilasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Mir-181a'nın ile PI3K/AKT sinyal yolağının aktifleştiği ve hücre büyümesinin regülasyonunda görev aldığı düşünülmektedir (89). T-hücreli lösemi/lenfoma tedavisinde düzenli olarak uygulanan siklofosfamid gibi kemoterapötik ajanların miR181a ekspresyonunu, AKT aktivasyonu ile birlikte yukarı regüle ettiği bildirilmiştir (90). AKT yolağının hücre proliferasyonunun yanında ilaç direncinde de önemli bir düzenleyici olduğu bilinmektedir(91). Yan ve arkadaşları da siklofosfamid gibi kemoterapotiklere maruziyetle miR-181a 'nın hücre içindeki artışını kemorezistansla ilişkilendirmişlerdir (90). Ayrıca miR-181a'nın yeni bir mitofaji inhibitörü olduğunu, Parkin E3 ubikuitin ligazı hedefleyerek mitokondri ile otofagozom ve lizozom birleşimini kısmı olarak engellediği ve bu sayede mitofajiyi azalttığı ileri sürülmektedir. MiR-181a aşırı ekspresyonu ile hücresel otofajiyi tetiklenmeden mitokondriyal ayrışma proteinlerinin bozulmasını önleyerek mitofajiye engel olmaktadır. Tam tersi durumda hücre içi miR-181a'ların hızlı yıkımında ise hasarlı mitokondrilerin mitofajisi hızlanmaktadır. Mir181a olmayan farelerde parkin düzeyinin ve dolayısıyla mitofajinin artmış olduğunun gösterilmesi de bu durumu desteklemektedir. MiR-181a'nın inhibitör etkisinin parkin ekspresyonundaki artış ile kurtarılabileceği iddia edilmiştir (92). Son birkaç yılda yapılan çalışmalar, miRNA'ların otofaji dışında da çeşitli biyolojik süreçleri düzenlediğini göstermiştir. MiR-181a'nın, ATG5'i hedefleyerek ve gastrik kanser hücrelerini sisplatine duyarlı hale getirdiği ve rapamisin kaynaklı otofajiyi inhibe ettiği (37), meme epitel hücre hattı MCF10A'da otofajiyi baskılayarak apopitozisin bir çeşidi olan anoikisi teşvik ettiği gösterilmiştir (93). Aynı zamanda miR-181a ekspresyonundaki artış proapoptotik bir protein olan Bim'in azalması ile de ilişkilendirilmiştir (94). MiR-181a'nın artan ifadesinin fare granüloza hücresinde proliferasyonunu baskıladığı ve apoptoza neden olduğu bildirilmiştir (95). Siklofosfomide maruz kalmış gonadlarda ortaya çıkan miR-

181a ekspresyonundaki artış, Cyp grubunda izlenen folliküler havuzdaki küçülme ile birlikte değerlendirildiğinde granüloza hücrelerinde apoptoza neden olabileceğini düşündürmektedir. Koruyucu ve tedavi gruplarında gözlenen Cyp grubuna göre miR-181a ifadesindeki azalma parkin üzerindeki inhibitör etkisinin kalkmasıyla folliküler havuzdaki iyileşmeye katkıda bulunmuş olabilir.

Siklofosfamid uygulaması ile miR-137 ifadesinin anlamlı oranda arttığı, kurkumin ve kuersetin uygulanan tüm gruplarda azalma olduğu; Kuersetin I, Kurkumin II ve Kuersetin II grubunda ise kontrol grubundan bile anlamlı oranda miR-137 ifadesinde azalma olduğu tespit edildi. Ancak ilişki olduğu düşünülen FUNDC1 ve BNIP3L immünreaktivitelerinde anlamlı bir değişim izlenmedi. Yalnızca atretik folliküller üzerinde BNIP3L immünreaktivitesinin Cyp grubunda belirgin artışı izlendi. Bir mitofaji proteini olan miR-137'nin FUNDC1 ve NIX(BNIP3L) üzerinde inhibe edici etkisi bulunmaktadır. Mitokondriyal bozulmanın önlenmesinde etkin bir rol oynayan miR-137'nin artışı ile birlikte azalan FUNDC1 ve NIX seviyeleri, mitofaji reseptör seviyesindeki azalma ve bunu takip eden LC3'e bağlı reseptör sayısındaki azalmayla birlikte mitofajiyi baskılar. Li ve arkadaşları; MiR-137'nin mitofaji reseptörleri olan FUNDC1 ve NIX'in LC3'e bağlanmasını bozduğu ve bu sayede mitokondrinin otofagozomlarca hedeflenmesini engelleyerek etki gösterdiğini ileri sürmüştür (35) Eritrositler olgunlaşmaları sırasında mitokondrilerini mitofaji yolu ile kaybederler. Bir mitokondriyal dış zar proteini olan NIX'in ekspresyonu eritrosit olgunlaşma sürecinde artarak mitokonfrilerin otofagozamlara bağlanmasında aracılık ettiği düşünülmektedir. Çünkü olgunlaşmış eritrosit hücrelerinde ekspresyonlarının büyük ölçüde arttığı tespit edilmiştir (78,96). Schweers ve ark.'ları otofajinin indüklenmesinde değil de mitokondriyal birleşme ve otofagozom olgunlaşmasında NIX'in önemini vurgulayarak benzer sonuçlara varmışlardır (32). Bazı dokularda NIX fonksiyonunun Parkin aracılı sinyal yolağı ile bağlantılı olduğunu ileri sürmektedir (81). Parkinin serin fosforilosyonu aracılığı ile NIX'i etkinleştirdiği ve mitokondriyel homeostazın korunduğu ileri sürülmüştür (97). Ancak Choi ve ark.'ları glukokortikoidlerin parkin aracılı yoldan bağımsız olarak NIX ekspresyonunu baskılayarak

mitofajiyi inhibe ettiklerini ortaya koymuştur. Ayrıca NIX düzeyinin parkin aşırı ifadesi ile değişmediğinin gösterilmesi parkinin NIX ile indüklenen bazal mitofajiden bağımsız olduğunu düşündürmektedir (98). Parkin aracılı olmayan mitofajide hipoksi sonucu orataya çıkan HIF-1'e bağımlı olarak mitokondriyel parçalanma gerçekleşmektedir. Bu yolakta HIF-1 aracılı NIX ekspresyonu hipoksi ile indüklenen mitofajide önemli yer tutmaktadır (99). Ayrıca hipoksi sonucu FUNDC1'in fosforilasyonu seçici mitofaji için LC3 ile olan etkileşimi için gereklidir (100). MiR-137 ifadesindeki Cyp grubunda izlenen anlamlı artış siklofosfamidin ovaryen doku üzerinde miR137 aracılığı ile de etki gösterebileceğini düşündürmekle birlikte ilişkili olduğu düşünülen BNIP3L ve FUNDC1 immünreaktivitelerinde anlamlı değişim izlenmemesi ovaryen mitofaji üzerinde parkin bağımlı yolakların daha etkin olduğunu düşündürmektedir.

Kontrol grubuna kıyasla siklofosfamid uygulanan grupta miR-30a ifadesi artış gösterirken, koruyucu ve tedavi gruplarında kontrol grubuna yaklaşan bir miR-30a ifadesi tespit edilmiştir. MiR-30a meme kanseri, akciğer kanseri, renal hücreli karsinom, hepatoselüler karsinom, kolorektal kanser, over kanseri, kondrosarkom ve mide kanseri gibi daha pek çok kanserin patogenezinde rol aldığı gösterilmiştir (101–108). Aynı zamanda tümör hücrelerinin proliferasyonunu, göçünde ve metastazında kanser türüne göre hedef genleri modüle ederek etki gösterir (109). Ayrıca mide kanseri hücrelerinde epitelyal mezenkimal geçişi artırarak sisplatine karşı duyarlılığı artırdığının gösterilmesi ile kanser tedavisi için potansiyel bir terapötik hedef haline gelmiştir (110). MiR-30'a hem sitoplazmada hem de çekirdekte B-katenin ekspresyonunu inhibe ederek hücre proliferasyonunu azaltır (111). Metadherin, PTEN, AKT ve PI3K sinyal yolakları da dahil olmak üzere birçok sinyal iletiminde görev alır (102). Hücre apoptozunda miR-30a aşırı ekspresyonu izlenirken apoptotik etkisini BCL-2 ifadesini azaltarak gösterir(112). Bununla birlikte PTEN ifadesini artıran ve AKT fosforilasyonunu inhibe eden metadherin proteinin ifadesini önemli ölçüde azaltır. Ek olarak DNA replikasyonunu RPA1 ifadesini azaltarak inhibe eder ve p53 üzerinden hücre apoptozunu artırır (102,113). MiR-30 ailesinin otofajideki rollerinin tanımlanması ile birlikte miR-30c ve miR-30e

böbrek epitel hücresinde BNIP3L ile ilişkilendirilmiştir (114,115). Yakın zamanda Chevalier ve arkadaşları miR-30a-5p'nin BNIP3L bağımlı mitofajiyi düzenlediğini ortaya koymuştur (116). Çalışmamızda Cyp grubunda izlenen miR30'anın anlamlı artışı, artan hücre apoptozuyla ilişkilendirilebilir.

İmmünohistokimyasal boyamada BNIP1 immünoreaktivitesinin koruyucu ve tedavi edici gruplarda kontrol grubu ve Cyp grubuna göre primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde artış gösterdiği tespit edildi. Atretik folliküllerde ise Cyp grubuna göre anlamlı bir değişim izlenmedi. BH3 protein ailesinin bir üyesi olan BNIP1'in hem endoplazmik retikulumda (ER) hem de mitokondride apoptoz modülatörü olarak görev aldığı bilinmektedir. Apoptotik hücre ölümü sürecinde mitokondrilerin çok önemli olduğu ortaya konmuş olsa da BCL-2, BCL-X(L), BAX ve BAK gibi antiapoptotik ve proapoptotik proteinlerin ER'da da bulunduğu gösterilmiştir (117–120). Hücre mitozunda bölünme ve yeniden yapılanma gösteren ER'nin aynı zamanda stres yanıtı, lipid sentezi ve salgı ile zar proteinlerinin katlanması ve taşınması gibi hücre içi birçok farklı fonksiyonu vardır (121). Yeve ve arkadaşları stres yanıtına bağlı olarak ER'den membrana bağlı transkripsiyon faktörü ATF6'nın bölünmesini indüklediğini göstermişlerdir (122). BNIP1 aynı zamanda stres aracılı apoptozda görev alan RNF186'nın işlevsel bir ortağı ve ubiquitin sürecinde substrattır (123). Otofajide önemli bir rol oynadığı bildirilmiş olan BNIP1 bu etkisini p62'yi mitokondriye alarak düzenler (124). Mitokondriyal dış zarda lokalize olduğu gösterilen BNIP1 mitokondriyal fisyonda da görevlidir. Aşırı ekspresyonu BH3'e bağlı bir şekilde apoptoza neden olur (124). Bunun yanında BNIP1'in mTOR ifadesini azaltarak metastaza engel olduğu, hücrede apoptozu teşvik ettiği ve serviks kanser hücrelerinde hücresel düzeyinin azaldığı bildirilmiştir (125). BNIP1 immünreaktivitesinde büyüyen folliküller üzerinde izlenen artış mitokondriler ve ER'lar aracılığı ile hücresel düzeyde artmış mitofajinin bir sonucu olabilir. Mitofaji ve otofajide rol oynayan yeni bir molekül olan BNIP1'in atrezik folliküllerde tüm gruplarda yüksek seyretmesi atrezide fonksiyon gösterdiğinin bir belirtisi olarak değerlendirildi. Aynı zamanda primer, sekonder ve tersiyer folliküller üzerinde parkin ve BNIP1 ekspresyonları benzerlik göstermektedir. BNIP1'in otofaji etkisi göz önüne alındığında parkin ile birlikte mitofaji sonrası

otofajiye gidişin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Daha önce parkin ile ilişkisi tam gösterilememiş olsa da bizim çalışmamızda paralel olması beraber hareket ettiğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda siklofosfamid uygulanan grupta kontrol grubuna kıyasla miR302/367 kümesi ifadesinde anlamlı bir değişme izlenmemiştir. MiR302/367 kümesi hücresel farklılaşma, çoğalma ve yeniden programlanma ve anjiogenez gibi önemli görevlerde rol alan omurgalılara özgü korunmuş miRNA sınıfıdır (126,127). Prostat kanseri ve glioblastoma gibi hastalıklarda rol aldığı gösterilmiştir (128,129). Jin ve arkadaşları miR302/367 kümesinin PI3K/PTEN/AKT/mTor sinyal yolakları ile ilişkili olduğu ve otofajiyi kontrol ettiğini ileri sürmüşlerdir (126). MiR302/367 ifadesinde gruplar arası anlamlı değişim izlenmemesi ovaryen folliküller üzerinde bu molekülün etkin olmadığını göstermiştir.

İmmünhistokimyasal boyamalarda ve mRNA ifadelerinde parkin, BNIP1, BNIP3L ve FUNDC1 ifadelerinde uyuşmazlık izlenmiştir. İmmünhistokimyasal boyamaların hücresel proteinleri temsil ettiği düşünüldüğünde bu uyuşmazlığın proteinin ekspresyonu ile mRNA seviyesindeki farklı ekspresyonundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. QPCR mRNA seviyeleri ölçümünde folliküler havuz dışında kalan dokuların da etki etmesi bu uyumsuzluğun bir başka nedeni olabilir.

VI. SONUÇ

Cyp grubunda primer, sekonder ve tersiyer folliküllerin toplam follikül havuzundaki artmış oranları siklofosfamid uygulaması altında folliküler gelişimin devam ettiğini ortaya koymaktadır. Ayrıca Cyp grubunda görülen azalmış primordial follikül sayıları ile atrezik follikül sayılarındaki artış siklofosfamidin ovaryen doku üzerinde doğurganlık için temel havuz olan primordial follikülleri tükettiğini ve atreziyi indüklediğini düşündürmektedir.

Tedavi ve koruyucu gruplarda izlenen ve doğurganlık için en önemli kaynak olan primordial follikül havuzdaki belirgin artış ile atrezik follikül oranlarındaki azalma kurkumin ve kuersetinin POY patogenezinde koruyucu ve tedavi edici rolleri olabileceğini ortaya koymaktadır.

İmmunohistokimyasal olarak incelediğimiz preparatlarda atretik folliküllerdeki artmış parkin immünoreaktivitesi; bu folliküllerde parkin aracılı mitofajinin etkin olduğunu düşündürmektedir.

Kurkumin ve kuersetin uygulanan gruplarda Cyp grubundaki atretik folliküllerde izlenen yüksek parkin immünreaktivitesi mitofaji ile tetiklenmiş hücresel otofajiye neden olabilir. Kurkumin ve kuersetin uygulaması ile birlikte atretik folliküllerde parkin immünreaktivitesinde düşüş olması, tedavi ve koruyucu gruplarda gösterilmiş olan primordial follikül havuzundaki artış ile birlikte değerlendirildiğinde kurkumin ve kuersetinin siklofosfamidin neden olduğu yüksek mitofajiyi dengeleyerek koruyucu düzeye indirgediği; primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde ise mitofajinin artması yoluyla mitokondriyel temizlenmeyi sağlayarak hücrenin canlılığını koruduğu ve ovaryen fonksiyon üzerinde olumlu etki gösterdiği düşünülmektedir.

Siklofosfomid ile karşılaşan gonadlarda ortaya çıkan miR-181a ekspresyonundaki artış, Cyp grubunda izlenen folliküler havuzdaki küçülme ile birlikte değerlendirildiğinde granüloza hücrelerinde apoptoza neden olabileceğini düşündürmektedir. Koruyucu ve tedavi gruplarında gözlenen Cyp

grubuna göre miR-181a ifadesindeki azalma parkin üzerindeki inhibitör etkisinin kalkmasıyla folliküler havuzdaki iyileşmeye katkıda bulunmuş olabilir.

Mir137 ve miR-30a ifadesindeki Cyp grubunda izlenen anlamlı artış siklofosfamidin ovaryen doku üzerinde bu iki molekül aracılığı ile etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Kontrol grubuna kıyasla siklofosfamid uygulanan sıçan grubunda miR-137 anlamlı artış izlenmesine rağmen ilişkili olduğu düşünülen BNIP3L ve FUNDC1 immünreaktivitelerinde anlamlı değişim izlenmemesi ovaryen mitofaji üzerinde parkin bağımlı yolakların daha etkin olabileceğini gösterebilir.

BNIP1 immünreaktivitesinde büyüyen folliküller üzerinde izlenen artış mitokondriler ve ER'lar aracılığı ile hücresel düzeyde artmış mitofajinin bir sonucu olabilir. Mitofaji ve otofajide rol oynayan yeni bir molekül olan BNIP1'in atrezik folliküllerde tüm gruplarda yüksek seyretmesi atrezide fonksiyon gösterdiğinin bir belirtisi olarak değerlendirildi. Aynı zamanda primer, sekonder ve tersiyer folliküller üzerinde parkin ve BNIP1 ekspresyonları benzerlik göstermektedir. BNIP1'in otofaji etkisi göz önüne alındığında parkin ile birlikte mitofaji sonrası otofajiye gidişin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. Daha önce parkin ile ilişkisi tam gösterilememiş olsa da bizim çalışmamızda paralel olması birlikte hareket ettiğini gösterebilir.

MiR302/367 ifadesinde gruplar arası anlamlı değişim izlenmemesi ovaryen folliküller üzerinde bu molekülün etkin olmadığını göstermiştir.

İmmünhistokimyasal boyamalarda ve mRNA ifadelerinde parkin, BNIP1, BNIP3L ve FUNDC1 ifadelerindeki uyuşmazlık protein ile mRNA seviyesindeki farklı ekspresyonundan ve qPCR mRNA seviyeleri ölçümünde folliküler havuz dışında kalan dokuların sonuca etki etmesinden kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

VII.ÖZET

DENEYSEL PREMATÜR OVARYEN YETMEZLİĞİ MODELİNDE KULLANILAN ANTİOKSİDANLARIN MİTOFAJİ PROTEİNLERİ VE BUNLARLA İLİŞKİLİ MİCRORNA'LAR ÜZERİNE ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

AMAÇ: Bu çalışmada parkin bağımlı ve bağımsız mekanizmaların kuersetin ve kurkumin ile ortaya çıkan değişiklikleri; follikül sayımı, immunohistokimyasal proteinler, mRNA'lar ve bunlarla ilişkili microRNA'lar aracılığıyla incelenerek, kuersetin ve kurkuminin prematür ovarten yetmezlikte koruyucu ve tedavi edici etkilerinin araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM: Çalışmamızda sıçanlar üzerinde siklofosfamid aracılığı ile deneysel prematür ovaryen yetmezlik modeli oluşturuldu. Ardından dokular histopatolojik yöntemlerle ve histokimyasal boyamalarla incelendi. Ovaryum örnekleri üzerinden RNA izolasyonu yapıldı ve cDNA Sentezi ve qPCR işlemleri gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular ile gruplar arasındaki farklılık istatistiksel olarak değerlendirildi.

BULGULAR: Siklofosfamidin ovaryen doku üzerinde doğurganlık için temel havuz olan primordial folliküllerı tüketti ve atreziyi indükledi. Kurkumin ve kuersetin parkin bağımlı yolaklar üzerinden etki göstererek ovaryen follikül havuzunda belirgin iyileşme sağladı.

SONUÇ: Kurkumin ve kuersetin verilen gruplarda izlenen primordial follikül havuzdaki belirgin artış ve atrezik follikül oranlarındaki azalma, over üzerinde parkin aracılı yolda belirgin olarak mitofajiyi regüle ederek kurkumin ve kuersetinin POY patogenezinde koruyucu ve tedavi edici rolleri olduğunu ortaya koymaktadır.

ANAHTAR KELİMELER: Siklofosfamid, Kurkumin, Kuersetin, MiRNA, POY, Parkin, FUNDC1, BNIP1, BNIP3L

VIII. ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF ANTIOXIDANTS USED IN THE EXPERIMENTAL MODEL OF PREMATURE OVARIAN FAILURE ON MITOPHAGY PROTEINS AND THEIR RELATED MICRORNAS

OBJECTIVE: We studied the changes in parkin-dependent and independent mechanisms that occur with quercetin and curcumin; It was aimed to investigate the protective and therapeutic effects of quercetin and curcumin in premature ovarian failure by examining follicle count, immunohistochemical proteins, mRNAs and related microRNAs.

MATERIALS AND METHODS: In our study, an experimental premature ovarian failure model was created on rats by means of cyclophosphamide. Then the tissues were examined by histopathological methods and histochemical staining. RNA isolation was performed on ovarian samples and cDNA synthesis and qPCR processes were performed. The difference between the obtained findings and the groups was evaluated statistically.

RESULTS: Cyclophosphamide depleted primordial follicles, which is the main pool for fertility, on ovarian tissue and induced atresia. Curcumin and quercetin acted on parkin-dependent pathways, resulting in significant improvement in the ovarian follicle pool.

CONCLUSION: The significant increase in the primordial follicle pool and the decrease in the rate of atretic follicles observed in the groups given curcumin and quercetin indicate that curcumin and quercetin have protective and therapeutic roles in the pathogenesis of POF by regulating mitophagy in the parkin-mediated pathway on the ovary.

KEYWORDS: Cyclophosphamide, Curcumin, Quercetin, MiRNA, POI, Parkin, FUNDC1, BNIP1, BNIP3L

IX. KAYNAKLAR

1. Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: Implications for forecasting menopause. Human Reproduction. 1992;7(10).

2. Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC, Charleston JS, Soules MR, Klein NA. A new model of reproductive aging: The decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. Human Reproduction. 2008;23(3).

3. Pastore LM, Christianson MS, Stelling J, Kearns WG, Segars JH. Reproductive ovarian testing and the alphabet soup of diagnoses: DOR, POI, POF, POR, and FOR. Vol. 35, Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 2018.

4. Klein NA, Harper AJ, Houmard BS, Sluss PM, Soules MR. Is the short follicular phase in older women secondary to advanced or accelerated dominant follicle development? Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2002;87(12).

5. Jankowska K. Premature ovarian failure. Menopausal Review. 2017;2:51–6.

6. Pal L, Torrealday S, Kodaman P. Premature Ovarian Insufficiency - an update on recent advances in understanding and management. Vol. 6, F1000Research. 2017.

7. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. Human Reproduction. 2016 May;31(5):926–37.

8. van Kasteren YM, Schoemaker J. Premature ovarian failure: A systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. In: Human Reproduction Update. 1999.

9. Reddy P, Zheng W, Liu K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. Vol. 21, Trends in Endocrinology and Metabolism. 2010.

10. Morrison JC, Givens JR, Wiser WL, Fish SA. Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. Fertil Steril. 1975;26(7).

11. Budani MC, Tiboni GM. Ovotoxicity of cigarette smoke: A systematic review of the literature. Vol. 72, Reproductive Toxicology. 2017.

12. Hoyer PB, Devine PJ, Xiaoming Hu PJ, Thompson KE, Sipes IG. Ovarian Toxicity of 4-Vinylcyclohexene Diepoxide: A Mechanistic Model. Toxicol Pathol. 2001;29(1).

13. Chon SJ, Umair Z, Yoon MS. Premature Ovarian Insufficiency: Past, Present, and Future. Front Cell Dev Biol. 2021 May 10;9.

14. Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. Hum Reprod Update. 2001;7(6).

15. Oktem O, Oktay K. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. Cancer. 2007;110(10).

16. Tucker EJ, Jaillard S, Sinclair AH. Genetics and Genomics of Primary Ovarian Insufficiency. In: Human Reproductive and Prenatal Genetics. Elsevier; 2019. p. 427–45.

17. Simpson JL. Genetic and Phenotypic Heterogeneity in Ovarian Failure. Ann N Y Acad Sci. 2008 Jun;1135(1):146–54.

18. Dan Dunn J, Alvarez LA, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. Redox Biol. 2015 Dec;6:472–85.

19. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: A review. Vol. 10, Reproductive Biology and Endocrinology. 2012.

20. Lemasters JJ. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. Vol. 8, Rejuvenation Research. 2005.

21. Chow J, Rahman J, Achermann JC, Dattani MT, Rahman S. Mitochondrial disease and endocrine dysfunction. Nat Rev Endocrinol. 2017 Feb 7;13(2):92–104.

22. Al-Gadi IS, Haas RH, Falk MJ, Goldstein A, McCormack SE. Endocrine Disorders in Primary Mitochondrial Disease. J Endocr Soc. 2018 Apr 1;2(4):361–73.

23. Koopman WJH, Willems PHGM, Smeitink JAM. Monogenic Mitochondrial Disorders. New England Journal of Medicine. 2012 Mar 22;366(12):1132–41.

24. Liu J, Cox L. Primary ovarian insufficiency: an update. Int J Womens Health. 2014 Feb;235.

25. la Marca A, Brozzetti A, Sighinolfi G, Marzotti S, Volpe A, Falorni A. Primary ovarian insufficiency: Autoimmune causes. Vol. 22, Current Opinion in Obstetrics and Gynecology. 2010.

26. Allshouse AA, Semple AL, Santoro NF. Evidence for prolonged and unique amenorrhea-related symptoms in women with premature ovarian failure/primary ovarian insufficiency. Menopause. 2015;22(2).

27. Fenton A. Premature ovarian insufficiency: Pathogenesis and management. J Midlife Health. 2015;6(4).

28. Kanki T, Klionsky DJ, Okamoto K. Mitochondria Autophagy in Yeast. Antioxid Redox Signal. 2011 May 15;14(10):1989–2001.

29. Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. Journal of Cell Biology. 2008 Dec 1;183(5):795–803.

30. Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, Occhipinti A, Jagasia R, Petcherski A, et al. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res. 2012;1823(12).

31. Chen M, Chen Z, Wang Y, Tan Z, Zhu C, Li Y, et al. Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. Autophagy. 2016;12(4).

32. Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, et al. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104(49).

33. Song M, Yin Y, Zhang J, Zhang B, Bian Z, Quan C, et al. MiR-139-5p inhibits migration and invasion of colorectal cancer by downregulating AMFR and NOTCH1. Protein Cell. 2014;5(11).

34. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. Vol. 136, Cell. 2009.

35. Li W, Zhang X, Zhuang H, Chen HG, Chen Y, Tian W, et al. MicroRNA-137 is a novel hypoxia-responsive MicroRNA that inhibits mitophagy via regulation of two mitophagy receptors FUNDC1 and NIX. Journal of Biological Chemistry. 2014;289(15).

36. Zhao J, Nie Y, Wang H, Lin Y. miR-181a suppresses autophagy and sensitizes gastric cancer cells to cisplatin. Gene. 2016;576(2).

37. Tekirdag KA, Korkmaz G, Ozturk DG, Agami R, Gozuacik D. MIR181A regulates starvation-and rapamycininduced autophagy through targeting of ATG5. Autophagy. 2013;9(3).

38. Gao Z, Zhu X, Dou Y. The miR-302/367 cluster: a comprehensive update on its evolution and functions. Open Biol. 2015 Dec;5(12):150138.

39. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. J Pharm Biomed Anal. 1997;15(12).

40. Gautam SC, Xu YX, Pindolia KR, Janakiraman N, Chapman RA. Nonselective inhibition of proliferation of transformed and nontransformed cells by the anticancer agent curcumin (diferuloylmethane). Biochem Pharmacol. 1998;55(8).

41. Chuang SE, Cheng AL, Lin JK, Kuo ML. Inhibition by curcumin of diethylnitrosamine-induced hepatic hyperplasia, inflammation, cellular gene products and cell-cycle-related proteins in rats. Food and Chemical Toxicology. 2000;38(11).

42. Gupta SC, Sung B, Kim JH, Prasad S, Li S, Aggarwal BB. Multitargeting by turmeric, the golden spice: From kitchen to clinic. Vol. 57, Molecular Nutrition and Food Research. 2013.

43. Suryanarayana P, Satyanarayana A, Balakrishna N, Kumar PU, Bhanuprakash Reddy G. Effect of turmeric and curcumin on oxidative stress and antioxidant enzymes in streptozotocin-induced diabetic rat. Medical Science Monitor. 2007;13(12).

44. Voznesens'ka TI, Bryzhina TM, Sukhina VS, Makohon N v., Aleksieieva IM. [Effect of NF-kappaB activation inhibitor curcumin on the oogenesis and follicular cell death in immune ovarian failure in mice]. Fiziol Zh. 2010;56(4).

45. Bhaumik S, Jyothi MD, Khar A. Differential modulation of nitric oxide production by curcumin in host macrophages and NK cells. FEBS Lett. 2000;483(1).

46. Hosseini A, Razavi BM, Banach M, Hosseinzadeh H. Quercetin and metabolic syndrome: A review. Vol. 35, Phytotherapy Research. 2021.

47. Boots AW, Haenen GRMM, Bast A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. Vol. 585, European Journal of Pharmacology. 2008.

48. Cao G, Sofic E, Prior RL. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. Free Radic Biol Med. 1997;22(5).

49. Hashemzaei M, Far AD, Yari A, Heravi RE, Tabrizian K, Taghdisi SM, et al. Anticancer and apoptosis-inducing effects of quercetin in vitro and in vivo. Oncol Rep. 2017;38(2).

50. Richter M, Ebermann R, Marian B. Quercetin-induced apoptosis in colorectal tumor cells: Possible role of EGF receptor signaling. Nutr Cancer. 1999;34(1).

51. Liu Y, Gong W, Yang ZY, Zhou XS, Gong C, Zhang TR, et al. Quercetin induces protective autophagy and apoptosis through ER stress via the p-STAT3/Bcl-2 axis in ovarian cancer. Apoptosis. 2017;22(4).

52. Vafadar A, Shabaninejad Z, Movahedpour A, Fallahi F, Taghavipour M, Ghasemi Y, et al. Quercetin and cancer: New insights into its therapeutic effects on ovarian cancer cells. Vol. 10, Cell and Bioscience. 2020.

53. Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Borzelleca JF, Flamm GW, Williams GM, Lines TC. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. Food and Chemical Toxicology. 2007;45(11).

54. Li HL, Zhao X bin, Ma YK, Zhai GX, Li LB, Lou HX. Enhancement of gastrointestinal absorption of quercetin by solid lipid nanoparticles. Journal of Controlled Release. 2009;133(3).

55. Tsai-Turton M, Luong BT, Tan Y, Luderer U. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion. Toxicological Sciences. 2007;98(1).

56. Plowchalk DR, Mattison DR. Phosphoramide mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. Toxicol Appl Pharmacol. 1991;107(3).

57. Nie Z, Zhang L, Chen W, Zhang Y, Hua R, Wang W, et al. The protective effects of pretreatment with resveratrol in cyclophosphamide-induced rat ovarian granulosa cell injury: In vitro study. Reproductive Toxicology. 2020;95.

58. Brougham MFH, Wallace WHB. Subfertility in children and young people treated for solid and haematological malignancies. Vol. 131, British Journal of Haematology. 2005.

59. Plowchalk DR, Mattison DR. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse: 1. Effects on ovarian structure and function. Reproductive Toxicology. 1992;6(5).

60. Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? Vol. 18, Human Reproduction Update. 2012.

61. Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout "; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. Sci Transl Med. 2013;5(185).

62. Meirow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: Clinical importance and proposed accurate investigative tool. Human Reproduction. 1999;14(7).

63. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. J Reprod Fertil. 1968;17(3).

64. Tandler B, Hoppel CL, Mears JA. Morphological pathways of mitochondrial division. Vol. 7, Antioxidants. 2018.

65. Ben-Meir A, Burstein E, Borrego-Alvarez A, Chong J, Wong E, Yavorska T, et al. Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging. Aging Cell. 2015;14(5).

66. Luo Q, Tang Y, Jiang Z, Bao H, Fu Q, Zhang H. hUCMSCs reduce theca interstitial cells apoptosis and restore ovarian function in premature ovarian insufficiency rats through regulating NR4A1-mediated mitochondrial mechanisms. Reproductive Biology and Endocrinology. 2022 Aug 19;20(1):125.

67. Boros E, Elilié Mawa Ongoth F, Heinrichs C, Mansbach AL, Seneca S, Aeby A, et al. Primary ovarian insufficiency in RMND1 mitochondrial disease. Mitochondrion. 2022 Sep;66:51–3.

68. Turkieh A, el Masri Y, Pinet F, Dubois-Deruy E. Mitophagy Regulation following Myocardial Infarction. Vol. 11, Cells. 2022.

69. Zhou J, Peng X, Mei S. Autophagy in ovarian follicular development and Atresia. Vol. 15, International Journal of Biological Sciences. 2019.

70. Shen M, Jiang Y, Guan Z, Cao Y, Sun SC, Liu H. FSH protects mouse granulosa cells from oxidative damage by repressing mitophagy. Sci Rep. 2016;6.

71. Qin X, Zhao Y, Zhang T, Yin C, Qiao J, Guo W, et al. TrkB agonist antibody ameliorates fertility deficits in aged and cyclophosphamide-induced premature ovarian failure model mice. Nat Commun. 2022;13(1).

72. Barberino RS, Lins TLBG, Monte APO, Gouveia BB, Campinho DSP, Palheta RC, et al. Melatonin Attenuates Cyclophosphamide-Induced Primordial Follicle Loss by Interaction with MT1 Receptor and Modulation of PTEN/Akt/FOXO3a Proteins in the Mouse Ovary. Reproductive Sciences. 2022;29(9).

73. Zhou L, Xie Y, Li S, Liang Y, Qiu Q, Lin H, et al. Rapamycin Prevents cyclophosphamide-induced Over-activation of Primordial Follicle pool

through PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway in vivo. J Ovarian Res. 2017;10(1).

74. Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Cetin A, Basak N. Beneficial effects of curcumin and capsaicin on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a rat model. J Ovarian Res. 2018;11(1).

75. Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. PLoS Biol. 2010;8(1).

76. Park J, Lee SB, Lee S, Kim Y, Song S, Kim S, et al. Mitochondrial dysfunction in Drosophila PINK1 mutants is complemented by parkin. Nature. 2006;441(7097).

77. Greene JC, Whitworth AJ, Kuo I, Andrews LA, Feany MB, Pallanck LJ. Mitochondrial pathology and apoptotic muscle degeneration in Drosophila parkin mutants. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003;100(7).

78. Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011;12(1).

79. Greene AW, Grenier K, Aguileta MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. EMBO Rep. 2012;13(4).

80. Sarraf SA, Raman M, Guarani-Pereira V, Sowa ME, Huttlin EL, Gygi SP, et al. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. Nature. 2013;496(7445).

81. Koentjoro B, Park JS, Sue CM. Nix restores mitophagy and mitochondrial function to protect against PINK1/Parkin-related Parkinson's disease. Sci Rep. 2017;7.

82. Cui C, Chen S, Qiao J, Qing L, Wang L, He T, et al. PINK1-Parkin alleviates metabolic stress induced by obesity in adipose tissue and in 3T3-L1 preadipocytes. Biochem Biophys Res Commun. 2018;498(3).

83. Yi S, Zheng B, Zhu Y, Cai Y, Sun H, Zhou J. Melatonin ameliorates excessive PINK1/Parkin-mediated mitophagy by enhancing SIRT1 expression in granulosa cells of PCOS. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2020;319(1).

84. Jiang Y, Shen M, Chen Y, Wei Y, Tao J, Liu H. Melatonin represses mitophagy to protect mouse granulosa cells from oxidative damage. Biomolecules. 2021;11(7).

85. Ortega-Domínguez B, Aparicio-Trejo OE, García-Arroyo FE, León-Contreras JC, Tapia E, Molina-Jijón E, et al. Curcumin prevents cisplatin-induced renal alterations in mitochondrial bioenergetics and dynamic. Food and Chemical Toxicology. 2017;107.

86. Jin Z, Chang B, Wei Y, Yang Y, Zhang H, Liu J, et al. Curcumin exerts chondroprotective effects against osteoarthritis by promoting AMPK/PINK1/Parkin-mediated mitophagy. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2022 Jul;151:113092.

87. Liu P, Lin H, Xu Y, Zhou F, Wang J, Liu J, et al. Frataxin-Mediated PINK1–Parkin-Dependent Mitophagy in Hepatic Steatosis: The Protective Effects of Quercetin. Mol Nutr Food Res. 2018;62(16).

88. Wang WW, Han R, He HJ, Li J, Chen SY, Gu Y, et al. Administration of quercetin improves mitochondria quality control and protects the neurons in 6-OHDA-lesioned Parkinson's disease models. Aging. 2021;13(8).

89. Henao-Mejia J, Williams A, Goff LA, Staron M, Licona-Limón P, Kaech SM, et al. The MicroRNA miR-181 Is a Critical Cellular Metabolic Rheostat Essential for NKT Cell Ontogenesis and Lymphocyte Development and Homeostasis. Immunity. 2013;38(5).

90. Yan ZX, Zheng Z, Xue W, Zhao MZ, Fei XC, Wu LL, et al. MicroRNA181a Is overexpressed in t-cell leukemia/lymphoma and related to chemoresistance. Biomed Res Int. 2015;2015.

91. Knuefermann C, Lu Y, Liu B, Jin W, Liang K, Wu L, et al. HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. Oncogene. 2003;22(21).

92. Cheng M, Liu L, Lao Y, Liao W, Liao M, Luo X, et al. MicroRNA-181a suppresses parkin-mediated mitophagy and sensitizes neuroblastoma cells to mitochondrial uncoupler-induced apoptosis. Oncotarget. 2016;7(27).

93. Wei J li, Li Y cheng, Ma Z liang, Jin Y xin. MiR-181a-5p promotes anoikis by suppressing autophagy during detachment induction in the mammary epithelial cell line MCF10A. Vol. 7, Protein and Cell. 2016.

94. Lwin T, Lin J, Choi YS, Zhang X, Moscinski LC, Wright KL, et al. Follicular dendritic cell-dependent drug resistance of non-Hodgkin lymphoma involves cell adhesion-mediated Bim down-regulation through induction of microRNA-181a. Blood. 2010;116(24).

95. Zhang M, Zhang Q, Hu Y, Xu L, Jiang Y, Zhang C, et al. Mir-181a increases foxo1 acetylation and promotes granulosa cell apoptosis via sirt1 downregulation. Cell Death Dis. 2017;8(10).

96. Aerbajinai W, Giattina M, Lee YT, Raffeld M, Miller JL. The proapoptotic factor Nix is coexpressed with Bcl-xL during terminal erythroid differentiation. Blood. 2003;102(2).

97. Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. Vol. 20, Nature Cell Biology. 2018.

98. Choi GE, Lee HJ, Chae CW, Cho JH, Jung YH, Kim JS, et al. BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against glucocorticoid-induced synapse defects. Nat Commun. 2021;12(1).

99. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Yee ST, Jin HB, Wesley JB, et al. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. Journal of Biological Chemistry. 2008;283(16).

100. Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, et al. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. Nat Cell Biol. 2012;14(2).

101. Wang Z, Dai X, Chen Y, Sun C, Zhu Q, Zhao H, et al. MIR-30a-5p is induced by Wnt/β-catenin pathway and promotes glioma cell invasion by repressing NCAM. Biochem Biophys Res Commun. 2015;465(3).

102. Li W fang, Dai H, Ou Q, Zuo G qing, Liu C an. Overexpression of microRNA-30a-5p inhibits liver cancer cell proliferation and induces apoptosis by targeting MTDH/PTEN/AKT pathway. Tumor Biology. 2016;37(5).

103. Correction: Heterochromatin Protein HP1γ Promotes Colorectal Cancer Progression and Is Regulated by miR-30a. Cancer Res. 2018;78(13).

104. Fu J, Xu X, Kang L, Zhou L, Wang S, Lu J, et al. MiR-30a suppresses breast cancer cell proliferation and migration by targeting Eya2. Biochem Biophys Res Commun. 2014;445(2).

105. Tang R, Liang L, Luo D, Feng Z, Huang Q, He R, et al. Downregulation of MiR-30a is associated with poor prognosis in lung cancer. Medical Science Monitor. 2015;21.

106. Liu K, Guo L, Guo Y, Zhou B, Li T, Yang H, et al. AEG-1 3'-untranslated region functions as a ceRNA in inducing epithelial-mesenchymal transition of human non-small cell lung cancer by regulating miR-30a activity. Eur J Cell Biol. 2015;94(1).

107. Jiang D, Zheng X, Shan W, Shan Y. The overexpression of miR-30a affects cell proliferation of chondrosarcoma via targeting Runx2. Tumor Biology. 2016;37(5).

108. Zhong M, Bian Z, Wu Z. MiR-30a suppresses cell migration and invasion through downregulation of PIK3CD in colorectal carcinoma. Cellular Physiology and Biochemistry. 2013;31(2–3).

109. Bai H, Wu S. Mir-451: A novel biomarker and potential therapeutic target for cancer. Vol. 12, OncoTargets and Therapy. 2019.

110. Wang LL, Zhang XH, Zhang X, Chu JK. MiR-30a increases cisplatin sensitivity of gastric cancer cells through suppressing epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2016;20(9).

111. Wang X, Wang K, Han L, Zhang A, Shi Z, Zhang K, et al. PRDM1 is directly targeted by miR-30a-5p and modulates the Wnt/β-catenin pathway in a Dkk1-dependent manner during glioma growth. Cancer Lett. 2013;331(2).

112. Jia Z, Wang K, Wang G, Zhang A, Pu P. MiR-30a-5p Antisense Oligonucleotide Suppresses Glioma Cell Growth by Targeting SEPT7. Vol. 8, PLoS ONE. 2013.

113. Zou Z, Ni M, Zhang J, Chen Y, Ma H, Qian S, et al. miR-30a can inhibit DNA replication by targeting RPA1 thus slowing cancer cell proliferation. Biochemical Journal. 2016;473(14).

114. Guo Y, Deng X, Chen S, Yang L, Ni J, Wang R, et al. MicroRNA-30e targets BNIP3L to protect against aldosterone-induced podocyte apoptosis and mitochondrial dysfunction. Am J Physiol Renal Physiol. 2017;312(4).

115. Du B, Dai XM, Li S, Qi GL, Cao GX, Zhong Y, et al. Mir-30c regulates cisplatin-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells by targeting bnip3l and hspa5. Cell Death Dis. 2017;8(8).

116. Chevalier FP, Rorteau J, Ferraro S, Martin LS, Gonzalez-Torres A, Berthier A, et al. MiR-30a-5p Alters Epidermal Terminal Differentiation during Aging by Regulating BNIP3L/NIX-Dependent Mitophagy. Cells. 2022;11(5).

117. Reed JC, Tanaka S, Takayama S, Schibler MJ, Fenton W. Investigation of the Subcellular Distribution of the bcl-2 Oncoprotein: Residence in the

Nuclear Envelope, Endoplasmic Reticulum, and Outer Mitochondrial Membranes. Cancer Res. 1993;53(19).

118. Ng FWH, Shore GC. Bcl-X(L) cooperatively associates with the Bap31 complex in the endoplasmic reticulum, dependent on procaspase-8 and Ced-4 adaptor. Journal of Biological Chemistry. 1998;273(6).

119. Häcki J, Egger L, Monney L, Conus S, Rossé T, Fellay I, et al. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. Oncogene. 2000;19(19).

120. Zong WX, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu QC, Yuan J, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. Journal of Cell Biology. 2003;162(1).

121. Nakajima KI, Hirose H, Taniguchi M, Kurashina H, Arasaki K, Nagahama M, et al. Involvement of BNIP1 in apoptosis and endoplasmic reticulum membrane fusion. EMBO Journal. 2004;23(16).

122. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. Mol Cell. 2000;6(6).

123. Wang P, Wu Y, Li Y, Zheng J, Tang J. A novel RING finger E3 ligase RNF186 regulate ER stress-mediated apoptosis through interaction with BNip1. Cell Signal. 2013;25(11).

124. Tang F, Wang B, Li N, Wu Y, Jia J, Suo T, et al. RNF185, a novel mitochondrial ubiquitin E3 ligase, regulates autophagy through interaction with BNIP1. PLoS One. 2011;6(9).

125. Park J, Han JH, Myung SH, Seo YW, Kim TH. Corrigendum to “MTD-like motif of a BH3-only protein, BNIP1, induces necrosis accompanied by an intracellular calcium spike” [Biochemical and Biophysical Research Communications 495 (2018) 1661–1667](S0006291X17324075)(10.1016/j.bbrc.2017.12.022). Vol. 508, Biochemical and Biophysical Research Communications. 2019.

126. Li FH, Xiang L, Ran L, Zhou S, Huang Z, Chen M, et al. BNIP1 inhibits cell proliferation, migration and invasion, and promotes apoptosis by mTOR in cervical cancer cells. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2019;23(4).

127. Jin L, Zhou Y, Han L, Piao J. MicroRNA302-367-PI3K-PTEN-AKT-mTORC1 pathway promotes the development of cardiac hypertrophy through controlling autophagy. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2020;56(2).

128. Pi J, Liu J, Zhuang T, Zhang L, Sun H, Chen X, et al. Elevated expression of miR302-367 in Endothelial cells inhibits developmental angiogenesis via CDC42/CCND1 mediated signaling pathways. Theranostics. 2018;8(6).

129. Yang CM, Chiba T, Brill B, Delis N, von Manstein V, Vafaizadeh V, et al. Expression of the miR-302/367 cluster in glioblastoma cells suppresses tumorigenic gene expression patterns and abolishes transformation related phenotypes. Int J Cancer. 2015;137(10).

130. Guo Y, Cui J, Ji Z, Cheng C, Zhang K, Zhang C, et al. MiR-302/367/LATS2/YAP pathway is essential for prostate tumor-propagating cells and promotes the development of castration resistance. Oncogene. 2017;36(45).