



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**RAT OVARYUMUNDA ÖSTRUS SIKLUSU, GEBELİK
VE LAKTASYON DÖNEMLERİNDE ISI ŞOK
PROTEİNLERİNİN (HSP27, HSP60, HSP70 VE HSP90)
İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONLARI
VE DAĞILIMLARI**

Banu KANDİL

**HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin KURTDEDE**

**ANKARA
2022**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RAT OVARYUMUNDA ÖSTRUS SIKLUSU, GEBELİK
VE LAKTASYON DÖNEMLERİNDE ISI ŞOK
PROTEİNLERİNİN (HSP27, HSP60, HSP70 VE HSP90)
İMMUNOHİSTOKİMYASAL LOKALİZASYONLARI
VE DAĞILIMLARI**

Banu KANDİL

**HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI
DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nevin KURTDEDE**

**Bu araştırma Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Koordinatörlüğü' nün 21L0239003 proje numarası ile desteklenmiştir**

**ANKARA
2022**

ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü' ne,

Doktora tezi olarak hazırlayıp sunduğum "Rat Ovaryumunda Östrus Siklusu, Gebelik ve Laktasyon Dönemlerinde Isı Şok Proteinlerinin (HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90) İmmunohistokimyasal Lokalizasyonları ve Dağılımları" başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler ve yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Banu KANDİL

Tarih: 06.07.2022

İmza:

KABUL VE ONAY

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'nda Banu KANDİL tarafından hazırlanan “Rat Ovaryumunda Östrus Siklusu, Gebelik ve Laktasyon Dönemlerinde Isı Şok Proteinlerinin (HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90) İmmunohistokimyasal Lokalizasyonları ve Dağılımları” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından DOKTORA TEZİ olarak OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 06.07.2022

Prof. Dr. Nevin KURTDEDE

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Levent ERGÜN

Ankara Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Siyami KARAHAN

Kırıkkale Üniversitesi

Üye

Prof. Dr. Aytül KÜRÜM

Kırıkkale Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fügen AKTAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İçindekiler	iv
Önsöz	vi
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Ovaryum	1
1.1.1. Ovaryum Gelişimi	1
1.1.2. Ovaryum Histolojisi	2
1.1.3. Ovaryum Folikülleri ve Gelişimi (Folikülogenezis)	3
1.1.3.1. Primordiyal Foliküller	3
1.1.3.2. Primer Foliküller	4
1.1.3.3. Sekonder Foliküller	6
1.1.3.4. Graaf Folikülleri (Tersiyer Foliküller)	7
1.1.3.5. Atretik Foliküller	7
1.1.4. İntersitisyel Hücreler	8
1.1.5. Ovulasyon	8
1.1.6. Korpus Luteum	9
1.2. Ratlarda Üreme Fizyolojisi ve Östrus Siklusu, Gebelik ve Laktasyon Dönem Özellikleri	11
1.3. Isı Şok Proteinleri (HSP)	15
1.3.1. HSP27	17
1.3.2. HSP60	18
1.3.3. HSP70	18
1.3.4. HSP90	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2.1. Hayvan Materyali	21
2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	21
2.2.1. Östrus Siklusu Dönemi	21
2.2.2. Gebelik Dönemi	22
2.2.3. Laktasyon Dönemi	23
2.3. Işık Mikroskopik İncelemeler	23
2.4. İmmunohistokimyasal Boyamalar	24
2.5. Foliküler Sınıflandırma	25
2.6. Korpus Luteum Sınıflandırma	25
3. BULGULAR	27
3.1. Rat Ovaryumunun Yapısal Özellikleri	27
3.2. Foliküllerin Yapısal Özellikleri	28
3.2.1. Primordiyal Foliküller	28
3.2.2. Primer Foliküller	28

3.2.3. Sekonder Foliküller	29
3.2.4. Graaf Folikülleri (Tersiyer Foliküller)	29
3.2.5. Atretik Foliküller	31
3.3. Foliküllerde HSP' lerin İmmunohistokimyasal Bulguları	33
3.3.1. HSP60	33
3.3.2. HSP90	34
3.4. İntersitisyel Hücrelerin Yapısal Özellikleri	36
3.5. İntersitisyel Hücrelerdeki HSP' lerin İmmunohistokimyasal Bulguları	36
3.5.1. HSP27	36
3.5.2. HSP60	39
3.5.3. HSP70	41
3.5.4. HSP90	43
3.6. Korpus Luteumların Yapısal Özellikleri	45
3.7. Korpus Luteumlardaki HSP' lerin İmmunohistokimyasal Bulguları	50
3.7.1. HSP27	50
3.7.2. HSP60	52
3.7.3. HSP70	56
3.7.4. HSP90	58
4. TARTIŞMA	62
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	75
ÖZET	77
SUMMARY	79
KAYNAKLAR	81
EKLER	91
Ek-1: Etik Kurul Kararı	91
ÖZGEÇMİŞ	92

ÖNSÖZ

Ovaryum, eşey hücrelerini meydana getiren, salgıladığı hormonlarla dişi genital sistemin diğer organları üzerinde etkili olan, genital siklusu ve gebeliği düzenleyen bir çift organdır. Ovaryumda oositin olgunlaşma bölünmelerinin tamamlanması, foliküllerin gelişimi, genital siklusun, gebeliğin ve laktasyon dönemlerinin devamlılığı için gerekli olan hormonların salgılanması oldukça kompleks bir süreçtir.

Isı şok proteinleri normal koşullar altında protein sentezinin düzgün bir şekilde gerçekleşmesini sağlarken; stres koşulları altında proteinlerin zarar görmesini engelleyerek, protein homeostasisinin sağlanmasında farklı roller üstlenirler. Ayrıca hücre siklusunun devamlılığı, hücre proliferasyonu ve gelişimi, hücre iskeletinin organizasyonu, immun cevabın oluşturulması, apoptozun düzenlenmesi, hormonların sentezi veya taşınması gibi birçok biyolojik olayda da görev alırlar. Canlılığın devamı için gerekli olan bu proteinlerin metabolik olaylardaki rollerinin belirlenmesi büyük önem taşımaktadır.

Proteinlerin biyolojik rolleri hakkında yorum yapabilmek için bu moleküllerin hangi tip dokulardan ve hücrelerden eksprese edildiğinin bilinmesi gerekmektedir. Isı şok proteinlerinin reproduktif sistemlerdeki biyolojik rollerinin ortaya konulması amacıyla yapılan çok sayıda araştırma olsa da, sağlıklı rat ovaryumunda yapılan çalışmaların oldukça sınırlı olduğu fark edilmiştir. Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri diğer hayvanlara göre kısa olan ratlarda, ilk defa ovaryumda ısı şok proteinlerinin (HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90) lokalizasyon ve dağılımlarının immunohistokimya yöntemi ile gösterilmesi bu proteinlerin ovaryum fizyolojisindeki olası fonksiyonlarının ortaya konulması açısından literatüre fayda sağlayacağı, diğer hayvanlarda yapılacak çalışmalara model oluşturacağı ve araştırmadan elde edilecek verilerin ovaryumda ısı şok proteinleriyle yapılacak histolojik, fizyolojik ve patolojik çalışmalara önemli katkılar sağlanacağı düşünülmektedir.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam sürecinde akademik bilgi ve deneyimleri ile bana yardımcı olan danışman hocam Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Nevin KURTDEDE' ye, tez izleme komitesinde yer alan ve bana yol gösteren Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Levent ERGÜN' e ve Anatomi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ahmet ÇAKIR' a, tez çalışmam boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Emel ERGÜN' e, Prof. Dr. Alev Gürol BAYRAKTAROĞLU' na, Doç. Dr. Ahmet CEYLAN' a, Gazi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mürşide Ayşe DEMİREL' e, kıymetli hocalarıma ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde maddi ve manevi büyük fedakarlıklar gösteren ve her zaman bana destek olan canım annem Habibe KANDİL' e, babam Şerafettin KANDİL' e, kardeşlerim Belgin BİRAL' a, Saniye KANDİL' e ve Bengü KANDİL' e sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin gerçekleştirilmesinde 21L0239003 proje numarası ile destek sağlayan Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü' ne teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
AMP	Adenozin Monofosfat
ATP	Adenozin Trifosfat
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrad Derece
C	Karboksi
cDNA	Komplementer Deoksiribonükleik Asit
DAB	Diaminobenzidine
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
Grp94	Glikozla İlişkili Protein 94
HSC	Isı Şoku Kognat
HSF	Isı Şok Faktör
HSP	Isı Şok Protein
kDa	Kilodalton
LH	Luteinleştirici Hormon
M	Orta
μm	Mikrometre
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
N	Amino
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCNA	Proliferatif Hücre Nükleer Antijeni
$\text{PGF}_{2\alpha}$	Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$
pH	Potansiyel Hidrojen
RNA	Ribonükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri

sn	Saniye
Strept- ABC	Strept-Avidin Biotin Kompleks
TRAP1	Tümör Nekroz Faktör Reseptör İlişkili Protein 1
W	Watt
%	Yüzde



ŞEKİLLER

- Şekil 2.1.** Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve diöstrus (D) dönemlerinden alınan vajinal smear. İnce ok: çekirdekli epitelyal hücreler, kalın ok: kornifiye epitelyal hücreler, ok başı: nötrofiller. Giemsa boyama. Bar: 20µm 22
- Şekil 2.2.** Gebe ratlarda görülen vajinal plak 23
- Şekil 2.3.** İmmunohistokimyasal boyamalarda negatif (A) ve pozitif (B) kontroller (rat oviduktu). Bar: 20µm 26
- Şekil 3.1.** Korteksin genel görünümü. AF: atretik folikül, ÇKPF: çok katlı primer folikül, D: kan damarı, GE: germinatif epitel, İH: intersitisyel hücreler, KL: korpus luteum, PrF: primordiyal folikül, S: stroma, TA: tunika albuginea, TKPF: tek katlı primer folikül. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 50µm 27
- Şekil 3.2.** Medullanın genel görünümü. D: kan damarı, KH: düz kas hücreleri, S: stroma. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 50µm 28
- Şekil 3.3.** Primordiyal (PrF), tek katlı primer (TKPF) ve çok katlı primer (ÇKPF) foliküllerin genel görünümü. GE: germinatif epitel, GH: granuloza hücreleri, O: oosit, TA: tunika albuginea, TF: teka folikülü, ZP: zona pellusida. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm 30
- Şekil 3.4.** Sekonder folikülün genel görünümü. A: antrum, GH: granuloza hücreleri, O: oosit; TE: teka eksterna, Tİ: teka interna, ZP: zona pellusida. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm 30
- Şekil 3.5.** Graaf folikülünün genel görünümü. A: antrum, KO: kumulus ovoforus, KR: korona radyata, O: oosit; SG: stratum granulozum, TE: teka eksterna, Tİ: teka interna. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 50µm 31
- Şekil 3.6.** Çok katlı primer (A) ve sekonder (B) folikül aşamasında atreziye uğrayan foliküllerin genel görünümü. Ok: apoptotik hücreler, ok başı: zona pellusidasıyla birlikte dejenere olmuş oosit. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm 32
- Şekil 3.7.** Proöstrus (A) ile gebeliğin (B) ve laktasyonun (C) 20. günlerinde görülen Graaf folikülleri. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 50µm 32
- Şekil 3.8.** Primordiyal (A) ve tek katlı primer (B) foliküllerdeki HSP60 immün reaksiyonu. Bar: 10µm 34
- Şekil 3.9.** Çok katlı primer (A), sekonder (B), Graaf (C) ve atretik (D) foliküllerdeki HSP60 immün reaksiyonu. Bar: A, B, D: 20µm, C: 50µm 34
- Şekil 3.10.** Primordiyal (A) ve tek katlı primer (B) foliküllerdeki HSP90 immün reaksiyonu. Bar: 10µm 35

Şekil 3.11. Çok katlı primer (A), sekonder (B), Graaf (C) ve atretik (D) foliküllerdeki HSP90 immün reaksiyonu. Ok: Oositin nukleusunda pozitif HSP90 immün reaksiyonu. Bar: 20µm 35

Şekil 3.12. İntersitisyel hücrelerin genel görünümü. İH: intersitisyel hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm 36

Şekil 3.13. Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve diöstrus (D) dönemlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP27 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 37

Şekil 3.14. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP27 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 38

Şekil 3.15. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP27 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 38

Şekil 3.16. Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve diöstrus (D) dönemlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP60 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 40

Şekil 3.17. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP60 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, eğri ok: zayıf, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 40

Şekil 3.18. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP60 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, eğri ok: zayıf, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 41

Şekil 3.19. Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve diöstrus (D) dönemlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP70 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 42

Şekil 3.20. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP70 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 42

Şekil 3.21. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP70 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 43

Şekil 3.22. Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve diöstrus (D) dönemlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP90 immün reaksiyonu. Kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 44

Şekil 3.23. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP90 immun reaksiyonu. Kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 44

Şekil 3.24. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP90 immun reaksiyonu. Kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm 45

Şekil 3.25. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki yeni siklik korpus luteumlar. İnce ok: luteal hücreler, kalın ok: apoptotik hücreler, yıldız: folikül sıvısı içeren boşluk. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm 46

Şekil 3.26. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlar. İnce ok: luteal hücreler, kalın ok: apoptotik hücreler, ok başı: fibrosit benzeri hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm 47

Şekil 3.27. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni gebelik korpus luteumları. Ok: luteal hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm 48

Şekil 3.28. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski siklik korpus luteumlar. Ok: luteal hücreler, ok başı: fibrosit benzeri hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm 48

Şekil 3.29. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni laktasyon korpus luteumları. Ok: luteal hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm 49

Şekil 3.30. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski gebelik korpus luteumları. Ok: luteal hücreler, ok başı: fibrosit benzeri hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm 50

Şekil 3.31. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP27 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, eğri ok: zayıf, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 51

Şekil 3.32. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP27 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, eğri ok: zayıf, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 51

Şekil 3.33. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski gebelik korpus luteumlarında HSP27 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, eğri ok: zayıf, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 52

Şekil 3.34. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki yeni siklik korpus luteumlarda HSP60 immun reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 53

Şekil 3.35. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni gebelik korpus luteumlarında HSP60 immün reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 53

Şekil 3.36. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni laktasyon korpus luteumlarında HSP60 immün reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 54

Şekil 3.37. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP60 immün reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 54

Şekil 3.38. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP60 immün reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar:20µm 55

Şekil 3.39. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski gebelik korpus luteumlarında HSP60 immün reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 55

Şekil 3.40. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP70 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 57

Şekil 3.41. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP70 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 57

Şekil 3.42. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski gebelik korpus luteumlarında HSP70 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 58

Şekil 3.43. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki yeni siklik korpus luteumlarda HSP90 immün reaksiyonu. Ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 59

Şekil 3.44. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni gebelik korpus luteumlarında HSP90 immün reaksiyonu. Ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 59

Şekil 3.45. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni laktasyon korpus luteumlarında HSP90 immün reaksiyonu. Ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 60

Şekil 3.46. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP90 immün reaksiyonu. Ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 60

Şekil 3.47. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP90 immun reaksiyonu. Ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 61

Şekil 3.48. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski gebelik korpus luteumlarında HSP90 immun reaksiyonu. Ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm 61



1. GİRİŞ

1.1. Ovaryum

Ovaryumlar, evcil memelilerde kavum abdoministe ve genellikle sublumbal bölgede, böbreklerin gerisinde yerleşmiş bir çift organdır (Bahadır ve Yıldız, 2012). Kısırta fasulye, diğer hayvan türlerinde ise oval şekle sahiptir (Erdost, 2011). Pembemsi beyaz renkte olup, ağırlığı ve boyutları hayvan türlerine ve içerdiği foliküllere göre değişkenlik gösterir (Clement, 1987; Dursun, 2006). Dış yüzeyleri puberteden önce düzgün iken; puberte ile birlikte foliküllerden ötürü nodüler veya tuberküler tipte çıkıntılı hale gelir (Bahadır ve Yıldız, 2012).

Oositin gelişimini, olgunlaşmasını ve ovulasyon ile ovidukta atılmasını sağlayan ovaryumlar, sentezleyip salgıladığı steroid hormonlar ile östrus siklusunu, gebeliği ve foliküler gelişimi düzenlerler. Bu hormonlar sekonder seks karakterlerinin ortaya çıkmasında, dişi genital kanalların gelişimi ve fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesinde de etkili olur (Adhikari ve Liu, 2009).

1.1.1. Ovaryum Gelişimi

Genital sistem intermediyer mezodermin ürogenital plağından farklılaşır. Bu bölgedeki sölom epiteline krsta genitalis adı verilen sağlı-sollu (bilateral) iki kabartı meydana gelir. Kökenini bu bölgeden değil de, vitellus kesesinin ilk bağırsak kanalına yakın kısmındaki endodermden alan primitif cinsiyet hücreleri amöboid hareketlerle dorsal mesenteriyumda ilerleyerek krsta genitalislere gelir ve sölom epitelinin altına yerleşirler (Barber, 1988; Hassa ve Aştı, 2003; Hirshfield, 1991). Burada çoğalarak endodermal kökenli germinatif epitel meydana getirirler (Hassa ve Aştı, 2003). Germinatif epitel hücreleri de bazal membran ile birlikte mezenşim içerisine uzantılar göndererek, yüzey epiteline bağlı düzensiz hücre kümelerinden oluşan primitif

cinsiyet hücre kordonlarını oluştururlar. Bu evredeki gonadlara farklılaşmamış gonadlar denir (Hassa ve Aşti, 2003; Sadler, 2012).

Primitif cinsiyet hücre kordonları primitif cinsiyet hücrelerini içeren düzensiz hücre kümelerine ayrılarak, ovaryumun medulla kısmına yerleşirler. Daha sonra bu yapılar kaybolur ve yerlerini ovaryumun medullasını oluşturan vasküler stromaya bırakırlar. Dişi gonadların yüzey epiteli çoğalarak, yüzeye yakın kortekste bulunan kortikal kordonlar adı verilen ikinci nesil kordonları oluştururlar. Bu kordonlar bir veya daha fazla sayıda primitif eşey hücrelerini içeren izole hücre topluluklarına ayrılırlar. Zamanla izole olan eşey hücreleri oogonyumlara dönüşürler (Barber, 1988; Sadler, 2012). Oogonyumlar mitoz bölünme ile hızla çoğalarak sayılarını artırırlar (Kuyucu ve Tap, 2009). Oogonyumların bir kısmı I. mayoz bölünmeye girer ve profazın diploten evresinde bölünmenin durması ile primer oositleri (oosit I) oluştururlar. Fötal dönemde şekillenen primer oositler, puberteye kadar I. olgunlaşma bölünmesinin profaz evresinin diploten döneminde beklerler (Hirshfield, 1991; Motta ve ark., 2003). Primer oositlerin etrafının tek katlı yassı epitel ile sarılmasıyla primordiyal foliküller gelişir ve puberteye kadar ovaryumun korteksinde sadece bu foliküller bulunur (Adhikari ve Liu, 2009; Eppig ve O' Brien, 1996).

1.1.2. Ovaryum Histolojisi

Ovaryum, dişi eşey hücrelerini meydana getiren ve salgıladığı hormonlar ile dişi genital sistemin diğer organları üzerinde de etkili olan ve genital siklusu düzenleyen bir organdır. Hilus bölgesinden mezovaryum olarak adlandırılan bağ dokusu ile pelvis duvarına ve uterusu tutunur. Organın mezovaryumu peritonun viseral yaprağı (mezotel ve bağ doku) ile geri kalan kısmı ise germinatif epitel ile örtülüdür (Erdost, 2011; Tanyolaç, 1999). Tek katlı kübikten prizmatığa değişkenlik gösteren germinatif epitel bazal membran üzerine oturur ve epitelin hemen altında sıkı bağ dokudan oluşan tunika albuginea yer alır (Clement, 1987; Erdost, 2011; Papadaki ve Beilby, 1971; Yamada ve ark., 1957).

Ovaryum korteks ve medulla denilen iki kısımdan meydana gelir (Tanyolaç, 1999). Medulla organın merkezinde bulunur ve gevşek bağ dokudan oluşur (Priedkalns ve Leiser, 1998). Bol miktarda kan damarları içermesinden dolayı medullaya zona vaskuloza da denir (Tanyolaç, 1999). Medullada ayrıca kollagen ve elastik iplikler, düz kas hücreleri ve sinir teli demetleri de bulunur (Erkoçak, 1984). Medullanın etrafını çevreleyen korteks, organın fonksiyon gören kısmıdır. Bu nedenle zona paransimatoza da denir (Ross ve Pawlina, 2006; Tanyolaç, 1999). Korteks farklı gelişim aşamalarında olan foliküller, korpus luteum, korpus albicans, atretik foliküller, intersitisyel hücreler ile bu yapılar arasında yer alan kortikal stromadan oluşur. Kortikal stroma, kollagen ve retikulum ipliklerini, stromal hücreleri ve şekilsiz temel maddeyi içeren bağ dokudur (Junqueira ve Carneiro, 2005; Tanyolaç, 1999).

1.1.3. Ovaryum Folikülleri ve Gelişimi (Folikülogenezis)

Folikülogenezis oosit gelişimi, primordiyal foliküllerin olgunlaşarak primer, sekonder, tersiyer foliküllere gelişmesi ve devamında Graaf folikülünün ovulasyonu ile sonuçlanan endokrin, parakrin ve otokrin süreçleri içeren olaylar dizisidir (Şimşek, 2012; Ünlüsoy ve Ertuğrul, 2014; Yücel ve ark., 2018). Endokrin kontrolü hipotalamustan salgılanan GnRH (Gonadotropin Salgılatıcı Hormon), hipofizden salgılanan FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) ve LH (Luteinleştirici Hormon) ile sağlanır (Hsueh ve ark., 2015). Otokrin ve parakrin kontrolünde ise ovaryumdan sentezlenen çeşitli büyüme faktörleri görev alır (Kuyucu ve Tap, 2009).

1.1.3.1. Primordiyal Foliküller

Primordiyal foliküller korteksin tunika albugineyaya bakan dış kısmındaki dar bir alanda, dağınık düzensiz topluluklar şeklinde bulunurlar (Clement, 1987). Bu foliküllerde yer alan primer oosit mayoz-I' in profazının diploten döneminde olup; oositin etrafı tek katlı yassı folikül epitel hücreleri ile sarılıdır (Adhikari ve Liu, 2009; Eppig ve O' Brien, 1996; Fortune ve ark., 2000). Folikül epitel hücreleri oositin

gelişimini destekler, fertilizasyon için oositi uyarır ve embriyonun implantasyonuna yardımcı olur (Eppig, 2001).

Folikül epitel hücrelerinin dış yüzü bazal membran ile sınırlıdır (Hirshfield, 1991; Oktem ve Oktay, 2008). Folikül epitel hücreleri ve oosit arasında dezmozom ve gap junction türü bağlantılar bulunur (Motta ve ark., 2003). Foliküldeki oosit yuvarlak şekilli olup, ekzantrik olarak yerleşmiş ökromatik büyük bir nukleus ve belirgin nukleolusa sahiptir (Junqueira ve ark., 1998). Oositin sitoplazmasına ooplazma da denir. Ooplazmada çok sayıda lizozom, mitokondri, endoplazmik retikulum ve Golgi cisimciğinden oluşan Balbiani cisimciği bulunur (Ross ve Pawlina, 2006).

1.1.3.2. Primer Foliküller

Puberteye giren dişide seksüel siklusun kesintiye uğramadan devam edebilmesi için hipotalamustan GnRH salgılanır. GnRH kan yoluyla hipofiz ön lobuna gelerek FSH ve LH salgılanmasını stimüle eder. FSH, ovaryumdaki primordiyal folikülleri gelişmesi yönünde uyarır (Hassa ve Aştı, 2003).

Bu gelişme sürecinde oositte, folikül epitel hücrelerinde ve folikülün etrafındaki stromada bir takım değişiklikler şekillenir (Junqueira ve ark., 1998). İlk olarak oosit büyüyerek çapı artar ve etrafında bulunan tek katlı yassı folikül epitel hücreleri tek katlı kübiğe dönüşür (Motta ve ark., 2003; Skinner, 2005). Bu foliküllere tek katlı (unilaminar) primer foliküller denir (Junqueira ve ark., 1998). Zamanla oosit daha da büyür, folikül epitel hücreleri ise mitoz bölünme ile çoğalarak çok katlı hale gelir. En içte (oosite yakın) ve en dışta olanlar kübik arada kalanlar ise poligonal şekil alır. Bu aşamadaki foliküllere ise çok katlı (multilaminar) primer foliküller denir (Erdost, 2011). Çok katlı primer foliküller preantral foliküller olarak da isimlendirilir (Junqueira ve Carneiro, 2005). Sayıları artan ve sitoplazması azalan folikül epitel hücreleri, çekirdekleri ile taneli bir görünüm sergiler; bu yüzden bu hücrelere granuloza hücreleri de denir (Tanyolaç, 1999). Granuloza hücreleri katmanı kan damarı içermediğinden, bu hücreler yakınındaki diğer hücreler ile teması artırmak için

bol miktarda gap junction türü bağlantılar geliştirirler. Bu bağlantılar ile hem hücreler arası iletişim hem de moleküllerin taşınması gerçekleşir (Oktem ve Oktay, 2008). Oositin etrafında bulunarak, oosite küçük bir mikroçevre ve fiziksel destek oluşturan granuloza hücreleri FSH' ın etkisi ile östrojen hormonunu sentezler (Erdost, 2011; Skinner, 2005).

Primer foliküllerdeki oosit büyüdükçe organellerin dağılımı da değişir. Golgi cisimcikleri Balbiani cisimciğinden ayrılır. Sitoplazmadaki ribozom, mitokondri, granülsüz endoplazmik retikulum ve küçük veziküllerin sayısı artar. Seyrek lipid damlacıkları ve kitleler halinde lipokrom pigmentleri de görülür (Ross ve Pawlina, 2006). Oosit büyüdükçe nukleus da büyür ve germinal vezikül diye isimlendirilir (Junqueira ve ark., 1998).

Folikül gelişimi devam ederken oosit ve granuloza hücreleri arasında homojen görünümde bir kalınlaşma meydana gelir. Oosit ve folikül epitel hücrelerinin oluşturduğu bu yapıya zona pellusida denir (Tanyolaç, 1999; Wassarman, 2008). Zona pellusida glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden zengin olup, kuvvetli PAS (Periyodik Asit Schiff) pozitif reaksiyon verir (Clement, 1987). Zona pellusida içerisinde oosit ve granuloza hücrelerinin birbirine doğru uzanan mikrovillusları bulunur. Bu mikrovilluslar aracılığı ile oosit ve granuloza hücreleri arasındaki temas ve rezorbsiyon yüzeyi arttırılarak, gelişmekte olan oositin metabolizma olayları kolaylaştırılır (Erkoçak, 1984). Zona pellusida folikülogenezis, fertilizasyon, oviduktan uterusu geçiş ve implantasyon sürecinde de oositi ve embriyoyu korur (Gedikli ve ark., 2013; Zhao ve Dean, 2002).

Folikül gelişimi ile birlikte folikül etrafındaki stroma hücreleri bağ doku kılıfı olan teka folikülünü oluştururlar (Erkoçak, 1984; Junqueira ve ark., 1998; Kuyucu ve Tap, 2009). Teka folikülü hücreleri stromadaki fibroblast benzeri hücrelerden köken alırlar (Young ve McNeilly, 2010).

1.1.3.3. Sekonder Foliküller

Oositin etrafındaki granuloza hücreleri çoğalarak 6-12 katmanlı bir hal alır ve hücreler arasında folikül sıvısı ile dolu olan, antrum adı verilen küçük boşluklar şekillenir (Junqueira ve ark., 1998; Ross ve Pawlina, 2006). Bu aşamadaki foliküllere antral foliküller de denir (Junqueira ve Carneiro, 2005). Folikül sıvısı, folikül epitel hücrelerinden salgılanan steroid hormonlar (östrojen, progesteron, androjen) ile proteinler, FSH, LH, büyüme hormonları, sitokinler, elektrolitler, enzimler ve reaktif oksijen türleri içermesinden dolayı zengin bir içeriğe sahiptir. Bu sıvı oositin büyümesinde, olgunlaşmasında, beslenmesinde, foliküllerin gelişmesinde, spermatozoonların kapasitasyonunda, fertilizasyonda ve erken embriyonik gelişimde oldukça önemli görevler alır (Basuino ve Silveira, 2016).

Folikül gelişimi ile birlikte teka folikülü, teka interna ve teka eksterna olarak iki katmanlı bir yapıya dönüşür (Erdost, 2011; Richards ve ark., 2018). Bu iki katmanda stromadaki fibrositlerden köken alan mekik şekilli hücreler yer alır. Bu hücrelerle birlikte teka eksternada çok sayıda kan damarı, teka internada ise bol miktardaki bağ dokunun (özellikle retikulum iplikleri) yanında daha az sayıda kan damarı ve ovulasyonda görev alan düz kas hücreleri bulunur (Tanyolaç, 1999). Teka katmanları arasındaki ve teka eksterna ile onun etrafında yer alan stroma arasındaki sınır belirgin değildir. Ancak teka interna ve granuloza hücreleri arasındaki sınır belli olup, ince bir bazal membran ile birbirlerinden ayrılır (Junqueira ve ark., 1998; Ross ve Pawlina, 2006).

Teka internada bulunan salgı hücreleri LH' ın etkisiyle kolesterolden östrojenin öncülü olan androstenedionu sentezler. Androstenedion daha sonra granuloza hücrelerine taşınır. FSH, granuloza hücrelerinden aromataz sitokrom P450 enziminin ekspresyonunu uyarır ve bu enzim aracılığıyla androstenedion östrojene dönüştürülür (Magoffin, 2005).

1.1.3.4. Graaf Folikülleri (Tersiyer Foliküller)

Folikül gelişimi devam ettikçe granuloza hücreleri çoğalıp farklılaşır ve oosit ovulasyon için uygun olgun ve büyüklüğe ulaşır (Motta ve ark., 2003). Granuloza hücreleri arasındaki antrum adı verilen küçük boşluklar birleşerek yarımay veya C şeklinde tek bir boşluk halini alır ve oosit antrum içerisinde küçük bir ada görüntüsü sergiler (Erdost, 2011). Granuloza hücreleri oositin etrafını ışınsal biçimde veya taç gibi sararak korona radyata yapısını şekillendirir. Korona radyatanın etrafında çok sıralı granuloza hücreleri bulunur. Bu oluşumlar folikül duvarının bir tarafına tutunmuş olarak antruma doğru yarımada biçiminde uzanır ve bu uzantı kumulus ovoforus olarak adlandırılır. Antrumu çevreleyen granuloza hücreleri katmanına ise stratum granulozum denir (Ross ve Pawlina, 2006; Samuelson, 2007; Tanyolaç, 1999).

Ovulasyona yaklaşırken granuloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır ve granuloza hücre tabakası incelirken antrumun boyutu gittikçe artar (Ross ve Pawlina, 2006). Antrum içerisinde bulunan folikül sıvısının artması sonucu granuloza hücreleri birbirinden uzaklaşır, oositin granuloza hücreleriyle olan bağlantısı gevşer ve sadece korona radyata hücreleri oosit etrafında radyer sıralanmış olarak oosite bağlı kalır (Erkoçak, 1984). Bu gelişmeler ile birlikte teka tabakaları da daha belirgin bir görünüm kazanır (Ross ve Pawlina, 2006).

1.1.3.5. Atretik Foliküller

Her östrus siklusunda çok sayıda primordiyal folikül büyümeye başlar; ancak bunlardan yalnızca bir veya birkaçı ovulasyona uğrar. Geri kalan foliküller apoptoz denilen olay ile atrezi sürecine girer (Hussein, 2005). Atrezi, gelişimin herhangi bir aşamasındaki foliküllerde (primordiyal, primer, sekonder ve Graaf) gerçekleşebilir (Erkoçak, 1984; Ross ve Pawlina, 2006). Atretik foliküllerin granuloza hücrelerindeki çekirdek büzüşür ve kromatin kitlesi kaybolur; granuloza hücreleri arasında apoptotik hücreler görülür, granuloza hücreleri ve oosit arasındaki bağlantılar kaybolur, zona pellusida ve oosit dejenere olur (Halıcıoğlu ve ark., 2021; Priedkalns ve Leiser, 1998;

Rençber ve ark., 2018; Samuelson, 2007; Yoshida ve ark., 2009). Atretik foliküllerin dejenere olan granuloza hücreleri ve oositi makrofajlar tarafından ovaryumdan uzaklaştırılırken, teka interna hücreleri steroid hormon sentezleyen intersitisyel hücrelere dönüşürler (Erdost, 2011; Junqueira ve ark., 1998).

1.1.4. İntersitisyel Hücreler

İntersitisyel hücreler, ovaryumun stromasında topluluklar halinde bulunan poligonal şekilli ve epiteloid karakterde olan hücrelerdir (Priedkalns ve Leiser, 1998). Bu hücreler atretik foliküllerin etrafındaki stromal yapılardan ve teka interna hücrelerinden köken alırlar (Erdost, 2011; Priedkalns ve Leiser, 1998). Ayrıca, tunika albugineyada bulunan ve çeşitli yönlerde diferensiye olma özelliğine sahip hücreler de zamanla intersitisyel hücrelere dönüşürler ve östrojen salgırlar (Tanyolaç, 1999). İntersitisyel hücreler steroid salgılayan hücrelere benzer şekilde sitolojik, histokimyasal ve biyokimyasal özelliklere sahiptirler. Sitoplazmalarında iyi gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulum ile bol miktarda lipid damlacıkları ve mitokondri içermesi gibi özelliklerinden dolayı steroidogeneze de katıldığı bilinir. İntersitisyel hücrelerin ovaryumdaki miktarı ve dağılımları hayvanların türlerine, üreme yaşlarına ve ovaryum sikluslarına bağlı olarak değişkenlik gösterir (Al-Mehdi, 1979; Gil ve ark., 2007; Guraya, 1973).

1.1.5. Ovulasyon

Hipofiz ön lobundan salgılanan FSH, ovaryumdaki foliküllerin gelişmesine ve bunun sonucunda da teka interna, granuloza ve intersitisyel hücrelerden östrojen hormonunun salgısının artmasına sebep olur. Perifer kanda östrojenin en yüksek düzeye ulaşması hipotalamustan yeni bir GnRH salgısına neden olur ve bu GnRH da hipofiz ön lobuna etki ederek birden bire fazla miktarda LH salgılanmasını uyarır (Hassa ve Aştı, 2003). Ovulasyondan önce ani LH salınımı ile birlikte I. olgunlaşma bölünmesinin profaz evresinin diploten döneminde olan primer oosit, bölünmeyi

tamamlar; sekonder oosit ve I. kutup cisimciği oluşur. Sekonder oosit, II. olgunlaşma bölünmesinin metafaz aşamasına gelince tekrar durur (Motta ve ark., 2003; Ünlüsoy ve Ertuğrul, 2014).

Ovulasyondan hemen önce ovaryum yüzeyine dayanarak, ovaryumu dışa doğru kubbeleniren ve germinatif epitele baskı yapan Graaf folikülü tunika albugineyadaki damarları sıkıştırarak o bölgenin beslenmesine engel olur. Folikül epitel hücrelerinden salgılan proteolitik enzimler tunika albugineyanın bağ dokusunu ve germinatif epiteli eritirler (Motta ve ark., 2003; Tanyolaç, 1999). Bu alandaki stromal hücreler de zamanla dejenere olur ve kollagen iplikler bütünlüğünü kaybeder (Clement, 1987). Nihayet II. olgunlaşma bölünmesinin metafaz aşamasındaki sekonder oosit, birinci kutup hücresi, zona pellusida, korona radiyata hücreleri ve bir miktar folikül sıvısı ile birlikte büyük bir basınçla germinatif epitelin zayıflayan bir noktasından (stigma) periton boşluğuna atılır ve ovulasyon gerçekleşir. Ovaryum yüzeyine uzanan fimbriya ovarikalar yardımı ile sekonder oosit yakalanarak tuba uterinanın infundibulum kısmına ulaşır (Priedkalns ve Leiser, 1998; Samuelson, 2007). Sekonder oosit spermatozoon tarafından fertilize olmazsa ovulasyondan 24 saat sonra dejenere olur (Junqueira ve ark., 1998). Eğer fertilizasyon gerçekleşirse sekonder oosit, II. olgunlaşma bölünmesini tamamlar ve haploid kromozom içeren ovum ve buna yapışık kutup hücreleri oluşur (Hassa ve Aştı, 2003). Mayoz bölünme tamamlandıktan sonra dişi ve erkek pronukleusları oluşur, bunların kaynaşmasıyla zigot şekillenir (Kuyucu ve Tap, 2009).

1.1.6. Korpus Luteum

Ovulasyon ile oositi atılan folikülün sıvısı boşalır ve folikül büzüşür (Erdost 2011; Ross ve Pawlina, 2006; Tanyolaç, 1999). Büzüşen boşluğa kan dolar ve pıhtılaşır. Ovulasyona uğrayan folikülün yerinde geçici bir yapı olan korpus hemorajikum oluşur (Kierszenbaum, 2006). Kan pıhtısı ile dolu olan folikülün antrum kısmını bağ dokusu işgal etmeye başlar ve burada bulunan pıhtılaşmış kan yavaş yavaş uzaklaştırılır (Junqueira ve Carneiro, 2005). Daha sonra teka interna ve granuloza

hücreleri fizyolojik ve morfolojik olarak farklılaşmaya başlar (Niswender ve ark., 2000). Granuloza hücreleri granuloza lutein hücrelerine, teka interna hücreleri de teka lutein hücrelerine dönüşür. Bu hücrelerin sitoplazmalarında lipid ve lipidlerde çözünen pigmentlerin birikmesinden dolayı bu yeni yapıya sarı cisim anlamına gelen korpus luteum denir (Motta ve ark., 2003). Lutein hücreleri sitoplazmalarında lipid damlacıkları, gelişmiş granülsüz endoplazmik retikulum ve tubulus tipi mitokondriyonlara sahip olması ile tipik steroid sentezleyen hücre özellikleri gösterirler (Kierszenbaum, 2006). Korpus luteum heterojen bir yapıya sahip olup luteal hücreler dışında fibroblastlar, endotelial hücreler, perisit ve immun sisteme ait hücreleri de içerir (Stocco ve ark., 2007).

Korpus luteumun fonksiyonları hipofiz, desidua ve plasentadan salgılanan hormonlar ile kontrol edilir (Stocco ve ark., 2007). Hipofizden salgılanan FSH ile granuloza lutein hücrelerinden progesteron ve östrojen hormonu sentezlenirken, LH etkisi ile teka lutein hücrelerinden progesteron ve androstenedion hormonu sentezlenir (Kierszenbaum, 2006). Bu salgılanan hormonlar, fertilizasyon gerçekleşmişse gelişen zigotun uterusu implantasyonunu ve gebeliğin devamı için gerekli koşulların sağlanmasını uyarırlar (Ross ve Pawlina, 2006). Korpus luteumdan salgılanan progesteron hormonu hipotalamusu etkileyerek yeni bir GnRH salgısının üretimini durdurur, uterus bezlerinin sekretorik aktivitesini artırır, uterus düz kaslarının gevşemesini sağlar ve maternal metabolizmayı etkileyerek meme gelişimini uyarır (Niswender ve ark., 2000; Reynolds ve Redmer, 1999).

Korpus luteum salgıladığı hormonlar ile gebeliğin devamlılığı için oldukça önemli bir yapıdır (Niswender ve ark., 2000). Embriyonun trofoblast hücreleri tarafından üretilen koryonik gonadotropin hormonu, korpus luteumun gelişimini etkileyerek gebeliğin sonuna kadar varlığını sürdürmesini sağlar (Erdost, 2011; Kierszenbaum, 2006). Ancak, gebeliğin ikinci yarısında korpus luteumun görevine plasenta da katılır (Tanyolaç, 1999). Gebelik korpus luteumu korpus luteum verum, korpus luteum pregnansi veya korpus luteum graviditatis olarak isimlendirilir. Eğer fertilizasyon veya implantasyon gerçekleşmediyse kısa süre varlığını sürdüren bir

korpus luteum şekillenir. Buna da korpus luteum periyodikum veya korpus luteum spurium denir (Erdost, 2011).

Normal üreme olaylarının düzenlenmesi ve devamlılığı için, görevi sona eren korpus luteumların ovaryumdan uzaklaştırılması gerekir (Stocco ve ark., 2007). Fekondasyonun şekillenmemesi halinde hipofizden salgılanan oksitosin ve ovaryumdan salgılanan östrojen, endometriyumdan $PGF_{2\alpha}$ (prostaglandin) salgısını uyarır (Hassa ve Aştı, 2003). $PGF_{2\alpha}$ salgısı ile görevi sona eren korpus luteumlar gerileme sürecine girerler. Luteal hücreler apoptoz yoluyla uzaklaştırılır (Niswender ve ark., 2000; Stocco ve ark., 2007). Gerileyen korpus luteum yerini bağ dokuya bırakır ve yavaş yavaş nedbe dokusu olarak da adlandırılan korpus albikansa dönüşür (Clement, 1987). Korpus luteumun gerilemesi ile birlikte progesteron sentezi durur. Progesteron seviyesinin önemli miktarda düşmesi hipotalamusu etkileyerek GnRH üretimini başlatır ve hipofizden salgılanan FSH, folikülleri gelişmesi yönünde uyarır (Şimşek, 2012).

1.2. Ratlarda Üreme Fizyolojisi ve Östrus Siklusu, Gebelik ve Laktasyon Dönem Özellikleri

Ratlar geçmişten günümüze kadar üzerinde birçok deneysel çalışmaların yapıldığı hayvanlardır. Bu hayvanlar çabuk üreyebilmeleri, bakım ve beslenmelerinin kolay olması, elde edilen verilerin diğer canlılar için model oluşturması, östrus siklusu ve gebelik tayininin kolayca yapılabilmesi gibi sebeplerden dolayı araştırmalarda çok fazla tercih edilir (Ajayi ve Akhigbe, 2020; Hamid ve Zakaria, 2013; Yiğit ve ark., 2019).

Ratlar mevsime bağlı olmayan poliöstrik hayvanlar olup, puberte başlangıcından yaşlılığa kadar gebe kalmadıkları süre boyunca 4-5 günde bir östrus siklusu gösterirler (Cora ve ark., 2015; Oba ve ark., 2001; Yiğit ve ark., 2019). Östrus siklusu proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere 4 evreden oluşur (Hamid ve Zakaria, 2013).

Proöstrus yaklaşık 12-14 saat, östrus 25-27 saat, metöstrus 6-8 saat, diöstrus ise 55-57 saat sürer (Westwood, 2008).

Ratlarda östrus siklusu vajinal smear yöntemi kullanılarak tespit edilir. Östrus siklusu boyunca vajina epitelinde hormonların etkisi ile yapısal değişiklikler şekillenir ve siklus evreleri vajinal smeardaki hücrelerin tiplerine göre belirlenir. Vajinal smear örneklerindeki epitelyal hücreler, kornifiye epitelyal hücreler ve lökositlere bakılarak siklus evreleri tespit edilmeye çalışılır (Çoban ve ark., 2016; Oba ve ark., 2001; Paccola ve ark., 2013).

Proöstrus evresi vajinal smearda çoğunlukla çekirdekli epitelyal hücrelerin görülmesi ile karakterizedir (Çoban ve ark., 2016; Hubscher ve ark., 2005). Östrus evresinin başlangıcında vajinal smearda yaklaşık olarak %75 çekirdekli epitelyal hücreler ve %25 keratinize (kornifiye, squamöz) hücreler saptanırken, ortalarında çekirdek içermeyen şişmiş keratinize hücreler çoğunluğu oluşturur. Östrusun sonlarına doğru ise keratinize hücreler dejenere olur ve epitelyal bir yığıntı oluştururlar (Lohmiller ve Swing, 2006). Metöstrus döneminde çekirdekli hücreler ve keratinize hücreler etrafında çok miktarda lökositler gözlenir. Diöstrus evresinde dominant hücre tipi lökositlerdir. Ayrıca diöstrus evresinde keratinize hücreler ile çekirdekli epitelyal hücrelere de rastlanılabilir (Ajayi ve Akhigbe, 2020; Çoban ve ark., 2016; Yener ve ark., 2007).

Östrus siklusu hipotalamus, hipofiz ve ovaryumdan salgılanan hormonlar ile kontrol edilir (Ajayi ve Akhigbe, 2020; Çoban ve ark., 2016). Hipofizden salgılanan LH, hipotalamustan salgılanan GnRH ile ilişkili olarak, pulsatif dalgalanmalar şeklinde salgılanır ve en yüksek düzeyi proöstrusda, en düşük düzeyi ise östrus da görülür (Lohmiller ve Swing, 2006). LH, Graaf folikülünün ovulasyonunu ve korpus luteumun oluşmasını uyarır (Hamid ve Zakaria, 2013). Östrus siklusu boyunca iki adet FSH dalgası gerçekleşir ve folikülleri gelişmesi yönünde uyarır. İlk dalga LH ile ilişkili olup, ikinci dalga ovulasyon sonrası inhibindeki azalmadan kaynaklıdır (Lohmiller ve Swing, 2006). Proöstrus ve östrus fazında ovaryumdaki foliküller gelişir, östrus evresinin ortalarında ovulasyon şekillenir ve ovulasyondan sonra

patlayan folikülün yerinde korpus luteum oluşur (Yiğit ve ark., 2019). Metöstrus döneminde korpus luteumdan progesteron hormonu salgılanır. Diöstrus döneminde progesteron hormon seviyesi azalır ve östradiol seviyesindeki artış ile birlikte foliküler gelişim tekrar hızlanır (Lohmiller ve Swing, 2006).

Ratlarda 4-5 gün süren östrus siklusunda gerçek bir luteal faz görülmemektedir. Ovulasyon sonrasında geriye kalan foliküler hücreler luteal hücrelerin bazı özelliklerini sergilese de, korpus luteumun iyi gelişmediği ve fonksiyonel olmadığı düşünülür. Çünkü, uterusu implantasyon için gerekli olan progesteronu yeterli miktarda salgılayamamaktadır. Östrus siklusu boyunca aktif bir korpus luteumun olmaması foliküler gelişmeye ve 4-5 gün içerisinde ovulasyonun tekrar gerçekleşmesine izin verir (Accialini ve ark., 2017).

Ratlarda korpus luteumun oluşumu, gerilemesi ve fonksiyonu diğer türlere kıyasla farklı özelliklere sahiptir. Ömrüne ve steroidojenik kapasitesine göre siklik, gebelik, yalancı gebelik ve laktasyon korpus luteumu olarak dört tip korpus luteum vardır (Accialini ve ark., 2017). Bu korpus luteumlar da östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemlerinde fonksiyonel olması ve gerilemesine bağlı olarak yeni ve eski korpus luteumlar olarak tekrar isimlendirilir (Accialini ve ark., 2017; Bagnell ve ark., 1987; Golos ve ark., 1984; Sato ve ark., 2014; Taketa ve ark., 2013; Yoshida ve ark., 2009).

Östrus siklusunda ovulasyondan hemen sonra oluşan siklik korpus luteumu küçük ve kısa ömürlüdür (2-3 gün) ve belli bir miktarda progesteron salınımı gerçekleştirir. Bunlar bir sonraki östrüs döngüsüne girerken, gerilemeye başlarlar (Yiğit ve ark., 2019). Böylece östrus siklusu boyunca rat ovaryumunda iki tip korpus luteum bulunur. Ovulasyon sonrasında şekillenip fonksiyonel olarak aktif olana yeni siklik korpus luteumu, önceki siklus döneminden kalıp gerileyene ise eski siklik korpus luteumu denir (Sato ve ark., 2014; Taketa ve ark., 2013; Yoshida ve ark., 2009).

Ratlarda gebelik ortalama 21-23 gün sürer (Sarıözkan, 2005). Çiftleşmeden sonra alınan vajinal smearda spermatozoonların bulunması veya vajinada 12-24 saat

kadar kalabilen vajinal plak görülmesi ile gebelik tanısı konulabilir. Ayrıca vücut ağırlığı artışı, abdominal büyüme, palpasyon bulguları ve gebeliğin 14. gününden sonra meme bezlerinin gelişimi bu tanıyı güçlendirir (Sarıözkan, 2005; Saruhan ve Dereli, 2016).

Gebelik süresinin büyük bir kısmında ovaryumda farklı büyüklüklerde foliküller bulunur ancak bunlar fizyolojik olarak tam olgunlaşamadıkları için ovule olamazlar (Miyamoto ve ark., 1987; Yiğit ve ark., 2019). Gebelik döneminde de rat ovaryumunda iki tip korpus luteum bulunur. Fonksiyonel olarak aktif olana yeni gebelik korpus luteumu, önceki siklus döneminden kalıp gerileyene ise eski siklik korpus luteumu denir (Golos ve ark., 1984). Gebelik durumunda şekillenen gebelik korpus luteumunun boyutu gebeliğin başlangıcında küçük olsa da steroidojenik aktivitesini zamanla artırarak gebelik boyunca fonksiyonel olur (Yiğit ve ark., 2019). İnsanlarda gebelik korpus luteumu sınırlı bir süre progesteron hormonunu üretir, daha sonra plasenta steroid hormonların üretimini devralır. Ratlarda ise plasentadan çok az miktarda progesteron üretimi gerçekleşir ve gebelik korpus luteumu gebelik boyunca progesteron hormonunun üretiminden sorumludur (Goyeneche ve ark., 2003). Gebeliğin sonunda korpus luteum geriler, progesteron seviyesi düşer ve bu düşüş doğumu tetikleyen önemli bir sinyaldir (Accialini ve ark., 2017). Diğer hayvanlardan farklı olarak rat embriyosu östrojen hormonu salgılayamaz, anneden salgılanan östrojen hem implantasyonu düzenler hem de gebelik korpus luteumunu aktive ederek devamlılığını sağlar (Lohmiller ve Swing, 2006).

Ratlarda laktasyon süresi yaklaşık 3 hafta sürer. Laktasyon emme uyarımı olmadan şekillenir. Laktasyon başlangıcı prolaktine, glukokortikoidlere ve gebeliğin son günlerinde artan plazma kortikosteronuna bağlıdır. Gebelik döneminde meme bezi gelişimi ve laktasyon döneminde süt üretimi plasental hormonlar ve laktojenler aracılığı ile olur (Lohmiller ve Swing, 2006).

Gebe ratlarda doğumdan hemen sonra (postpartum) ovulasyon şekillenir ve laktasyon dönemi boyunca rat ovaryumunda iki tip korpus luteum bulunur. Bunlardan bir tanesi önceki gebelik döneminden kalıp gerileme sürecine giren eski gebelik korpus

luteumu, diğeri ise postpartum ovulasyon sonrasında şekillenip, fonksiyonel olarak aktif olan yeni laktasyon korpus luteumudur (Bagnell ve ark., 1987). Laktasyon dönemi boyunca gebelik korpus luteumu gerilemeye başlar, laktasyon korpus luteumu ise fonksiyonel olur, büyür ve progesteron hormonunu üretir. Laktasyon korpus luteumu, emziren annelerde emme uyarımı ile birlikte artan prolaktine oldukça hassastır ve bu korpus luteumun ömrü prolaktin hormonu tarafından düzenlenir (Accialini ve ark., 2017). Östrus siklusu ve ovulasyon, laktasyon sürecinde ertelenir ve emzirmenin bitiminden itibaren tekrar başlar (Lohmiller ve Swing, 2006).

1.3. Isı Şok Proteinleri (HSP)

1962 yılında Ritossa, *Drosophila melanogaster*' in tükürük bezi hücrelerinin kromozomlarında yüksek ısıya bağlı olarak artan gen ifadesi sonucu puff (şişkinlik) adı verilen yapılar gözlemlemiştir. 12 yıl sonra puff bölgelerinde kodlanan proteinler belirlenmiş ve çevre sıcaklığındaki ani artıştan kaynaklı olarak sentezlerinin artmasından dolayı, bu proteinler ısı şok proteinleri olarak isimlendirilmiştir (Neuer ve ark., 2000). Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda ısı artışı dışında enfeksiyon, yangı, etanol, arsenik, ağır metaller, ultraviyole ışınları gibi hücresele toksinlere maruz kalma durumlarında; açlık, oksijen yetersizliği gibi stres faktörlerinin varlığında bu proteinlerin artış gösterdiği farkedilmiş ve bunlara stres proteinleri de denilmiştir (Neuer ve ark., 2000; Tsan ve Gao, 2004; Whitley ve ark., 1999).

HSP' ler organizmaların canlılığını devam ettirmesinde önemli fonksiyonlara sahiptirler. Normal fizyolojik koşullarda moleküler şaperon görevi yaparak, yeni sentezlenen proteinlerin doğru bir şekilde katlanmalarını sağlarlar. Aynı zamanda protein sentezine katılarak sentez sırasında veya hemen sonra proteinlerin fonksiyonel üç boyutlu yapılarını kazanmasına ve gerekli yerlere taşınmasına yardımcı olurlar. Stres durumlarında birçok enzim ve proteinde yapısal ve fonksiyonel değişimler şekillenir. Stres altında bulunan hücrelerin yaşamlarını devam ettirebilmesi için proteinlerin kendi fonksiyonel yapılarını koruması, doğal olmayan proteinlerin toplanmasının önlenmesi, denatüre proteinlerin yeniden yapılanması ile tekrar

fonksiyonel yapılarına dönmeleri ve fonksiyonel olmayan ama zararlı olabilecek peptidlerin ortadan kaldırılması gereklidir (Aşkar ve ark., 2007; Bener ve ark., 2018; Neuer ve ark., 2000; Tsan ve Gao, 2004). HSP' ler hidrojen bağları, güçlü hidrofobik etkileşimleri ve çift kutuplu heliks stabilitesinden dolayı stres anında denatüre olmadıkları için hücresel korumada tamamlayıcı rol alıp, proteinleri stresten koruyarak hücrelerin zarar görmesini engellerler (Bener ve ark., 2018). HSP' lerin görevleri sadece bunlar ile sınırlı olmayıp hücre proliferasyonu, gelişimi, yaşlanması veya siklusun devamlılığı gibi hücre metabolizması ile ilgili birçok olayda da önemli görevler alırlar (Baykal ve ark., 2000; Whitley ve ark., 1999). Ayrıca hücrelerin hayati fonksiyonlarını devam ettirebilmesinde kritik bir öneme sahip olan apoptozun düzenlenmesinde de farklı roller üstlenirler (Beere, 2004). Hücre koruyucu özelliğinden dolayı bazen apoptotik cevabı inhibe ederken, bazen de ya direkt olarak ya da ölüm sinyal proteininin şaperonu olarak apoptozu teşvik edebilirler (Sreedhar ve Csermely, 2004). İmmun sistem üzerinde de düzenleyici role sahip olup, birçok patojenik ajana karşı immün cevabın oluşturulmasında görev alırlar. Antijenik peptidleri bağlayıp, antijen sunan hücrelere taşıyarak doğal ve kazanılmış bağışıklık sisteminin uyarılmasını sağlarlar. Lenfositlerin ve makrofajların aktivasyonu veya dendritik hücrelerin olgunlaşması gibi olaylara katılarak organizmaları hastalıklara karşı korurlar (Baykal ve ark., 2000; Javid ve ark., 2007; Park ve Seo, 2015; Tsan ve Gao, 2004).

HSP' ler endoplazmik retikulum, mitokondri, sitosol ve nukleus gibi hücrenin farklı komponentlerinde günlük metabolik olayların devamı için düşük seviyelerde bulunurken, çeşitli stres faktörlerinin varlığında ekspresyonlarında artış görülür (Habich ve Burkart, 2007; Iwama ve ark., 1998; Kiang ve Tsokos, 1998; Kregel, 2002). Hücre içi proteinler olmasına rağmen, hücre dışında da gözlenirler. Bu proteinler normal bireylerin dolaşım sisteminde belli seviyede bulunurken, yaşlanmaya bağlı olarak seviyeleri düşer; hipertansiyon, ateroskleroz veya ameliyat sonrası gibi patolojik durumlarda ise artış gösterir (Tsan ve Gao, 2004). HSP' lerin ekspresyonlarındaki artış hücrenin stres altında olduğunun göstergesidir ve hücreler stres altında iken biyolojik yapısının veya genetik materyalinin zarar görmemesi için

bu proteinleri fazla miktarda eksprese ederek kendini koruma mekanizmasını oluştururlar (Bener ve ark., 2018).

HSP' lerin ekspresyonu ısı şok faktörleri (HSF) tarafından kontrol edilir. HSF' ler inaktif halde iken monomer yapıda olup, belirli stres koşulları altında aktif hale gelir. Monomer yapıdaki HSF' ler sitoplazmadan nukleusa taşınır, burada diğer monomer yapıda bulunan HSF' ler ile birleşerek trimer yapılar şekillendirirler. Trimer yapıdaki HSF' ler HSP sentezlenmesinde görevli olan DNA' nın promotör bölgelerine bağlanır. Trimer yapıların promotör bölgelere bağlanması ile HSP mRNA ekspresyonu gerçekleşir. mRNA nukleustan sitoplazmadaki ribozomlara giderek HSP' lerin translasyonu şekillenir (Whitley ve ark., 1999).

HSP' ler moleküler ağırlıklarına göre ve/veya fonksiyonlarına göre; küçük HSP' ler (HSP27, p20, HSPB2, HSPB3, HSPB8, HSPB9, cvHSP, α -A kristalin ve α -B kristalin), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90 ve HSP100 olmak üzere 6 gruba ayrılır (Concannon ve ark., 2003; Habich ve Burkart, 2007; Lu ve ark., 2014; Westerheide ve Morimoto, 2005).

1.3.1. HSP27

Küçük HSP' ler grubuna dahil olan HSP27, 27 kDa molekül ağırlığına sahip olup N-terminal, C-terminal ve yaklaşık 80 amino asitlik uzunlukta olan α -kristalin olmak üzere üç domainden oluşur (Treweek ve ark., 2015). HSP27, ATP bağımsız şaperonlardandır. Sıcaklık, oksidatif stres, hastalık, enfeksiyon gibi farklı stres durumlarının etkisinde, hücre içindeki ATP miktarı önemli derecede düşer ve proteinlerin dejenere olmasını engellemek için hemen ATP bağımsız şaperonlar devreye girer. Hücredeki stres durumu iyileşmeye başlayınca, ATP seviyesi yükselmeye başlar ve HSP70, HSP90 gibi ATP bağımlı şaperonlar görev olarak proteinlerin tekrar katlanmalarını ve taşınmalarını sağlarlar (Garrido ve ark., 2003).

HSP27 ekspresyonu hücrelerin farklılaşmasından önce başlar, hücrelerin çoğalma ve farklılaşması ile birlikte azalır. Bu nedenle HSP27'ye farklılaşma öncesi belirteci de denir (Garrido ve ark., 2003). HSP27 oksidatif stres boyunca antioksidan görevi görerek, reaktif oksijen türlerinin (ROS) ve hücre içi demir miktarının azalmasını, hücre içi glutatyon miktarının artmasını sağlar (Vidyasagar ve ark., 2012). Ayrıca apoptoz ve hücre iskeletinin düzenlenmesi gibi görevler üstlenerek, hücre koruyucu etkiler gösterir (Concannon ve ark., 2003; Wang ve ark., 2014).

1.3.2. HSP60

HSP60 mitokondriyal matriks proteini olup, aynı zamanda şaperoninler olarak da bilinir. Mitokondriyal proteinlerin sentezlenmelerinde, doğru bir şekilde katlanmalarında ve sitoplazmadan mitokondriyal matrikse taşınmalarında önemli roller alırlar (Paranko ve ark., 1996; Tkacova ve Angelovicova, 2012).

HSP60 temel olarak mitokondride bulunurken; hücre yüzeyinde, ekstrasellüler alanda, endoplazmik retikulumda, sitoplazmik granül ve veziküllerde de bulunabilir (Soltys ve Gupta, 1996). HSP60 memelilerde mitokondriyal (mt-HSP60) ve sitosolik (T-kompleks polipeptit-1) olmak üzere iki üyeden oluşur. mt-HSP60 monomerler, heptamerler ve dördü dekamerler arasında dinamik bir denge içerisinde bulunur. Düşük konsantrasyonlarda monomer yapılara ayrışır, mt-HSP60'ın kofaktörü olan mt-HSP10 ve ATP'nin varlığında ise dördü dekamerler içerisinde toplanır. Sitosolik HSP60, hetero-oligomerik halka yapısı oluşturur; aktin ve tubulin gibi hücre iskeleti proteinlerinin katlanmalarına yardımcı olur (Tsan ve Gao, 2004).

1.3.3. HSP70

HSP70, 70 kDa ağırlığına sahip olup nükleus, sitosol, endoplazmik retikulum, mitokondri gibi hücrenin farklı kompartmanlarında bulunabildiği gibi hücre dışında da bulunabilir (Pulur ve ark., 2017; Tkacova ve Angelovicova, 2012). HSP70

ekspresyonu hücre içi pH, kalsiyum ve siklik AMP, hücre dışı protein kinaz C- 1, 4, 5 trifosfat gibi farklı moleküllerin etkisi ile değişebilir (Hassan ve ark., 2019).

HSP70 ailesi ATP bağımlı şaperon proteinler olup; sitosol (HSP70/HSC70), mitokondri (HSP75), endoplazmik retikulumda bulunan ve ayrıca uyarılabilir ile kurucu form olmak üzere beş farklı üyeden oluşur (Beere ve Green, 2001; Tsan ve Gao, 2004). Bu ailenin üyelerinin hemen hemen hepsi aynı yapıya sahip olup, 45 kDa N-terminal ATPaz domain ve 25 kDa C-terminal substrat bağlayan domaine sahiptir. C-terminal substrat bağlayan domain ise kendi içinde β -sandviç ve C-terminal α -helikal alt domainlerine ayrılır (Mayer ve Bukau, 2005).

HSP70' in en önemli görevi ısı stresine karşı proteinlerin denatürasyonunu önleyerek termotolerans göstermesidir. Çünkü, hücre stres altındayken madde transportu, DNA replikasyonu, protein sentezi veya taşınması gibi normal fizyolojik olayları gerçekleştirmekte zorluk çeker. Isı stresi gibi değişik stres koşulları altında HSP70 ekspresyonu büyük oranda artış göstererek, hücrelerin normal aktivitelerini yerine getirmelerine yardımcı olur (Hassan ve ark., 2019). HSP70 sinyal iletimi, hücre bölünmesi, hücre farklılaşması ve programlı hücre ölümünde de önemli görevler alır (Mayer ve Bukau, 2005).

1.3.4. HSP90

HSP90, 90 kDa ağırlığına sahip olup ökaryotik hücrelerde bol miktarda bulunur. Stres içermeyen durumlarda total hücresel proteinlerin %1-2' sini oluştururken; kanser, viral enfeksiyon, inflamasyon gibi çoğu hastalık durumunda veya farklı stres koşullarında bu oran %4-6' ya kadar artar (Prodromou, 2016; Sreedhar ve ark., 2004).

HSP90, ATP bağımlı şaperon protein olup, fleksibl dimerik yapıya sahiptir. Her bir monomer üç domainden oluşur. Birincisi N-terminal domain, ikincisi N domaine bağlı olan M-domain ve üçüncüsü M-domaine bağlı C-terminal domaindir (Pearl ve Prodromou, 2006; Wandinger ve ark., 2008). N-terminal domaine ATP bağlanır ve

ATPaz aktivitesiyle hidrolize edici cep bu kısımda bulunur (Wandinger ve ark., 2008). M-domain bazı proteinlerin veya şaperonların etkileşim içinde olduğu kısımdır. C-terminal domain ise HSP90' ın dimerizasyonunu düzenler (Li ve Buchner, 2013).

HSP90' ın HSP90 α (uyarılabılır form) ve HSP90 β (kurucu form) olmak üzere iki ana sitoplazmik formu bulunur. Ancak yapılan son çalışmalarda HSP90' ın yeni izoformlarının da mevcut olduğu belirtilmiştir. Bunlar sellüler transformasyon ile ilişkilendirilen HSP90N, endoplazmik retikulumda yer alan Grp94 (Glikozla ilişkili protein 94), mitokondriyal matriksde bulunan HSP75/TRAP1 (Tümör nekroz faktör reseptör ilişkili protein 1)' dir (Sreedhar ve ark., 2004).

HSP90 α hücre büyümesinde ve hücre döngüsünün düzenlenmesinde, HSP90 β erken embriyonik gelişimde, eşey hücrelerinin olgunlaşmasında, hücre iskeleti stabilizasyonunda, hücresel transformasyonda, sinyal iletiminde ve uzun süreli hücre adaptasyonunda görev alır (Sreedhar ve ark., 2004). Bu iki izoform arasındaki en önemli farklılık, α formunun β formuna göre daha kolay bir şekilde dimerize olması ve aynı zamanda α formunun β ' ya göre çoğu hücreden ekspresyonunun az olmasıdır (Pires ve Khole, 2009). HSP90 izoformlarının biyokimyasal ayrımı oldukça zor olup, yapılan çalışmalarda HSP90' ın α ve β formunun karışımı olan HSP90 α/β kullanılmaktadır (Sreedhar ve ark., 2004).

Yapılan literatür taramaları sonucunda ısı şok proteinleri ile ilgili çalışmaların özellikle uterus, plasenta ve testis dokusu üzerinde yoğunlaştığı, ovaryumdaki çalışmaların oldukça sınırlı olduğu fark edilmiştir. Sağlıklı rat ovaryumunda bu proteinler ile ilgili yapılan çalışmaların da fetal, postnatal veya yetişkin dönemlerde olduğu dikkati çekmiştir. Bu çalışmadaki amacımız, rat ovaryumunda ilk defa östrus siklusu (proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus), gebelik (5, 10, 15 ve 20. günler) ve laktasyon (1, 5, 10 ve 20. günler) dönemleri boyunca HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90' ın immunohistokimyasal lokalizasyonları ve dağılımlarını değerlendirerek, bu proteinlerin oogenezis, folikülogenezis, foliküler atrezi, steroidogenezis, luteal gelişim ve gerilemedeki olası rollerini ortaya koymaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Hayvan Materyali

Bu çalışmanın onayı Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı' nın 21. 02. 2020 tarih ve E. 6556 sayılı yazısı ile alınmıştır (Ek-1).

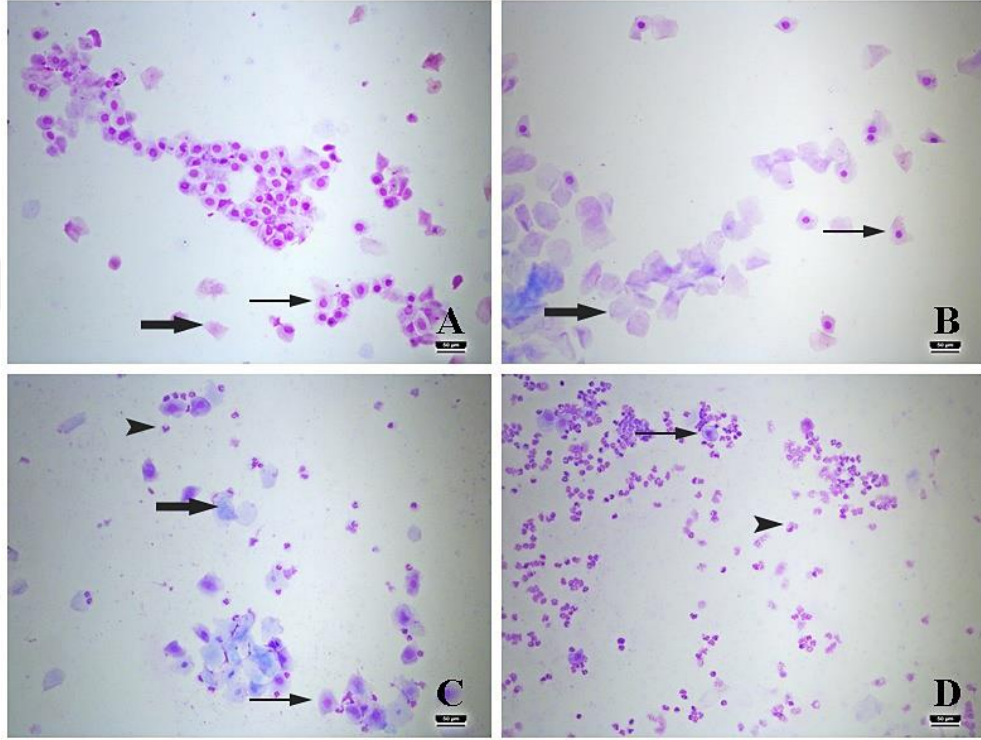
Çalışmada materyal olarak kullanılan 6-8 haftalık *Sprague Dawley* ırkı dişi ratlar Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi' nden temin edildi. Bu merkezde ratların bakım, beslenme ve çalışma gruplarının oluşturulması gerçekleştirildi. Ad libitum içme suyu ve standart yem ile beslenen ratlar ortalama $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 12 saat aydınlık/karanlık döngüde tutuldu. Araştırmada her grupta 6 adet olacak şekilde toplam 72 adet rat kullanılarak östrus siklusu (proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus evreleri), gebelik (5, 10, 15 ve 20. günler) ve laktasyon (1, 5, 10 ve 20. günler) dönemleri oluşturuldu.

2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

2.2.1. Östrus Siklusu Dönemi

Östrus siklusu dönemlerini belirlemek için vajinal smear yöntemi kullanıldı. Vajinal smear alınmadan önce ratların vulva bölgesi %70 etil alkolle silindi. Vajinadan alınan sürüntü, lam üzerine yayılarak oda ısısında kuruması beklendi. Kuruyan preparatlar Giemsa ile 30 sn boyandıktan sonra distile su ile yıkanıp, alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek entellan ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopta incelenip çekirdekli epitelyal hücrelerin, kornifiye epitelyal hücrelerin ve lökositlerin dağılımına bakılarak östrus siklus evreleri tespit edildi. Proöstrus döneminde (Şekil 2.1, A) çok sayıda küçük, yuvarlak çekirdekli epitelyal hücrelerin; östrus döneminde (Şekil 2.1, B) çok sayıda çekirdeksiz kornifiye epitelyal hücrelerin; metöstrus

döneminde (Şekil 2.1, C) eşit oranda dağılım gösteren lökositlerin, kornifiye epitelyal hücrelerin ve çekirdekli epitelyal hücrelerin; diöstrüs döneminde (Şekil 2.1, D) ise çok sayıda lökositlerin görülmesi döngü belirteci olarak kullanıldı (Cora ve ark., 2015; Yener ve ark., 2007). Bu şekilde siklus dönemleri saptanan ratlardan ovaryum dokuları alındı.



Şekil 2.1. Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve diöstrus (D) dönemlerinden alınan vajinal smear. İnce ok: çekirdekli epitelyal hücreler, kalın ok: kornifiye epitelyal hücreler, ok başı: nötrofiller. Giemsa boyama. Bar: 20µm.

2.2.2. Gebelik Dönemi

Vajinal smear yöntemi sonucu proöstrus veya östrus evresinde olduğu saptanan dişi ratlar, erkek ratlar ile aynı kafeste bir gece boyunca tutuldu. Sabah erken saatte dişi ratların vajina kısımları kontrol edildi ve vajinal plak (Şekil 2.2) şekillenen ratlar gebeliğin 0. günü olarak kabul edildi. Gebe ratlar ayrı kafeslere alınarak, gebelik döneminin 5, 10, 15 ve 20. günlerinde ovaryum dokuları alındı.



Şekil 2.2. Gebe ratlarda görülen vajinal plak.

2.2.3. Laktasyon Dönemi

Gebe ratların doğum olayının gerçekleştiği gün laktasyon dönemin 0. günü kabul edildi. Anne ratlar yavruları ile birlikte aynı kafeste tutuldu ve emzirme işlemine izin verilerek, laktasyon döneminin 1, 5, 10 ve 20. günlerinde ovaryum dokuları alındı.

2.3. Işık Mikroskopik İncelemeler

Materyal olarak kullanılmak üzere ksilazin-ketamin anestezisi altında ötenazi işlemi uygulanan ratlardan ovaryum dokuları temin edildi. Alınan ovaryum dokularına Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında %10' luk formaldehitte (pH: 6,9-7,1) 24 saat tespit işlemi uygulandı. Rutin histolojik takip yöntemi sonrasında dokular paraplastta bloklandılar. Bu bloklardan poly-L-lizinli lamlara (Thermo Scientific) alınan 5 µm' lik seri kesitlerin bir kısmına genel histolojik incelemeler için Crossmon (1937) tarafından modifiye edilen Mallory' nin üçlü boyaması yapıldı (Bancroft ve Gamble, 2002).

2.4. İmmunohistokimyasal Boyamalar

Alınan kesitlerin diğer kısmına ise Streptavidin Biotin Kompleks (Strept- ABC) tekniği ile immunohistokimyasal boyama uygulandı (Bancroft ve Gamble, 2002). Deparafinizasyon ve rehidrasyon işlemleri yapılan doku kesitleri fosfat tampon solüsyonunda (PBS) 15 dk bekletildi. Sitrat buffer (pH: 6) solüsyonu içerisinde, mikrodalga fırında 600 W' da 20 dk kaynatılarak antijen retrieval (antijen kazanımı) işlemi uygulanan ve 20 dk oda ısısında soğuması beklenen kesitler 15 dk PBS ile yıkandı. Daha sonra endojen peroksit aktivitesini engellemek için kesitler karanlık ortamda %3' lük hidrojen peroksit solüsyonu içerisinde 20 dk inkübasyona bırakıldı. Tekrar 15 dk PBS ile yıkanan kesitlerin etrafı dakopen ile sınırlandırılarak, nonspesifik antijenik bağlanmanın engellemesi için 10 dk bloklama solüsyonunda (Large Volume Ultra V Blok, Thermo, TA-125-UB) bekletildi. Devamında kesitlere uygun miktarlarda sulandırılan primer antikörler (HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90) damlatıldı ve +4°C' de 1 gece inkübe edildi. Ertesi gün kesitler 15 dk PBS ile yıkandıktan sonra 30 dk biotinlenmiş sekonder antikör (Biotinylated Goat Anti-Polyvalent, Thermo, TP-125-BN) ile inkübe edilerek primer antikora bağlanması sağlandı. Kesitler tekrar 15 dk PBS ile yıkanıp enzim konjugatlı streptavidin (Streptavidin Peroxidase, Thermo, TS-125-HR) solüsyonunda 30 dk bekletildi. 15 dk PBS ile yıkanan kesitler, immün reaksiyonun açığa çıkmasını sağlamak için 1-2 dk 3-3'-diaminobenzidine kromojen (Large Volume DAB Substrate System, Thermo, TA-125-HD) solüsyonunda inkübasyona bırakıldı. Distile suyla yıkanan kesitler çekirdek boyaması için Gill' s hematoksileninde 2 dk tutuldu. Daha sonra alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı (Bancroft ve Gamble, 2002; Liman, 2017; Özbek ve ark., 2018). Kahverengi presipitasyonun gözlemlenmesi ile immün reaksiyon pozitif olarak belirlendi. Kesitler ışık mikroskopta (Leica DM 2500) incelenerek fotoğrafları çekildi. İmmunohistokimyasal boyanmaların yoğunluklarına göre negatif, zayıf, orta ve kuvvetli şiddette olarak semikantitatif değerlendirilmeleri gerçekleştirildi (Kuzkale ve Liman, 2016).

Santa Cruz Biotechnology firmasından temin edilen monoklonal primer antikörlerden HSP60 (sc-59567) ve HSP70 (sc-24) için 1/100, HSP27 (sc-13132) ve

HSP90 (sc-13119) için 1/150 dilusyon oranları kullanıldı. Negatif kontrol (Şekil 2.3, A) amacıyla kesitler primer antikör yerine PBS ile inkübe edildi. Pozitif kontrol amacıyla rat oviduktu (Şekil 2.3, B) kullanıldı.

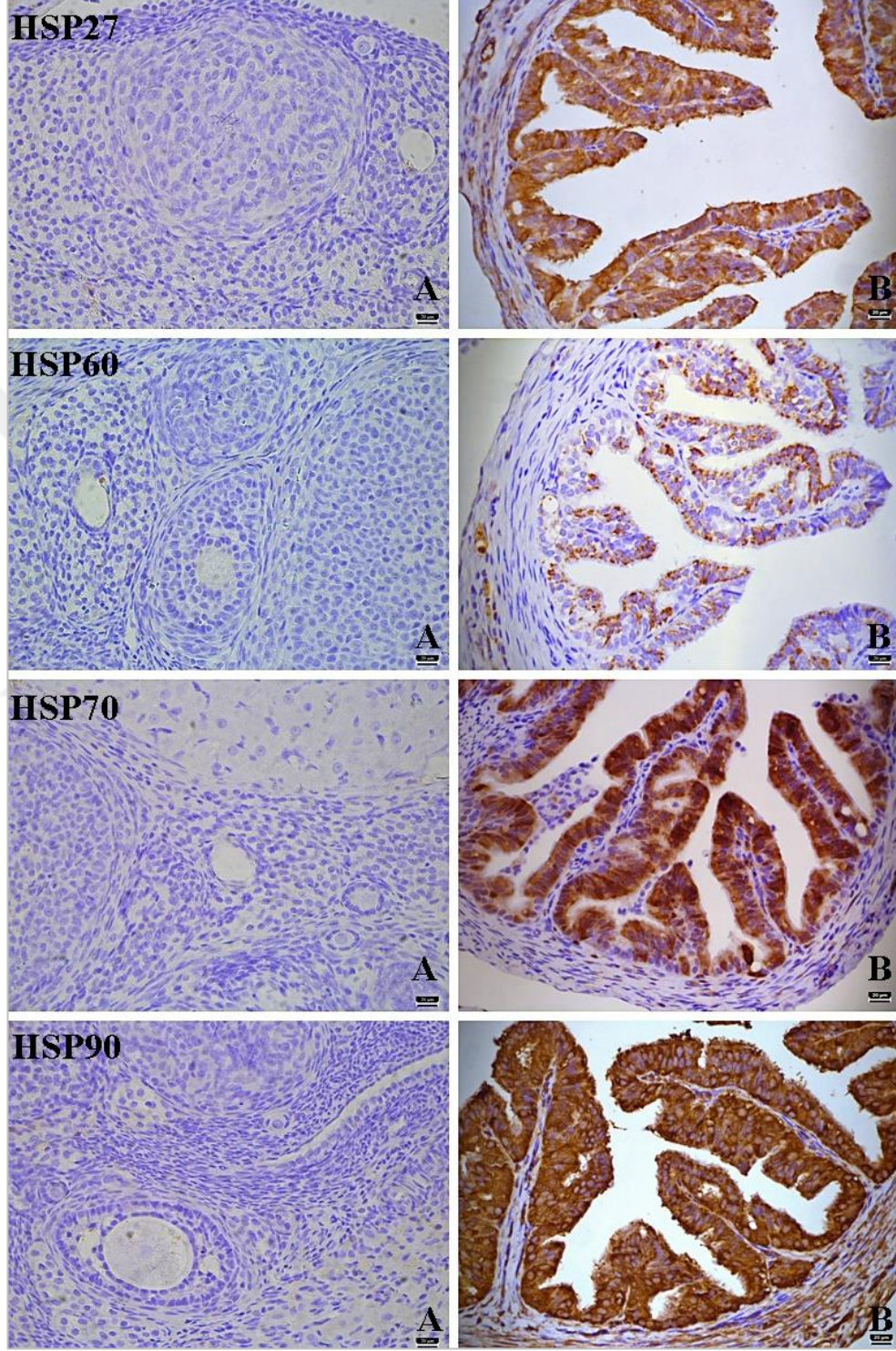
2.5. Foliküler Sınıflandırma

Ovaryumdaki foliküller primordiyal, primer (tek katlı primer ve çok katlı primer), sekonder ve Graaf folikülü olarak sınıflandırıldı. Oositin etrafındaki folikül epitel hücreleri tek katlı yassı ise primordiyal folikül, tek katlı kübik ise tek katlı primer folikül, birden fazla katlı ise çok katlı primer folikül olarak belirlendi. Oositin etrafındaki çok katlı granuloza hücreleri arasında folikül sıvısı ile dolu olan küçük antrumların görüldüğü foliküller sekonder folikül, antrumların birleşerek tek bir boşluk halini aldığı, kumulus ovoforusun ve korona radyata yapılarının belirginleştiği foliküller ise Graaf folikülü olarak tanımlandı (Erdost, 2011; Halıcıoğlu ve ark., 2021; Rençber ve ark., 2018; Ross ve Pawlina, 2006). Folikül yapısının bozulduğu, zona pellusida ve oositin dejenere olduğu, granuloza hücreleri ile oosit arasındaki bağlantıların kaybolduğu, granuloza hücreleri arasında apoptotik hücrelerin görüldüğü foliküller ise atretik folikül olarak belirlendi (Halıcıoğlu ve ark., 2021; Rençber ve ark., 2018; Yoshida ve ark., 2009).

2.6. Korpus Luteum Sınıflandırma

Östrus siklusu döneminde ovulasyon sonrasında şekillenen ve fonksiyonel olarak aktif olan korpus luteuma yeni sıklık korpus luteumu, önceki siklus döneminden kalıp gerileyene ise eski sıklık korpus luteumu denildi (Sato ve ark., 2014; Taketa ve ark., 2013; Yoshida ve ark., 2009). Gebelik döneminde şekillenen ve fonksiyonel olarak aktif olan korpus luteum yeni gebelik korpus luteumu, önceki siklus döneminden kalıp gerileyen ise eski sıklık korpus luteumu adı verildi (Golos ve ark., 1984). Laktasyon döneminde postpartum ovulasyon sonrasında şekillenip, fonksiyonel olarak aktif olan korpus luteum yeni laktasyon korpus luteumu, önceki

gebelik döneminden kalıp gerileyen ise eski gebelik korpus luteumu şeklinde tanımlandı (Bagnell ve ark., 1987).

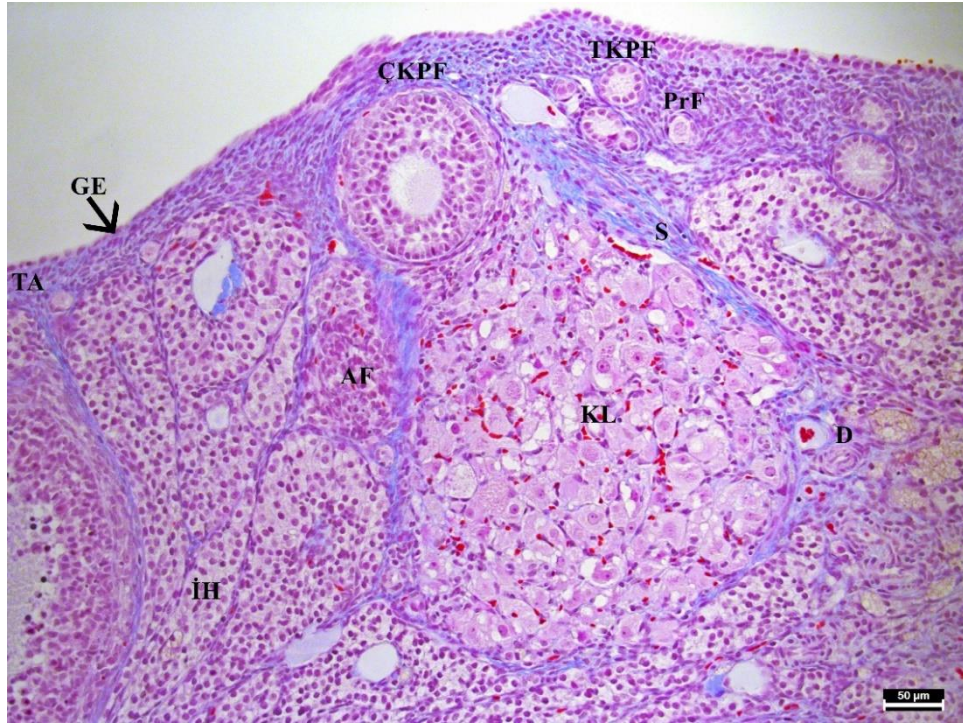


Şekil 2.3. İmmunohistokimyasal boyamalarda negatif (A) ve pozitif (B) kontroller (rat oviduktu). Bar: 20µm.

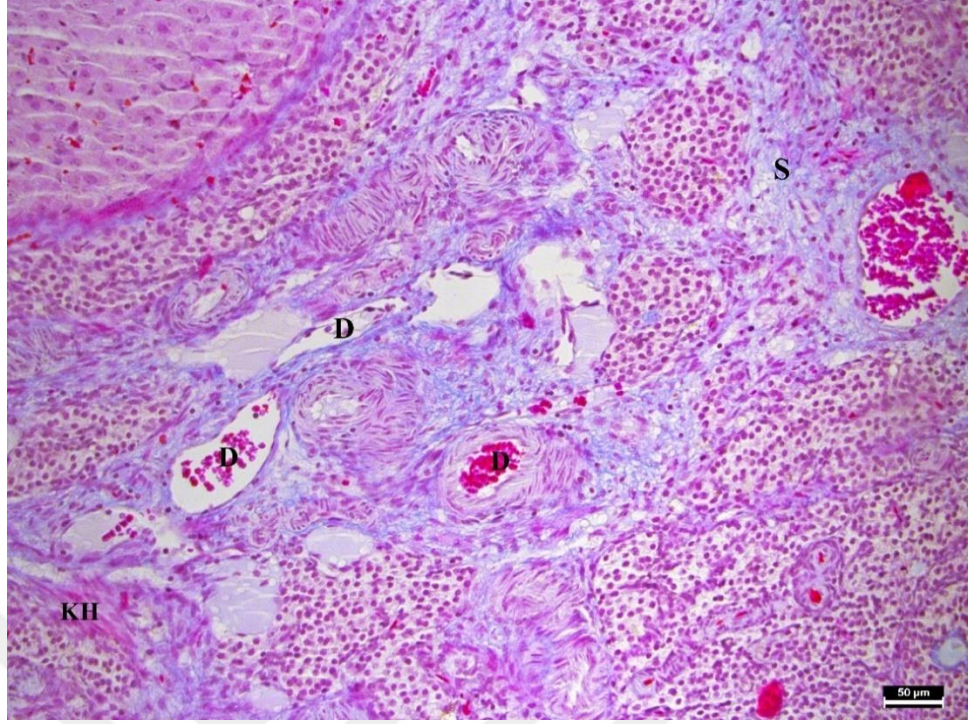
3. BULGULAR

3.1. Rat Ovaryumunun Yapısal Özellikleri

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemlerindeki üçlü boyama yapılan kesitler incelendiğinde ovaryumların dıştan germinatif epitel ile örtüldüğü gözlemlendi. Bu germinatif epitelin yer yer tek katlı yassı, tek katlı kübik ve tek katlı prizmatik olduğu tespit edildi. Germinatif epitelin altında sıkı bağ dokudan oluşan tunika albuginea görüldü. Ovaryumlarda, tunika albugineyanın altında korteks ve iç kısımda medulla olmak üzere iki bölge gözlemlendi. Kortekste farklı gelişim aşamalarında olan foliküller, atretik foliküller, korpus luteum, intersitisyel hücreler ve bu yapılar arasında yer alan kortikal stroma ayırt edildi. Kortikal stromada stromal hücreler ile kan damarları gözlemlendi (Şekil 3.1). Medullar stromada ise gevşek bağ doku içinde bol miktarda kan ve lenf damarları, sinir telleri, stromal ve düz kas hücreleri görüldü (Şekil 3.2).



Şekil 3.1. Korteksin genel görünümü. AF: atretik folikül, ÇKPF: çok katlı primer folikül, D: kan damarı, GE: germinatif epitel, İH: intersitisyel hücreler, KL: korpus luteum, PrF: primordiyal folikül, S: stroma, TA: tunika albuginea, TKPF: tek katlı primer folikül. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 50µm.



Şekil 3.2. Medullanın genel görünümü. D: kan damarı, KH: düz kas hücreleri, S: stroma. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 50μm.

3.2. Foliküllerin Yapısal Özellikleri

3.2.1. Primordiyal Foliküller

Primordiyal foliküllerde, oositin etrafında tek katlı yassı folikül epitel hücreleri ayırt edildi (Şekil 3.1 ve Şekil 3.3).

3.2.2. Primer Foliküller

Primer foliküllerdeki oositin primordiyal foliküllere göre büyüdüğü gözlemlendi. Tek katlı primer foliküllerde oositin etrafında tek katlı kübik folikül epitel hücreleri görülürken, çok katlı primer foliküllerde çok katlı folikül epitel hücreleri (granuloza hücreleri) tespit edildi (Şekil 3.1 ve Şekil 3.3). Teka folikülünün tek katlı primer foliküllerde bir iki sıralı, çok katlı primer foliküllerde ise aralarında kan damarlarının

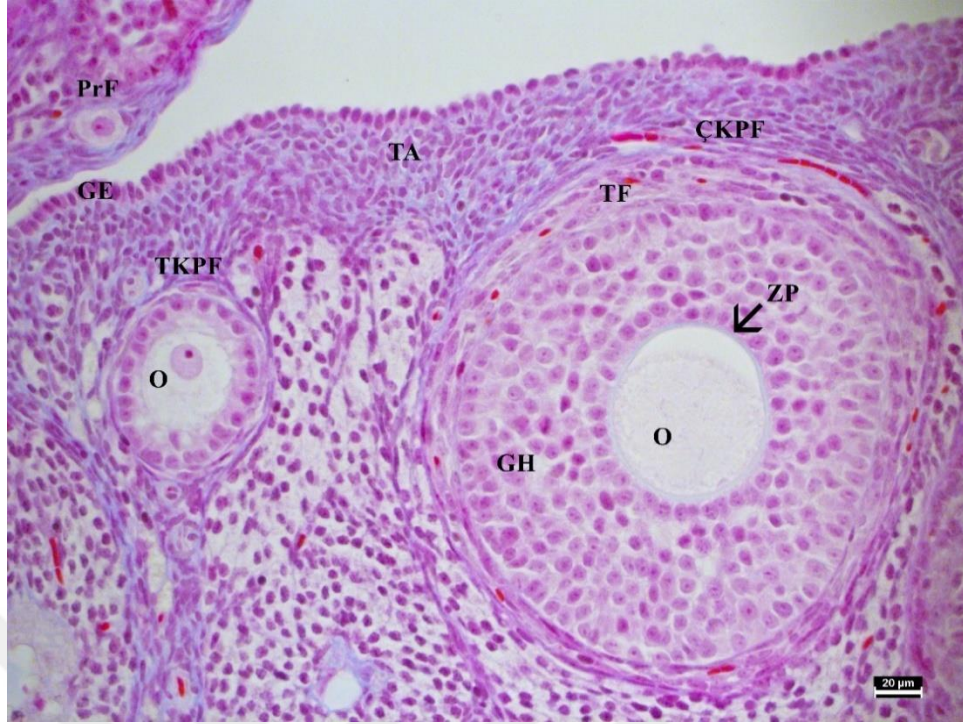
da gözlemlendiği, üç dört sıralı sirküler seyirli mekik şekilli hücrelerden meydana geldiği dikkat çekti. Ayrıca, çok katlı primer foliküllerin oositi ile granuloza hücreleri arasında zona pellusida görüldü (Şekil 3.3).

3.2.3. Sekonder Foliküller

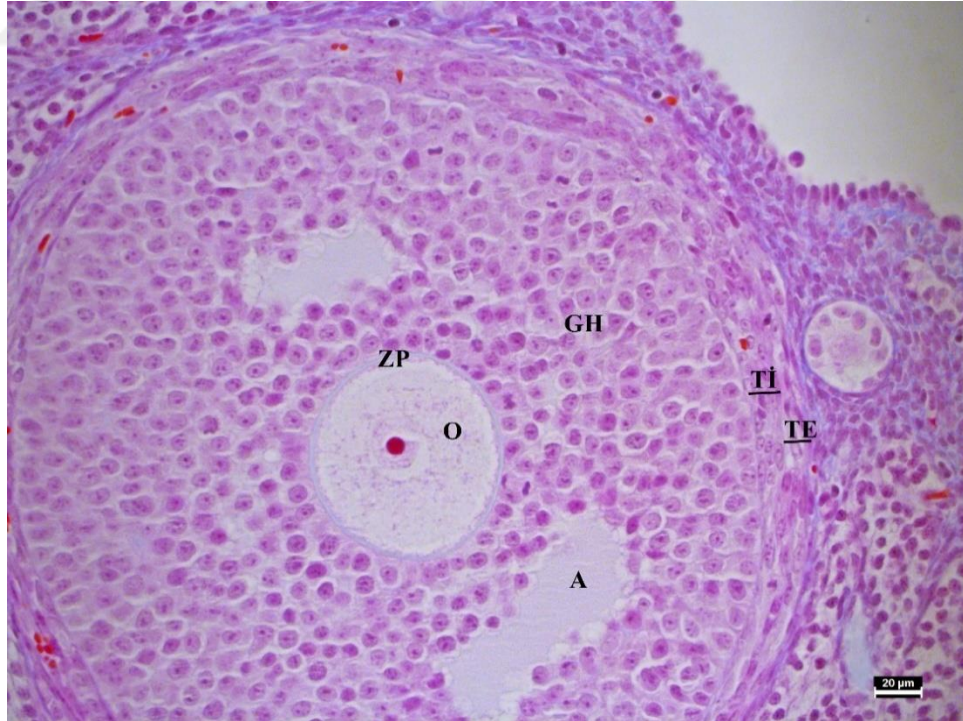
Sekonder foliküllerde oositin etrafındaki çok katlı granuloza hücrelerinin arasında, antrum adı verilen küçük boşluklar tespit edildi. Bu foliküllerde teka folikülünün teka eksterna ve teka interna olmak üzere iki katmandan meydana geldiği gözlemlendi. Her iki katmanda da birkaç sıralı yassı hücreler arasında kan damarları fark edildi (Şekil 3.4).

3.2.4. Graaf Folikülleri (Tersiyer Foliküller)

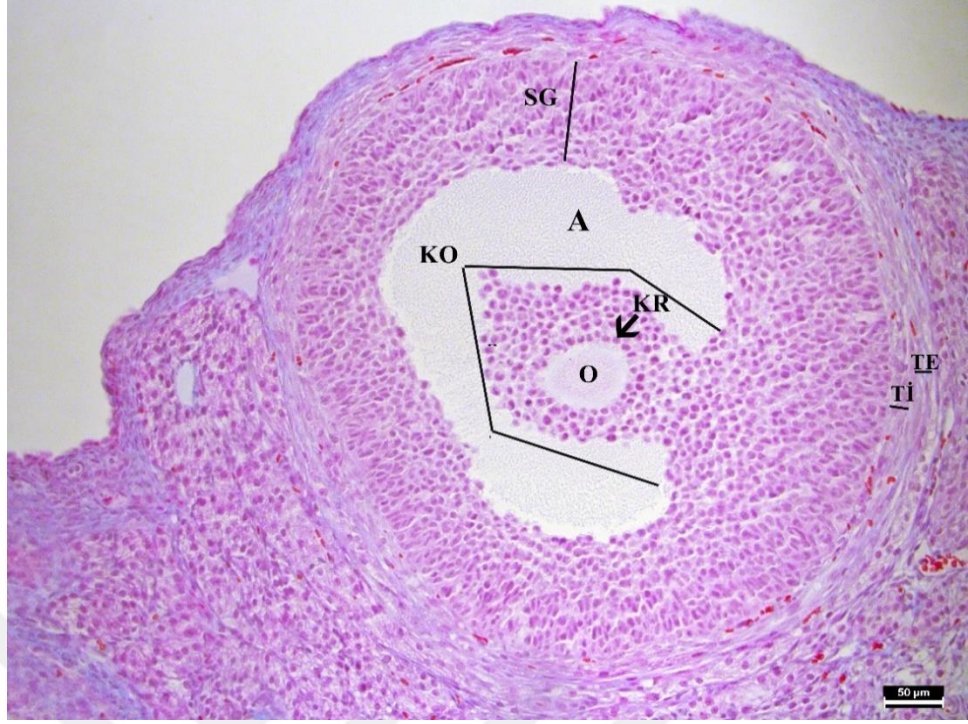
Graaf foliküllerinde folikülün çapının daha da arttığı ve antrum adı verilen boşlukların birleşerek, yarım ay şeklinde tek bir boşluk halini aldığı ayırt edildi. Oositin etrafını taç gibi saran korona radyata hücreleri fark edildi. Korona radyata hücrelerinin etrafında çok sıralı granuloza hücreleri görüldü. Bu oluşumların folikül duvarının bir tarafına tutunmuş olarak antruma doğru yarımada biçiminde uzanan kumulus ovoforusu şekillendirdiği belirlendi. Antrumun etrafında stratum granulozum katmanını oluşturan çok sıralı granuloza hücreleri tespit edildi. Teka folikülünün, sekonder foliküllerde olduğu gibi, teka eksterna ve teka interna olarak iki katmanlı olduğu gözlemlendi (Şekil 3.5).



Şekil 3.3. Primordiyal (PrF), tek katlı primer (TKPF) ve çok katlı primer (ÇKPF) foliküllerin genel görünümü. GE: germinatif epitel, GH: granuloza hücreleri, O: oosit, TA: tunika albuginea, TF: teka folikülü, ZP: zona pellusida. Crossmon'ın üçlü boyaması. Bar: 20µm.



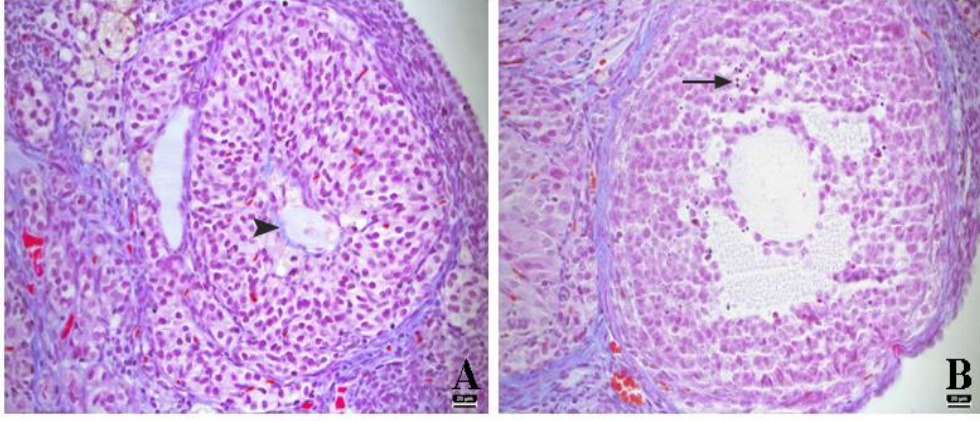
Şekil 3.4. Sekonder folikülün genel görünümü. A: antrum, GH: granuloza hücreleri, O: oosit; TE: teka eksterna, TI: teka interna, ZP: zona pellusida. Crossmon'ın üçlü boyaması. Bar: 20µm.



Şekil 3.5. Graaf folikülünün genel görünümü. A: antrum, KO: kumulus ovoforus, KR: korona radyata, O: oosit; SG: stratum granulozum, TE: teka eksterna, Ti: teka interna. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 50µm.

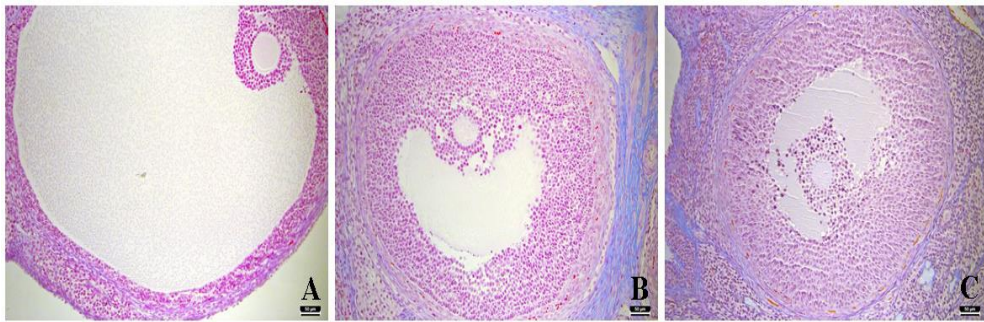
3.2.5. Atretik Foliküller

İncelenen kesitlerde, farklı gelişme evrelerindeki foliküllerin gerilemesi sonucu şekillenen atretik foliküller görüldü. Bunlar, folikül yapısının bozulması, zona pellusida veya oositinin dejenere olması, granuloza hücreleri ile oosit arasındaki bağlantıların kaybolması ve granuloza hücreleri arasında apoptotik hücrelerin gözlenmesi ile ayırt edildi (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Çok katlı primer (A) ve sekonder (B) folikül aşamasında atreziye uğrayan foliküllerin genel görünümü. Ok: apoptotik hücreler, ok başı: zona pellusidasıyla birlikte dejenere olmuş oosit. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm.

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca ovaryum kesitlerinde farklı gelişim aşamalarında olan foliküller ile atretik foliküller görüldü. Proöstrus ve östrus dönemlerinde oldukça büyük ve iyi gelişim gösteren Graaf folikülleri dikkat çekti. Diğer siklus dönemlerine kıyasla, proöstrus döneminde daha fazla sayıda sekonder ve Graaf folikülünün atreziye uğradığı belirlendi. Gebelik ve laktasyon dönemlerinde ovaryum korteksinin büyük bir çoğunluğunu korpus luteumlar doldurmasına rağmen, foliküler gelişimin de devam ettiği fark edildi. Gebelik ve laktasyon dönemlerinin 20. günündeki kesitlerde daha iyi gelişim gösteren, çok sayıda sekonder ve Graaf folikülleri görüldü. Ancak, Graaf foliküllerinin proöstrus ve östrus dönemlerindeki kadar büyük olmadığı tespit edildi (Şekil 3.7).



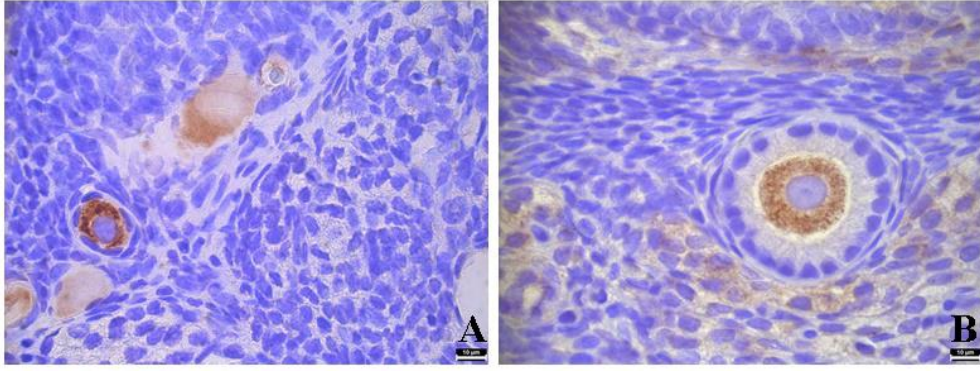
Şekil 3.7. Proöstrus (A) ile gebeliğin (B) ve laktasyonun (C) 20. günlerinde görülen Graaf folikülleri. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 50µm.

3.3. Foliküllerde HSP' lerin İmmunohistokimyasal Bulguları

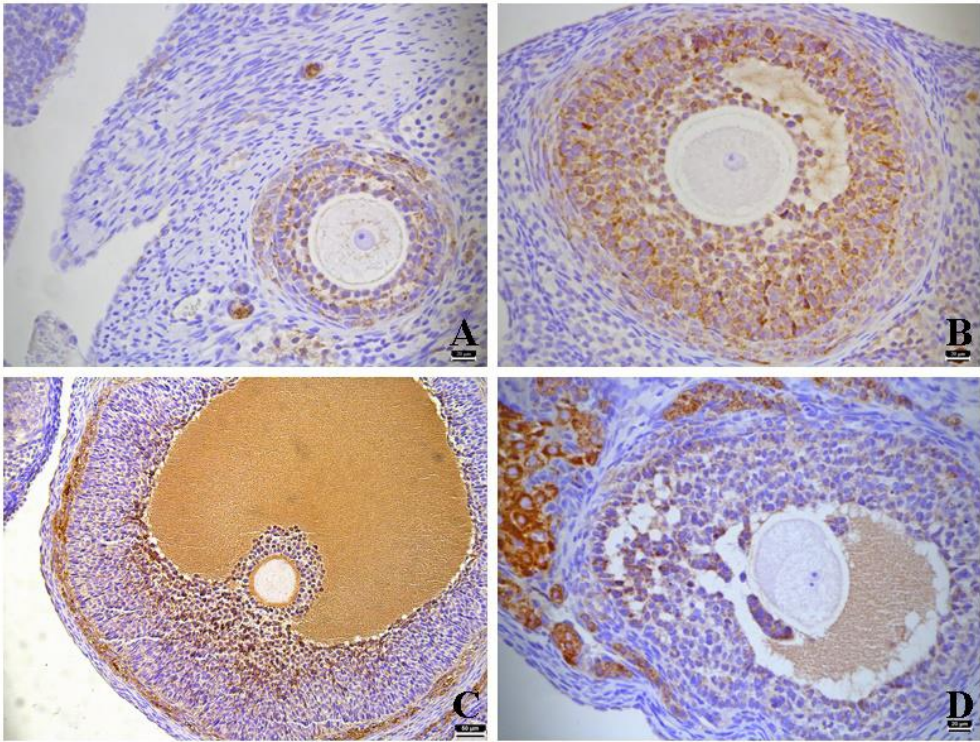
Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca farklı gelişim aşamalarında olan foliküller ile atretik foliküllerin oosit, granuloza ve teka hücrelerinde HSP27 ve HSP70' in negatif immun reaksiyon gösterdiği tespit edildi.

3.3.1. HSP60

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca farklı gelişim aşamalarında olan foliküllerin oositlerindeki sitoplazmik ve granüler HSP60 immun reaksiyonunun; primordiyal foliküllerde kuvvetli (Şekil 3.8, A), tek katlı primer foliküllerde orta (Şekil 3.8, B) ve çok katlı primer foliküllerde zayıf (Şekil 3.9, A) olduğu görüldü. Sekonder (Şekil 3.9, B) ve Graaf (Şekil 3.9, C) foliküllerinde ise reaksiyon gözlenmedi. Granuloza hücrelerindeki sitoplazmik HSP60 immun reaksiyonunun; primordiyal (Şekil 3.8, A) ve tek katlı primer (Şekil 3.8, B) foliküllerde negatif, çok katlı primer (Şekil 3.9, A) ve sekonder foliküllerde (Şekil 3.9, B) orta, Graaf folikülünde (Şekil 3.9, C) ise kuvvetli şiddette ve granüler tarzda olduğu tespit edildi. Ancak, Graaf folikülünün oositin uzak granuloza hücrelerinde çok sayıda negatif immun reaksiyonlar fark edildi. Teka folikülü hücrelerindeki sitoplazmik HSP60 immun reaksiyonunun çok katlı primer (Şekil 3.9, A) ve sekonder foliküllerde orta (Şekil 3.9, B), Graaf foliküllerinde (Şekil 3.9, C) ise kuvvetli şiddette ve granüler tarzda olduğu belirlendi. Ancak, teka folikülünün teka eksterna katmanındaki HSP60 boyanma yoğunluğunun ve immunopozitif hücrelerin teka interna katmanına göre daha az olduğu ayırt edildi (Şekil 3.9). Atretik foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde orta şiddette ve granüler tarzda sitoplazmik HSP60 immun reaksiyon (Şekil 3.9, D) görülmesine rağmen, immunopozitif hücrelerin farklı gelişim aşamalarında olan foliküllere kıyasla azaldığı fark edildi (Şekil 3.9).



Şekil 3.8. Primordiyal (A) ve tek katlı primer (B) foliküllerdeki HSP60 immun reaksiyonu. Bar: 10µm.

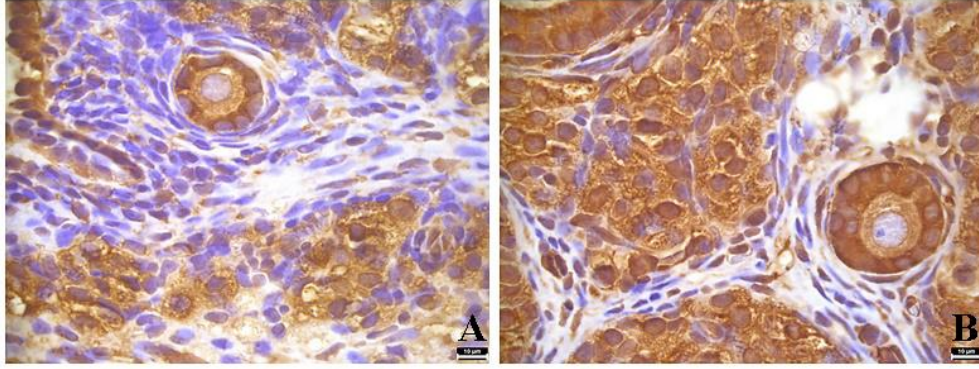


Şekil 3.9. Çok katlı primer (A), sekonder (B), Graaf (C) ve atretik (D) foliküllerdeki HSP60 immun reaksiyonu. Bar: A, B, D: 20µm, C: 50µm.

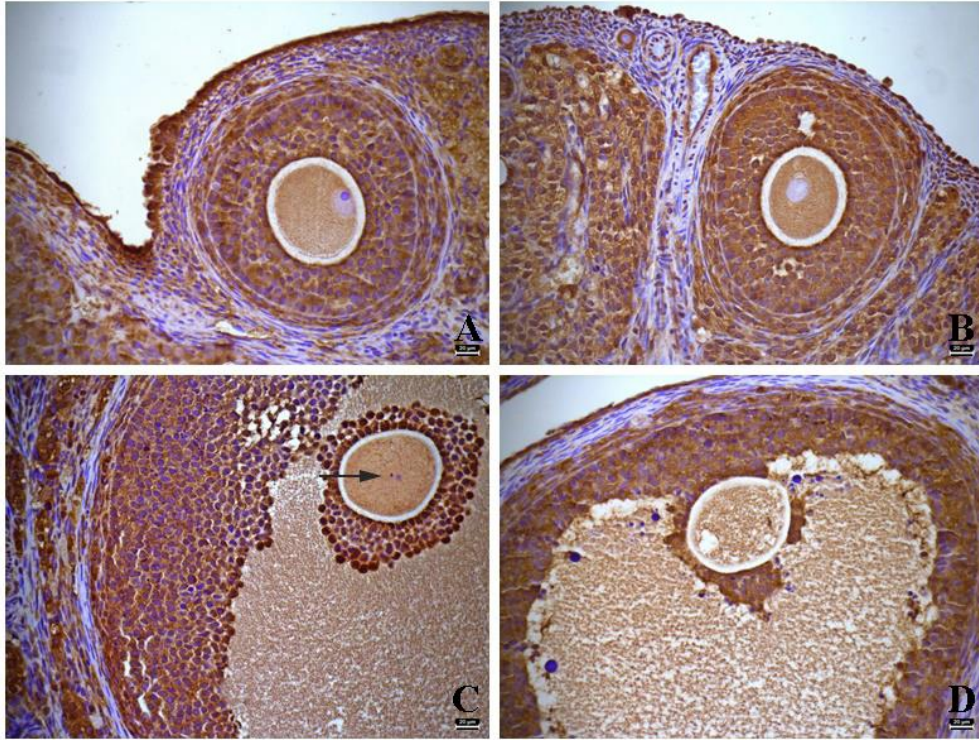
3.3.2. HSP90

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca farklı gelişim aşamalarında olan foliküller ile atretik foliküllerin oositlerinin ooplazmasında (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11) ve sadece Graaf folikülünün nukleusunda (Şekil 3.11, C) zayıf şiddette HSP90 immun reaksiyonu görüldü. Tüm foliküllerin granuloza ve teka

hücrelerinde orta şiddette sitoplazmik HSP90 immun reaksiyonu gözlemlendi. Ancak, teka eksterna katmanındaki HSP90 boyanma yoğunluğunun ve immunopozitif hücrelerin teka interna katmanına göre daha az olduğu ayırt edildi (Şekil 3.10 ve Şekil 3.11).



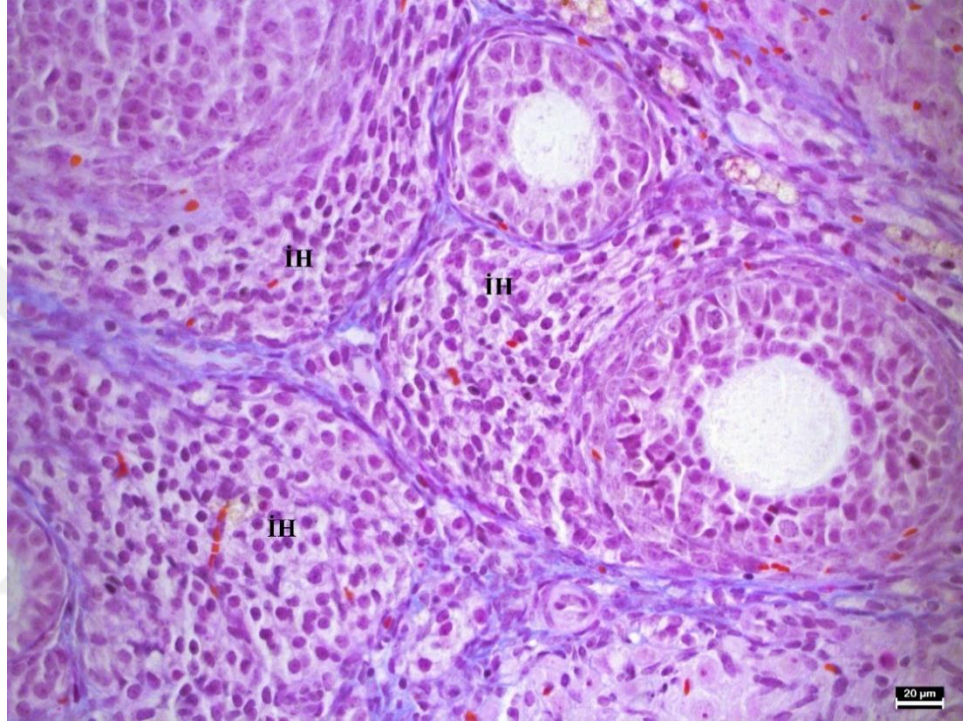
Şekil 3.10. Primordiyal (A) ve tek katlı primer (B) foliküllerdeki HSP90 immun reaksiyonu. Bar: 10µm.



Şekil 3.11. Çok katlı primer (A), sekonder (B), Graaf (C) ve atretik (D) foliküllerdeki HSP90 immun reaksiyonu. Ok: Oositin nukleusunda pozitif HSP90 immun reaksiyonu. Bar: 20µm.

3.4. İntersitisyel Hücrelerin Yapısal Özellikleri

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca üçlü boyama yapılan kesitler incelendiğinde; ovaryumun korteks bölgesinde, poligonal şekle sahip intersitisyel hücrelerin topluluklar halinde bulunduğu görüldü (Şekil 3.12).



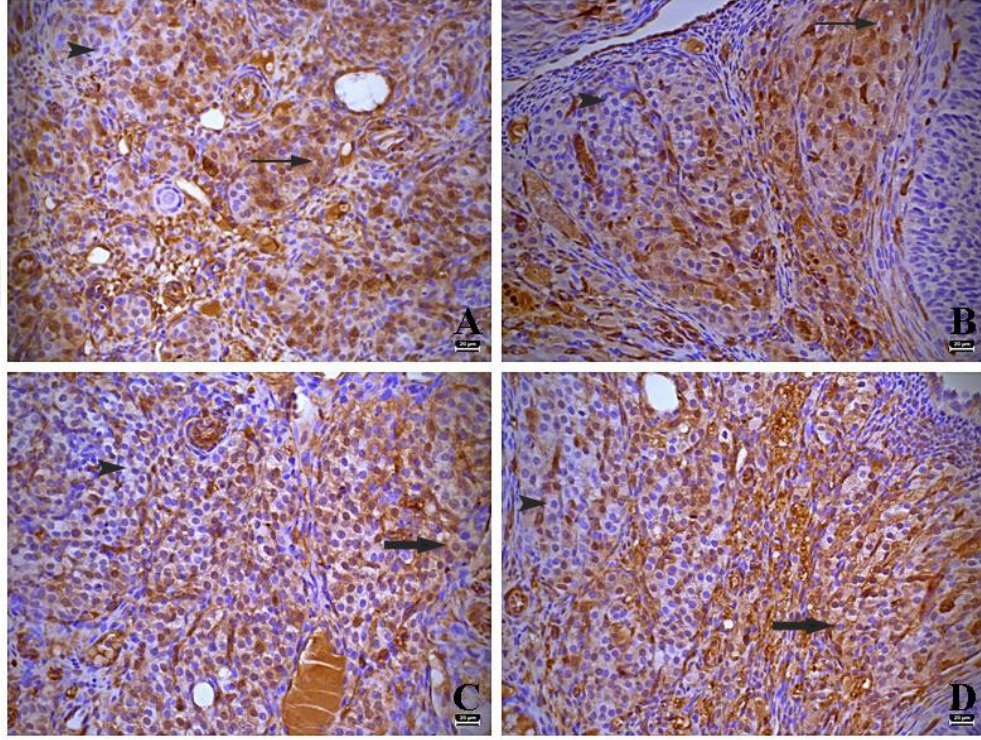
Şekil 3.12. İntersitisyel hücrelerin genel görünümü. İH: intersitisyel hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm.

3.5. İntersitisyel Hücrelerdeki HSP' lerin İmmunohistokimyasal Bulguları

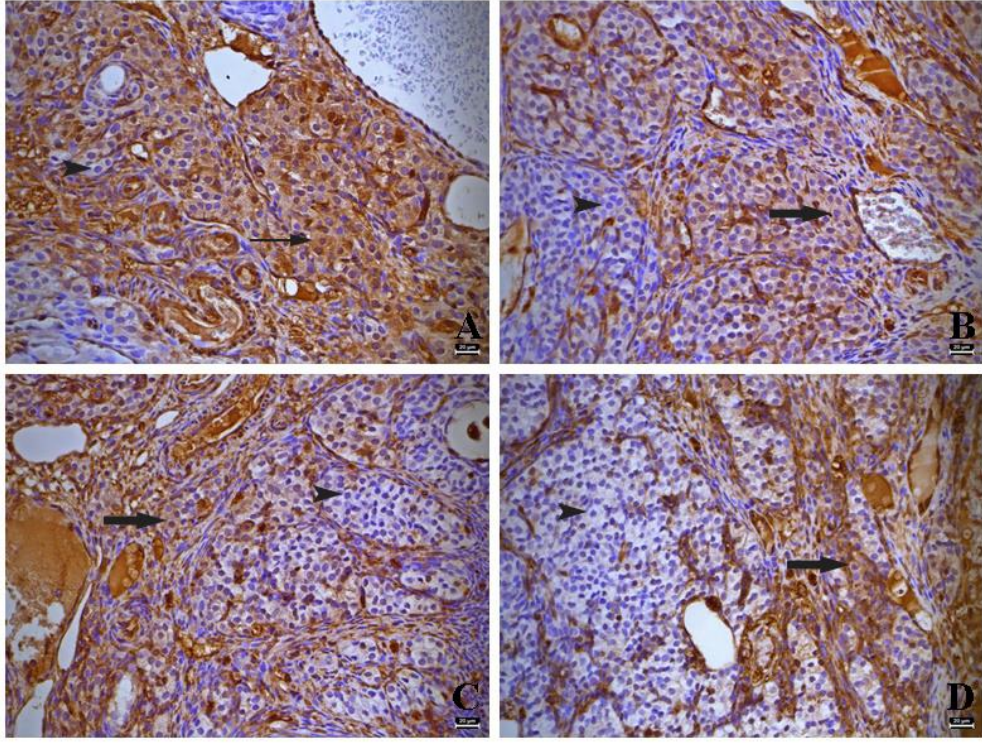
3.5.1. HSP27

İntersitisyel hücrelerdeki sitoplazmik HSP27 immun reaksiyonunun proöstrus ve östrus dönemlerinde orta (Şekil 3.13, A ve B), metöstrus ve diöstrus dönemlerinde ise zayıf (Şekil 3.13, C ve D); gebeliğin 5. gününde orta (Şekil 3.14, A), 10, 15 ve 20. günlerinde zayıf (Şekil 3.14, B, C ve D) ve laktasyonun 1. gününde orta (Şekil 3.15, A), 5, 10 ve 20. günlerinde ise zayıf (Şekil 3.15, B, C ve D) şiddette olduğu belirlendi.

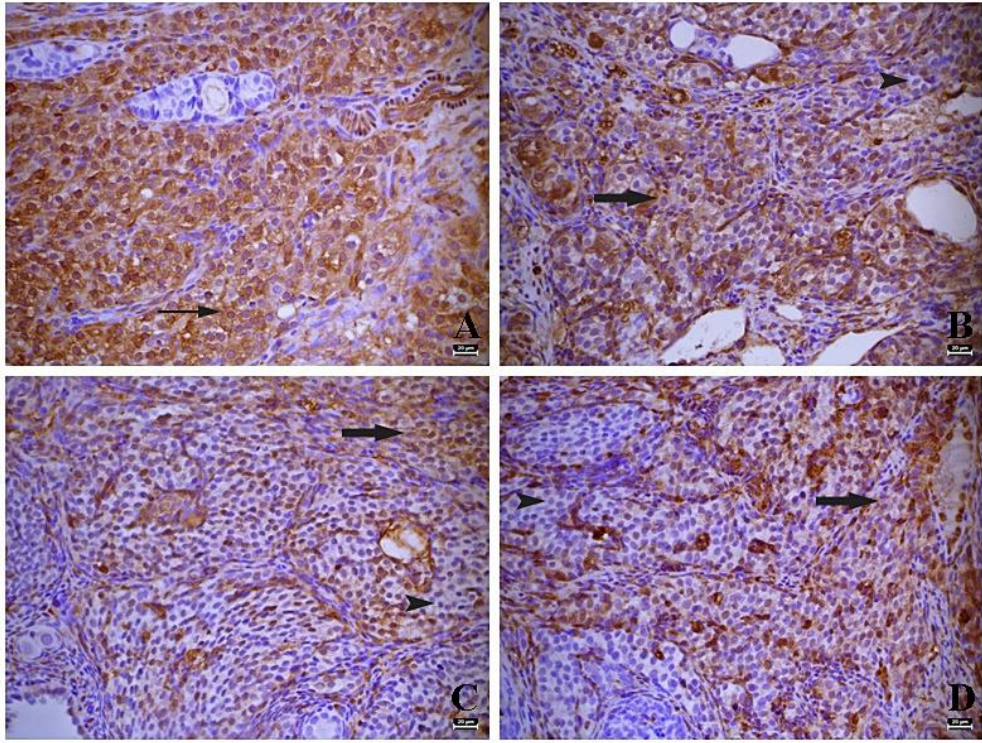
Pozitif immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücrelerin proöstrus ve östrus dönemlerine göre, metöstrus ve diöstrus dönemlerinde azaldığı görüldü (Şekil 3.13). Gebeliğin 5. gününden, 15 ve 20. günlerine (Şekil 3.14) ve laktasyonun 1. gününden, 10 ve 20. günlerine (Şekil 3.15) doğru immunopozitif intersitisyel hücrelerin giderek azaldığı fark edildi.



Şekil 3.13. Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve diöstrus (D) dönemlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP27 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.



Şekil 3.14. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP27 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.

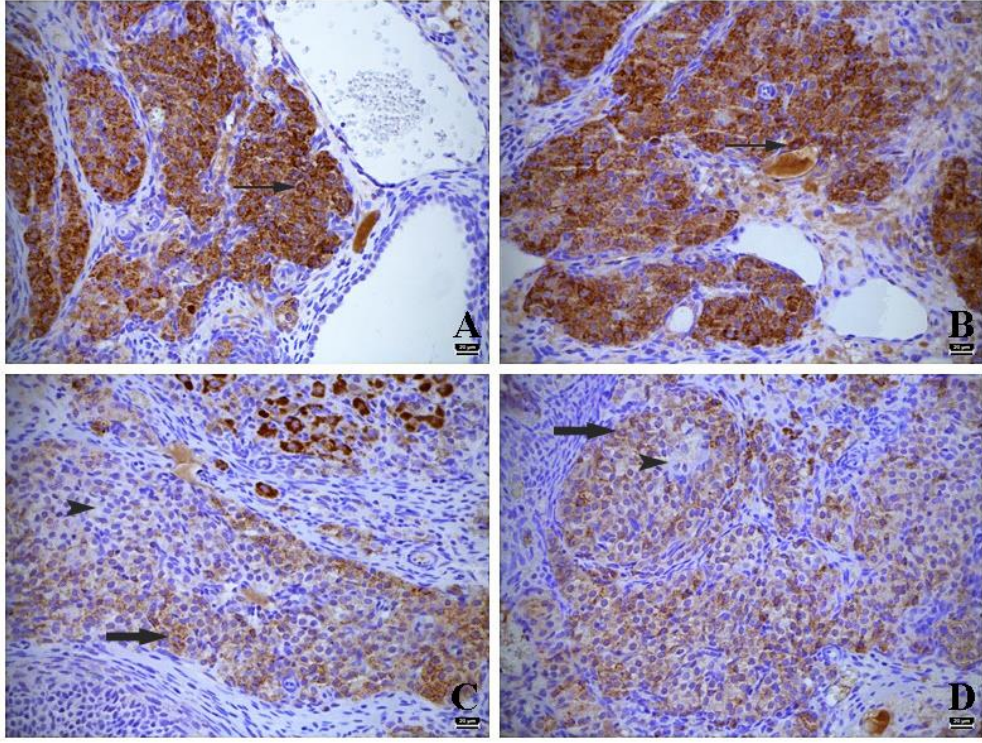


Şekil 3.15. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP27 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.

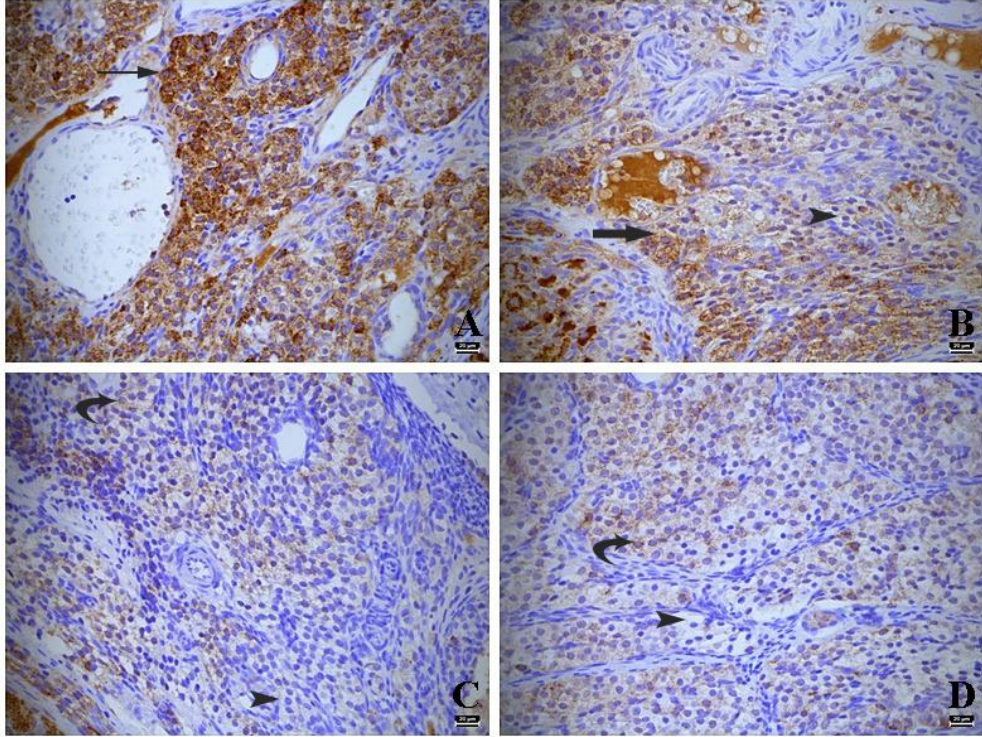
3.5.2. HSP60

İntersitisyel hücrelerdeki sitoplazmik HSP60 immun reaksiyonunun; proöstrus ve östrus dönemlerinde kuvvetli (Şekil 3.16, A ve B), metöstrus ve diöstrus dönemlerinde orta (Şekil 3.16, C ve D), gebeliğin 5. gününde kuvvetli (Şekil 3.17, A), 10. gününde orta (Şekil 3.17, B), 15 ve 20. günlerinde zayıf (Şekil 3.17, C ve D) ve laktasyonun 1. gününde kuvvetli (Şekil 3.18, A), 5. gününde orta (Şekil 3.18, B), 10 ve 20. günlerinde ise zayıf (Şekil 3.18, C ve D) şiddette ve granüler tarzda olduğu gözlemlendi.

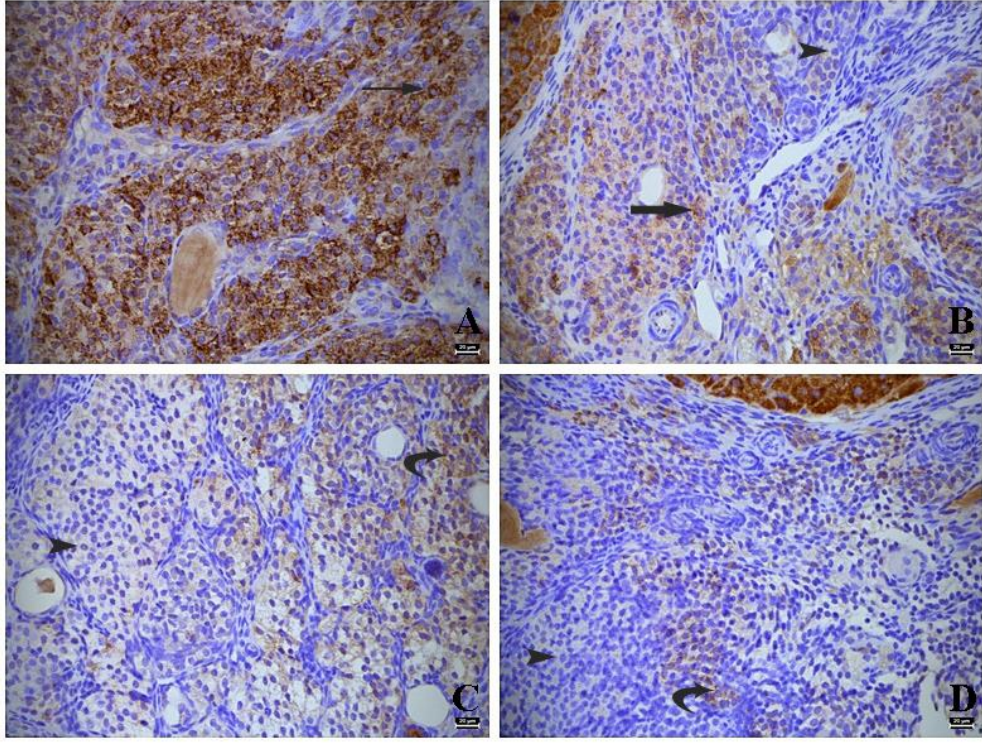
Pozitif immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücrelerin ve sitoplazmalarındaki granül yoğunluğunun, proöstrus ve östrusa kıyasla metöstrus ve diöstrus dönemlerinde azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.16). Gebeliğin 5. gününden, 15 ve 20. günlerine (Şekil 3.17) ve laktasyonun 1. gününden, 10 ve 20. günlerine (Şekil 3.18) doğru immunopozitif intersitisyel hücrelerin ve sitoplazmadaki granül yoğunluğunun giderek azaldığı fark edildi.



Şekil 3.16. Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve diöstrus (D) dönemlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP60 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.



Şekil 3.17. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP60 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, eğri ok: zayıf, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.

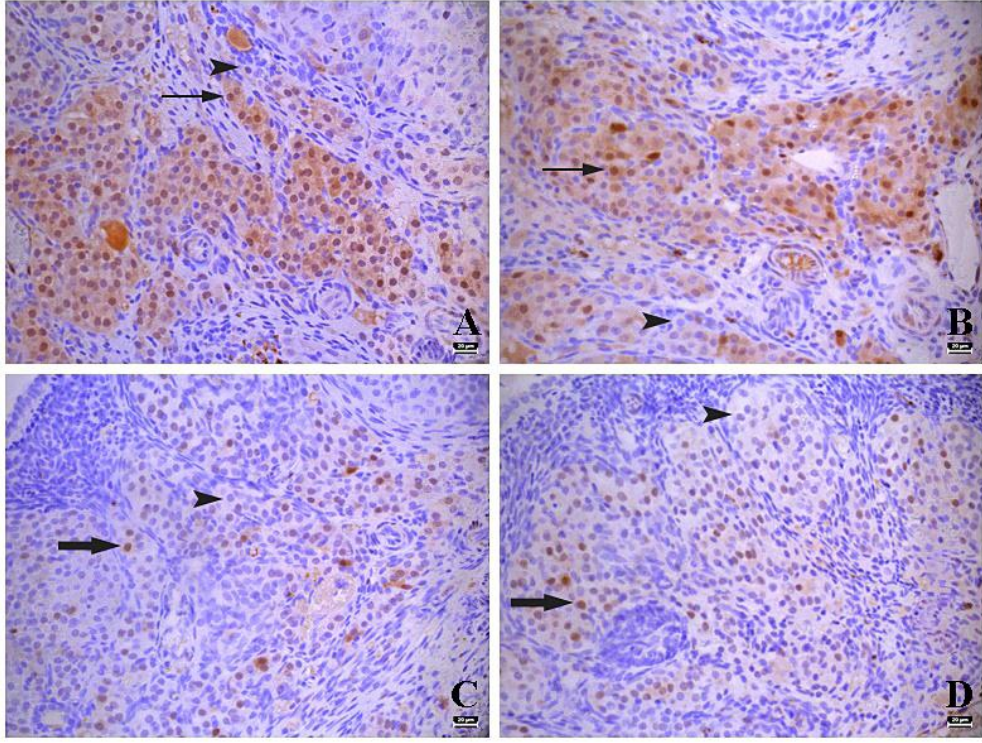


Şekil 3.18. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP60 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, eğri ok: zayıf, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.

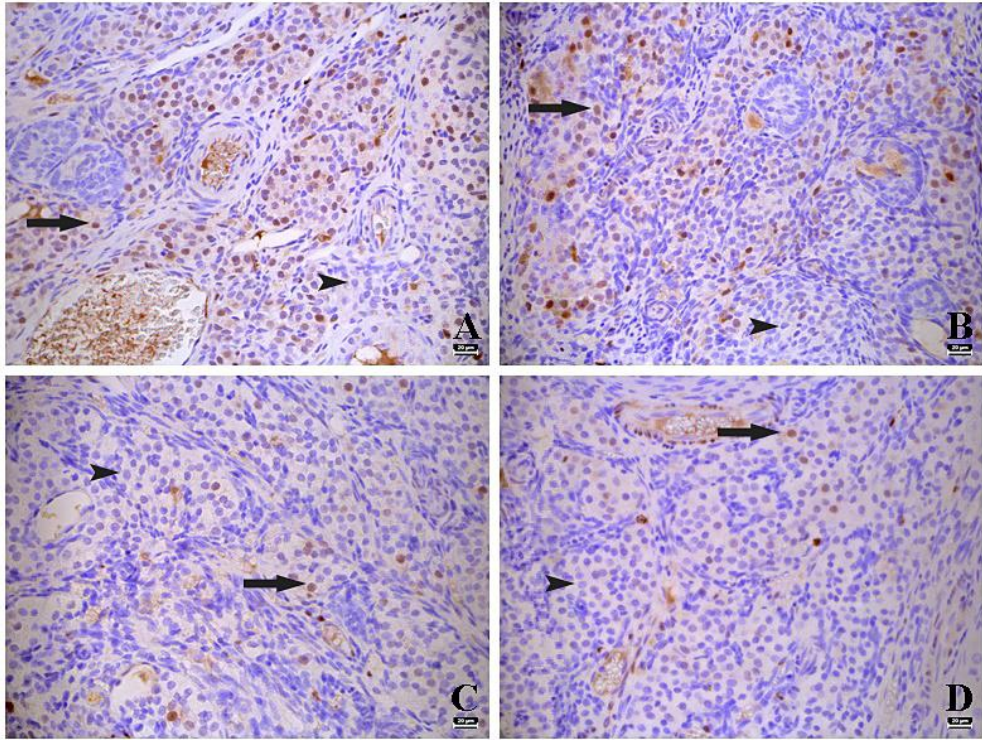
3.5.3. HSP70

İntersitisyel hücrelerde sitoplazmik ve nükleer olarak gözlenen HSP70 immun reaksiyonunun; proöstrus ve östrusta orta (Şekil 3.19, A ve B), metöstrus ve diöstrus dönemleri (Şekil 3.19, C ve D) ile gebeliğin (Şekil 3.20) ve laktasyonun (Şekil 3.21) tüm dönemlerinde zayıf şiddette olduğu belirlendi.

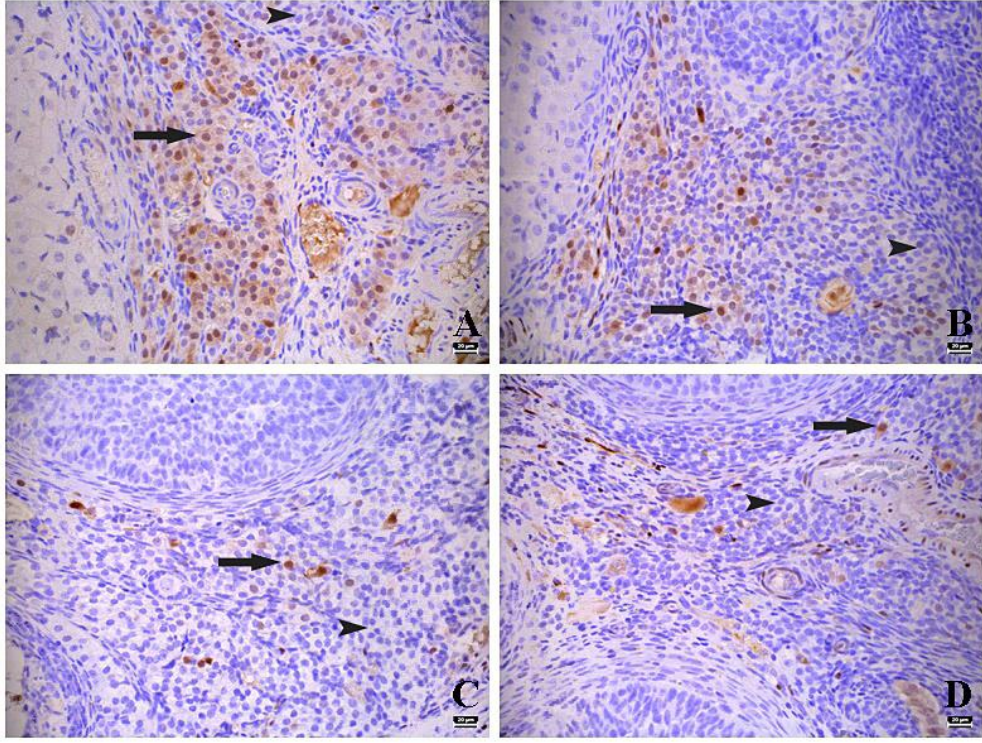
Proöstrus ve östrus dönemlerindeki immunopozitif intersitisyel hücrelerin, metöstrus ve diöstrus dönemlerinde azaldığı dikkat çekti (Şekil 3.19). Pozitif immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücrelerin gebeliğin 5. gününden, 15 ve 20. günlerine (Şekil 3.20) ve laktasyonun 1. gününden, 10 ve 20. günlerine (Şekil 3.21) doğru giderek azaldığı gözlemlendi.



Şekil 3.19. Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve diöstrus (D) dönemlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP70 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.



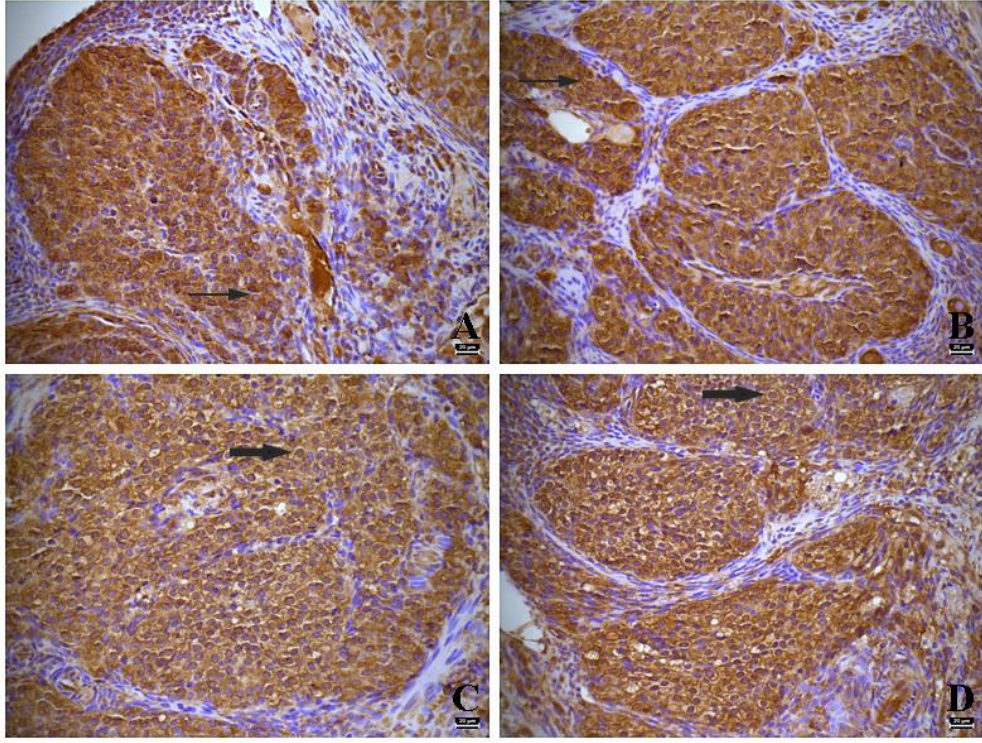
Şekil 3.20. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP70 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.



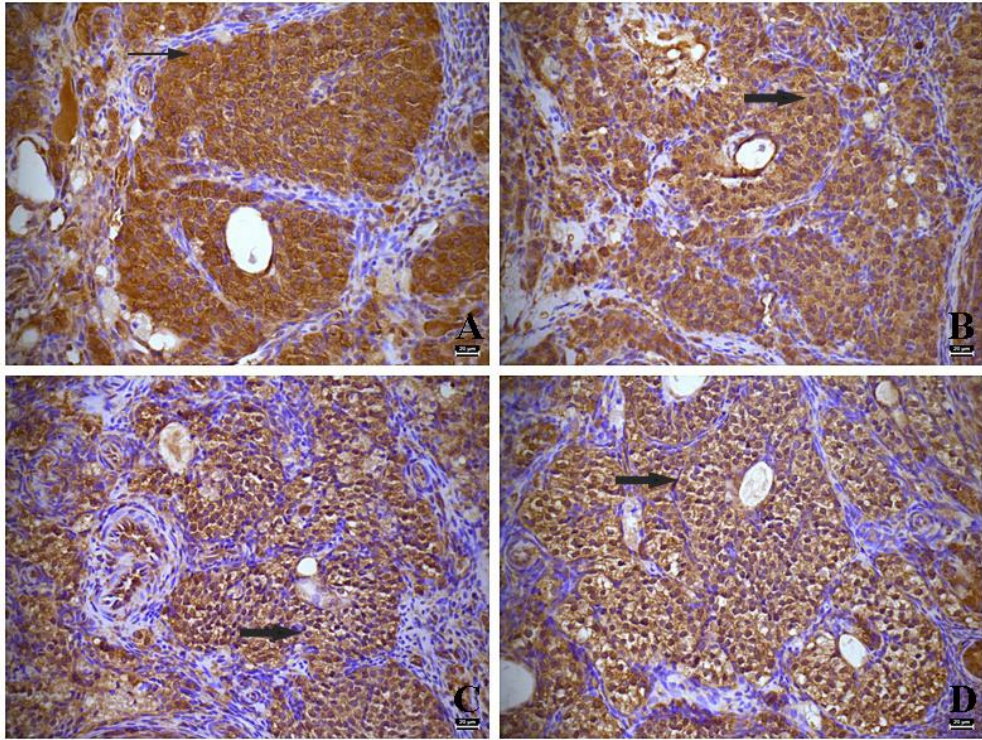
Şekil 3.21. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP70 immün reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.

3.5.4. HSP90

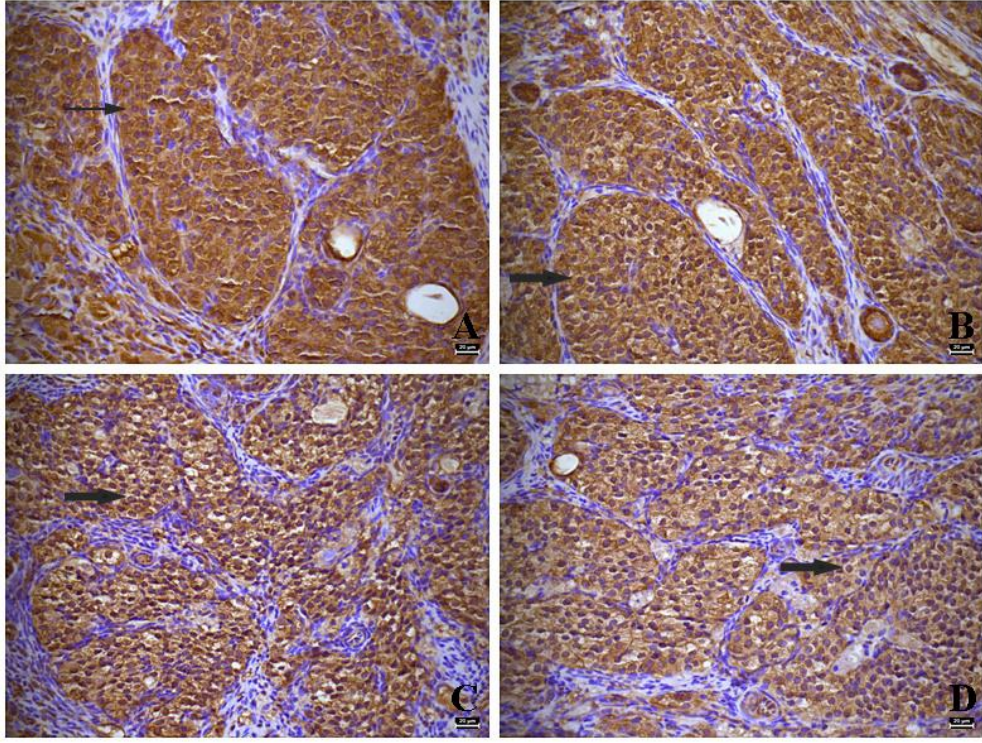
Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca bütün intersitisyel hücrelerde sitoplazmik HSP90 immün reaksiyonu gözlemlendi. Bu reaksiyonun proöstrus ve östrus dönemlerinde orta (Şekil 3.22, A ve B), metöstrus ve diöstrus dönemlerinde ise zayıf (Şekil 3.22, C ve D) şiddette olduğu görüldü. Gebeliğin 5. (Şekil 3.23, A) ve laktasyonun 1. gününde (Şekil 3.24, A) orta şiddette olan HSP90 immünreaksiyonu, gebeliğin 10. (Şekil 3.23, B) ve laktasyonun 5. gününde (Şekil 3.24, B) zayıf şiddetteydi. Bu dönemlerin ilerleyen günlerindeki reaksiyonlar ise oldukça zayıftı (Şekil 3.23, C ve D; Şekil 3.24, C ve D).



Şekil 3.22. Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve döstrus (D) dönemlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP90 immun reaksiyonu. Kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.



Şekil 3.23. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP90 immun reaksiyonu. Kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.



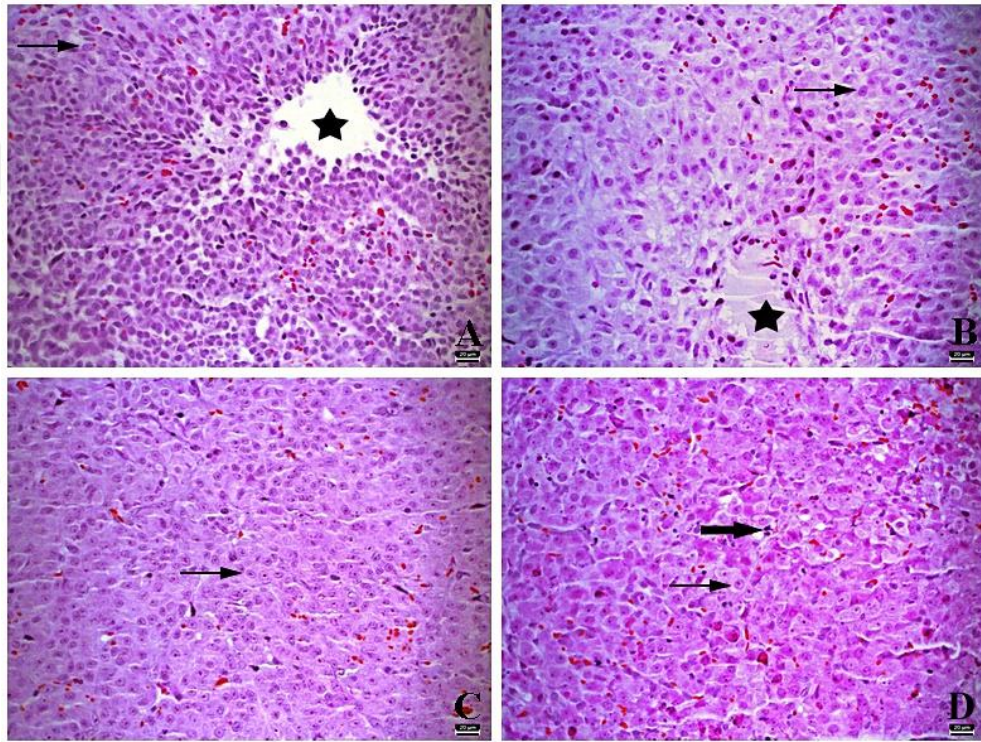
Şekil 3.24. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki intersitisyel hücrelerde HSP90 immün reaksiyonu. Kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immün reaksiyon gösteren intersitisyel hücreler. Bar: 20µm.

3.6. Korpus Luteumların Yapısal Özellikleri

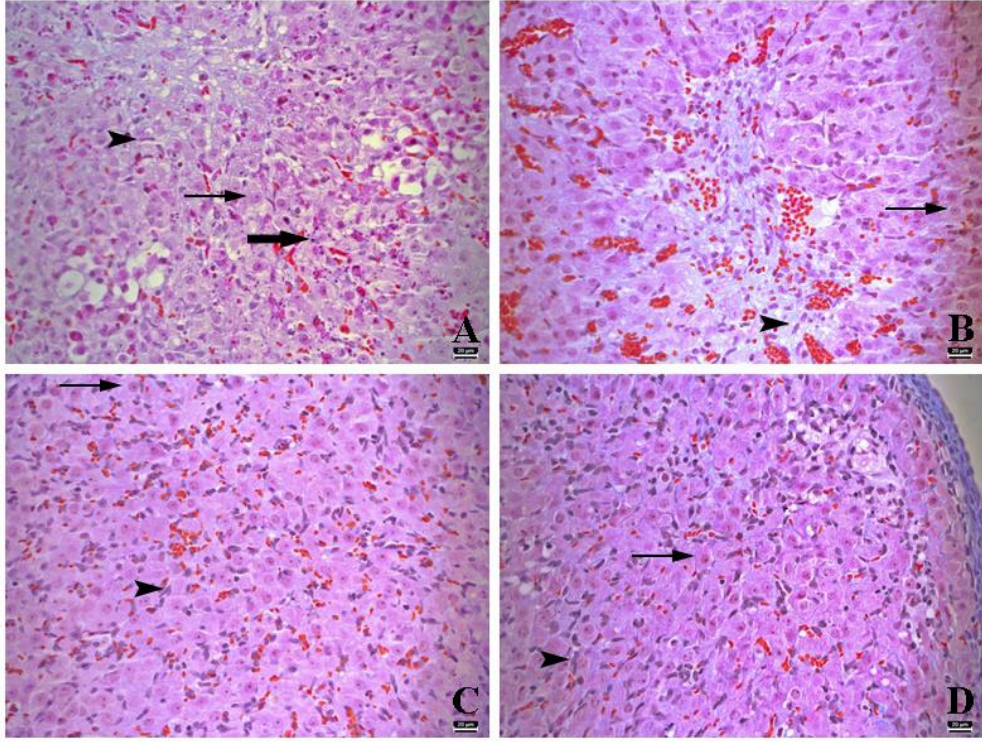
Üçlü boyama yapılan ovaryum kesitleri incelendiğinde, östrus döneminde ovulasyon ile birlikte yeni siklik korpus luteumların şekillendiği görüldü. Östrus ve metöstrüs dönemlerinde, bunların bazılarının merkezinde folikül sıvısının olduğu tespit edildi (Şekil 3.25, A ve B). Yeni siklik korpus luteumların boyutlarının metöstrüs döneminde arttığı, maksimum boyuta ise diöstrüs döneminde ulaştığı gözlemlendi. Östrus dönemindeki (Şekil 3.25, A) yeni siklik korpus luteumların mekik ya da yuvarlak şekilli küçük luteal hücrelerden oluştuğu belirlenirken, metöstrüs, diöstrüs ve bir sonraki siklusun proöstrüs dönemlerinde (Şekil 3.25, B, C ve D) luteal hücrelerin büyüdüğü ve yuvarlak şekle sahip olduğu fark edildi. Östrus siklusunun tüm dönemlerinde, yeni siklik korpus luteumların luteal hücre çekirdekleri ökromatikti (Şekil 3.25). Bir sonraki siklusun proöstrüs dönemindeki yeni siklik korpus luteumlarda apoptotik hücreler ayırt edildi (Şekil 3.25, D). Yeni siklik korpus

luteumlar, bir sonraki siklusun östrus döneminde ovulasyon olayının tekrar gerçekleşmesiyle birlikte, eski siklik korpus luteum olarak isimlendirildi.

Östrus siklusunun tüm dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlarda fibrosit benzeri hücrelerin arttığı görüldü. Bunların gerilemesiyle birlikte, yeni siklik korpus luteumlara kıyasla, boyutlarının küçüldüğü dikkati çekti. Östrus dönemindeki eski siklik korpus luteumlarda ise apoptotik hücreler fark edildi (Şekil 3.26).

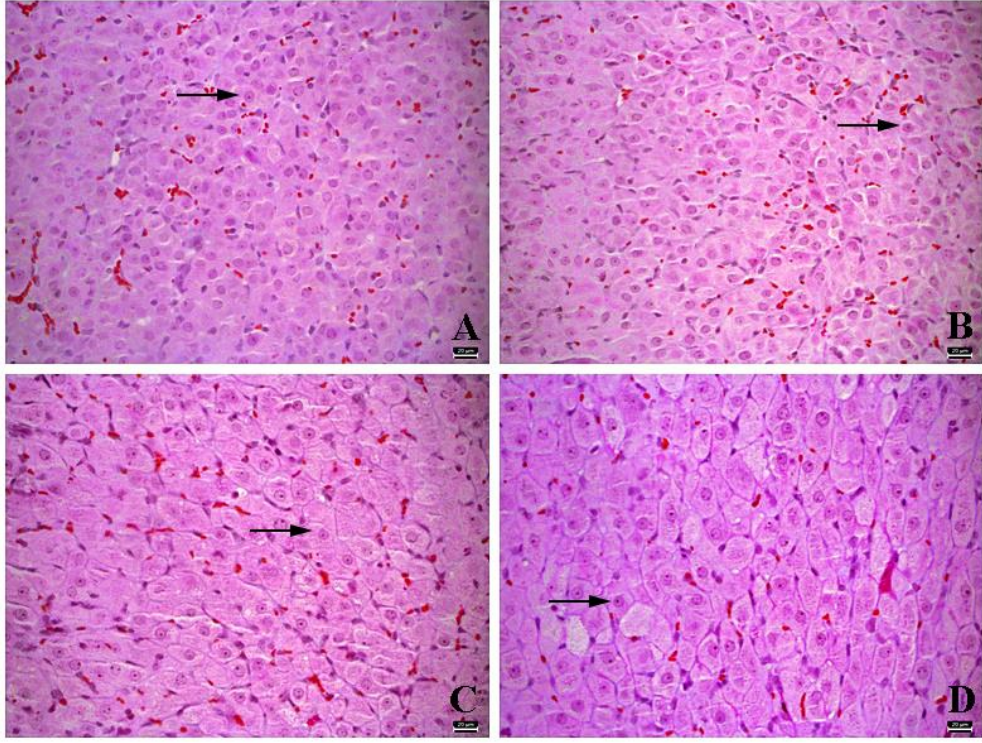


Şekil 3.25. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki yeni siklik korpus luteumlar. İnce ok: luteal hücreler, kalın ok: apoptotik hücreler, yıldız: folikül sıvısı içeren boşluk. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm.

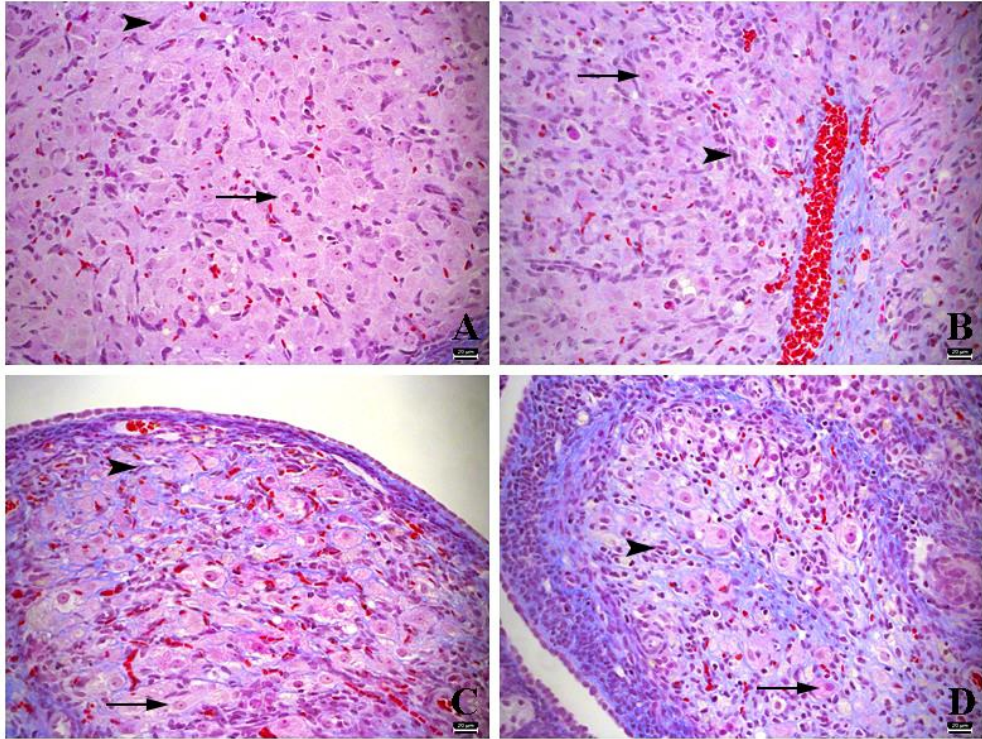


Şekil 3.26. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlar. İnce ok: luteal hücreler, kalın ok: apoptotik hücreler, ok başı: fibrosit benzeri hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm.

Gebelik döneminde; gebelik ilerledikçe yeni gebelik korpus luteumlarının boyutlarının ve luteal hücrelerin büyüklüklerinin arttığı, östrus döneminden kalan eski siklik korpus luteumların ise bağ doku proliferasyonunun artmasıyla gerilediği tespit edildi. Her iki korpus luteumun luteal hücre çekirdeklerinin ökromatik yapıda olduğu görüldü. Eski siklik korpus luteumlarda fibrosit benzeri hücreler de gözlemlendi (Şekil 3.27 ve 3.28).

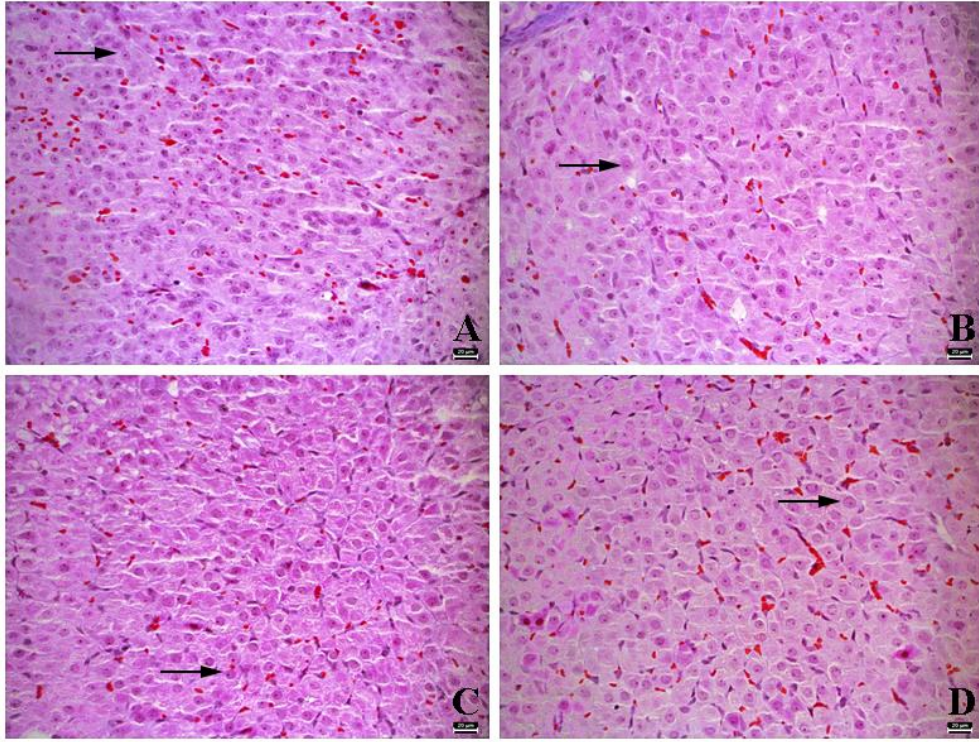


Şekil 3.27. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni gebelik korpus luteumları. Ok: luteal hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm.

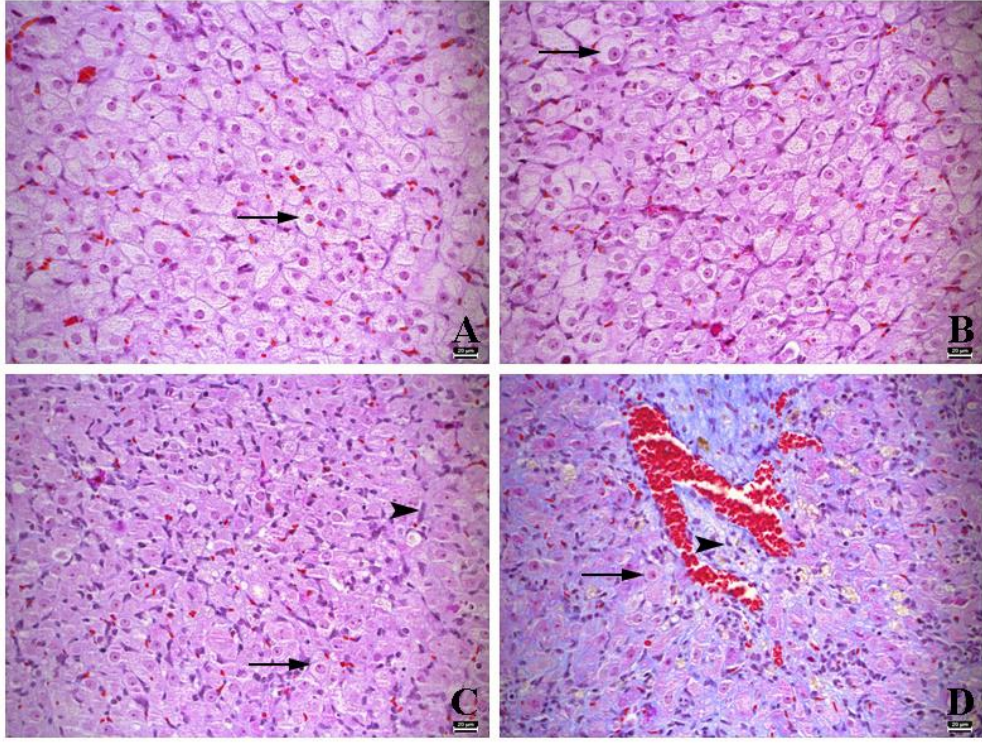


Şekil 3.28. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski siklik korpus luteumlar. Ok: luteal hücreler, ok başı: fibrosit benzeri hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm.

Laktasyonun 1. gününde, postpartum ovulasyon sonrası şekillenen yeni laktasyon korpus luteumları tespit edildi. Laktasyon günleri ilerledikçe bunların büyüdüğü, eski gebelik korpus luteumlarının ise küçüldüğü dikkati çekti. Her ikisinin de luteal hücrelerinin çekirdekleri ökromatikti. Laktasyonun 1. gününde görülen yeni laktasyon korpus luteumlarındaki luteal hücrelerin, eski gebelik korpus luteumlarındakine göre küçük olduğu; ancak, laktasyon günü ilerledikçe bu luteal hücrelerin büyüdüğü fark edildi. Laktasyonun 10 ve 20. günlerinde eski gebelik korpus luteumlarında fazla sayıda fibrosit benzeri hücrelerin görülmesiyle gerilemenin ilerlediği belirlendi (Şekil 3.29 ve 3.30).



Şekil 3.29. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni laktasyon korpus luteumları. Ok: luteal hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm.



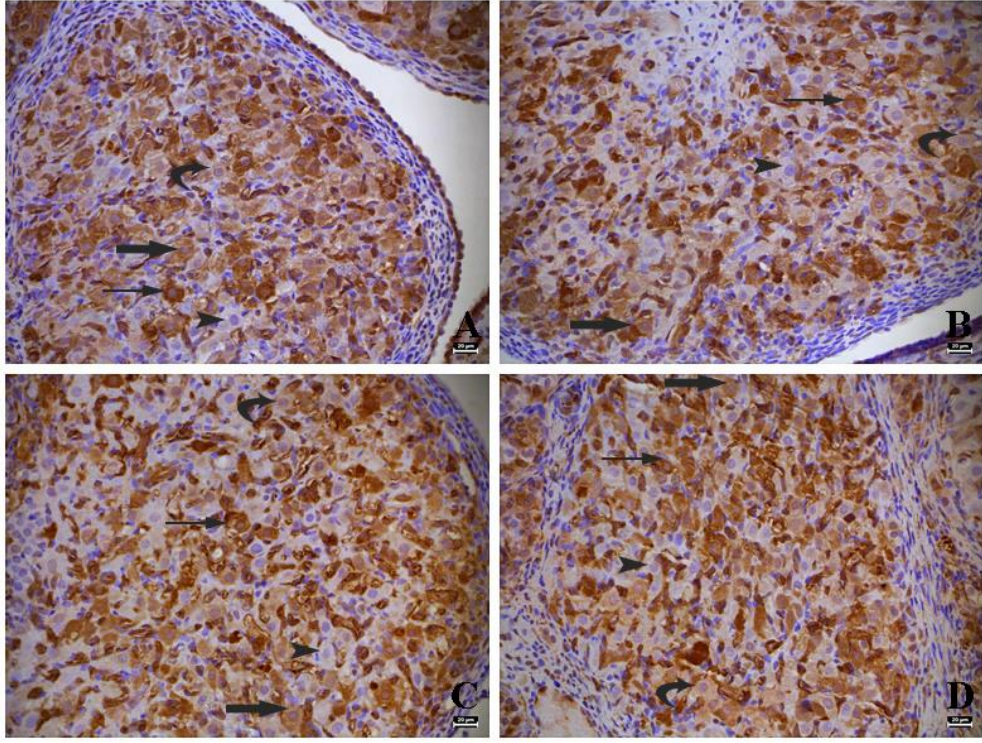
Şekil 3.30. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski gebelik korpus luteumları. Ok: luteal hücreler, ok başı: fibrosit benzeri hücreler. Crossmon' ın üçlü boyaması. Bar: 20µm.

3.7. Korpus Luteumlardaki HSP' lerin İmmunohistokimyasal Bulguları

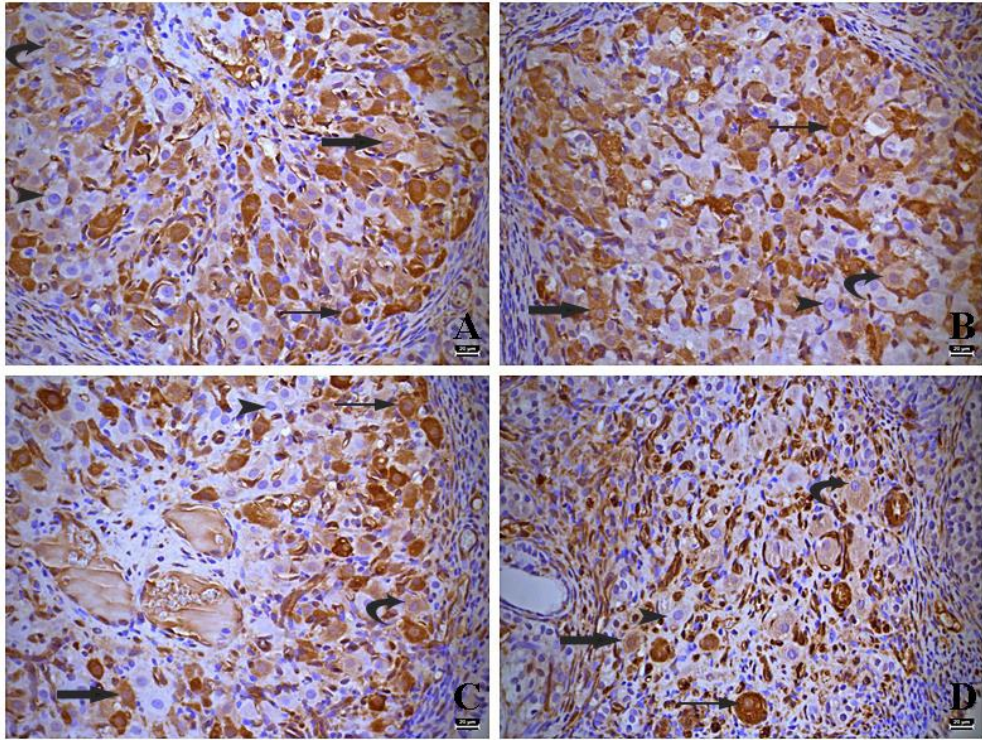
3.7.1. HSP27

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemlerinin tüm çalışma gruplarında, yeni korpus luteumların luteal hücrelerinin sitoplazma ve nukleusunda negatif HSP27 immun reaksiyonu belirlendi.

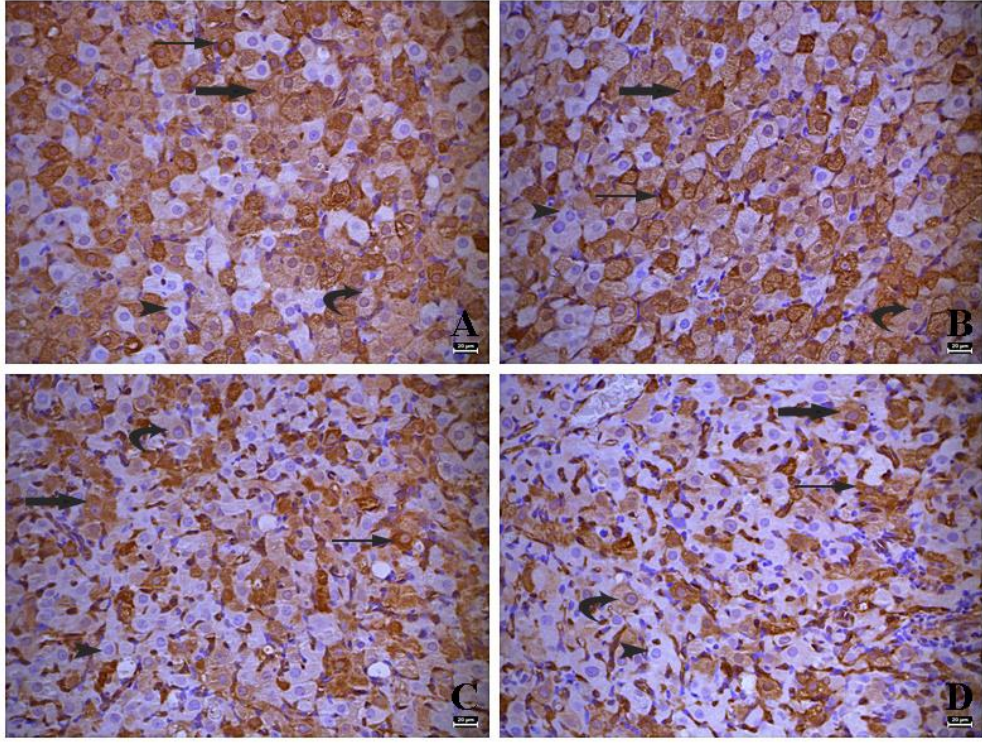
Bütün dönemlerdeki eski korpus luteumların luteal hücrelerinin nukleusunda negatif, sitoplazmasında ise negatif, zayıf, orta ve kuvvetli şiddette olmak üzere dört farklı HSP27 immun reaksiyonu görüldü (Şekil 3.31-33).



Şekil 3.31. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP27 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, eğri ok: zayıf, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



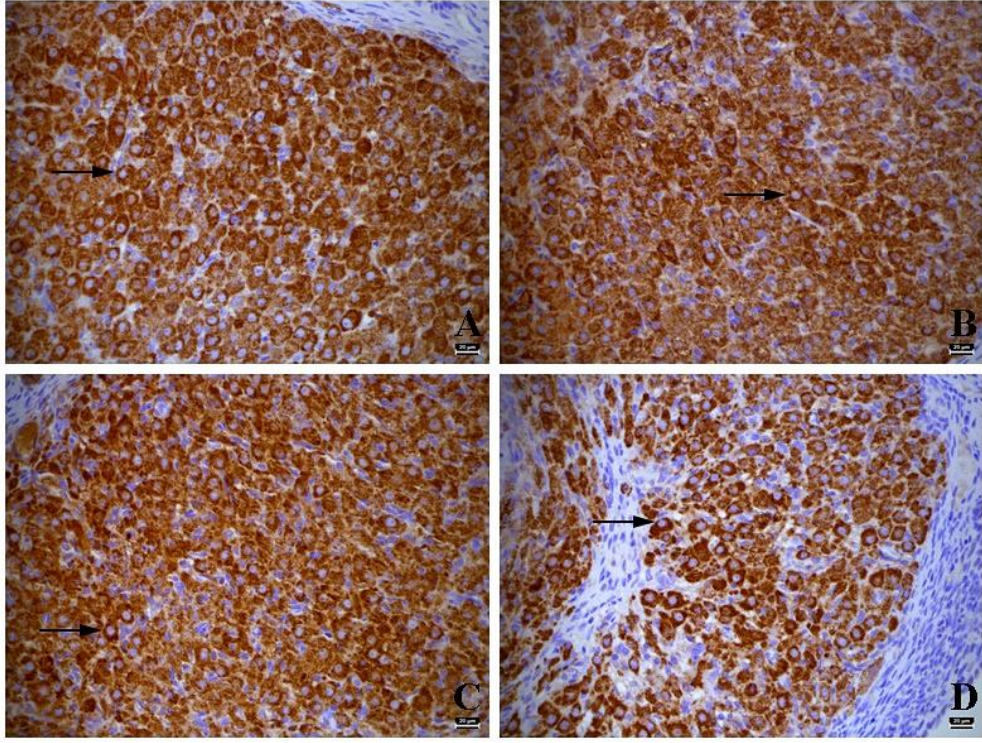
Şekil 3.32. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP27 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, eğri ok: zayıf, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



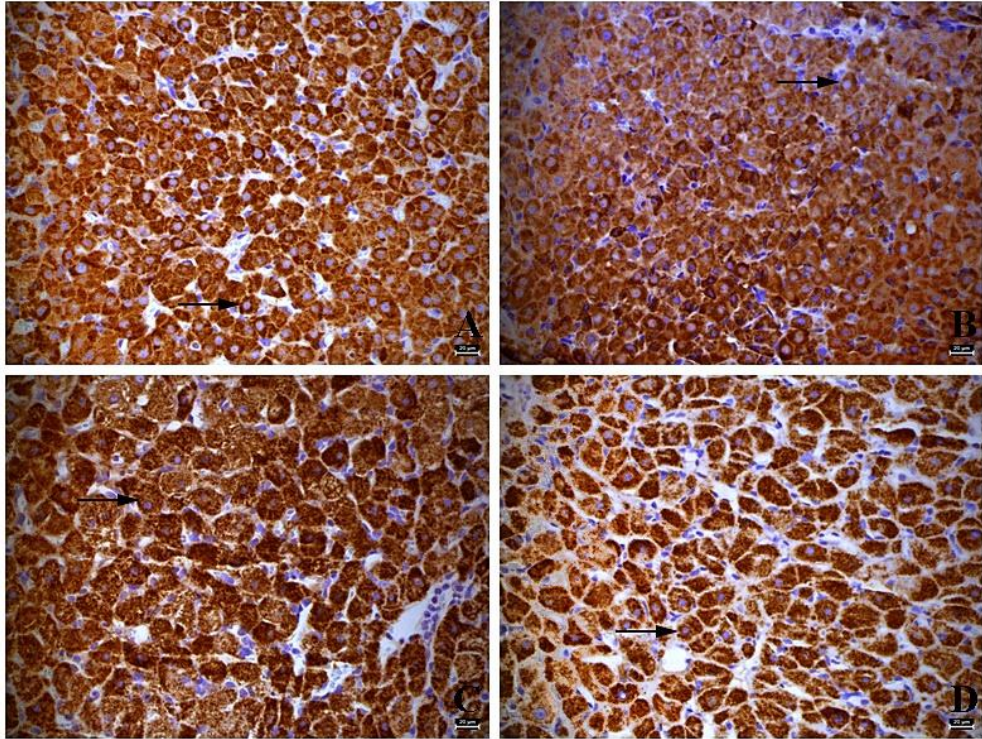
Şekil 3.33. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski gebelik korpus luteumlarında HSP27 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, eğri ok: zayıf, kalın ok: orta, ince ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.

3.7.2. HSP60

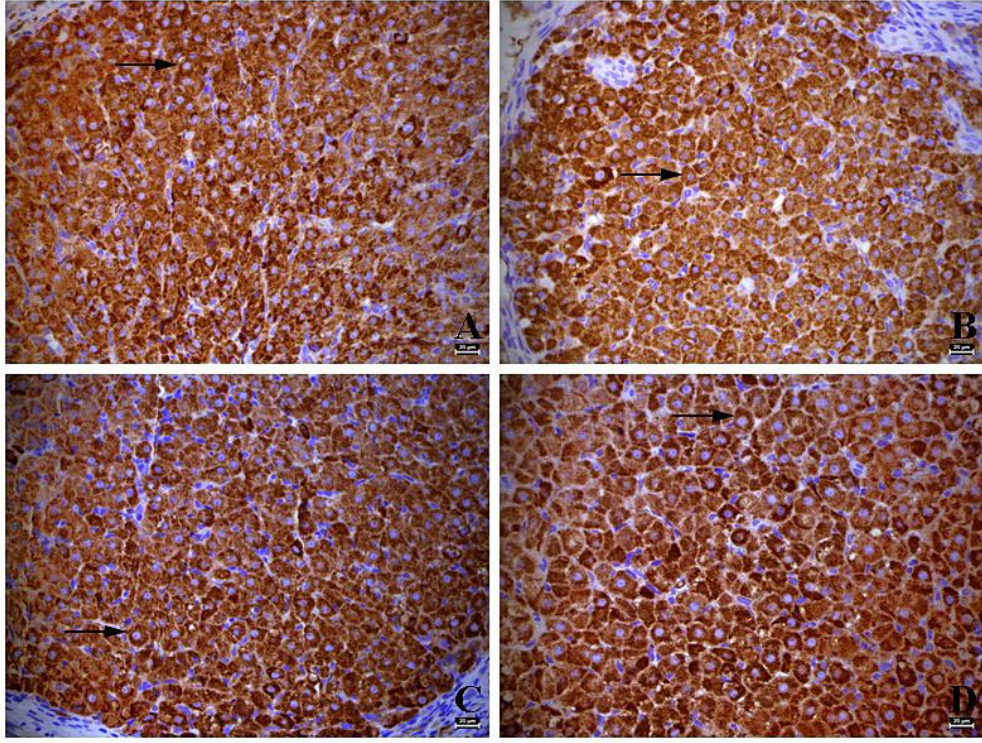
Östrus siklusu, gebelik ve laktasyonun tüm dönemlerindeki eski ve yeni korpus luteumların luteal hücrelerinin sitoplazmasında kuvvetli şiddette ve granüler tarzda HSP60 immun reaksiyonu tespit edildi. Ancak, eski korpus luteumların luteal hücrelerinin sitoplazmalarındaki HSP60 granül yoğunluğunun yeni korpus luteumlara kıyasla azaldığı fark edildi (Şekil 3.34-39).



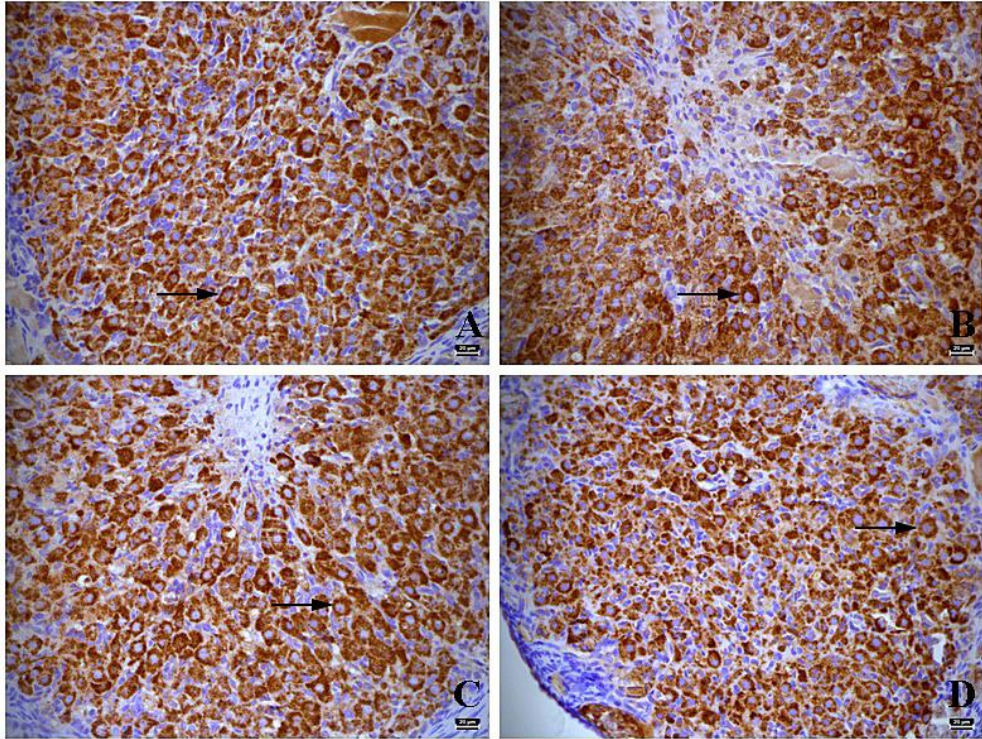
Şekil 3.34. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki yeni siklik korpus luteumlarda HSP60 immun reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



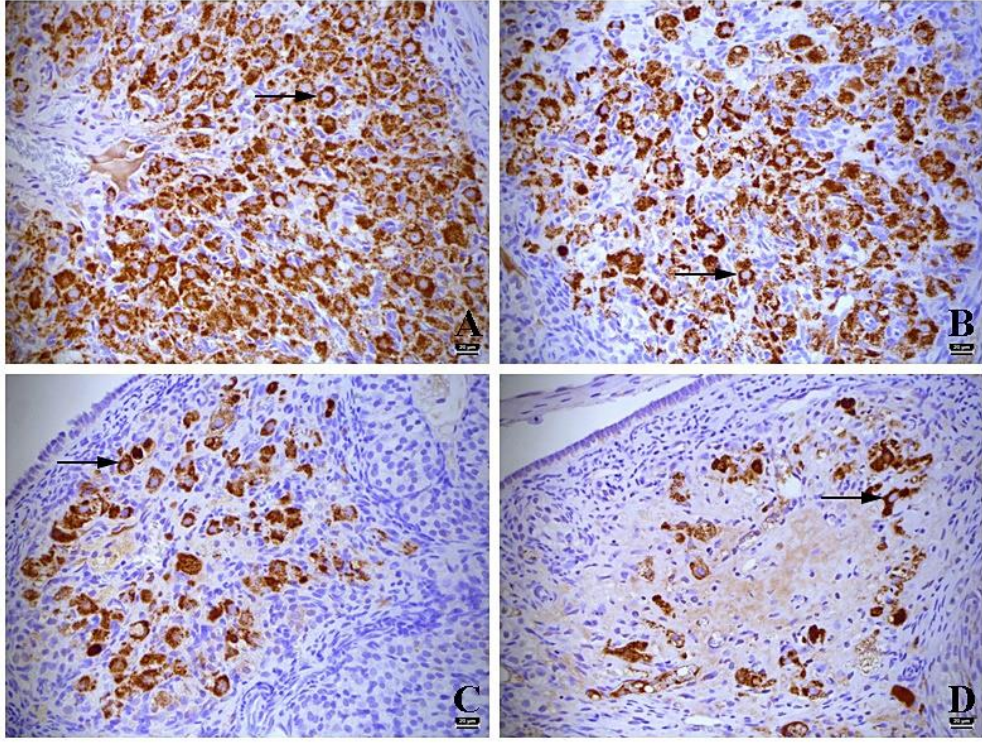
Şekil 3.35. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni gebelik korpus luteumlarında HSP60 immun reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



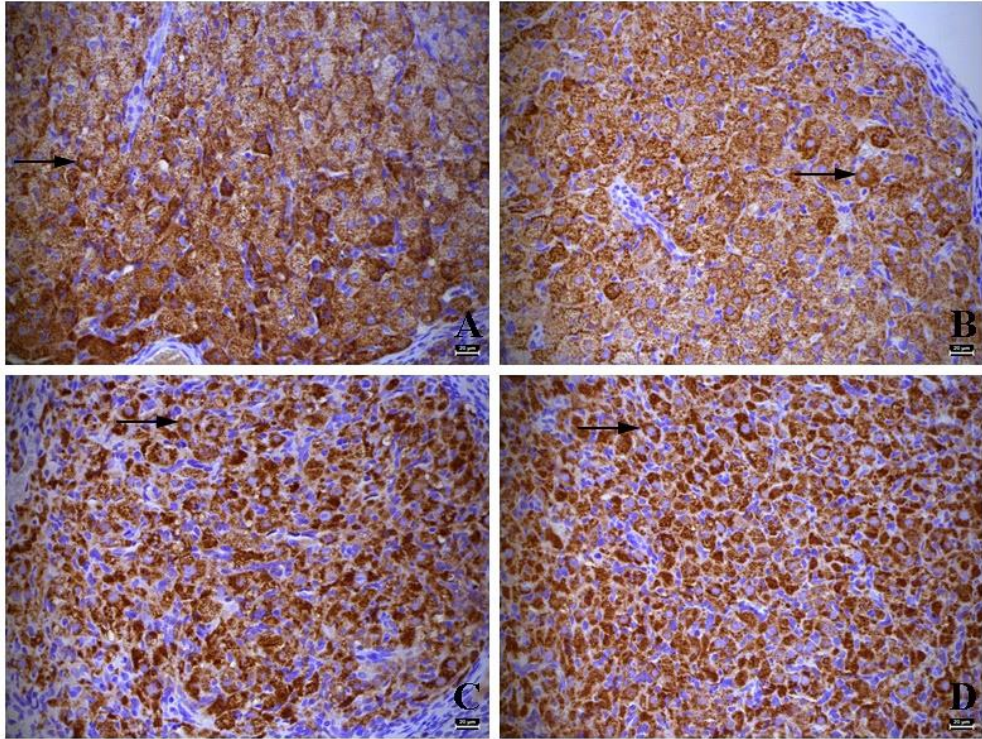
Şekil 3.36. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni laktasyon korpus luteumlarında HSP60 immun reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20μm.



Şekil 3.37. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP60 immun reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20μm.



Şekil 3.38. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP60 immun reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar:20µm.



Şekil 3.39. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski gebelik korpus luteumlarında HSP60 immun reaksiyonu. Ok: kuvvetli şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.

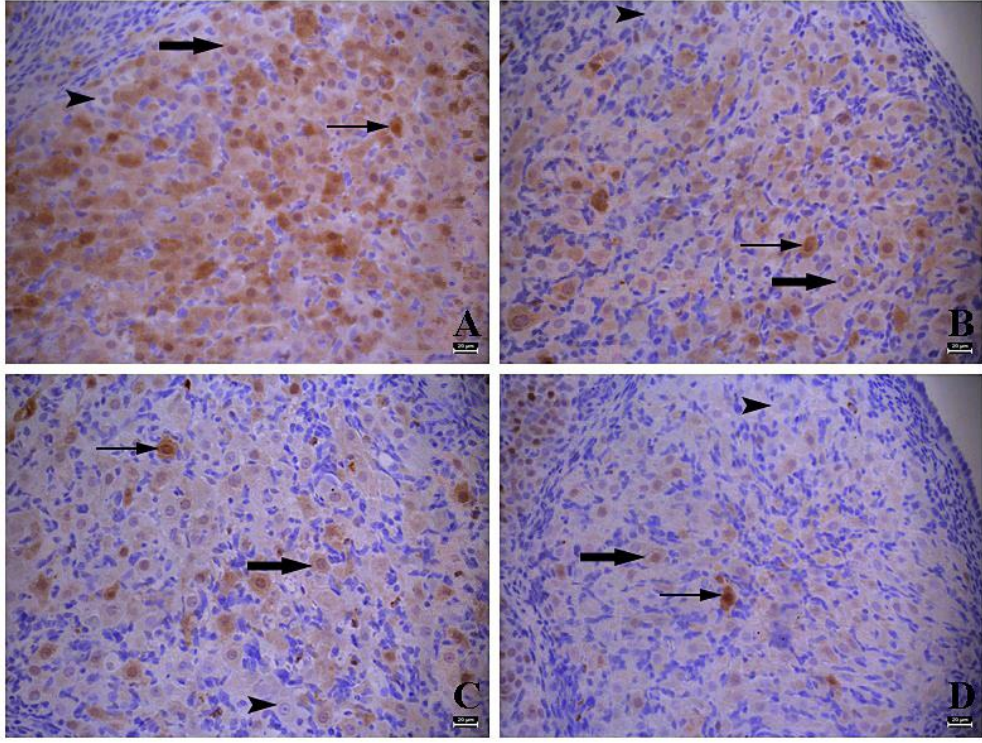
3.7.3. HSP70

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemlerinin tüm çalışma gruplarında, yeni korpus luteumların luteal hücrelerinin sitoplazma ve nukleusunda negatif HSP70 immun reaksiyonu tespit edildi.

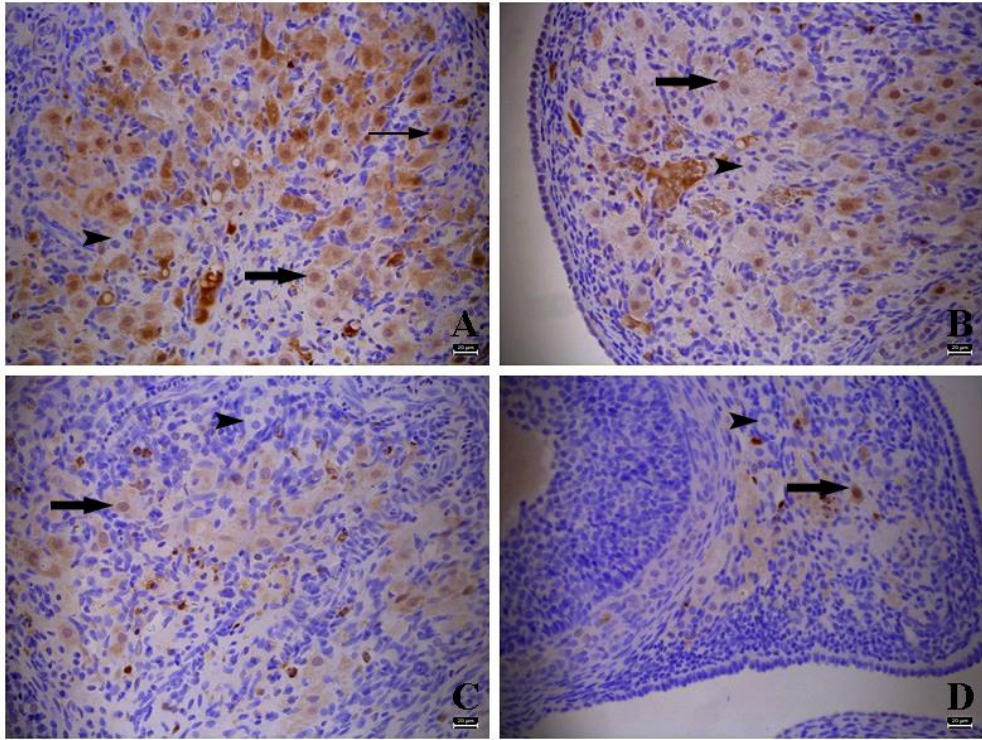
Eski siklik korpus luteumların luteal hücrelerindeki HSP70 immun reaksiyonunun en fazla östrus döneminde olduğu, metöstrus, diöstrus ve bir sonraki siklusun proöstrus dönemlerinin ilerlemesine paralel olarak, eski siklik korpus luteumların gerilemesiyle birlikte reaksiyonun azaldığı dikkati çekti. Zayıf ve orta şiddette sitoplazmik ve nükleer immun reaksiyon gösteren luteal hücrelerin en fazla östrus döneminde olduğu ve bu hücrelerin metöstrus, diöstrus ve bir sonraki siklusun proöstrus dönemlerinin ilerlemesiyle birlikte azaldığı görüldü (Şekil 3.40).

Gebelik döneminde, eski siklik korpus luteumların luteal hücrelerindeki HSP70 immun reaksiyonunun en fazla gebeliğin 5. gününde olduğu ve gebeliğin ilerlemesiyle birlikte, korpus luteumların gerilemesine bağlı olarak HSP70 immun reaksiyonunun azaldığı tespit edildi. Orta şiddette sitoplazmik ve nükleer immun reaksiyon gösteren luteal hücreler gebeliğin sadece 5. gününde görüldü. Gebeliğin ilerlemesi ile birlikte zayıf şiddette sitoplazmik ve nükleer immun reaksiyon gösteren luteal hücrelerin azaldığı fark edildi (Şekil 3.41).

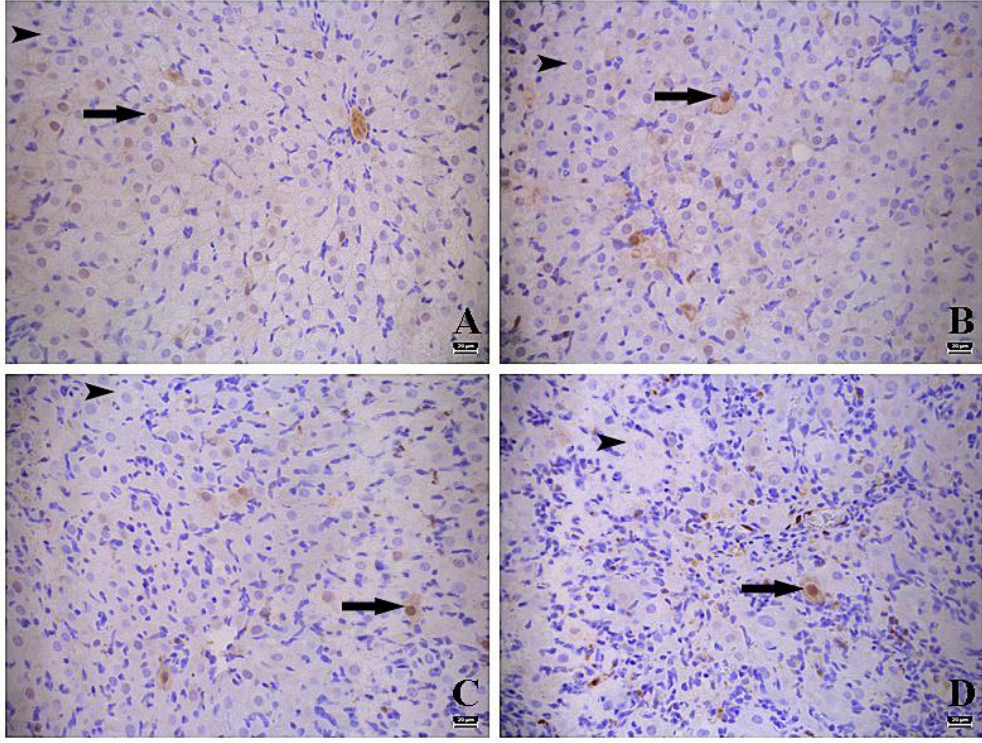
Laktasyonun tüm dönemlerindeki eski gebelik korpus luteumlarında negatif immun reaksiyon gösteren luteal hücreler arasında, zayıf şiddette sitoplazmik ve nükleer immun reaksiyon gösteren tek tük luteal hücre fark edildi (Şekil 3.42).



Şekil 3.40. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP70 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



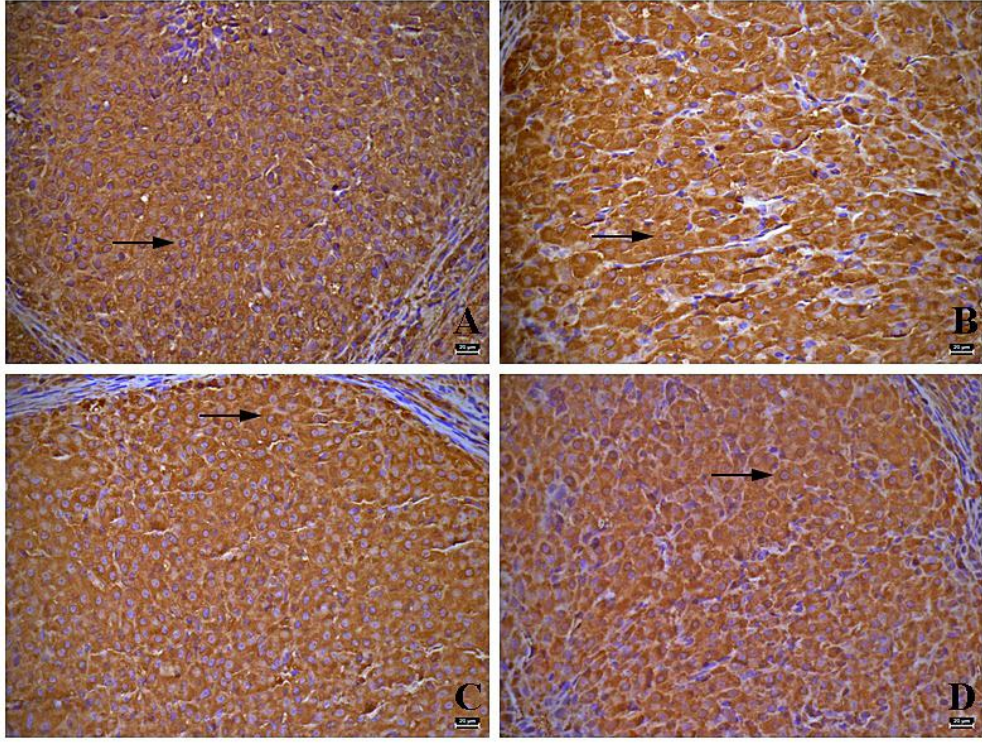
Şekil 3.41. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP70 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf, ince ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



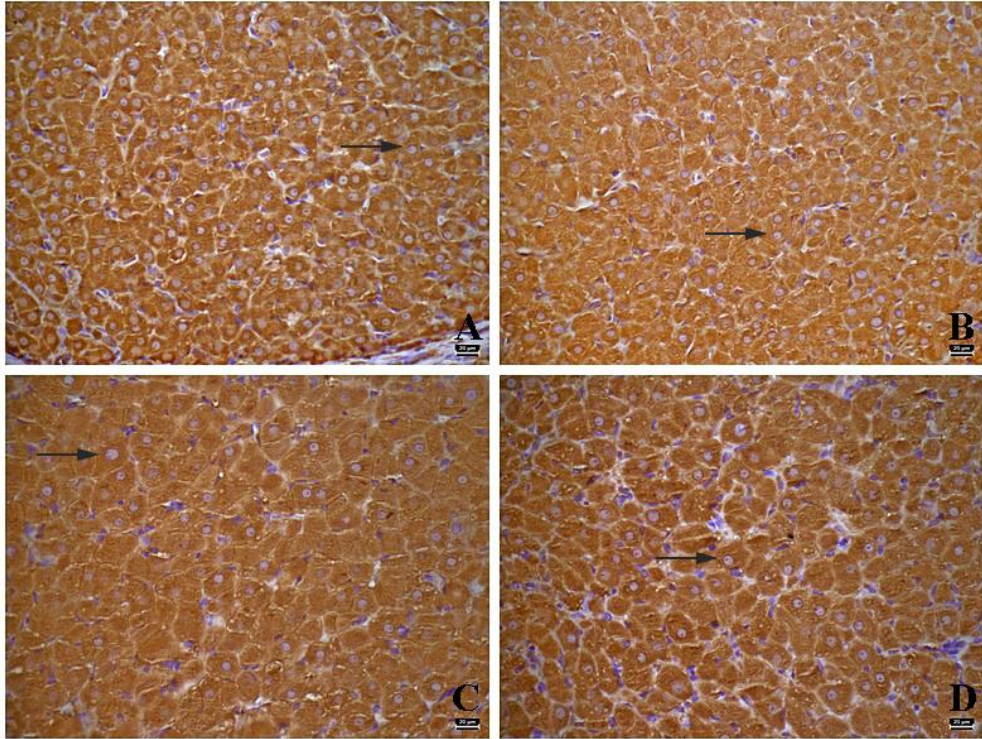
Şekil 3.42. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski gebelik korpus luteumlarında HSP70 immun reaksiyonu. Ok başı: negatif, kalın ok: zayıf şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.

3.7.4. HSP90

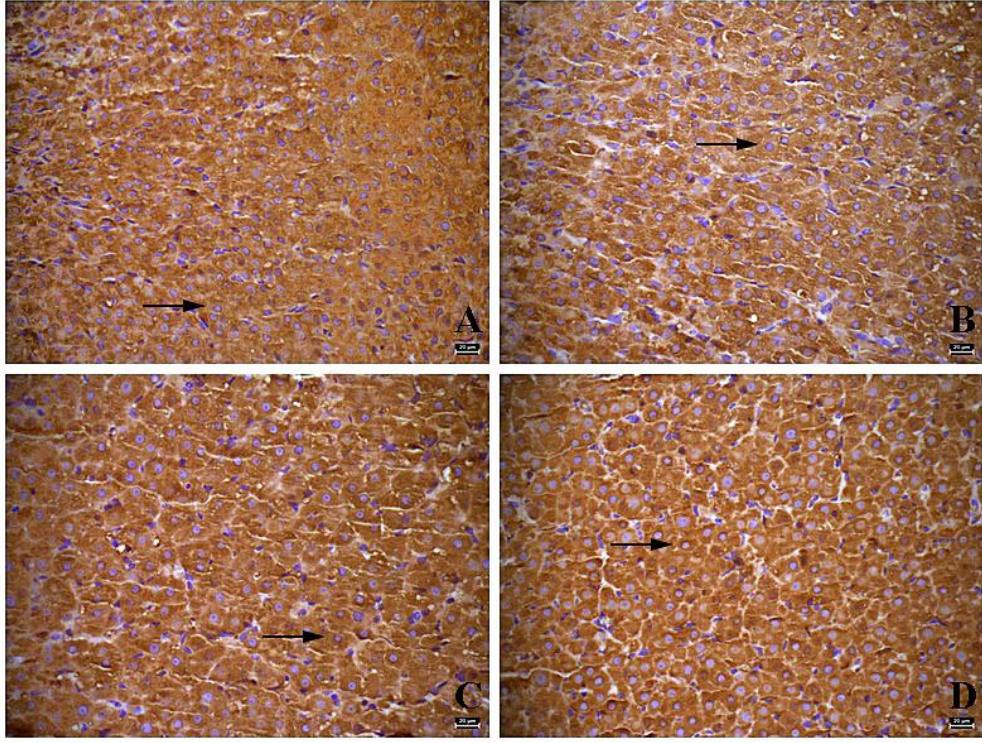
Östrus siklusu, gebelik ve laktasyonun tüm dönemlerinde, yeni ve eski korpus luteumların luteal hücrelerinde orta şiddette sitoplazmik HSP90 immun reaksiyonu tespit edildi (Şekil 3.43-48).



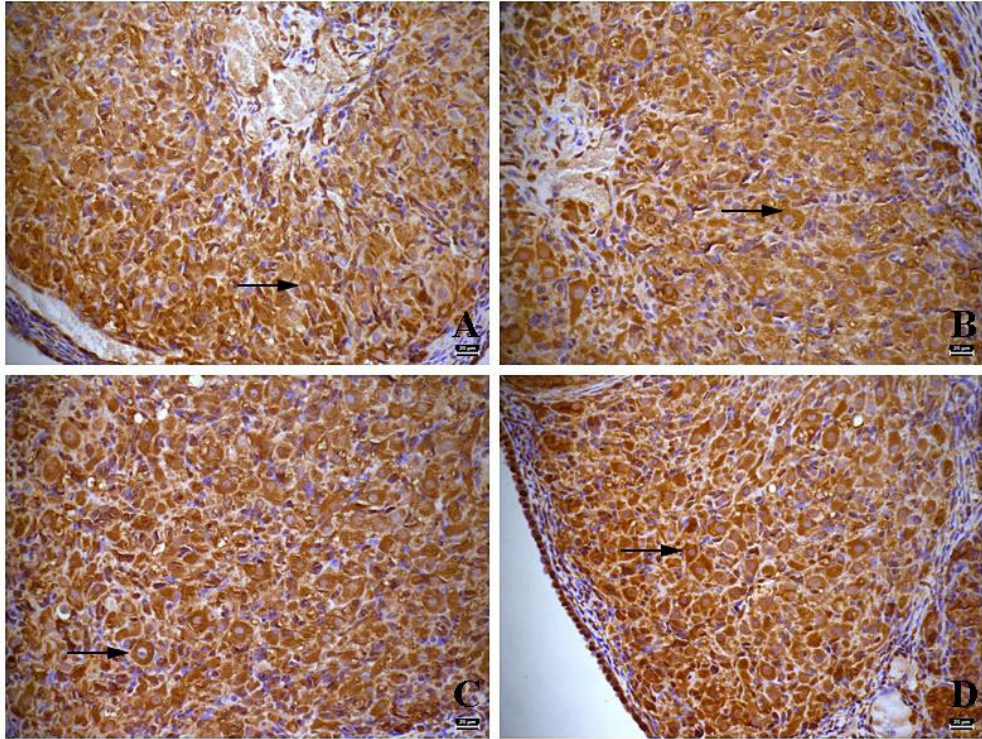
Şekil 3.43. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki yeni siklik korpus luteumlarda HSP90 immun reaksiyonu. Ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



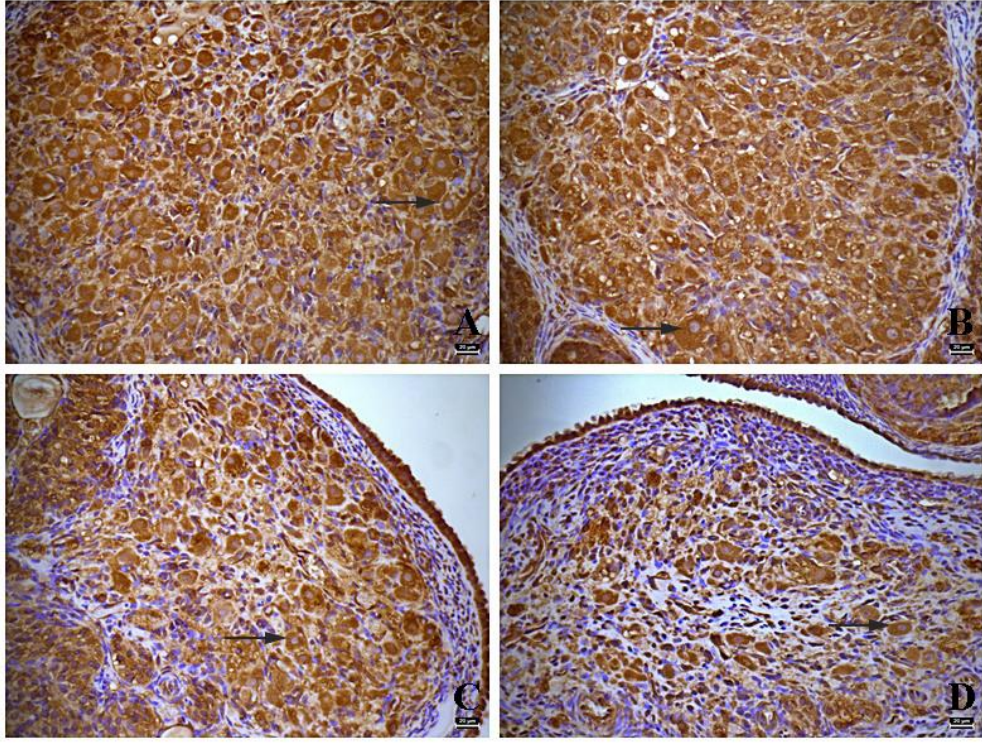
Şekil 3.44. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni gebelik korpus luteumlarında HSP90 immun reaksiyonu. Ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



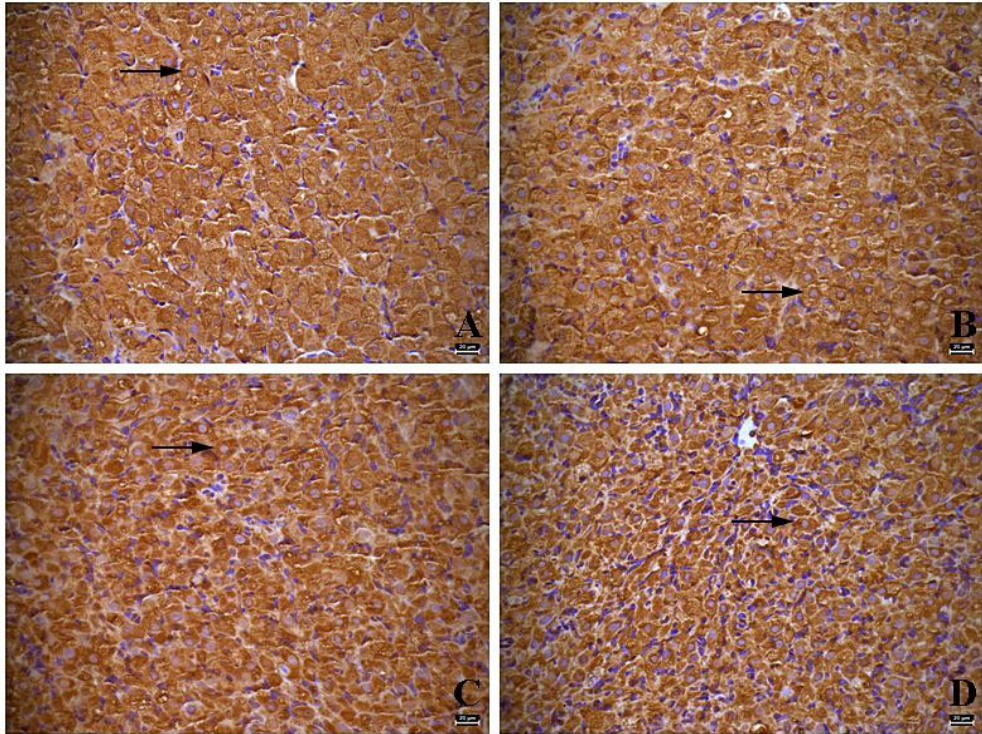
Şekil 3.45. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki yeni laktasyon korpus luteumlarında HSP90 immun reaksiyonu. Ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



Şekil 3.46. Östrus (A), metöstrus (B), diöstrus (C) ve proöstrus (D) dönemlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP90 immun reaksiyonu. Ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



Şekil 3.47. Gebeliğin 5 (A), 10 (B), 15 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski siklik korpus luteumlarda HSP90 immun reaksiyonu. Ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.



Şekil 3.48. Laktasyonun 1 (A), 5 (B), 10 (C) ve 20. (D) günlerindeki eski gebelik korpus luteumlarında HSP90 immun reaksiyonu. Ok: orta şiddette immun reaksiyon gösteren luteal hücreler. Bar: 20µm.

4. TARTIŞMA

Ovaryum; oositleri üreten, sentezlediği hormonlarla genital siklusu düzenleyen, embriyonun uterusu implantasyonunu ve doğuma kadar gelişimini destekleyen önemli bir organdır (Erdost, 2011). Korteks ve medulla olmak üzere iki kısımdan oluşan organın korteksi, fonksiyon gören kısım olup, farklı gelişim aşamalarında olan foliküller, korpus luteum, atretik foliküller, intersitisyel hücreler ve bu yapılar arasında yer alan kortikal stromadan oluşmaktadır (Erdost, 2011; Erkoçak, 1984; Junqueira ve Carneiro, 2005; Ross ve Pawlina, 2006; Samuelson, 2007; Tanyolaç, 1999). Çalışmamızda östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemlerinde üçlü boyama uyguladığımız doku kesitlerini incelediğimizde; hücre çoğalması, farklılaşması ve apoptoz olaylarını kapsayan folikülogenezisin tüm aşamalarındaki folikül yapılarının ve ovaryumun yapısal özelliklerinin literatür bilgiyle (Erdost, 2011; Erkoçak, 1984; Junqueira ve Carneiro, 2005; Ross ve Pawlina, 2006; Samuelson, 2007; Tanyolaç, 1999) uyumlu olduğu belirlenmiştir. Ovaryumdaki foliküller ise primordiyal, primer (tek katlı primer, çok katlı primer), sekonder, Graaf ve atretik foliküller olarak sınıflandırılmıştır (Erdost, 2011; Halıcıoğlu ve ark., 2021; Rençber ve ark., 2018; Ross ve Pawlina, 2006; Yoshida ve ark., 2009).

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemlerindeki folikülogenezise yönelik yapılan çalışmalarda, rat ovaryumunda farklı gelişim aşamalarında olan foliküller ile atretik foliküllerin görüldüğü bildirilmiştir (Ekizceli ve ark., 2015; Greenwald, 1966; Miyamoto ve ark., 1987; Osman, 1986; Taya ve Sasamoto, 1981). Östrus siklusu döneminde yapılan bir çalışmada, proöstrus ve östrus evrelerinde Graaf foliküllerinin sayısında artış tespit edilmiştir (Ekizceli ve ark., 2015). Gebelik döneminde yapılan çalışmalarda, farklı boyutlarda gelişim gösteren foliküller ile atretik foliküllerin görülmesiyle, gebelik boyunca foliküler sessizlik olarak ifade edilen fikir çürütülmüştür (Greenwald, 1966; Miyamoto ve ark., 1987; Osman, 1986). Gebelik döneminde yapılan başka bir çalışmada ise (Greenwald, 1966) gebeliğin 22. gününe kadar foliküllerin belli bir büyüklüğe ulaşabildiği; ancak 22. günden sonra foliküler büyümenin arttığı ve bu durumun postpartum ovulasyona hazırlık olarak

değerlendirildiği dikkat çekmiştir. Taya ve Sasamoto (1981), laktasyonun 3. gününden 7. gününe kadar büyük foliküllerin ovaryumda bulunmadığını; ancak, 8. günden sonra büyük foliküllerin ovaryum kesitlerinde mevcut olduğunu tespit etmişlerdir. Bu çalışmada, her üç dönemde de farklı gelişim aşamalarında olan foliküller ile atretik foliküller üçlü boyama yapılan ovaryum kesitlerinde görülmüştür. Yukarıdaki çalışmalarla uyumlu olarak östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca foliküler gelişimin ve atrezi olayının dinamik bir süreç şeklinde devam ettiğini ve ovulasyonun gerçekleşebilmesi için belirli dönemlerde foliküler gelişimin arttığını söyleyebiliriz.

Isı şok proteinlerinin (HSP) proliferatif ve apoptotik mekanizmalara katılarak, ovaryumdaki foliküllerin ve korpus luteumların gelişim ve gerileme sürecinde etkin roller üstlendiği bildirilmektedir. Ayrıca, steroid hormon reseptörleri için şaperon proteinler olarak steroidogenezis olayında da görevler aldığı belirtilmiştir (Kuzkale ve Liman, 2016; Velazquez ve ark., 2010).

Foliküllerin gelişim sürecinde, hücrelerin mitoz bölünmeler geçirerek sayılarını arttırdıkları bilinmektedir (Motta ve ark., 2003; Ross ve Pawlina, 2006). Aktif protein sentezinin gerçekleştiği bu dönemde, HSP' lerin hem normal koşullar hem de stres koşulları altında çoğalma, büyüme ve farklılaşma için gerekli olan proteinlerle etkileşerek bu proteinlerin yanlış katlanmalarını ve çökmelerini engelleyerek bu süreçlere katılabildiğinden söz edilmektedir (Pechan, 1991; Velazquez ve ark., 2010). Ovaryumda foliküllerin bazıları gelişim gösterirken, bazılarının ise atreziye uğradığı (Kaipia ve Hsueh, 1997) ve HSP' lerin apoptoz olayının düzenlenmesinde farklı roller üstlenerek, atrezi sürecinde etkili olabildiği belirtilmiştir (Beere, 2004; Velazquez ve ark., 2010). HSP' lerin oositin olgunlaşma bölünmelerinin tamamlanması, canlılığı ve metabolik aktivitelerini sürdürmelerinde de önemli roller üstlenebildiği ifade edilmiştir (Lanska ve ark., 2006; Paranko ve ark., 1996).

HSP27' nin fare, insan ve sığır; HSP70' in domuz, fare, sığır ve kedi oositlerinde eksprese edildiği yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Cai ve ark., 2013; Costa ve ark., 2016; Curci ve ark., 1987; Edwards ve Hansen, 1997; Kuzkale ve Liman, 2016;

Lanska ve ark., 2006; Liu ve ark., 2010; Liu ve ark., 2013; Minqing ve ark., 2021; Pennarossa ve ark., 2012). HSP27' nin sıgır, HSP70' in insan, domuz, fare, kedi ve sıgırda foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinden ekspresyonlarının gerçekleştiği ortaya konulmuştur (Karabulut ve ark., 2020; Kuzkale ve Liman, 2016; Li ve ark., 2016; Pennarossa ve ark., 2012; Susanti ve ark., 2020; Velazquez ve ark., 2010; Velazquez ve ark., 2013). Ancak, rat ovaryumunda foliküllerin oosit, granuloza ve teka hücrelerindeki HSP27 ve HSP70' in ekspresyonlarına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu çalışmada östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca rat ovaryumundaki farklı gelişim aşamalarında olan foliküller ile atretik foliküllerin oosit, granuloza ve teka hücrelerinde HSP27 ve HSP70' in negatif immun reaksiyon gösterdiği tespit edilmiştir. Yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak ratlarda folikülogenezis sürecinde HSP27 ve HSP70' in aktif rol almadığı görülmüştür. Bu durumun da türlerin fizyolojik özelliklerinden kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Kuzkale ve Liman (2016) erişkin kedi ovaryumunda yaptıkları çalışmada, oositlerin ooplazmasındaki HSP60 immunboyanmasını primordiyal, primer ve sekonder foliküllerde büyük granüler benekler, tersiyer foliküllerde ise granüler benekler ile ince granüler boyanma şeklinde olduğunu ve HSP60' ın ooplazmadaki organellerde bulunduğunu, şaperon proteinler olarak oositin olgunlaşma sürecinde etkin roller üstlenebileceğini ifade etmişlerdir. Paronka ve ark. (1996) pubertal rat ovaryumunda farklı gelişim aşamasındaki foliküllerin oositlerinde pozitif HSP60 immun reaksiyonu görürken, en kuvvetli boyanmayı primordiyal ve büyüyen preantral foliküllerin oositlerinde tespit etmişlerdir. Bu çalışmada östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca ooplazmadaki granüler HSP60 immun reaksiyonunun, primordiyal foliküllerde kuvvetli, tek katlı primer foliküllerde orta, çok katlı primer foliküllerde zayıf şiddette olduğu görülmüştür. Sekonder ve Graaf folikülleri (tersiyer) ooplazmasında ise boyanma reaksiyonu gösteren granüle rastlanılmamıştır. Kuzkale ve Liman (2016) ile Paronka ve ark. (1996)' nın bulgularıyla uyumlu olarak, oositlerdeki HSP60 immunboyanmasının foliküler gelişimin erken dönemlerinde daha fazla olduğu ve foliküler gelişimle birlikte giderek azaldığı dikkat çekmiştir.

Velazquez ve ark. (2010) sığırlarda, foliküllerin granuloza hücrelerindeki HSP60 ekspresyonunun primer ve sekonder foliküllere kıyasla tersiyer ve atretik foliküllerde daha yoğun olduğunu; teka hücrelerindeki ekspresyonunun ise sekonder foliküllere kıyasla tersiyer ve atretik foliküllerde daha fazla olduğunu görmüşlerdir. Kuzkale ve Liman (2016) erişkin kedi ovaryumunda yaptıkları çalışmada, granuloza hücrelerindeki HSP60 immunboyanmasını primordiyal, primer ve sekonder foliküllerde orta, erken tersiyer foliküllerde kuvvetli, olgun tersiyer foliküllerde ise daha da kuvvetli olarak belirlemişlerdir. Aynı araştırmacılar, sekonder ve tersiyer foliküllerin teka hücrelerinin sitoplazmalarında az sayıda HSP60 pozitif granülleri görmüşlerdir. Paronka ve ark. (1996) ise pubertal rat ovaryumunun teka hücrelerindeki HSP60 immun reaksiyonunun, erken preantral foliküllere kıyasla antral foliküllerde daha yoğun olduğunu tespit etmişlerdir. Yukarıdaki çalışmaları değerlendirdiğimizde, farklı gelişim aşamalarında olan foliküllerin granuloza (Kuzkale ve Liman, 2016; Valezquez ve ark., 2010) ve teka (Paronka ve ark., 1996; Valezquez ve ark., 2010) hücrelerindeki HSP60 immunekspresyonunun folikülün gelişimi ile birlikte arttığı dikkati çekmiştir. Bu çalışmada östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca granuloza hücrelerindeki sitoplazmik HSP60 immun reaksiyonunun primordiyal ve tek katlı primer foliküllerde negatif, çok katlı primer ve sekonder foliküllerde orta, Graaf foliküllerinde ise kuvvetli şiddette granüler tarzda olduğu görülmüştür. Ancak, Graaf folikülünde çok sayıda negatif immun reaksiyon gösteren granuloza hücreleri de fark edilmiştir. Teka hücrelerindeki HSP60 immun reaksiyonunun çok katlı primer ve sekonder foliküllerde orta, Graaf foliküllerinde kuvvetli şiddette sitoplazmik ve granüler tarzda olduğu tespit edilmiştir. Fakat, teka folikülünün teka eksterna katmanındaki HSP60 boyanma yoğunluğunun ve immunopozitif hücrelerin teka interna katmanına göre daha az olduğu dikkati çekmiştir. Velazquez ve ark. (2010) atretik foliküllerin granuloza ve teka hücrelerindeki HSP60 ekspresyonunun güçlü olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada, atretik foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde orta şiddette HSP60 immun reaksiyonu görülmesine rağmen, immunopozitif hücrelerin farklı gelişim aşamalarında olan foliküllere kıyasla azaldığı belirlenmiştir. Çalışmamızda gelişen foliküllerdeki HSP60 immunekspresyonunun artışından dolayı, bu proteinin hücre çoğalması ve farklılaşması olaylarına katılarak folikülogenezis sürecinde etkin roller

aldığını düşünüyoruz. Ayrıca, steroid yapıdaki östrojen hormonunun sentezinde görev alan granuloza ve teka interna hücrelerindeki HSP60 immunekspresyonunun teka eksternaya kıyasla fazla görülmesi, HSP60' ın granuloza ve teka interna hücrelerinde gerçekleşen steroidogenezisde aktif görevler aldığını göstermektedir.

HSP90' ın domuz, fare ve kedi oositlerinde eksprese olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Curci ve ark., 1987; Kuzkale ve Liman, 2016; Metchat ve ark., 2009; Pennarossa ve ark., 2012). Ohsako ve ark. (1995), fetal ve prepubertal dönemdeki ratların oogonyum ve oositlerinin ooplazmasında HSP90' ın güçlü boyandığını; ancak, doğumdan sonraki ilk bir hafta boyunca primordiyal foliküllerin gelişimi ile birlikte oositlerdeki boyanma yoğunluğunun azaldığını tespit etmişlerdir. Bahsi geçen çalışmalardaki araştırmacılar, HSP90' ın oositlerden yapısal olarak eksprese edildiğini ve gelişim sürecindeki oositlerin metabolik faaliyetlerini ve canlılıklarını sürdürmesinde etkin roller üstlendiğini ifade etmişlerdir. Bu çalışmada da östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca tüm foliküllerin oositlerinin ooplazmasında zayıf şiddette HSP90 immun reaksiyonunun görülmesi bu ifadeleri destekler niteliktedir. Ohsako ve ark. (1995) yetişkin dönemdeki ratların çoğu oositinin nukleusunda negatif olan HSP90 immun reaksiyonunun, Graaf folikülünde pozitif olduğunu belirlemişlerdir. Berbers ve ark. (1988) HSP90' ın önce hücrelerin sitoplazmasında lokalize olduklarını daha sonra nukleusa translokasyonunun olabileceğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızda, diğer foliküllerin oositinin nukleusunda negatif olan HSP90 immun reaksiyonunun Graaf folikülünde zayıf pozitif olduğu belirlenerek, HSP90' ın nukleusa translokasyonunun gerçekleştiği düşünülmüştür. Bu translokasyonun neden gerçekleştiği tam anlaşılmamış olup, bu konu ile ilgili yapılacak olan çalışmalara Graaf folikülünün iyi bir model olabileceği düşünülmektedir.

Sığır, domuz, rat ve kedi ovaryumundaki foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde HSP90' ın pozitif reaksiyon verdiği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Driancourt ve ark., 1999; Juliani ve ark., 2008; Kuzkale ve Liman, 2016; Ohsako ve ark., 1995; Pennarossa ve ark., 2012; Velazquez ve ark., 2010; Velazquez ve ark., 2013). Sığır ovaryumunda, granuloza hücrelerindeki HSP90 ekspresyonunun teka

hücrelerine kıyasla daha fazla olduğu ve folikül gelişimi ile birlikte arttığı belirlenmiştir. Atretik foliküllerin ise tersiyer foliküllere benzer boyanma özelliği gösterdiği ifade edilmiştir (Velazquez ve ark., 2010). Erişkin kedi ovaryumundaki foliküllerin granuloza hücrelerinde HSP90 immun reaksiyonu; primordiyal ve primer foliküllerde zayıf sitoplazmik, sekonder ve antral foliküllerde ise orta sitoplazmik ve kuvvetli nükleer olarak görülmüştür. Foliküllerin teka hücrelerinde ise zayıf reaksiyon belirlenmiştir (Kuzkale ve Liman, 2016). Kuzkale ve Liman (2016) ve Velazquez ve ark. (2010) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda, genel olarak farklı gelişim aşamalarında olan foliküllerin granuloza hücrelerindeki HSP90 immunekspresyonunun folikül gelişimiyle arttığı ve teka hücrelerindeki immunboyanmanın granuloza hücrelerine göre daha az olduğu görülmüştür. Bu çalışmada östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca tüm foliküllerin granuloza ve teka hücrelerinde orta şiddette sitoplazmik HSP90 immun reaksiyonu belirlenmiştir. Ancak, teka eksterna katmanındaki HSP90 boyanma yoğunluğunun ve immunopozitif hücrelerin teka interna katmanına göre daha az olduğu fark edilmiştir. Ayrıca, gelişim ve gerileme sürecindeki foliküllerin granuloza ve teka hücrelerindeki HSP90 immunboyanma yoğunluğunun değişmediği görülmüştür. Bu durumun da HSP90' ın sitoplazmada yapısal olarak sentezlendiğini ve hücrelerin homeostazisinin sağlanmasında şaperon proteinler olarak folikülogenezis sürecinde rol aldığını düşündürmektedir. Granuloza ve teka internadaki HSP90 immunekspresyonunun, teka eksternaya kıyasla fazla görülmesi ise HSP90' ın da HSP60 gibi granuloza ve teka interna hücrelerinde gerçekleşen steroidogenezisde aktif görevler aldığını göstermektedir.

Poligonal şekle sahip intersitisyel hücrelerin literatür bilgiyle (Erdost, 2011; Ross ve Pawlina, 2006) uyumlu olarak, ovaryumların korteks bölgesinde topluluklar halinde bulunduğu gözlenmiştir.

Velazquez ve ark. (2010) sığır ovaryumundaki intersitisyel dokuda HSP27' nin kuvvetli, HSP60, HSP70 ve HSP90' ın ise orta şiddette immun reaksiyon sergilediğini görmüşlerdir. Kuzkale ve Liman (2016) erişkin kedi ovaryumundaki intersitisyel hücrelerde HSP60 immun reaksiyonunun kuvvetli sitoplazmik, HSP70 ve HSP90' ın

kuvvetli nükleer ve orta şiddette sitoplazmik olduğunu tespit etmişlerdir. Paronka ve ark. (1996) ise fetal dönemdeki ratların intersitisyel hücrelerinde HSP60' ın immun reaksiyonunu negatif olarak belirlemişlerdir.

İntersitisyel hücrelerin endojen ve ekzojen gonadotropinlere duyarlı olduğu ve yapılan çalışmalarda özellikle LH' ın bu hücrelerin gelişimini ve steroidojenik aktivitesini düzenlediği belirtilmiştir (Capps ve ark., 1978; Carithers, 1976; Carithers ve Green, 1972a; Carithers ve Green, 1972b; Gil ve ark., 2007). Carithers (1976) tarafından yapılan bir çalışmada, ratların hipofiz bezinin çıkarılması sonucunda intersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivitelerinin azaldığı görülmüştür. Aynı çalışmada ratlara LH uygulamasından sonra intersitisyel hücrelerin tekrar farklılaşarak, aktif steroidojenik hücre özelliklerini taşıdığı belirlenmiştir.

Lawrence ve ark. (1977) gebeliğin 4, 6, 10, 14 ve 18. günlerinde rat ovaryumundaki intersitisyel hücrelerin ince yapılarını elektron mikroskop ile incelemişlerdir. İntersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivitelerinin gebeliğin ilk yarısında yüksek olduğunu görmüşler, gebeliğin 14. gününde intersitisyel hücrelerin ince yapısında gerilemenin olduğunu ve 18. günde ise bu durumun iyice belirginleştiğini ve dolayısıyla gebeliğin ikinci yarısında steroidojenik aktivitenin azaldığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar elde ettikleri bulguları, gebelik boyunca ratlardaki serum LH seviyesinin ölçüldüğü çalışma (Morishige ve ark., 1973) ile kıyaslamışlardır. Söz konusu bu çalışmada LH seviyesinin gebeliğin ilk yarısında yüksek olduğu, 14. güne kadar düştüğü ve 18. günde ise en düşük seviyede olduğu bulunmuştur. Lawrence ve ark. (1977) gebelik döneminde intersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivite özelliklerinin gebelik döneminde ölçülen LH' daki değişikliklere benzerlik göstermesinden dolayı, intersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivitelerinin dolaşımdaki LH tarafından düzenlenebileceğini belirtmişlerdir. Bu çalışmada, HSP' lerin immunekspresyonlarının gebeliğin 5. gününde yüksek olduğu tespit edilmiştir. Gebeliğin 5. gününe kıyasla; 10. gününde azaldığı, 15 ve 20. günlerinde ise daha da azaldığı fark edilmiştir. Bu bulgu, HSP' lerin intersitisyel hücrelerdeki steroidogenezis olayında rol aldığını ve intersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivitelerine bağlı olarak immunekspresyonlarının azaldığını göstermektedir.

Yapılan literatür taramaları sonucunda, ratlarda östrus siklusu ve laktasyon dönemlerinde intersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivitelerine yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Ancak, Lawrence ve ark. (1977)'nin intersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivitelerinin dolaşımdaki LH tarafından düzenlenebileceğini belirtmesinden yola çıkılarak, östrus siklusu ve laktasyon dönemleri boyunca ratlarda LH seviyesinin ölçüldüğü çalışmalar incelenmiştir. Örneğin; Taya ve Greenwald (1982) tarafından yapılan bir çalışmada, laktasyonun 1. gününde serum LH seviyesinin pik yaptığı, 2. gününde bu seviyenin aniden düştüğü görülmüştür. 2. günden 12. güne kadar bu seviyenin düşük olduğu, 15. günden 21. güne kadar ise bazal seviyede kaldığı belirtilmiştir. Elde ettiğimiz bulgularda, gebeliğin 15 ve 20. günlerinde intersitisyel hücrelerdeki azalan HSP immunekspresyonunun laktasyonun 1. gününde tekrar arttığı görülmüştür. Laktasyonun 1. gününe kıyasla 5. günde azalan immunekspresyonun, 10 ve 20. günlerde daha da azaldığı gözlemlenmiştir. Bu durumun da laktasyonun 1. gününde pik seviyede olan LH'ın etkisi ile, intersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivite özelliklerini tekrar kazanmasına bağlı olarak, HSP'lerin immunekspresyonlarının arttığını; laktasyonun devamında LH seviyesindeki azalış ile birlikte, intersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivite özelliklerini kaybetmesinden dolayı, HSP'lerin immunekspresyonlarının azaldığını söyleyebiliriz. Bu çalışmada yine benzer şekilde, östrus siklusu döneminde intersitisyel hücrelerdeki HSP'lerin immunekspresyonlarının, metöstrus ve diöstrus dönemlerine kıyasla proöstrüs ve östrus dönemlerinde daha fazla olduğu belirlenmiştir. Butcher ve ark. (1974) tarafından yapılan bir çalışmada, proöstrus döneminde plazma LH seviyesinin pik yaptığı; östrus, metöstrüs ve diöstrüs dönemlerinde ise proöstrusa göre düşük olduğu tespit edilmiştir. Proöstrus döneminde pik seviyede olan LH etkisi ile intersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivite özelliklerini kazandıklarını, bu aktivitelerinin östrus döneminde de devam ettiğini ve LH azalışına bağlı olarak zamanla aktivitelerinin azaldığını düşünmekteyiz. Sonuç olarak; östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca HSP'lerin intersitisyel hücrelerde gerçekleşen steroidogeneziste aktif rol aldığını ve intersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivitelerine bağlı olarak immunekspresyonlarının değiştiğini söyleyebiliriz.

Yoshida ve ark. (2009) östrus siklusu döneminde, rat ovaryumundaki siklik korpus luteumları histolojik yönüyle yeni ve eski olarak tanımlamışlardır. Östrus döneminde, yeni korpus luteumların luteal hücrelerinin küçük ve mekik şeklinde olduğunu; metöstrus döneminde bu hücrelerin boyutlarının arttığını ve bazı korpus luteumların merkezlerinde içi sıvı dolu boşlukların bulunduğunu belirlemişlerdir. Diöstrus döneminde, yeni korpus luteumların boyutlarının maksimuma eriştiğini ve bir sonraki siklusun proöstrus döneminde ise apoptotik hücrelerin ortaya çıkması ile dejenere olmaya başladıklarını görmüşlerdir. Eski korpus luteumların ise tüm siklus dönemlerinde fibröz bağ doku proliferasyonuna sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Bagnell ve ark. (1987) laktasyon dönemi boyunca gebelik korpus luteumunun gerileyerek küçüldüğünü ve laktasyon korpus luteumunun ise büyüdüğünü fark etmişlerdir. Laktasyonun 1 ve 3. günü, laktasyon korpus luteumunun luteal hücre boyutlarının gebelik korpus luteumuna göre daha küçük olduğunu; laktasyonun 5 ve 9. gününde gebelik ve laktasyon korpus luteumunun luteal hücre boyutlarının ve görünüşlerinin aynı olduğunu tespit etmişlerdir. Laktasyonun 16. gününde ise luteal hücrelerin daha da büyüdüğünü belirlemişlerdir. Çalışmamızda da östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca korpus luteumların yeni ve eski diye ayrımı gerçekleştirilmiştir. Yeni korpus luteumların ayrımında, korpus luteumun ve luteal hücre boyutlarının zamanla artması ve içi sıvı dolu boşlukların bulunuşu; eski korpus luteumlarda ise fibrosit benzeri hücreler ile apoptotik hücrelerin gözlenmesi ve gerilemeyle birlikte boyutlarının küçülmesi gibi özellikler dikkate alınmıştır.

Sağlıklı rat ovaryumunda HSP' lerin korpus luteumlardaki ekspresyonları ile ilgili çalışmaların çok az olduğu; bu çalışmaların da yetişkin dönem rat ovaryumu ile sınırlı kaldığı ve korpus luteumların ayrımına (gelişimi ve gerilemesi) gidilmeden değerlendirildiği görülmüştür. Söz konusu bu çalışmalarda korpus luteumlardaki HSP60 immün reaksiyonu kuvvetli (Paronko ve ark., 1996), HSP90 immün reaksiyonu ise negatif (Ohsako ve ark., 1995) olarak değerlendirilmiştir. Sığır ovaryumunda, HSP27, HSP70 ve HSP90' ın korpus luteumlarda kuvvetli, korpus albikansta orta şiddette; HSP60' ın korpus luteumlarda orta, korpus albikansta zayıf şiddette immün reaksiyon verdiği gözlenmiştir (Velazquez ve ark., 2010). Kuzkale ve Liman (2016) ise erişkin kedi ovaryumunda korpus luteumlardaki HSP60, HSP70 ve HSP90' ın

immunohistokimyasal ekspresyonlarını erken, orta ve geç luteal fazda değerlendirmişlerdir. Araştırmacılar, erken luteal evrede kuvvetli olan HSP immun boyanma yoğunluğunun, orta luteal fazdan geç luteal faza kadar değişmediğini; ancak, luteal hücre yapısındaki değişikliklerle birlikte sitoplazmadaki boyanmanın azaldığını ifade etmişlerdir (Kuzkale ve Liman, 2016).

Kuzkale ve Liman (2016) ile Velazquez ve ark. (2010) korpus luteumun gerilemesi ile birlikte HSP' lerin immun reaksiyonlarının azaldığını belirlemiş olsalar da; yapılan başka çalışmalarda (Khanna ve ark., 1995; McPherson ve ark., 1993; Murdoch, 1995; Narayansingh ve ark., 2004), korpus luteumun gerileme sürecinde etkin rol alan $PGF_{2\alpha}$ salgısı ile HSP' lerin ekspresyonlarının indüklendiği de belirtilmiştir. Khanna ve ark. (1995) ratlara $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonu gerçekleştirmişler ve uygulamadan 1 saat sonra serum progesteron seviyesinin düşmesi ile birlikte HSP70' in indüksiyonunun gerçekleştiğini görmüşlerdir. Koyunlarda yapılan in vivo bir çalışmada, McPherson ve ark. (1993) $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonundan 4 saat sonra progesteron hormon seviyesinin azaldığını belirlemişlerdir. 2 saat sonra ise luteal hücrelerdeki HSP70 reaktivite yoğunluğunun ve sayısının arttığını; ancak, yapısal regresyon ile birlikte reaktivitenin zamanla azaldığını tespit etmişlerdir. Yine benzer başka bir çalışmada, Murdoch (1995) koyunlarda $PGF_{2\alpha}$ enjeksiyonundan sonra progesteron hormon seviyesinin hızla azaldığını, 2 saat sonra ise luteal hücrelerdeki HSP70 ekspresyonunun arttığını; ancak, 4 ve 16. saatlerde ekspresyonun azaldığını tespit etmiştir.

Bu çalışmadaki tüm gruplarda yeni korpus luteumların luteal hücrelerinde negatif HSP70 immun reaksiyonu görülürken; östrus siklusu ve gebelik dönemlerinde yeni korpus luteumların şekillenmesiyle birlikte, eski korpus luteumların luteal hücrelerinde HSP70' in indüklendiği görülmüştür. Östrus döneminde ve gebeliğin 5. günündeki eski korpus luteumların luteal hücrelerindeki HSP70 immunekspresyonunun fazla olduğu; östrus siklusunun ve gebeliğin ilerlemesiyle birlikte, eski korpus luteumların gerilemesine bağlı olarak HSP70 immunekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Ancak laktasyon döneminde yeni laktasyon korpus luteumlarının şekillenmesiyle birlikte, eski gebelik korpus

luteumlarının luteal hücrelerinde HSP70' in indüklenmediği; negatif reaksiyon gösteren luteal hücreler arasında tek tük zayıf şiddette HSP70 immün reaksiyon veren luteal hücreler olduğu belirlenmiştir. Ratlarda korpus luteumun gerilemesinin, progesteron hormonunun azalmasına bağlı olarak, önce fonksiyonel daha sonra yapısal gerileme şeklinde meydana geldiği (Accialini ve ark., 2017); gebelik döneminden kalan eski gebelik korpus luteumunun erken laktasyon dönemi boyunca steroidojenik olarak fonksiyonel olduğu ve progesteron hormonunu üretmeye devam ettiği ifade edilmiştir (Bagnell ve ark., 1987). Bu bilgiler doğrultusunda laktasyon döneminde, eski gebelik korpus luteumun hala steroidojenik fonksiyonel özelliğini kaybetmemesi nedeniyle HSP70' in indüksiyonunun gerçekleşmediği düşünülmektedir. Elde ettiğimiz bulgular ve yukarıdaki literatür bilgileri ile birlikte luteal hücrelerin steroidojenik fonksiyonunu kaybetmesiyle hücresel strese karşı HSP70' in indüklenerek immünekspresyonunun arttığını; daha sonra ise luteal gerilemeyle birlikte immünekspresyonun zamanla azaldığını ve HSP70' in luteal regresyonun önemli bir mediatörü olduğunu söyleyebiliriz.

Bu çalışmada östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca HSP27' nin yeni korpus luteumların luteal hücrelerinde negatif, eski korpus luteumların luteal hücrelerinde negatif, zayıf, orta ve kuvvetli şiddette sitoplazmik immün reaksiyon sergilediği tespit edilmiştir. Eski korpus luteumların gerilemesiyle birlikte luteal hücrelerdeki HSP27 immün reaksiyonunun değişmediği gözlenmiştir. Tüm çalışma gruplarında, HSP60' ın hem yeni hem de eski korpus luteumların luteal hücrelerinde kuvvetli şiddette sitoplazmik ve granüler tarzda immün reaksiyon gösterdiği belirlenmiştir. Eski korpus luteumların gerilemesiyle birlikte, HSP60' ın luteal hücrelerdeki immün reaksiyonunun değişmediği görülmüştür. Eski korpus luteumların luteal hücrelerindeki HSP60 granül yoğunluğunun yeni korpus luteumlara kıyasla azaldığı fark edilmiştir. HSP90' ın ise yeni ve eski korpus luteumların luteal hücrelerinde orta şiddette sitoplazmik immün reaksiyon verdiği belirlenmiş olup, eski korpus luteumların gerilemesi ile birlikte immün reaksiyonun değişmediği gözlenmiştir. HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90' ın eski korpus luteumların luteal hücrelerinde farklı özelliklerde pozitif immün reaksiyon göstermesi, bunların farklı fizyolojik görevler üstlenerek luteal gerilemede etkin roller aldığını ve bu konu ile

ilgili daha ayrıntılı çalışmaların yapılması gerektiğini düşündürmüştür. Ayrıca, HSP27 ve HSP70' in yeni korpus luteumların aksine eski korpus luteumların luteal hücrelerinde immunopozitiflik göstermesi nedeniyle, ratlarda eski korpus luteumların belirlenmesinde HSP27 ve HSP70' in önemli bir marker olarak kullanılabileceğini söyleyebiliriz.

Ovulasyona uğrayan folikülün teka interna ve granuloza hücrelerinden şekillenen korpus luteumun, progesteron hormonunun sentezi ve salgılanmasında görevler aldığı bildirilmiştir (Abdulrahman ve Fair, 2019; Stocco ve ark., 2007). Steroid yapıdaki progesteron hormonunun sentezi oldukça kompleks bir yolak olup, bu hormonların sentezinde gerek duyulan ilk temel madde kolesteroldür (Kabakçı ve Yiğit, 2019). Kolesterol, hücre iskeleti elemanları ve sterol taşıyıcı proteinler aracılığıyla mitokondriye taşınmaktadır. Mitokondrinin dış membranından iç membranına geçen kolesterol, daha sonra sitokrom P450_{SCC} enzimi ile pregnanolona dönüştürülmektedir. En son olarak da granülsüz endoplazmik retikulumda, 3 β -hidroksisteroid dehidrojenaz, D5, D4 izomeraz (3 β -HSD) enzimleri ile progesterona çevrilmektedir (Tomic ve ark., 2011). Korpus luteumda gerçekleşen steroidogenezis olayında HSP' lerin fizyolojik rolüne yönelik çalışma olmamasına rağmen, Olvera-Sanchez ve ark. (2011) tarafından yapılan bir çalışmada insan plasentadaki HSP60' ın kolesterolün taşınmasında, progesteronun sinsityotrofoblastlardan maternal kana gönderilmesinde ve plasental steroidogeneziste görev aldığı ifade edilmiştir. Bu çalışmada östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca progesteron hormonunun sentezlenmesinde aktif rol alan yeni korpus luteumların luteal hücrelerinde HSP27 ve HSP70' in negatif, HSP60' ın kuvvetli ve HSP90' ın ise orta şiddette sitoplazmik immun reaksiyon gösterdiği belirlenmiş olup; yeni korpus luteumların gelişimsel sürecinde HSP60 ve HSP90 immun reaksiyonunun değişmediği tespit edilmiştir. Elde edilen bulgular sonucunda HSP60 ve HSP90' ın yeni korpus luteumların luteal hücrelerinden yapısal olarak sentezlendiğini ve korpus luteumların şekillenmesinde, büyümesinde ve steroidogenezis olayında şaperon proteinler olarak görevler alabileceğini söyleyebiliriz.

Ratlarda östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca foliküllerde ve yeni korpus luteumlarda HSP27 ve HSP70' in negatif, HSP60 ve HSP90' ın pozitif immun reaksiyonlarının görülmesi; HSP60 ve HSP90' nın oogenezis, folikülogenezis, foliküler atrezi ve luteal gelişim ile granuloza, teka interna ve luteal hücrelerdeki steroidogeneziste önemli görevler aldığını düşündürmüştür. Tüm çalışma gruplarındaki eski korpus luteumlarda ve intersitisyel hücrelerde HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90' ın pozitif immun reaksiyonlarının belirlenmesi nedeni ile bu proteinlerin luteal gerilemede ve intersitisyel hücrelerdeki steroidogeneziste etkin roller üstlendiği söylenebilir.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca foliküler gelişim ve gerilemenin dinamik bir şekilde devam ettiği ve bu süreçlerde farklı gelişim aşamalarında olan foliküller ile atretik foliküllerin oosit, granuloza ve teka hücrelerinde HSP27 ve HSP70' in negatif, HSP60 ve HSP90' ın ise sitoplazmik immun reaksiyonları belirlenmiştir. Oositlerin gelişim sürecinde HSP60 immunekspresyonunun azaldığı, HSP90 immunekspresyonunun ise değişmediği tespit edilmiştir. Granuloza ve teka folikülü hücrelerindeki HSP60 immunekspresyonunun foliküler gelişimle arttığı, atreziyle azaldığı belirlenirken; HSP90 immunekspresyonunun foliküler gelişim ve atrezi sürecinde değişmediği fark edilmiştir. Teka internadaki HSP60 ve HSP90 immunekspresyonunun teka eksternaya göre daha fazla olduğu ayırt edilmiştir. Bu bulgular, HSP27 ve HSP70' in aksine HSP60 ve HSP90' ın oogenezis, folikülogenezis, foliküler atrezi süreçlerinde, granuloza ve teka internadaki steroidogeneziste etkin roller aldığını düşündürmektedir.

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca intersitisyel hücrelerde HSP27, HSP60 ve HSP90' ın sitoplazmik, HSP70' in sitoplazmik ve nükleer immun reaksiyonları gözlenmiştir. İntersitisyel hücrelerin steroidojenik aktivitelerinin artmasıyla, HSP' lerin immunekspresyonlarının arttığı; steroidojenik aktivitelerinin azalması ile birlikte immunekspresyonlarının azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, HSP' lerin intersitisyel hücrelerde gerçekleşen steroidogeneziste aktif görevler üstlendiğini göstermektedir.

Östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemlerindeki yeni korpus luteumların luteal hücrelerinde HSP27 ve HSP70' in negatif, HSP60 ve HSP90' ın ise sitoplazmik immun reaksiyonları tespit edilmiştir. Luteal gelişim sürecinde HSP60 ve HSP90' ın immunekspresyonunun değişmediği fark edilmiştir. Eski korpus luteumların luteal hücrelerinde ise HSP27, HSP60 ve HSP90' ın sitoplazmik, HSP70' in sitoplazmik ve nükleer immun reaksiyonları görülmüştür. Luteal gerileme sürecinde östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemlerinde HSP27, HSP60 ve HSP90' ın

immunekspresyonlarının değişmediği belirlenirken; östrus siklusu ve gebelik döneminde HSP70' in indüklendiği, luteal gerileme ile birlikte immunekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir. Bu bulgular sonucunda yeni korpus luteumların oluşum, gelişim ve steroidogenezis sürecinde HSP27 ve HSP70' in aksine HSP60 ve HSP90' ın; luteal gerileme sürecinde ise HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90' ın etkin rollere sahip olabileceği düşünölebilir. Ayrıca, eski korpus luteumların belirlenmesinde HSP27 ve HSP70' in önemli bir marker olarak kullanılabileceği söylenebilir.

Özet olarak ratlarda östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca HSP60 ve HSP90' ın oogenezis, folikölogenezis, foliköler atrezi, luteal gelişim ile granuloza, teka interna ve luteal hücrelerdeki steroidogenezis süreçlerinde; HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90' ın luteal gerileme ve intersitisyel hücrelerdeki steroidogeneziste etkin rollere sahip olabileceği görüşündeyiz. Bu çalışmanın, ısı şok proteinlerinin bahsedilen süreçlerdeki rollerinin diğer hayvanlarda da araştırıldığı çalışmalar için uygun bir model olacağını ve elde ettiğimiz verilerin ovaryumda bu proteinler ile ilgili yapılacak olan histolojik, fizyolojik ve patolojik çalışmalara ışık tutacağını düşünmekteyiz.

ÖZET

Rat Ovaryumunda Östrus Siklusu, Gebelik ve Laktasyon Dönemlerinde Isı Şok Proteinlerinin (HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90) İmmunohistokimyasal Lokalizasyonları ve Dağılımları

Bu araştırma, rat ovaryumunda östrus siklusu, gebelik ve laktasyon dönemleri boyunca HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90' ın immunohistokimyasal lokalizasyon ve dağılımları değerlendirilerek, bu proteinlerin oogenezis, folikülogenezis, foliküler atrezi, steroidogenezis, luteal gelişim ve gerilemedeki rollerinin ortaya konulması amacıyla yapıldı.

Araştırmada her grupta 6 adet olacak şekilde toplam 72 adet 6-8 haftalık *Sprague Dawley* ırkı dişi rat materyal olarak kullanıldı. Östrus siklusu (proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus evreleri), gebelik (5, 10, 15 ve 20. günler) ve laktasyon (1, 5, 10 ve 20. günler) dönemlerindeki ratlardan alınan ovaryum dokuları rutin histolojik takip yöntemi uygulandıktan sonra parafleste bloklandılar. Doku bloklarından alınan seri kesitlerin bir kısmına genel histolojik incelemeler için Mallory' nin üçlü boyaması ve diğer kısmına ise HSP27, HSP60, HSP70 ve HSP90 antikorları ile immunohistokimyasal boyama işlemi uygulandı.

Tüm çalışma gruplarında bütün foliküllerin oosit, granuloza ve teka hücrelerinde HSP27 ve HSP70' in negatif immun reaksiyonu tespit edildi. Bütün çalışma gruplarında ooplazmadaki HSP60 immunekspresyonunun oositin büyümesi ile birlikte azaldığı görüldü. HSP60' ın primordiyal ve tek katlı primer foliküllerin folikül epitel hücrelerinde negatif; çok katlı primer, sekonder ve Graaf foliküllerinin granuloza ve teka hücrelerinde sitoplazmik immun reaksiyonu gözlemlendi. Granuloza ve teka hücrelerindeki HSP60 immunekspresyonunun folikülün gelişimi ile arttığı, atreziye uğramasıyla birlikte azaldığı fark edildi. Çalışma gruplarının hepsinde HSP90' ın bütün foliküllerin oosit, granuloza ve teka hücrelerindeki sitoplazmik immunekspresyonunun foliküllerin gelişim ve atrezi sürecinde değişmediği belirlendi. Teka internadaki HSP60 ve HSP90 immunekspresyonunun teka eksternaya göre daha fazla olduğu ayırt edildi.

Tüm çalışma gruplarında intersitisyel hücrelerde HSP27, HSP60 ve HSP90' ın sitoplazmik, HSP70' in ise sitoplazmik ve nükleer immun reaksiyonları tespit edildi. İntersitisyel hücrelerdeki HSP' lerin immunekspresyonlarının proöstrüs ve östrus dönemlerinde, metöstrus ve diöstrus dönemlerine göre fazla olduğu gözlemlendi. Gebelik döneminde HSP' lerin intersitisyel hücrelerdeki immunekspresyonlarının gebeliğin 5. gününe kıyasla 10. gününde azaldığı, 15 ve 20. günlerinde ise daha da azaldığı belirlendi. Gebeliğin 15 ve 20. günlerinde intersitisyel hücrelerdeki azalan HSP immunekspresyonunun laktasyonun 1. gününde arttığı görüldü. Artan immunekspresyonun laktasyonun 1. gününe kıyasla 5. gününde azaldığı, 10 ve 20. günlerde daha da azaldığı gözlemlendi.

Bütün çalışma gruplarında yeni korpus luteumların luteal hücrelerinde HSP27 ve HSP70' in negatif, HSP60 ve HSP90' ın ise sitoplazmik immun reaksiyonu görüldü. Luteal gelişim sürecinde HSP60 ve HSP90' ın immunekspresyonunun değişmediği fark edildi. Çalışma gruplarının hepsinde eski korpus luteumların luteal hücrelerinde HSP27, HSP60 ve HSP90' ın sitoplazmik, HSP70' in ise sitoplazmik ve nükleer immun reaksiyonu tespit edildi. Luteal gerileme sürecinde HSP27, HSP60 ve HSP90' ın immunekspresyonunun değişmediği

belirlendi. Ancak, östrus siklusu ve gebelik döneminde eski korpus luteumların luteal hücrelerinde HSP70' in indüklendiği ve immunekspresyonunun luteal gerilemeyle birlikte azaldığı belirlendi. Laktasyon dönemde ise eski korpus luteumların luteal hücrelerinde HSP70' in indüklenmediği ve immunekspresyonunun östrus siklusu ve gebelik dönemine kıyasla oldukça zayıf olduğu fark edildi.

Anahtar Sözcükler: Gebelik, Isı Şok Proteinleri, Laktasyon, Ovaryum, Östrus Siklusu.



SUMMARY

Immunohistochemical Localizations and Distributions of Heat Shock Proteins (HSP27, HSP60, HSP70 and HSP90) in Oestrous Cycle, Pregnancy and Lactation Periods in Rat Ovary

This study was carried out to evaluate the immunohistochemical localization and distribution of HSP27, HSP60, HSP70 and HSP90 during the oestrous cycle, pregnancy and lactation periods in rat ovary, and to reveal the roles of these proteins in oogenesis, folliculogenesis, steroidogenesis, luteal development and regression.

In the study, a total of 72, 6-8 weeks old *Sprague Dawley* female rats, 6 in each group, were used as material. Ovarian tissues taken from rats in the oestrous cycle (phases of proestrous, estrous, metestrous, diestrous) pregnancy (5th, 10th, 15th and 20th days) and lactation (1st, 5th, 10th and 20th days) periods were blocked in the paraplast after routine histological process was applied. Mallory's triple staining was applied to some of the serial sections taken from the tissue blocks for general histological examinations, and immunohistochemical staining with HSP27, HSP60, HSP70 and HSP90 antibodies was applied to the other part.

Negative immuno reaction of HSP27 and HSP70 was detected in oocyte, granulosa and theca cells of all follicles in all study groups. In all study groups, it was seen that HSP60 immunoexpression in the ooplasm decreased with the growth of the oocyte. It was observed that HSP60 immuno reaction was negative in the follicular epithelial cells of primordial and unilaminar primary follicles, and cytoplasmic in the granulosa and theca cells of multilaminar primary, secondary and Graafian follicles. It was noticed that the HSP60 immunoexpression in granulosa and theca cells increased with the development of the follicle and decreased with the atresia. It was determined that HSP90 cytoplasmic immunoexpression in oocyte, granulosa and theca cells of all follicles in all study groups did not change in the process of development and atresia of the follicles. It was distinguished that HSP60 and HSP90 immunoexpression in the theca interna was higher than in the theca externa.

It was detected that HSP27, HSP60 and HSP90 were cytoplasmic, while HSP70 was nuclear and cytoplasmic immuno reactions in the interstitial cells in all study groups. It was observed that immunoexpressions of HSPs in interstitial cells were higher in proestrous and estrous periods compared to metestrous and diestrous periods. The immunoexpression of HSPs in interstitial cells during pregnancy was found to be lower on the 10th day of pregnancy compared to the 5th day, and much lower on the 15th and 20th days. It was observed that the decreased HSPs immunoexpression in interstitial cells on days 15 and 20 of pregnancy increased on the 1st day of lactation. Increased immunoexpression decreased on the 5th day of lactation compared to the 1st day, and then even further on the 10th and 20th days.

It was observed that HSP27 and HSP70 were negative, while HSP60 and HSP90 were cytoplasmic immuno reaction in the luteal cells of the new corpus luteum in all study groups. It was noticed that the immunoexpression of HSP60 and HSP90 did not change during the luteal development process. It was detected that HSP27, HSP60 and HSP90 were cytoplasmic, while HSP70 was nuclear and cytoplasmic immuno reaction in luteal cells of old corpus luteum in all study groups. It was determined that the immunoexpression of HSP27, HSP60

and HSP90 did not change during the luteal regression process. However, it was determined that HSP70 was induced in the luteal cells of the old corpus luteum during the oestrous cycle and pregnancy, and the immunoexpression decreased with luteal regression. In the lactation period, it was noticed that HSP70 was not induced in the luteal cells of the old corpus luteum and its immunoexpression was quite weak compared to the oestrous cycle and pregnancy period.

Keywords: Heat Shock Proteins, Lactation, Oestrous Cycles, Ovary, Pregnancy.



KAYNAKLAR

- ABDULRAHMAN N, FAIR T (2019). Contribution of the immune system to follicle differentiation, ovulation and early corpus luteum formation. *Anim Reprod*, **16**(3): 440-448.
- ACCIALINI P, HERNANDEZ SF, ABRAMOVICH D, TESONE M (2017). The Rodent Corpus Luteum. In: *The Life Cycle of the Corpus Luteum*, Ed: MEIDAN R. Springer, Switzerland. p: 117-125.
- ADHIKARI D, LIU K (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*, **30**(5): 438-464.
- AJAYI AF, AKHIGBE RE (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice*, **6**(5): 1-15.
- AL-MEHDI MIA (1979). Fine structure and origin of interstitial tissue in the ovary of the pregnant rat. *Acta Anat*, **103**: 245-251.
- AŞKAR TK, ERGÜN N, TURUNÇ V (2007). Isı şok proteinler ve fizyolojik rolleri. *Kafkas Üniv Vet Fak Derg*, **13**(1): 109-114.
- BAGNELL CA, MCMURTRY JP, BAKER NK, TIMTIM JK, BRYANT-GREENWOOD GD (1987). Detection of relaxin by immunohistochemistry in the corpus luteum during lactation. *Biology of Reproduction*, **37**: 1317-1325.
- BAHADIR A, YILDIZ H (2012). Veteriner Anatomi. 4. Baskı. Ezgi Kitapevi, Bursa. s: 323.
- BANCROFT JD, GAMBLE M (2002). Theory and Practice of Histological Techniques. 5nd Ed. Churchill Livingstone, China. p: 75-153.
- BARBER HRK (1988). Embryology of the gonad with reference to special tumors of the ovary and testis. *Journal of Pediatric Surgery*, **23**(10): 967-972.
- BASUINO L, SILVEIRA CF (2016). Human follicular fluid and effects on reproduction. *JBRA Assisted Reproduction*, **20**(1): 38-40.
- BAYKAL Y, GÖK F, KOCABALKAN F (2000). Isı şok proteinleri ve hastalıklardaki rolü. *T Klin J Med Sci*, **20**:187-195.
- BEERE HM (2004). The stress of dying: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *Journal of Cell Science*, **117**(13): 2641-2651.
- BEERE HM, GREEN DR (2001). Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis. *Trends in Cell Biology*, **11**(1): 6-10.
- BENER L, YAŞAR R, KURAN M (2018). Isı şok proteinleri ve in vitro embriyo. *Black Sea Journal of Agriculture*, **1**(3): 89-93.

- BERBERS GAM, KUNNEN R, VAN BERGEN EN, HENEGOUWEN PMP, VAN WIJK R (1988). Localization and quantitation of HSP84 in mammalian cells. *Experimental Cell Research*, **177**: 257-271.
- BUTCHER RL, COLLINS WE, FUGO NW (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endo*, **94**(6): 1704-1708.
- CAI L, MA X, LIU S, LIU J, WANG W, CUI Y, DING W, MAO Y, CHEN H, HUANG J, ZHOU Z, LIU J (2013). Effects of upregulation of HSP27 expression on oocyte development and maturation derived from polycystic ovary syndrome. *Plos One*, **8**(12): e83402.
- CAPPS ML, LAWRENCE IE, BURDEN HW (1978). Ultrastructure of the cells of the ovarian interstitial gland in hypophysectomized rats. The effects of stimulation of the ovarian plexus and of denervation. *Cell Tissue Res*, **193**: 433-442.
- CARITHERS JR (1976). Ultrastructure of rat ovarian interstitial cells. III. Response to luteinizing hormone. *J Ultrastructure Research*, **55**: 96-104.
- CARITHERS JR, GREEN JA (1972a). Ultrastructure of rat ovarian interstitial cells. I. Normal structure and regressive changes following hypophysectomy. *J Ultrastructure Research*, **39**: 239-250.
- CARITHERS JR, GREEN JA (1972b). Ultrastructure of rat ovarian interstitial cells. II. Response to gonadotropin. *J Ultrastructure Research*, **39**: 251-261.
- CLEMENT PB (1987). Histology of the ovary. *The American Journal of Surgical Pathology*. **11**(4): 277-303.
- CONCANNON CG, GORMAN AM, SAMALI A (2003). On the role of HSP27 in regulating apoptosis. *Apoptosis*, **8**(1): 61-70.
- CORA MC, KOOISTRA L, TRAVLOS G (2015). Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic Pathology*, **43**: 776-793.
- COSTA NN, BRITO KNL, SANTANA PPB, CORDEIRO MS, SILVA TVG, SANTOS AX, RAMOS PC, SANTOS SSD, KING WA, MIRANDA MS, OHASHI OM (2016). Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. *Theriogenology*, **85**: 323-329.
- CROSSMON G (1937). A modification of Mallory's connective tissue stain with a discussion of the principles involved. *Anat Rec*, **69**: 33-38.
- CURCI A, BEVILACQUA A, MANGIA F (1987). Lack of heat-shock response in preovulatory mouse oocytes. *Developmental Biology*, **123**(1): 154-160.
- ÇOBAN ZD, GÜRAN Ş, ALTAYLI E, KAYIR H, BAYKAL B (2016). Farede östrus siklusu tayininde hızlı, kolay ve etkin bir yöntem. *Gülhane Tıp Derg*, **58**: 82-87.

- DRIANCOURT MA, GUET P, REYNAUD K, CHADLI A, CATELLI MG (1999). Presence of an aromatase inhibitor, possibly heat shock protein 90, in dominant follicles of cattle. *Journal of Reproduction and Fertility*, **115**: 45-58.
- DURSUN N (2006). Veteriner Anatomi II. 10. Baskı. Medisan, Ankara. s: 161-162.
- EDWARDS JL, HANSEN PJ (1997). Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol Reprod Dev*, **46**: 138-145.
- EKİZCELİ G, İNAN S, ÖKTEM G, ONUR E, ÖZBİLGİN K (2015). Sıçanlarda östrus döngüsü ile ilişkili ovaryum ve uterusların histolojik değerlendirmesi. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, **41**(2): 65-72.
- EPPIG JJ (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, **122**: 829-838.
- EPPIG JJ, O'BRIEN MJ (1996). Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*, **54**: 197-207.
- ERDOST H (2011). Dişi Genital Sistem. In: *Veteriner Özel Histoloji*, Ed: ÖZER A. 3. Baskı. Nobel Akademik Yayıncılık Eğitim Danışmanlık Tic Ltd Şti, Ankara. s: 219-231.
- ERKOÇAK A (1984). Özel Histoloji. 5. Baskı. Refko, İzmir. s: 191-198.
- FORTUNE JE, CUSHMAN RA, WAHL CM, KITO S (2000). The primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **163**: 53-60.
- GARRIDO C, SCHMITT E, CANDE C, VAHSEN N, PARCELLIER A, KROEMER G (2003). HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle*, **2**(6): 579-584.
- GEDİKLİ S, ÖZBEK E, DEMİRCİ T (2013). Fertilizasyonun moleküler temeli. *Van Tıp Dergisi*, **20**(4): 294-301.
- GIL E, FORNERIS M, DOMINGUEZ S, PENISSI A, FOGAL T, PIEZZI RS, SCARDAPANE L (2007). Morphological and endocrine study of the ovarian interstitial tissue of viscacha (*Lagostomus maximus maximus*). *The Anatomical Record*, **290**: 788-794.
- GOLOS TG, WEYHENMEYER JA, SHERWOOD OD (1984). Immunocytochemical localization of relaxin in the ovaries of pregnant rats. *Biology of Reproduction*, **30**: 257-261.
- GOYENECHE AA, DEIS RP, GIBORI G, TELLERIA CM (2003). Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors. *Biology of Reproduction*, **68**: 151-158.
- GREENWALD GS (1966). Ovarian follicular development and pituitary FSH and LH content in the pregnant rat. *Endocrinology*, **79**: 572-578.
- GURAYA SS (1973). Interstitial gland tissue of mammalian ovary. *Acta Endocrin*, **171**: 1-27.

- HABICH C, BURKART V (2007). Heat shock protein 60: regulatory role on innate immune cells. *Cell Mol Life Sci*, **64**: 742-751.
- HALICIOGLU BS, SAADAT KASM, TUĞLU MI (2021). The relationship of 4-vinylcyclohexene diepoxide toxicity with cell death, oxidative stress, and gap junctions in female rat ovaries. *Reprod Med Biol*, **00**: 1-11.
- HAMID HY, ZAKARIA MZAB (2013). Reproductive characteristics of the female laboratory rat. *Afr J Biotechnol*, **12**(19): 2510-2514.
- HASSA O, AŞTI RN (2003). Embriyoloji. Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd Şti, Ankara. s: 13-133.
- HASSAN F, NAWAZ A, REHMAN MS, ALI MA, DILSHAD SMR, YANG C (2019). Prospects of HSP70 as a genetic marker for thermo-tolerance and immuno-modulation in animals under climate change scenario. *Animal Nutrition*, **5**: 340-350.
- HIRSHFIELD AN (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, **124**: 43-101.
- HSUEH AJW, KAWAMURA K, CHENG Y, FAUSER BCJM (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, **36**(1): 1-24.
- HUBSCHER CH, BROOKS DL, JOHNSON JR (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry*, **80**(2): 79-87.
- HUSSEIN MR (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, **11**(2): 162-178.
- IWAMA GK, THOMAS PT, FORSYTH RB, VIJAYAN MM (1998). Heat shock protein expression in fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **8**: 35-56.
- JAVID B, MACARY PA, LEHNER PJ (2007). Structure and function: heat shock proteins and adaptive immunity. *J Immunol*, **179**: 2035-2040.
- JULIANI CC, SILVA-ZACARIN ECM, SANTOS DC, BOER PA (2008). Effects of atrazine on female wistar rats: morphological alterations in ovarian follicles and immunocytochemical labeling of 90 kda heat shock protein. *Micron*, **39**: 607-616.
- JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J (2005). Basic Histology Text & Atlas. 11nd Ed. McGraw Hill, USA. p: 439.
- JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J, KELLEY RO (1998). Basic Histology. 9nd Ed. Appleton & Lange, USA. p: 421-426.
- KABAKÇI R, YİĞİT AA (2019). İneklerde luteal progesteron biyosentezi ve moleküler kontrol mekanizması. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, **10**(3): 125-134.
- KAIPIA A, HSUEH AJW (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. *Annu Rev Physiol*, **59**: 349-363.

- KARABULUT S, KORKMAZ O, KUTLU P, GOZEL HE, KESKİN I (2020). Effects of follicular fluid oxidative status on human mural granulosa cells, oocyte competency and ICSI parameters. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **252**: 127-136.
- KHANNA A, ATEN RF, BEHRMAN HR (1995). Heat shock protein-70 induction mediates luteal regression in the rat. *Mol Endo*, **9**(11): 1431-1440.
- KIANG JG, TSOKOS GC (1998). Heat shock protein 70 kda: molecular biology, biochemistry and physiology. *Pharmacol Ther*, **80**(2): 183-201.
- KIERSZENBAUM AL (2006). Folikül Gelişimi ve Menstrual Döngü (Siklus). In: *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*, Ed: DEMİR R. Palme Yayınları, Ankara. s: 572-573.
- KREGEL KC (2002). Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol*, **92**: 2177-2186.
- KUYUCU Y, TAP Ö (2009). Oosit olgunlaşma süreci ve düzenleyici faktörler. *Arşiv*, **18**(4): 227-240.
- KUZKALE M, LİMAN N (2016). Erişkin kedi ovaryumunda foliküler ve luteal gelişim sırasında ısı şok proteinlerinin (HSP60, HSP70, HSP90, HSP105/110) immunekspresyonları. (Doktora Tezi, Erciyes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı).
- LANSKA V, CHMELIKOVA E, SEDMIKOVA M, JAROSLAV P, RAJMON R, JESETA M, ROZINEK J (2006). Expression of heat shock protein70 in pig oocytes: heat shock response during oocyte growth. *Animal Reproduction Science*, **96**: 154-164.
- LAWRENCE IE, BURDEN JHW, CAPPS ML (1977). Ultrastructure of rat ovarian interstitial gland cells during pregnancy. *Cell Tiss Res*, **184**: 143-154.
- LI J, BUCHNER J (2013). Structure, function and regulation of the HSP90 machinery. *Biomed J*, **36**: 106-117.
- LI J, GAO H, TIAN Z, WU Y, WANG Y, FANG Y, LIN L, HAN Y, WU S, HAQ I, ZENG S (2016). Effects of chronic heat stress on granulosa cell apoptosis and follicular atresia in mouse ovary. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **7**(57): 1-10.
- LIU JJ, MA X, CAI LB, CUI YG, LIU JY (2010). Downregulation of both gene expression and activity of HSP27 improved maturation of mouse oocyte in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, **8**(47): 1-12.
- LIU S, DAI X, CAI L, MA X, LIU J, JIANG S, LIU J, CUI Y (2013). Effect of HSP27 on early embryonic development in the mouse. *Reproductive Biomedicine Online*, **26**: 491-499.
- LİMAN N (2017). Heat shock proteins (HSP)-60, -70, -90, and 105 display variable spatial and temporal immunolocalization patterns in the involuting rat uterus. *Anim Reprod*, **14**(4): 1072-1086.
- LOHMILLER JJ, SWING SP (2006). Reproduction and Breeding. In: *The Laboratory Rat*, Ed: SUCKOW MA, WEISBROTH SH, FRANKLIN CL. 2nd Ed. Elsevier. p: 148-153.

- LU RC, TAN MS, WANG H, XIE AM, YU JT, TAN L (2014). Heat shock protein 70 in alzheimer's disease. *BioMed Research International*, **2014**: 1-8.
- MAGOFFIN DA (2005). Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, **37**(7): 1344-1349.
- MAYER MP, BUKAU B (2005). HSP70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, **62**: 670-684.
- MCPHERSON LA, VAN KIRK EA, MURDOCH WJ (1993). Localization of stress protein-70 in ovine corpora lutea during prostaglandin-induced luteolysis. *Prostaglandins*, **46**: 433-440.
- METCHAT A, AKERFELT M, BIERKAMP C, DELSINNE V, SISTONEN L, ALEXANDRE H, CHRISTIANS ES (2009). Mammalian heat shock factor 1 is essential for oocyte meiosis and directly regulates HSP90 α expression. *Journal of Biological Chemistry*, **284**(14): 9521-9528.
- MINQING L, HONGHONG H, YANGYANG P, HUIZHU Z, YAYING W, SHANSHAN Y, YAN C, SIJUI Y (2021). Expression of HSP27 gene in yak oocytes and early embryos in vitro. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, **35**(12): 2716-2723.
- MIYAMOTO H, YOSHIDA E, OTSUKA Y, ISHIBASHI T (1987). Ovarian follicular development in the pregnant rat. *Jpn J Anim Reprod*, **33**(3): 117-122.
- MORISHIGE WK, PEPE GJ, ROTHCHILD I (1973). Serum luteinizing hormone, prolactin, and progesterone levels during pregnancy in the rat. *Endocrinology*, **92**(5): 1527-1530.
- MOTTA PM, NOTTOLA SA, FAMILIARI G, MAKABE S, STALLONE T, MACCHIARELLI G (2003). Morphodynamics of the follicular-luteal complex during early ovarian development and reproductive life. *International Review of Cytology*, **223**: 177-288.
- MURDOCH WJ (1995). Temporal relationships between stress protein induction, progesterone withdrawal, and apoptosis in corpora lutea of ewes treated with prostaglandin F_{2a}. *J Anim Sci*, **73**: 1789-1792.
- NARAYANSINGH RM, SENCHYNA M, VIJAYAN MM, CARLSON JC (2004). Expression of prostaglandin G/H synthase (PGHS) and heat shock protein-70 (HSP-70) in the corpus luteum (CL) of prostaglandin F_{2a}-treated immature superovulated rats. *Can J Physiol Pharmacol*, **82**: 363-371.
- NEUER A, SPANDORFER SD, GIRALDO P, DIETERLE S, ROSENWAKS Z, WITKIN SS (2000). The role of heat shock proteins in reproduction. *Human Reproduction Update*, **6**(2): 149-159.
- NISWENDER GD, JUENGEL JL, SILVA PJ, ROLLYSON MK, MCINTUSH EW (2000). Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, **80**(1): 1-29.
- OBA G, ASLAN S, KAYMAZ M (2001). Gebelik ve siklus dönemlerinin belirlenmesi amacıyla ratlarda vaginal sitolojinin kullanılması. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, **48**: 51-57.

- OHSAKO S, BUNICK D, HAYASHI Y (1995). Immunocytochemical observation of the 90 kd heat shock protein (HSP90): high expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, **43**(1): 67-76.
- OKTEM O, OKTAY K (2008). The ovary anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci*, **1127**: 1-9.
- OLVERA-SANCHEZ S, ESPINOSA-GARCIA MT, MONREAL J, FLORES-HERRERA O, MARTINEZ F (2011). Mitochondrial heat shock protein participates in placental steroidogenesis. *Placenta*, **32**: 222-229.
- OSMAN P (1986). Morphometric analysis of follicular dynamics in pregnant and pseudopregnant rats. *J Reprod Fert*, **76**: 11-12.
- ÖZBEK M, BOZKURT MF, BEYAZ F, ERGÜN E, ERGÜN L (2018). Expression profile of some neuronal and glial cell markers in the ovine ileal enteric nervous system during prenatal development. *Acta Histochemica*, **120**: 768–779.
- PACCOLA CC, RESENDE CG, STUMPP T, MIRAGLIA SM, CIPRIANO I (2013). The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim Reprod*, **10**(4): 677-683.
- PAPADAKI L, BEILBY JOW (1971). The fine structure of the surface epithelium of the human ovary. *J Cell Sci*, **8**: 445-465.
- PARANKO J, SEITZ J, MEINHARDT A (1996). Developmental expression of heat shock protein 60 (HSP60) in the rat testis and ovary. *Differentiation*, **60**: 159-167.
- PARK CJ, SEO YS (2015). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity. *Plant Pathol J*, **31**(4): 323-333.
- PEARL LH, PRODROMOU C (2006). Structure and mechanism of the HSP90 molecular chaperone machinery. *Annu Rev Biochem*, **75**: 271-294.
- PECHAN PM (1991). Heat shock proteins and cell proliferation. *Febs Letters*, **280**: 1-4.
- PENNAROSSA G, MAFFEI S, RAHMAN MM, BERRUTI G, BREVINI TAL, GANDOLFI F (2012). Characterization of the constitutive pig ovary heat shock chaperone machinery and its response to acute thermal stress or to seasonal variations. *Biology of Reproduction*, **87**(119): 1-9.
- PIRES ES, KHOLE VV (2009). A block in the road to fertility: autoantibodies to heat-shock protein 90- β in human ovarian autoimmunity. *Fertil Steril*, **92**(4): 1395-1409.
- PRIEDKALNS J, LEISER R (1998). Female Reproductive System. In: *Textbook of Veterinary Histology*, Ed: DELMANN HD, EURELL J. 5nd Ed. Williams & Wilkins, USA. p: 249-255.
- PRODROMOU C (2016). Mechanisms of HSP90 regulation. *Biochem J*, **473**: 2439-2452.
- PULUR A, KARACA İ, KARACA SY (2017). Isı şok protein 70 (heat shock protein 70) düzeylerinin normal ve preeklampatik gebelerdeki seviyesi. *Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Dergisi*, **27**(2): 88-92.

- RENÇBER SF, OZBEK SK, ERALDEMİR C, SEZER Z, KUM T, CEYLAN S, GUZEL E (2018). Effect of resveratrol and metformin on ovarian reserve and ultrastructure in PCOS: an experimental study. *Journal of Ovarian Research*, **11**(55): 1-16.
- REYNOLDS LP, REDMER DA (1999). Growth and development of the corpus luteum. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement*, **54**: 181-191.
- RICHARDS JS, REN YA, CANDELARIA N, ADAMS JE, RAJKOVIC A (2018). Ovarian follicular theca cell recruitment, differentiation, and impact on fertility: 2017 update. *Endocrine Reviews*, **39**: 1-20.
- ROSS MH, PAWLINA W (2006). Histology: A Text and Atlas. 5nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, USA. p: 773-782.
- SADLER TW (2012). Langman's Medical Embryology. 12nd Ed. Lippincott Williams & Wilkins, China. p: 243-245.
- SAMUELSON DA (2007). Textbook of Veterinary Histology. Elsevier, China. p: 442-455.
- SARIÖZKAN S (2005). Laboratuvar hayvanlarında reproduksiyon. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, **45**(1): 33-39.
- SARUHAN BG, DERELİ S (2016). Deney hayvanlarının beslenme, barınma ve üremesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, **1**(3): 16-21.
- SATO J, HASHIMOTO S, DOI T, YAMADA N, TSUCHITANI M (2014). Histological characteristics of the regression of corpora lutea in wistar hannover rats: the comparisons with sprague-dawley rats. *J Toxicol Pathol*, **27**: 107-113.
- SKINNER MK (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*, **11**(5): 461-471.
- SOLTYS BJ, GUPTA RS (1996). Immunoelectron microscopic localization of the 60-kda heat shock chaperonin protein (HSP60) in mammalian cells. *Experimental Cell Research*, **222**: 16-27.
- SREEDHAR AS, CSERMELY P (2004). Heat shock proteins in the regulation of apoptosis: new strategies in tumor therapy. *Pharmacology & Therapeutics*, **101**: 227-257.
- SREEDHAR AS, KALMAR E, CSERMELY P, SHEN YF (2004). HSP90 isoforms: functions, expression and clinical importance. *Febs Letters*, **562**: 11-15.
- STOCCO C, TELLERIA C, GIBORI G (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*, **28**(1): 117-149.
- SUSANTI E, SUDIANA K, HENDARTO H (2020). Smoke effects of disturbances folliculogenesis (Mda, GnRh, Hsp70, apoptosis, and follicles) in ovarian on mice Balb/C. *J Int Dent Med Res*, **13**(2): 774-777.
- ŞİMŞEK Ö (2012). Kedilerde ovaryum fizyolojisi. *Kocatepe Vet J*, **5**(2): 43-47.

- TAKETA Y, INOUE K, TAKAHASHI M, YAMATE J, YOSHIDA M (2013). Differential morphological effects in rat corpora lutea among ethylene glycol monomethyl ether, atrazine, and bromocriptine. *Toxicologic Pathology*, **41**: 736-743.
- TANYOLAÇ A (1999). Özel Histoloji. Yorum Basın Yayın Sanayi Ltd Şti, Ankara. s: 144-151.
- TAYA K, GREENWALD GS (1982). Peripheral blood and ovarian levels of sex steroids in the lactating rat. *Endocrinol Japon*, **29**(4): 453-459.
- TAYA K, SASAMOTO S (1981). Changes in FSH, LH and prolactin secretion and ovarian follicular development during lactation in the rat. *Endocrinol Japon*, **28**(2): 187-196.
- TKACOVA J, ANGELOVICOVA M (2012). Heat shock proteins (hsps): a review. *Animal Science and Biotechnologies*, **45**(1): 349-353.
- TOMAC J, CEKINOVIC D, ARAPOVIC J (2011). Biology of the corpus luteum. *Periodicum Biologorum*, **113**(1): 43-49.
- TREWEEK TM, MEEHAN S, ECROYD H, CARVER JA (2015). Small heat-shock proteins: important players in regulating cellular proteostasis. *Cell Mol Life Sci*, **72**: 429-451.
- TSAN MF, GAO B (2004). Heat shock protein and innate immunity. *Cellular & Molecular Immunology*, **1**(4): 274-279.
- ÜNLÜSOY İ, ERTUĞRUL O (2014). Foliküler aktivasyonu etkileyen transkripsiyon faktörleri. *Lalahan Hay Araşt Enst Derg*, **54**(1): 28-32.
- VELAZQUEZ MML, ALFAROA NS, DUPUY CRF, SALVETTI NR, REY F, ORTEGA HH (2010). Heat shock protein patterns in the bovine ovary and relation with cystic ovarian disease. *Animal Reproduction Science*, **118**: 201-209.
- VELAZQUEZ MML, ALFARO NS, SALVETTI NR, STANGAFERRO ML, REY F, PANZANI CG, ORTEGA HH (2013). Levels of heat shock protein transcripts in normal follicles and ovarian follicular cysts. *Reproductive Biology*, **11**(3): 276-283.
- VIDYASAGAR A, WILSON NA, DJAMALI A (2012). Heat shock protein 27 (HSP27): biomarker of disease and therapeutic target. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, **5**(7): 2-7.
- WANDINGER SK, RICHTER K, BUCHNER J (2008). The HSP90 chaperone machinery. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(27): 18473-18477.
- WANG X, CHEN M, ZHOU J, ZHANG X (2014). HSP27, 70 and 90, anti-apoptotic proteins, in clinical cancer therapy. *International Journal of Oncology*, **45**: 18-30.
- WASSARMAN PM (2008). Zona pellucida glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, **283**(36): 24285-24289.
- WESTERHEIDE SD, MORIMOTO RI (2005). Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem*, **280**: 33097-33100.

- WESTWOOD FR (2008). The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology*, **36**: 375-384.
- WHITLEY D, GOLDBERG SP, JORDAN WD, ALA B (1999). Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones. *Journal of Vascular Surgery*, **29**(4): 748-751.
- YAMADA E, MUTA T, MOTOMURA A, KOGA H (1957). The fine structure of the oocyte in the mouse ovary studied with electron microscope. *The Kurume Medical Journal*, **4**(3): 148-171.
- YENER T, TUNC AT, ASLAN H, AYTAN H, CALISKAN AC (2007). Determination of oestrous cycle of the rats by direct examination: how reliable?. *Anat Histol Embryol*, **36**: 75-77.
- YİĞİT AA, BÖYÜK G, KABAKÇI R (2019). Dişi ratlarda üreme fizyolojisi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*, **12**(2): 163-167.
- YOSHIDA M, SANBUISSYO A, HISADA S, TAKAHASHI M, OHNO Y, NISHIKAWA A (2009). Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *J Toxicol Sci*, **34**: 189-197.
- YOUNG JM, MCNEILLY AS (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, **140**: 489-504.
- YÜCEL GN, KAPLANOĞLU GT, SEYMEN CM (2018). Karanlığın mucizesi: melatonin ve ovaryum etkileşimi. *Dicle Tıp Dergisi*, **45**(1): 85-92.
- ZHAO M, DEAN J (2002). The zona pellucida in folliculogenesis, fertilization and early development. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, **3**(1): 19-26.

EKLER

Ek-1: Etik Kurul Kararı

Evrak Tarih ve Sayısı: 21.02.2020-E.6556



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



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof.Dr. Nevin KURTDEDE
Ankara Üniversitesi
Veteriner Fakültesi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Araştırmacı grubu Nevin KURTDEDE, Banu KANDİL'den oluşan, G.Ü.ET-20.015 kod numaralı ve *"Rat Ovaryumunda Östrus Siklusu, Gebelik ve Laktasyon Dönemlerinde Isı Şok Proteinlerinin (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90) İmmunohistokimyasal Lokalizasyonları ve Dağılımları"* başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-20.015 and entitled *"Immunohistochemical Localizations and Distributions of Heat Shock (HSP27, HSP60, HSP70 and HSP90) in Oestrous Cycle, Pregnancy and Lactation Periods in Rat Ovary"* is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

Hayvan Türü : Rat Sprague Dawley
Hayvan Sayısı : 72

Ek: 1 Liste



Evrakı Doğrulamak İçin: <https://belgedogrulama.gazi.edu.tr/BelgeDogrulama.aspx>

Ankara

Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76

Posta: hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi: <http://hadyek.gazi.edu.tr/>

Pin: 34452

Bilgi için :Esengül BOŞNAK

Genel Evrak Sorumlusu

Telefon No:03122022666

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 3. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

