

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ENERJİ STRESİNDE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN ACE2**  
**İFADELENMESİNİN SIRT1 İLE İLİŞKİSİNİN**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Erblina NİKŞİQİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır.**

**ANKARA**  
**2024**



**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**ENERJİ STRESİNDE GRANÜLOZA HÜCRELERİNİN ACE2**  
**İFADELENMESİNİN SIRT1 İLE İLİŞKİSİNİN**  
**DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dr. Erblina NİKŞİQİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**  
**Olarak Hazırlanmıştır.**

**Tez Danışmanı**  
**Prof. Dr. Sevda F. MÜFTÜOĞLU**

**ANKARA**

**2024**

## **ONAY SAYFASI**

## TEŞEKKÜR

Tez çalışması ve uzmanlık eğitimim süresinde kıymetli bilgilerini benden esirgemeyen, bilimsel ve akademik olarak her türlü desteği sunan, yabancı bir ülkede eğitim görmenin yarattığı zorlukları hiçbir zaman hissettirmeyen ve her konuda yol gösteren saygıdeğer tez danışmanım Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu'na,

Çalışmanın gerçekleşmesi için klinik destek sağlayan Sayın Prof. Dr. Lale Karakoç Sökmensüer'e,

Uzmanlık eğitimim sürecinde bana karşı gösterdiği anlayışlı ve nazik yaklaşımları ve eğitime verdiği önemle bana ilham kaynağı olan Hacettepe Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Pergin Atilla'ya,

Uzmanlık eğitimime katkıda bulunan Hacettepe Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerine,

Eğitimim süresince bana her konuda yardımcı olan sekreterimiz Meltem Avcı ve teknik personelimiz Emrah Tosun, Hava Duygu, Hüseyin Konukçu'ya

Tez çalışmamda laboratuvar altyapısı ve malzeme temini için finansal destek sağlayan Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Histoloji ve Embriyoloji uzmanlık eğitimim boyunca deneyimlerini ve desteğini esirgemeyen Uzm. Dr. İlker Levent Erdem'e

Her türlü deneyimini ve bilgisini tereddüt etmeden paylaşan, motivasyonumu yüksek tutan, dostluğuna sahip olduğum için çok şanslı hissettiğim eş kıdemim Merve Ayan Türel'i'ye,

Güler yüzü ve pozitif duruşu ile bana ilham olan Rumeysa Havvanur Hannelçi'ye ve diğer tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Her koşulda yanımda olan ve kararlarımı her durumda destekleyen biricik aileme,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Erbolina Nikshiqi, Enerji Stresinde Granüloza Hücrelerinin ACE2 İfadesinin SIRT1 ile İlişkisinin Değerlendirilmesi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2024.** Hücrede enerji stresi artan enerji ihtiyacı ve azalan enerji kaynağı ile ortaya çıkar, bu nedenle enerji stresi hücredeki metabolizmayı etkileyen bir durumdur. Hücresel enerji homeostazisinin temel düzenleyicisi olan adenzin monofosfat ile aktifleşen protein kinaz (AMPK), çeşitli fizyolojik süreçlerin düzenlenmesi için sınırlı enerji durumunda aktive olur. AMPK artışına yanıt olarak SIRT1, enerji metabolizması ve stres yanıtı gibi hücresel süreçleri modüle eder. İnsan granüloza hücresinde eksprese olan ACE2 steroidogenez, foliküler gelişim, granuloza-lutein hücre apoptozu, foliküler atrezi, oosit maturasyonu ve ovulasyonda etkin rol oynar. ACE2 seviyeleri, hücrede enerji stresi ile bağlantılıdır. Hücreler, yaşamlarını devam ettirebilmek için enerji kaynağı olan ATP üretimini %88 mitokondriyal oksidasyondan sağlar. Granüloza hücreleri; ovaryal siklusta foliküler gelişimde rol alan kritik öneme sahip hücrelerdir ve bu hücrelerin metabolizmasındaki değişim fertilité için önemlidir. Tüm bu bilgilerden yola çıkarak AICAR uygulaması ile AMPK aktivasyonu üzerinden enerji stresi oluşturarak granüloza hücrelerinde ACE2 ifadesinin SIRT1 ile ilişkisinin araştırılması için gözlemsel tanımlayıcı bir çalışma planlandı. HGL5 insan granüloza hücre hattında, hücre enerji stresinde mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığı, SIRT1 inhibisyonu sonrasında da bu hasarın daha da şiddetlendiği bulundu. Enerji stresi modeli oluşturulduktan sonra HGL5 granüloza hücrelerinde, primer hücre kültürü yapılan sağlıklı ve PKOS grubu granüloza hücrelerinde SIRT1'in immünfloresan işaretleme ile istatistiksel olarak arttığı bulundu. AOR grubunda ise stres ile SIRT1'in kontrol grubuna göre azaldığı saptandı. SIRT1 inhibisyonu sonrası ACE2 ifadenmesinin AOR grubu dışında bütün gruplarda arttığı saptandı. Çalışmamızda ilk defa granüloza hücresinde SIRT1 ve ACE2 arasında AMPK yolağı üzerinden ilişki olabileceği gösterildi.

**Anahtar Kelimeler:** Enerji Stresi, SIRT1, ACE2 reseptörü, Granüloza Hücreleri  
Destekleyen Kurum: Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi, Hızlı Destek Araştırma Projesi (THD-2023-20668)

## ABSTRACT

**Nikshiqi Erblina, Evaluation of the Relationship Between ACE2 Expression and SIRT1 in Granulosa Cells Under Energy Stress, Hacettepe University Faculty of Medicine, Department of Histology and Embryology Residency Thesis, Ankara 2024.** Cellular energy stress arises from an increased demand for energy and a decreased energy supply, thereby affecting cellular metabolism. Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), a key regulator of cellular energy homeostasis, is activated under limited energy reserves to regulate various physiological processes. In response to increased AMPK, SIRT1 modulates cellular processes such as energy metabolism and stress response. ACE2, expressed in human granulosa cells, plays a significant role in steroidogenesis, folliculogenesis, follicular atresia, granulosa-lutein cell apoptosis, oocyte maturation, and ovulation. ACE2 levels are linked to cellular energy stress. Cells produce 88% of their energy source, ATP, from mitochondrial oxidation in order to survive. Granulosa cells are crucially important cells that play a role in follicular development in the ovarian cycle. The metabolic changes these cells undergo is important for fertility. Based on what is known, an observational descriptive study was planned to investigate the relationship between ACE2 expression and SIRT1 in granulosa cells through AMPK activation induced by AICAR treatment. In the HGL5 human granulosa cell line, it was found that mitochondrial membrane potential decreased after cellular energy stress, and this damage was further exacerbated after SIRT1 inhibition. After establishing an energy stress model, our study results showed that SIRT1 statistically increased in the HGL5 granulosa cells, primary cultured healthy and PCOS granulosa cells group via indirect immunofluorescent staining method. In the Diminished Ovarian Reserve (DOR) group, our study results showed that after cellular energy stress, SIRT1 decreased compared to the control group. After SIRT1 inhibition, ACE2 expression increased in all groups except the DOR group. For the first time, our study demonstrated a potential relationship between SIRT1 and ACE2 in granulosa cells via the AMPK pathway.

**Keywords:** Energy Stress, SIRT1, ACE2 Receptor, Granulosa Cell **Funding:** Supported by Hacettepe University Scientific Research Projects Coordination Unit, Research Fund (THD-2023-20668)

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ONAY SAYFASI</b>	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b>	<b>iv</b>
<b>ÖZET</b>	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>vii</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b>	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>x</b>
<b>GİRİŞ</b>	<b>1</b>
<b>GENEL BİLGİLER</b>	<b>4</b>
2.1. Ovaryum Histolojisi	4
2.2 Folikülogenez	5
2.3. Granüloza Hücresi	10
2.4. Ovulasyon	12
2.5. Ovarian Metabolizma ve Homeostaz	14
2.5.1. Enerji Metabolizması ve Mitokondriyal Fonksiyon	16
2.6. Hücrede Enerji Stresi ve AMPK - AICAR İlişkisi	17
2.6.1 AMPK ile Mitokondriyal Dinamiklerin Regülasyonu	20
2.7. Polikistik Over Sendromu	21
2.8. Azalmış Over Rezervi	24
2.9. Sirtuin Ailesi	26
2.9.1. SIRT1 ve Granüloza Hücresi	30
2.10. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE2)	32
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>35</b>
3.1. Etik Kurul İzin Süreci	35
3.2. Deney Gruplarının Belirlenmesi	35
3.3. Folikül Sıvısının Temini	36
3.4. Folikül Sıvısından ve Denüasyon Artığından Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu	37
3.5. HGL5 ve Primer Granüloza Hücrelerinin Ekilmesi ve Çoğaltılması	38



3.6. Kùltür Hùcrelerinin Kaldırılması, Pasajlanması ve Dondurulması	38
3.7. Kùltür Hùcrelerinin Sayılması	39
3.8. AICAR ile Hùcre Enerji Stresi Modeli Oluşturulması	40
3.9 İmmünfloresan İşaretleme İçin Gerekli Malzeme ve Solüsyonların Hazırlanması	42
3.9.1 Fosfat Tamponu (PBS)	42
3.9.2. PBS-BSA Solüsyonu Hazırlanması	43
3.9.4. Primer Antikorlar	43
3.9.5. Floresan İşaretleli Sekonder Antikor	45
3.10. İmmünfloresan İşaretlemenin Uygulaması	45
3.11. JC-1 Boyama Prosedürü	45
3.12. Wst-1 Proliferasyon Testi	46
3.13. İstatistiksel Analiz	47
<b>4. BULGULAR</b>	<b>48</b>
4.1. Kùltüre Edilen Hùcrelerin Faz Kontrast Mikroskopunda İncelenmesi	48
4.2. HGL5 Hùcrelerinin Stres Sonrası Faz Kontrast Mikroskopunda İncelenmesi	52
4.2. İmmünfloresan İşaretlemenin Değerlendirilmesi	53
4.2.1 SIRT1 İmmünfloresan İşaretlemenin Değerlendirilmesi	53
4.3.1 ACE2 İmmünışaretlemenin Değerlendirilmesi	63
4.4. HGL5 hùcrelerinde JC-1 ile Mitokondrial Membran Potansiyeli Değerlendirilmesi	71
4.5. HGL5 granùloza hùcrelerinin Wst-1 Analizi ile Mitokondriyal Dehidrogenaz Aktivitesi	74
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>75</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b>	<b>82</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>84</b>

## SİMGELER VE KISALTMALAR

<b>ACE2</b>	Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2
<b>AICAR</b>	5-aminoimidazol-4-karboksamid Ribonükleotid
<b>AMH</b>	Anti Mülleriyan Hormon
<b>AMPK</b>	Adenozin Monofosfat ile Aktifleştirilen Protein Kinaz
<b>AOR</b>	Azalmış Oosit Rezervi
<b>ART</b>	Assisted Reproductive Technology
<b>BMP15</b>	Kemik Morfogenetik Proteini
<b>cAMP</b>	3',5'-siklik adenozin monofosfat
<b>cKit</b>	Tirozin Kinaz Reseptörü
<b>DRP1</b>	Mitokondriyal Fiyon Faktörü
<b>E2</b>	Östradiol
<b>Ex-527</b>	6-Chloro-2,3,4,9-tetrahydro-1H-carbazole-1-carboxamide
<b>FSH</b>	Folikül uyarıcı hormon
<b>GDF9</b>	Büyüme Farklılaşma Faktörü 9
<b>HGL5</b>	Silent Information Regulator 1
<b>LH</b>	Steroidojenik Akut Düzenleyici Protein
<b>MFF</b>	Mitokondriyal Fiyon Faktörü
<b>mtDNA</b>	Mitokondriyal DNA
<b>NADPH</b>	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat
<b>OPU</b>	Oocyte Pick Up
<b>P4</b>	Progesteron
<b>PKOS</b>	Polikistik Over Sendromu
<b>RAS</b>	Renin Anjiyotensin Sistemi
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türleri
<b>Rpm</b>	Dakikadaki Devir Sayısı
<b>SIRT1</b>	Silent Information Regulator 1
<b>StAR</b>	Steroidojenik Akut Düzenleyici
<b>ÜYTE</b>	Üreme Yardımcı Tedavi Yöntemleri
<b>ZP</b>	Zona Pellusida Sperm Bağlayıcı Protein

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Folikülogenez ve oosit olgunlaşmasının aşamaları [8].	6
2.2. Teka hücreleri, granüloza hücreleri ve oosit arasındaki parakrin ve otokrin etkileşimler [10].	8
2.3. Folikülün mikro ortamı içinde çift yönlü iletişim [11].	9
2.4. AMPK yapısı [33].	19
2.5. Folikülogenez ve embriyo gelişiminin farklı aşamalarındaki temel Sirtuin fonksiyonları [48].	30
3.1. Deney tasarımı. Bu şekil BioREnder uygulaması kullanarak çizilmiştir.	36
3.2. Granüloza hücresi izolasyonu. A: Bulutsu Faz B: Granüloza hücresi peleti.	38
3.3. Bu şekil BioREnder uygulaması kullanarak çizilmiştir.	40
3.4. Fosforile AMPK ELISA grafiği.	42
3.5. SIRT1 primer antikör dilüsyonları. A: SIRT1 primer antikör 1/100 dilüsyonu B: SIRT1 primer antikör 1/200 dilüsyonu C: SIRT1 primer antikör 1/300 dilüsyonu D: SIRT1 primer antikör 1/500 dilüsyonu	43
3.6. SIRT1 primer antikör dilüsyonları. A: SIRT1 primer antikör 1/100 dilüsyonu B: SIRT1 primer antikör 1/200 dilüsyonu C: SIRT1 primer antikör 1/300 dilüsyonu D: SIRT1 primer antikör 1/500 dilüsyonu	44
3.7. Wst-1 hücre proliferasyon testi şeması. Bu şekil BioREnder uygulaması kullanarak çizilmiştir.	46
4.1. HGL5 granüloza hücre hattı <b>A:</b> 8. saat <b>B:</b> 24. saat <b>C:</b> 48. saat	49
4.2. Sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinin primer kültür mikrografları. <b>A:</b> Primer kültürde 0. saat granüloza hücreleri. Hücreler küme halinde ekilmiştir ve henüz tutunmadıkları görülmektedir. <b>B:</b> Primer kültürde 24. saat granüloza hücreleri. <b>C:</b> Primer kültürde 48. saat granüloza hücreleri. <b>D:</b> Primer kültürde 1. hafta granüloza hücreleri.	50
4.3. PKOS kadınların granüloza hücrelerinin primer kültür mikrografları. <b>A:</b> Primer kültürde 0. saat granüloza hücreleri. Hücreler henüz tutunmadıkları görülmektedir. <b>B:</b> Primer kültürde 24. saat granüloza hücreleri. <b>C:</b> Primer kültürde 48. saat granüloza hücreleri. <b>D:</b> Primer kültürde 1. hafta granüloza hücreleri.	51

- 4.4.** AOR kadınların granüloza hücrelerinin primer kültür mikrografları. **A:** Primer kültürde 0. saat granüloza hücreleri. Hücreler henüz tutunmadıkları görülmektedir. **B:** Primer kültürde 24. saat granüloza hücreleri. **C:** Primer kültürde 48. saat granüloza hücreleri. **D:** Primer kültürde 1. hafta granüloza hücreleri 52
- 4.5.** **A:** HGL5 grubu, x10 objektif büyütmesi. **B:** HGL5 grubu, x20 objektif büyütmesi. **C:** AICAR sonrası HGL5, x10 objektif büyütmesi. **D:** AICAR sonrası HGL5, x10 objektif büyütmesi. **E:** SIRT1 inhibisyonu ve AICAR sonrası x10 objektif büyütmesi **F:** SIRT1 inhibisyonu ve AICAR sonrası x20 objektif büyütmesi. 53
- 4.6.** **A:** HGL5 hücreleri SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **B:** HGL5 hücreleri AICAR sonrası SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **C:** HGL5 hücreleri AICAR+Ex-527 immünişaretleme, x40 büyütmesi 54
- 4.7.** HGL5 granüloza grubunda SIRT1 intesitesinin karşılaştırılması. Image J kullanılarak yapılan immünofloresan yoğunluğu analizinde Kontrol ve Stres grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.999$ ). Kontrol ve İnhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\* ( $p=0.0001$ ). Stres ve inhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\* ( $p=0.0001$ ). 55
- 4.8.** **A:** Sağlıklı Granüloza Grubu SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **B:** Sağlıklı Granüloza Grubu SIRT1 immünişaretleme, x60 objektif büyütmesi. **C:** PKOS Grubu SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS Grubu SIRT1 immünişaretleme, x60 objektif büyütmesi. **E:** AOR Grubu SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **F:** AOR Grubu SIRT1 immünişaretleme, x60 objektif büyütmesi. 56
- 4.9.** Gruplarda SIRT1 intesitesinin karşılaştırılması. Image J kullanılarak yapılan immünofloresan yoğunluğu analizinde sağlıklı granüloza grubu (erkek infertilitesi) ve PKOS grubu arasında önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.274$ ). Sağlıklı granüloza (erkek infertilitesi) grubu ve AOR grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\* ( $p=0.0001$ ). PKOS grubu ve AOR grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\* ( $p=0.0001$ ). 57
- 4.10.** **A:** Sağlıklı Granüloza Grubu SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **B:** Sağlıklı Granüloza Grubu AICAR sonrası SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **C:** Sağlıklı Granüloza Grubu AICAR+EX-527 sonrası SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. 58
- 4.11.** Sağlıklı granüloza hücresi (erkek infertilitesi) grubunda SIRT1 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immünofloresan yoğunluğu analizinde Stres grubunda Kontrol grubuna

- göre SIRT1 immünişaretleme ifadesinde istatistiksel olarak fark bulunmuştur \* ( $p=0.013$ ). Kontrol ve İnhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p=0.15$ ). Stres ve inhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\* ( $p=0.0001$ ). 59
- 4.12. A:** PKOS Grubu SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **B:** PKOS Grubu AICAR sonrası SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS Grubu AICAR+EX-527 sonrası SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. 60
- 4.13.** Polikistik over sendromu grubunda SIRT1 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immünfloresan yoğunluğu analizinde Stres grubunda Kontrol grubuna göre SIRT1 ifadesi istatistiksel olarak önemli ölçüde arttığı bulunmuştur \*\*\* ( $p=0.008$ ). Kontrol ve İnhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p=0.147$ ). Stres ve inhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\* ( $p=0.0001$ ). 61
- 4.14. A:** AOR Grubu SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **B:** AOR Grubu AICAR sonrası SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **C:** AOR Grubu AICAR+EX-527 sonrası SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi 62
- 4.15.** Azalmış oosit rezervi grubunda SIRT1 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immünfloresan yoğunluğu analizinde Kontrol grubu ile Stres grubu arasında SIRT1 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.111$ ). Kontrol grubunda İnhibisyon grubuna göre SIRT1 ifadesi istatistiksel olarak önemli ölçüde arttığı bulunmuştur \*\*\*\* ( $p=0.0001$ ). Stres grubundaki SIRT1 ifadesi inhibisyon grubuna göre istatistiksel olarak arttığı bulunmuştur \*\* ( $p=0.002$ ). 63
- 4.16. A:** HGL5 granüloza hücreleri ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **B:** HGL5 granüloza hücreleri AICAR sonrası ACE2 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **C:** HGL5 granüloza hücreleri AICAR+EX527 sonrası ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. 64
- 4.17.** HGL5 granüloza hücresi grubunda ACE2 intesitesinin karşılaştırılması. Image J kullanılarak yapılan immünofloresan yoğunluğu analizinde Kontrol ve Stres grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.728$ ). İnhibisyon grubunda Kontrol grubuna göre ACE2 ifadesi istatistiksel olarak arttığı bulunmuştur \*\* ( $p=0.009$ ). Stres ve inhibisyon grubu arasındaki ACE2 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.233$ ). 65

- 4.18. A:** Sağlıklı granüloza hücreleri ACE2 floresan immünişaretlemesi, x40 objektif büyütmesi **B:** Sağlıklı granüloza hücreleri AICAR sonrası ACE2 floresan immünişaretlemesi, x40 objektif büyütmesi **C:** Sağlıklı granüloza hücreleri AICAR+EX527 sonrası ACE2 floresan immünişaretlemesi, x40 objektif büyütmesi. 66
- 4.19.** Sağlıklı granüloza hücresi (erkek infertilitesi) grubunda ACE2 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immünofloresan yoğunluğu analizinde kontrol ve inhibisyon grubu arasındaki ACE2 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.999$ ). Kontrol grubunda ACE2 ifadesi stres grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır \*\*\* ( $p=0.0004$ ). İnhibisyon grubunda ACE2 ifadesi stres grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır \*\* ( $p=0.0017$ ) 67
- 4.20. A:** PKOS grubu granüloza hücreleri ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **B:** PKOS grubu granüloza hücreleri AICAR sonrası ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **C:** PKOS grubu granüloza hücreleri AICAR+EX527 sonrası ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. 68
- 4.21.** Polikistik over sendromu grubunda ACE2 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immünofloresan yoğunluğu analizinde stres ve inhibisyon grubu arasındaki ACE2 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.999$ ). Stres grubunda ACE2 ifadesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır \*( $p=0.0396$ ). İnhibisyon grubunda ACE2 ifadesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır \*( $p=0.0164$ ) 69
- 4.22. A:** AOR grubu granüloza hücreleri ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **B:** AOR grubu granüloza hücreleri AICAR sonrası ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **C:** AOR grubu granüloza hücreleri AICAR+EX sonrası ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. 70
- 4.23.** Azalmış oosit rezervi grubunda ACE2 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immünofloresan yoğunluğu analizinde stres ve inhibisyon grubu arasındaki ACE2 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.999$ ). Kontrol grubunda ACE2 ifadesi inhibisyon grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır \*\*\*\*( $p=0.0001$ ). Kontrol grubunda ACE2 ifadesi stres grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır \*\*\*( $p=0.007$ ). 71
- 4.24.** HGL5 uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücreleri JC-1 ile mitokondriyal membran potansiyeli boyanması. **A:** DAPI ile boyanmış granüloza hücre çekirdekleri. **B:** Sağlıklı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 kırmızı monomerleri. **C:** Hasarlı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 yeşil monomerleri. **D:** JC-

- 1 ile immünfloresan boyanan mitokondriyal membran potansiyelinin birleştirilmiş görüntüsü. 72
- 4.25.** HGL5 granüloza hücrelerinin AICAR ile metabolik stres modellemesi JC-1 ile mitokondriyal membran potansiyeli boyanması. **A:** DAPI ile boyanmış granüloza hücre çekirdekleri. **B:** Sağlıklı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 kırmızı monomerleri. **C:** Hasarlı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 yeşil monomerleri. **D:** JC-1 ile immünfloresan boyanan mitokondriyal membran potansiyelinin birleştirilmiş görüntüsü. 72
- 4.26.** HGL5 granüloza hücrelerinin SIRT1 inhibisyonu sonrası JC-1 ile mitokondriyal membran potansiyeli boyanması. **A:** DAPI ile boyanmış granüloza hücre çekirdekleri. **B:** Sağlıklı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 kırmızı monomerleri. **C:** Hasarlı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 yeşil monomerleri. **D:** JC-1 ile immünfloresan boyanan mitokondriyal membran potansiyelinin birleştirilmiş görüntüsü. 73
- 4.27.** JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü. Normal mitokondriyal membran potansiyeli göstergesi olan JC-1 kırmızı monomerlerin kontrol grubu ile stres grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ( $p=0.556$ ). İnhibisyon grubu JC-1 kırmızı monomerler boyaması kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azalmış bulundu  $***(p=0.0003)$ . Hasarlı mitokondriyal membran potansiyeli göstergesi olan JC-1 yeşil monomerlerin inhibisyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak artmış bulundu  $***(p=0.0001)$ . İnhibisyon grubu JC-1 yeşil monomerler boyaması stres grubuna kıyasla istatistiksel olarak artmış bulundu  $** (p= 0.0004)$ . 73
- 4.28.** Wst-1 analizi grafiği. 74

## GİRİŞ

Fertilitenin korunmasında ve infertilitenin etiopatogenezinde ovaryum içerdiği hücre ve metabolik değişikliklerden etkilenen mikroçevreleri ile sıklıkla araştırılan önemli bir organdır. İnfertilite günümüzde giderek artan bir sağlık problemidir. Birçok nedenlerle oluşmasının yanı sıra ovaryumdaki çeşitli hücrelerin, özellikle granüloza hücrelerinin metabolik uyumu ve homoestazı da bunda rol oynamaktadır. Fertilitenin korunmasında veya infertilite patogenezinde sadece germ hücrelerinin yeri yoktur, aynı zamanda folikülogenez gibi olgunlaşma süreçleri de etkindir. Folikülogenez sırasında değişen folikül evrelerine göre lokal büyüme faktörleri, steroidogenez gibi hormonal etki mekanizmaları ile folikül nişi yani folikül içi ortam ve folikül mikroçevresi de folikülogenezin başlıca yönlendiricileridir. Folikülogenez için bu mikroçevreyi sağlayan oosit ile yakın ilişkili temel hücre granuloza hücreleri olup diğer teka hücreleri ve stromal hücrelerin de önemi büyüktür. Granuloza hücreleri; graafian foliküle doğru farklanmakta olan foliküllerde oositin canlılığı ve metabolik dengesini koruyarak oosit sağ kalımını ve matürasyonunu destekler. Ovaryumda folikülogenez sırasında herhangi bir metabolik strese maruz kaldığında, bundan ilk etkilenen ve değişim gösteren granüloza hücreleri olabilmektedir. Bu da intrafoliküler ortamda oosit ile haberleşme sürecinde dominant folikülün seçiminde ve/veya primer folikülden sekonder, tersiyer foliküle ilerlemesinde önemli rol oynar.

Polikistik over sendromu ve Azalmış Oosit Rezervi gibi hastalıklar infertiliteye neden olmaktadır. Bu hastalıklar ovaryum ve oosit olgunlaşmasında yer alan hücrelerin metabolik değişiklikleri ve enerji stresi ile yakından ilişkilidir.

Foliküler gelişimin ilerleyemediği, granüloza hücre proliferasyonunda duraklamanın görüldüğü, sonuç olarak kistik foliküllerin gözlendiği polikistik over sendromu (PKOS), günümüzün yaygın endokrin bozukluklarından biridir. PKOS; hiperandrojenemi, ovulasyon bozukluğu ve ovaryan polikistik transformasyon ile karakterize endokrin ve metabolik bir hastalıktır. PKOS'lu hastalar klinik olarak kronik inflamasyon, oksidatif ve metabolik stres ile seyretmektedir.



Granüloza hücrelerinde enerji stresi ile ilişkilendirilen ve son yıllarda fertilitiyi de etkileyen bir diğer klinik durum da Azalmış Oosit Rezervi'dir (AOR). Azalmış oosit rezervi tanılı kadınlar, düzenli menstrüel siklusleri olmasına rağmen düşük fertilitite oranına sahiptirler. AOR, 35 yaş altı kadınlarda infertilitenin bir nedenidir ve prevalansı üzerine az sayıda çalışma yapılmıştır.

Granüloza hücrelerinde enerji stresi günümüz koşullarında üreme biyolojisini yakından ilgilendiren bazı proteinlerin görev aldığı süreçlerin araştırma ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Kümüls oosit komplekslerinin ihtiyaç duyduğu enerji mitokondriyonlar tarafından sağlanır. Çünkü mitokondriyon tüm hücrel işlevler için gerekli enerjiyi üreten güç merkezidir. Mitokondriyonun üreme yeteneğinin düzenlenme konusunda anahtar rol oynadığı düşünülmektedir. İnfertil bireylerde oosit ve embriyolardaki yüksek ATP içeriğinin, daha iyi üreme sonuçları ile birliktelik gösterdiği bildirilmiştir. İnsan granüloza hücrelerinde mitokondriyal disfonksiyon, steroidogenezin, oosit olgunlaşma sürecine ve fertilizasyonunun azalmasına neden olabilmektedir. Hücre enerji stresine girdiğinde, ATP azalığından mitokondriyon fonksiyonunda adaptif değişiklikler meydana gelecektir.

Sitoplazmada SIRT1 ve ACE2 çözünebilir proteinlerdir. Folikülogenez boyunca granüloza hücrelerindeki değişimlere adaptasyon ile ilişkilendirilmektedirler. Enerji stresinde önemli yollardan biri de AMPK/SIRT1 yolağıdır. Enerji stresinde bu yolda SIRT1 ekspresyonunda artış meydana gelmektedir. Yakın zamanlarda hepatositlerde yapılan bir çalışmada; hepatositlerde SIRT1 artışı ACE2 reseptör sayısını arttırarak enerji homeostazını sağladığını göstermiştir, ancak granüloza hücrelerinde SIRT1 ve ACE2 reseptör ilişkisi aydınlanmamıştır.

Ovaryal stromal hücreler ile granüloza hücrelerinde ve oositlerde de, ACE2 reseptörü bulunarak steroidogenezis, foliküler gelişim, granuloza-lutein hücre apoptozu/foliküler atrezi, oosit maturasyonu ve ovülasyonda etkin rol oynar. SIRT1 de granüloza hücrelerinin sitoplazmasında ve/veya çekirdeğinde mevcuttur. ACE2'nin granuloza hücrelerindeki önemi ile üreme biyolojisine etkilerine ait bilgiler henüz kısıtlıdır. Metabolik strese maruz kalan hepatositlerde SIRT1 ve ACE2 artışıyla enerji homeostazı gösterilmişken granüloza hücrelerinde enerji stresinde SIRT1 ile ACE2 arasındaki direkt ya da indirekt ilişki bilinmemektedir.

Bu gerekçeden yola çıkarak, çalışmamızda amaç; granüloza hücrelerinde in-vitro koşullarda enerji stresi oluşturarak AMPK/SIRT1 yolağı ve ACE2 ifadesi arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir.

Bu nedenle araştırma sorularımız:

- Enerji stresi altındaki granüloza hücresinde SIRT1 artıyor mu?
- Enerji stresi altındaki granüloza hücresinde ACE2 artıyor mu?
- Enerji stresi altındaki granüloza hücresinde SIRT1 artışı ACE2 ekspresyonuna nasıl etki eder ? Azaltır/ Arttırır ?
- PKOS tanılı hastaların granüloza hücrelerinin in-vitro şartlarda enerji stresi devam ediyor mu ?
- PKOS tanılı hastaların granüloza hücrelerinin in-vitro şartlarda enerji stresi varsa, artması beklenen SIRT1 ACE2 ifadesini değiştirir mi?
- AOR tanılı hastaların granüloza hücrelerinin in-vitro şartlarda enerji stresi devam ediyor mu?
- AOR tanılı hastaların granüloza hücrelerinin in-vitro şartlarda enerji stresi varsa, artması beklenen SIRT1 ACE2 ifadesini değiştirir mi?

Bu hedef doğrultusunda oluşturduğumuz hipotezimiz granüloza hücrelerindeki enerji stresi nedeniyle AMPK yolağı aracılı SIRT1 artışı ACE2 ifadesini azaltarak etki eder.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ovaryum Histolojisi

Ovaryum, iki adet ve her biri oval, tunica albuginea adı verilen kalın bağ dokusundan kapsüle sahiptir. Germinal epitel olarak bilinen tek katlı yassı ya da küboidal mezotelle kaplıdır. Ovaryum iki tabakadan oluşmaktadır, folikülleri içeren dıştaki korteks tabakası ve vasküler bağ dokudan oldukça zengin stroma, içteki medulla tabakasıdır [1].

Korteks, tunica albugineanın derininde folikülleri içerir. Ovaryan foliküller, primer oosit ve onu çevreleyen destek hücrelerinden oluşur. Bu destek hücrelerinden yassı olanlar folikül hücreleri olarak isimlendirilir, folikülogenez sırasında bu yassı hücreler kübik biçim alır ve granüloza hücreleri olarak adlandırılır [2].

Embriyonik gelişim sırasında, dişi germ hücresi oogonyum mitoz bölünmeler geçirir. Embriyonik dönemin ilk ayında, primordial germ hücre popülasyonu, vitellus kesesi duvarından primordial gonadların gelişeceği alana göç eder. Ovaryum farklanmasının temel belirleyici yolağı Wnt yolağıdır ve Wnt4 bu farklanmada en önemli rolü oynamaktadır [3]. Primitif gonadın korteksi ovaryumlara farkedildikten sonra beşinci haftada primer seks kordonlarını içerir. Bu mitotik aktivite, insanlarda gebeliğin 11-12. haftalarında sona erer ve oogonia kümeleri, ilk mayotik bölünmenin uzun profaz aşamasına girer. Bu hücrelerin bir kısmı apoptotik hücre ölümüne uğrar. Ancak diğerleri mayozun diğer aşamalarına ilerlemeden, uzun süre mayozun ilk bölünmesinin profaz evresine girer ve bu evrede latent olarak kalır. Mayotik duraklamadaki bu hücrelerin her biri folikül hücresi adı verilen tek katlı yassı epitel hücreleriyle çevrenir. Primordiyal foliküller ergenliğe kadar değişime uğramazlar. Genellikle her adet döngüsü sırasında, sadece bir oosit mayoz bölünmeye devam eder ve ovulasyon ile atılır. Bir kadının üreme süreci yaklaşık 30-35 yıl olduğundan, ovulasyon ile ovaryumlardan sadece yaklaşık 450 oosit atılır. Diğerleri atrezi yoluyla dejenere olur.

Ovaryumda oositler, foliküller içerisinde gelişen büyük hücrelerdir ve embriyoya nükleer genetik materyalin yarısını sağlamaktadır. Memelilerde oositler,

parakrin etki yani çevredeki somatik hücrelerle bağlantılar kurarak uzun süreli kompleks bir gelişim sürecinden geçer. Oosit ve somatik hücreler arasındaki bu iletişim, oosit metabolizmasını, hücre iskeletinin yeniden şekillenmesini, hücre döngüsünün ilerlemesini ve fertilizasyonu kontrol eden birçok düzenleyici sinyalin alışverişine olanak tanır [4].

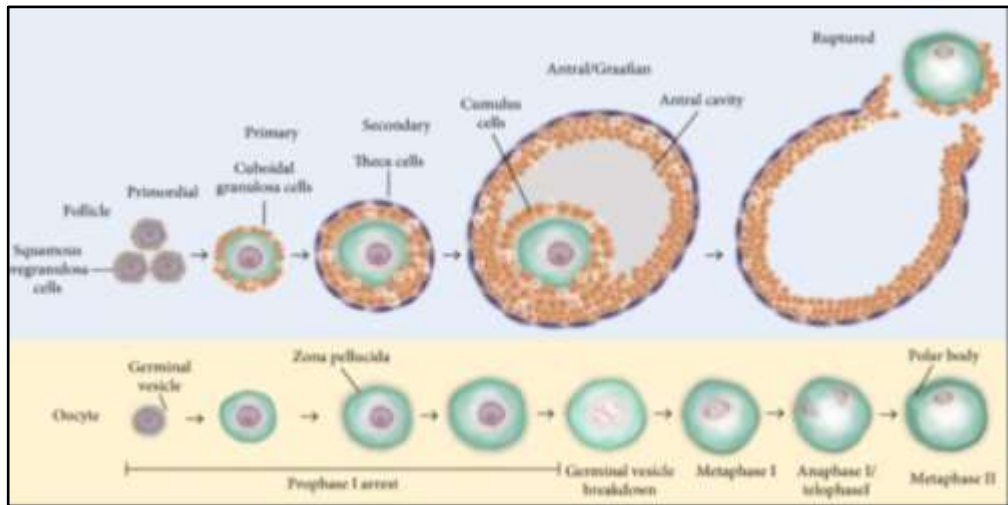
## 2.2 Folikülogenez

Folikülogenez fetal yaşam sırasında başlar. Primordiyal germ hücrelerinin embriyonik genital çıkıntıya göçü aslında bu süreçteki en erken olay olarak kabul edilir [5]. Primordiyal germ hücrelerinin genital çıkıntıya yerleşiminden sonra, bipotansiyel gonad oluşur ve daha sonra ovaryum/testise dönüşür. Gonaddaki somatik, stromal hücrelerin eşzamanlı gelişimi primordiyal germ hücrelerinin farklılaşmasında çok önemli bir rol oynar [6] .

Ovaryumda folikülogenez sırasında primer foliküller, her biri iki veya daha fazla çoğalan granüloza hücresi katmanıyla çevrelenmiş bir oosit içeren multilaminar primer foliküllere dönüşür. Bu foliküller daha da büyüyerek preantral aşamaya ulaşır. Bu aşamada, granüloza hücrelerinin dışında bazal membran oluşur, interna ve eksterna olarak bölünmüş yeni bir stromal hücreler içeren teka tabakaları folikülleri çevreler. Teka hücreleri tabakası, granüloza hücreleri tarafından östrojen üretimi için substrat olan androjenlerin kaynağıdır. Vaskülarizasyon teka hücreleriyle sınırlıdır ve damarlar bazal membranın ötesine geçmez. Bu koşullar altında iç folikül avaskülarize kalır. Foliküllerin primordiyalden preantral aşamaya kadar büyümesi gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır, bu süreç hem oosit hem de stromal hücrelerden kaynaklanan lokal sinyallerin çift yönlü iletişimi ile kontrol edilir. Folikülogenezde oosit matürasyonu hem granüloza hücrelerinin hem de teka hücrelerinin çoğalması ve farklılaşmasıyla düzenlenir. Bazı moleküller, yani 1kDaltondan daha küçük olanlar oosit de dahil olmak üzere çeşitli folikül hücreleri arasındaki oluklu bağlantılar aracılığıyla aktarılırken, proteinler kendi reseptörleri aracılığıyla etkilerini ortaya çıkarır. Preantral foliküllerde ortaya çıkan içi sıvı dolu boşluklar en sonunda birleşerek antrumunu oluşturur. Antral foliküller iki granüloza hücresi alt popülasyonu ile karakterize edilir; bunlar oositi çevreleyen kümülüs hücreleri ve folikül duvarını

kaplayan mural granüloza hücreleridir. Antral foliküllerin çoğu atretik dejenerasyondan geçer ve yalnızca birkaçı hipofizden salgılanan folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinize hormona (LH) yanıt verir. Antral folikülü etkileyen ilk gonadotropin olan FSH, granüloza hücrelerinin hayatta kalmasından ve çoğalmasından, östradiol üretiminden ve LH reseptörlerinin ekspresyonundan sorumludur. Yüksek konsantrasyonda LH reseptörleri eksprese eden antral foliküller, bu gonadotropine yanıt olarak ovulasyon öncesi Graafian foliküllerine dönüşür. Ovulasyon öncesi LH dalgalanması Graafian foliküllerini aktive ederek oosit olgunlaşması, kümülüs hücre musifikasyonu, folikül rüptürü ve ardından oositin dışarı atılması gibi bir dizi olayı üretir. Bu olaylar dizisi ovulasyon olarak adlandırılır [7].

Folikülogenez ve oogenez, sonuç olarak steroid hormonlarının ve diğer sinyal moleküllerinin üretimi, metabolik hormon sinyalizasyon sürecine yanıt veren, bu mekanizmalarla düzenlenen ovaryan süreçlerdir. Oogenez, embriyonik gelişimin erken dönemlerinde, mitotik olarak bölünerek çoğalan, programlanmış hücre ölümüne maruz kalabilen veya primer oosit olarak mayoz bölünmeye girerek oogonia'yı oluşturan primordiyal germ hücreleriyle başlar. Primer oositler mayoz bölünmeyi tamamlamaz, bunun yerine profaz aşamasında duraklar ve primordiyal folikül adı verilen yapılardaki tek tek granüloza hücrelerinden oluşan bir kılıfla çevrenir. Kadınlar oosit rezervini oluşturan yaklaşık bir milyon atretik olmayan primordiyal folikül ile doğarlar (Şekil 2.1) [8].



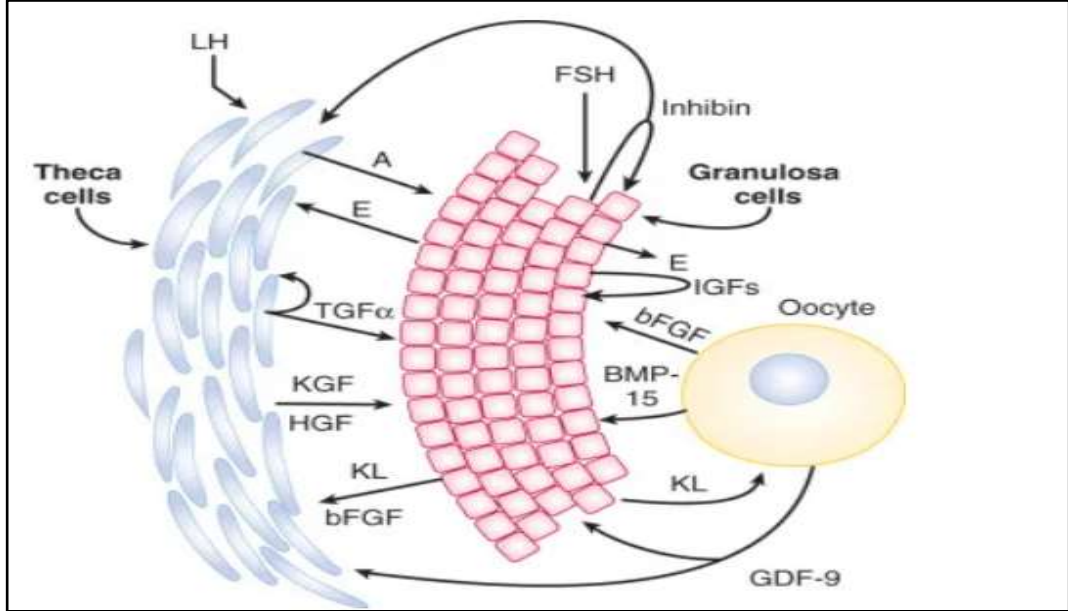
**Şekil 2.1.** Folikülogenez ve oosit olgunlaşmasının aşamaları [8].

Atreziye veya apoptoz aracılı dejenerasyona uğrayan primordiyal foliküller gittikçe büyüyen folikül havuzuna sürekli olarak katılır. Primordiyal foliküller bağımsız bir kan kaynağına sahip olmadığından, folikülogenezin erken aşamalarında sınırlı endokrin düzenlenmesi altındadır; primordiyal folikülden primer foliküle geçiş büyük ölçüde ovaryum içi parakrin sinyalizasyon tarafından kontrol edilir. Primer folikülün granüloza hücreleri, FSH reseptörlerini eksprese etmeye başlar ve FSH, sekonder foliküle ilerlemenin uyarılmasında rol oynar. Folikülü saran teka hücreleri, sekonder folikül evresinin sonlarında LH reseptörleri geliştirir ve antral folikül geliştikçe teka tabakası giderek daha fazla vaskülarize olur. Folikülogenezin preantral aşamaları sürekli olarak, neredeyse tamamı atreziye dönüşen ve gelişmekte olan foliküllerden oluşan bir havuz oluşturur. Ancak ergenlikten sonra gonadotropinlerin uyarılmasıyla her ay yaklaşık 10 antral folikülden oluşan çok küçük bir grup, daha fazla olgunlaşma için toplanır. FSH ve LH'a yanıt olarak granüloza hücreleri ve teka hücreleri, androjenler, östrojenler ve progesteron üretmek için steroidogenezde birlikte rol alırlar. Dominant folikül, FSH üretimini baskılamamanın yanı sıra lokal etki gösteren östradiol ve diğer sinyal faktörlerinin üretimini artırır; böylece dominant olmayan folikülleri atreziye iter, çünkü daha az FSH reseptörüne sahiplerdir ve foliküler atreziyi inhibe eden bir hayatta kalma faktörü olan FSH için rekabette geride kalırlar. Dominant antral folikül olgunlaşmaya devam ettikçe oosit mayoz bölünmeye devam eder. Sonunda, sürekli yüksek östradiol seviyeleri hipofizden üretilen LH ve FSH'da bir artışı tetikleyerek folikül rüptürünü ve kümülüs hücreleri adı verilen destekleyici granüloza hücreleriyle çevrelenen oositin ovulasyonunu tetikler. Bu arada, kalan folikül hücreleri, korpus luteum adı verilen geçici bir endokrin beze farklanır [9].

Folikülogenez sırasında büyüme ve olgunlaşma sürecinde metabolik ihtiyaçları desteklemek için granüloza hücreleriyle oositin fiziksel teması gerekir. Metabolik işbirliği fertilizasyon sonrası embriyonun biyoenerjik gereksinimlerini doğrudan etkiler. Oositlerin veya granüloza hücrelerinin gen ekspresyon profili, bu iki hücre arasındaki farklılığı net bir şekilde ortaya çıkarmıştır.

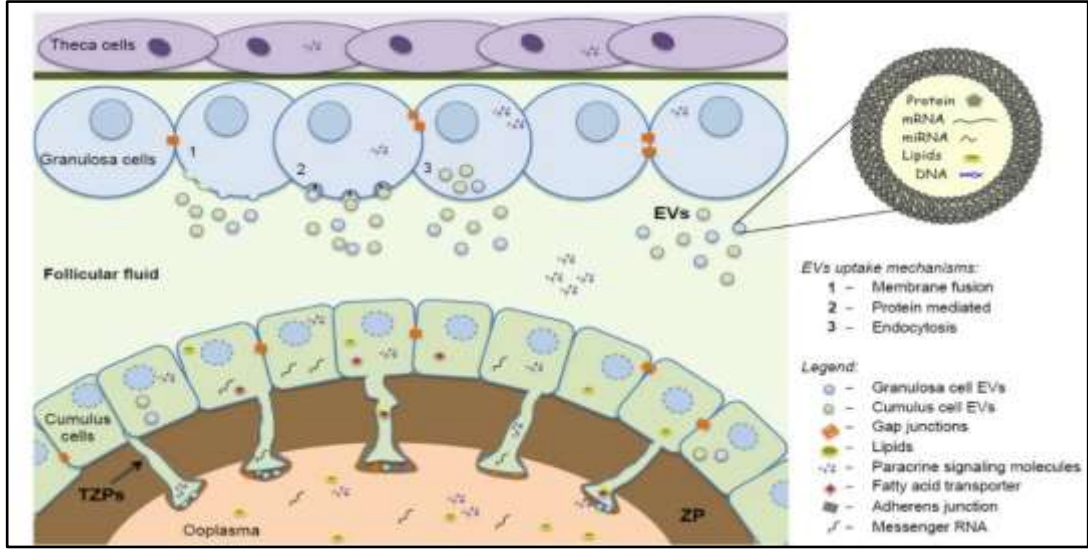
Büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF9) ve kemik morfogenetik proteini 15 (BMP15) gibi oosit tarafından salgılanan faktörler, oositlerde bulunmayan ancak granüloza hücrelerinde işlevsel olan enerji metabolizması ve kolesterol biyosentezinin

modülasyonunda doğrudan rol oynar. Diğer benzer oosit parakrin faktörleri, implantasyon gerçekleşmeden çok önce büyüme, olgunlaşma ve hatta embriyogenez sürecindeki metabolik ihtiyaçları karşılamak amacıyla granüloza hücrelerini etkiler (Şekil 2.2) [10].



**Şekil 2.2.** Teka hücreleri, granüloza hücreleri ve oosit arasındaki parakrin ve otokrin etkileşimler [10].

Oosit ile onu çevreleyen hücreler arasındaki yakın temasın süreç boyunca sürdüğü bilinmektedir. Folikül büyüme aşamasının başlangıcında, oositi çevreleyen pre-granüloza hücrelerinin sayısı sınırlıdır ancak özellikle gamet ile yakın temas halinde olanlarda artış meydana gelir. Pre-granüloza hücrelerinin sitoplazmik membranları başlangıçta yan yana bulunup, zonula adherens ve desmozom yoluyla oosit oolemmasına bağlanır. Folikül ve oosit birlikte büyür, çevredeki somatik hücreler gamet yüzeyini tamamen kaplayacak şekilde bölünerek çoğalır. İlk büyüme aşamaları yavaştır ve tamamlanması aylar sürer. Zona pellusida, granüloza hücrelerini primer oositte aşamalı olarak ayıran bir glikoprotein yapısında tabakadır. Zona pellusida ZP1, ZP2, ZP3 ve ZP4 glikoproteinlerinden oluşmaktadır (Şekil 2.3) [11].



**Şekil 2.3.** Folikülün mikro ortamı içinde çift yönlü iletişim [11].

Bu iletişim folikülogenez için gereklidir ve bilinen temel rollerinden biri mayotik duraklamayı sürdürmek için siklik nükleotidleri oosit sitoplazmasına taşımaktır. Transzonal uzantılar açık uçlu değildir. Moleküller, her iki membranı da kapsayan oluklu bağlantılar aracılığıyla aktarılır. Teka ve granuloza hücreleri tarafından algılanan LH dalgalanması, parakrin etki yoluyla kümülüs hücrelerine iletilir, bu da oluklu bağlantılar yoluyla moleküler transferlerin destabilizasyonuna, kapanmasına veya durmasına yol açar [12]. Böylece kümülüs hücreleri mayoz bölünmenin kesintiye uğraması ile ilgili son kontrolü sağlar. Kümülüs granuloza hücrelerinin bir diğer önemli rolü de oosite enerji substratlarının sağlanmasıdır. Oosit, ATP üretmek için laktat, piruvat ve kreatinin kullanır, bu da transzonal uzantılar aracılığıyla granuloza hücreleri tarafından sağlanır. Oosit sitoplazmasında sayıları 30.000 ila 1.000.000 arasında olduğu tahmin edilen, ancak glikoliz veya oksidatif fosforilasyon yoluyla ATP üretmede verimsiz olan özel mitokondri grubuna sahiptir. Oosit mitokondrisi folikülogenez sırasında konformasyonel dönüşümler geçirerek küçük ve yuvarlaktan, embriyonik genom aktivasyonu tamamlandıktan sonra fertilizasyon sonrası bilinen oval bir forma geçer. Ancak mayoz bölünmenin yeniden başlamasını takiben meydana gelen transzonal uzantıların geri çekilmesine kadar, kümülüs hücreleri oosit için ATP kullanılabilirliğini kontrol eder. Bunun önemi, gamet depolanmış mRNA'nın maternal rezervlerini oluşturmak için genomunu yönetmek,



transkripsiyonunu yapmak ve proteinlerin translasyonu için daha fazla enerjiye ihtiyaç duyar.

### 2.3. Granüloza Hücresi

Granüloza hücreleri ovaryumda yer alan ve ovaryumun fonksiyonel aktivitesinde önemli rol oynayan hücrelerdir. Ovaryumda folikül içindeki gametin gelişimini destekleyen, birbiriyle iletişim kuran, birbirine bağımlı hücreler topluluğudur. Antral folikülün gelişimi büyük ölçüde hipotalamus-hipofiz-gonadal aksı aracılığıyla kontrol edilirken, foliküler olgunlaşma ve oogenez daha çok folikül içi iletişime bağlıdır. Folikülogenez, folikülün tamamen işlevsel hale gelinceye kadar büyüdüğü tüm süreci ifade eder. Ovaryan döngü, FSH tarafından büyümenin uyarılmasını ve granüloza hücreleri tarafından östradiol salgılanması yoluyla negatif geri bildirim mekanizmasını içerir [13].

İmplantasyon için gametlerin, embriyoların ve maternal ortamının kalitesi, gebelik veya canlı doğum elde etmede çok önemli parametrelerdir. Foliküler hücreler (granüloza hücreleri ve teka hücreleri) ve oositler arasında iletişim, karşılıklı etkileşim ile düzenlenir. Oositlerin canlılığı ve üreme potansiyeli hakkında bilgi edinmek için araştırmalarda kümülüs ve granüloza hücreleri kullanılabilir. Spesifik olarak, ovulasyondan sonra oositlere eşlik eden kümülüs hücreleri aynı zamanda oosit beslenmesinde önemli olan birçok sitokin, büyüme faktörü ve steroid salgılama yeteneğine de sahiptir. Hem granüloza hem de teka hücreleri steroid üreten hücrelerdir. Teka hücreleri, granüloza hücrelerinde östrojen sentezinin öncüleri olarak görev yapan progesteron (P4) ve androjenleri sentezler. Östradiol (E2) folikülün hayatta kalmasını, büyümesini, antrum oluşumunu ve oosit sağlığını iyileştirirken, P4 folikülün hayatta kalması üzerinde çok az yararlı etki sağlar [14].

Steroidojenik akut düzenleyici protein (StAR) ve 3-beta hidroksisteroid dehidrojenaz; steroidogenezde yer alan anahtar faktörlerdir, oosit kalitesi ve gebelik sonuçlarıyla ilişkilidir. Mitokondriyonun steroid hormon biyosentezi için kritik organellerdir. Steroid hormonlarının biyosentezinde başlatılan ve hız sınırlayıcı adım, kolesterolün mitokondriye transferidir ve bu da StAR tarafından kolaylaştırılır. Bu nedenle, sağlam bir mitokondriyal membran potansiyeline sahip fonksiyonel

mitokondriyonun granüloza hücre steroidogenezini kolaylaştırdığı gösterilmiştir [15]. Çalışmalar, ayırıcı karbonil siyanür m-klorofenil hidrazonun mitokondriyal membran potansiyelini bozduğunu ve StAR'ın mitokondriyal matrikse taşınmasını önlediğini bildirmiştir [16]. Ayrıca hücelere Fo/F1 ATP inhibitörü olan oligomisin eklenmesi, ATP sentezinde StAR protein ekspresyonunda ve P4 üretiminde azalmaya neden olur. Ayrıca diğer bazı çalışmalarda, mitokondriyal DNA (mtDNA) 4977 bp silinmesi gibi granüloza hücrelerinde mitokondriyal genom mutasyonlarının ortaya çıkmasının, granüloza hücre apoptozu ile ilişkili olduğunu göstermiştir. Mitokondriyonun kadın üreme süreçlerini kontrol eden anahtar organel olduğu gösterilmiştir. Dejenere granüloza hücreleri ve kümülüs hücrelerinin mitokondriyal şişme ile ilişkili olduğu, hücre apoptozuna ve folikül atrezisine yol açtığı gösterilmiştir. Çalışmalarla, endometriozis ve PKOS hastalarında granüloza hücre sayısında azalma, hücre canlılığında azalma ve insan granüloza hücrelerinde mitokondriyal anormalliklerde artış bulunduğunu ortaya çıkarmıştır [14]. Son araştırmalar, endometriozis veya PKOS'lu hastaların granüloza hücrelerinde mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve mutasyon olduğunu göstermiştir. Granüloza hücreleri folikül ve oosit sağlığının kritik ve önemli sensörleridir. Granülozadaki mitokondriyonun oosit kalitesi ve fertilizasyon kapasitesinin korunmasında kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir [17]. Granüloza hücrelerinin mitokondriyal disfonksiyonunun, steroidogenez, oosit olgunlaşma hızı ve fertilizasyon oranındaki küresel düşüşe katkıda bulunabileceği ve sonuçta fertilitiyi tehlikeye atabileceği gösterilmiştir [14].

Folikül gelişimi sırasında, oosit içindeki mitokondriyon, mitokondriyal biyogenez yoluyla önemli miktarda sayısal genişlemeye maruz kalırken, mitokondriyal otofajiye yönelik mekanizmalar embriyogenezin 4-8 hücre aşamasına kadar gizli kalır. Ovulasyon zamanında mitokondriyal biyogenez durur ve implantasyon zamanı civarındaki blastosist aşamasına kadar devam etmez. Bu nedenle, her hücre bölünmesi sırasında mitokondriyal içerik ve mtDNA kopya sayısı hücre başına azaltılır ve blastosistin başarılı bir şekilde geliştirilmesi ve ardından implantasyon için kritik bir eşik sayısını korur [18].

Her ne kadar hem teka hem de granüloza hücreleri endokrin fonksiyonuna katılsa da, granüloza hücreleri, parakrin faktörlerin yanı sıra oluklu bağlantı yoluyla

çalışan çift yönlü iletişim ile özellikle oosit ile uyum içinde çalışır ve bu da sonuçta fertilizasyona uygun oositlerin büyümesi ve olgunlaşmasıyla sonuçlanır [18].

Steroidogenez için iki hücreli modelde, progesterinler ve androjenler teka hücrelerinde sentezlenir, komşu granüloza hücrelerinde östrojenlere dönüştürülür. Granüloza hücreleri de progesterinler üretir. Steroidogenez süreci, steroid hormon biyosentezi için gerekli özel enzimleri barındıran steroidojenik hücreye özgü mitokondriyona bağlıdır. Granüloza ve teka hücrelerinin yanı sıra mitokondriyonun steroid hormon üretimindeki rolü bilinmektedir. Spesifik olarak granüloza hücrelerinde mitokondriyon, steroid hormon üretimine entegre olan iki süreç için de kritik öneme sahiptir; kolesterolün mitokondriyona taşınması ve kolesterolün enzimatik olarak steroid hormonlara dönüştürülmesidir [19].

#### **2.4. Ovulasyon**

Ovulasyon öncesi, LH artışı teka ve granüloza hücreleri tarafından algılanır; cAMP akışını durdurarak yanıt veren epiregulin, amfiregulin, betaselülin, neuregulinler ve diğerleri gibi epidermal büyüme faktörü sinyal yoluyla kümümlüs hücrelerine iletilir. Böylece oositte mayozun yeniden başlamasını tetikler. Buradaki cAMP akışı endokrin değildir, daha çok kümümlüs hücrelerinden zona pellusida boyunca uzanan ve oolemma ile doğrudan temas kuran transzonal projeksiyonlar olarak adlandırılan, tübül kanallar yoluyla meydana gelir [13].

Ovaryum dışında doğrudan oosit üzerinde etkili olan hiçbir sinyal yolu bulunmamaktadır. Aslında oositin FSH veya LH için reseptörleri yoktur ve hatta komşu hücrelerde gonadotropin reseptör ekspresyonunun baskılayıcılarını salgılar. Bu nedenle dış sinyallerini ara hücreler aracılığıyla alır. Tirozin kinaz reseptörü (cKit) oosit ve teka hücrelerinde eksprese edilirken, KIT ligandı granüloza hücreleri tarafından salgılanır ve oosit büyümesi ile birlikte teka hücre farklanmasını etkiler [20].

Transzonal uzantılar, folikülogenezin sekonder aşamasının sonunda meydana gelen zona pellusida ile ortaya çıkar. Bu, gamete yakın hücrelerin kümümlüs hücrelerine farklandığı, daha uzaktakilerin ise granüloza hücreleri olarak kaldığı bir evrenin

başlangıcını gösterir. İnsan oosit komplekslerindeki transzonal uzantıların sayısının folikülogenez sırasında arttığı gösterilmiştir. Hücresel uzantılar statik yapılar olmayıp büyüyen folikül içinde değişir. Çoğu transzonal uzantı aktin filamentlere sahipken, bazıları mikrotübüller de içerir [21].

İn-vitro fertilizasyon çalışmalarında ortaya konduğu gibi oogenezin geç aşamalarında bile denüde oositlerin mayoz bölünmeye devam etmediği gözlenir. Denüde oositler bazen tamamen kümülüs-oosit kompleksleri ile çevrili ko-kültür yoluyla değerlendirilir. İn-vitro koşullarda gruplar halinde olgunlaşan oositlerin bireysel olarak olgunlaşanlara göre genellikle daha iyi sonuç verdiği rapor edilmiştir. İn-vitro oosit maturasyonu sırasında çoğalan kümülüs hücreleri gameti çevreleme eğiliminde olduğundan, matür oositin izolasyonunu zorlaştırır. Kümülüs hücrelerinin bir oositten ayrılıp komşu denüde oosite yeniden bağlandığı gözlemlenmiştir. Bu tür yeni bağlantıların işlevsel olduğu, oositin olgunlaşmasını desteklemeye önemli katkılarda bulunduğu ve çeşitli faktörler salgılayarak yakınındaki oositlerin olgunlaşmasına yardımcı olduğu görülmüştür [22].

Oositler, granüloza hücreleri ve foliküler sıvıdan oluşan bir çevrede folikül içinde gelişir. Antral folikülde, granüloza hücrelerinin özel bir alt grubu olan kümülüs hücreleri transzonal projeksiyonlarındaki oluklu bağlantılar yoluyla oosite bağlanır ve kümülüs-oosit kompleksi adı verilen bir yapı oluşturur. Oosit ve kümülüs hücrelerinin metabolik olarak birbirine bağımlı olduğu bilinmektedir. Kümülüs hücreleri, oosit ve çevresi arasında biyolojik bir bariyer görevi görürken, küçük düzenleyici faktörlerin ve metabolitlerin folikül ile fiziksel transferine izin verir. Kümülüs hücreleri oositin metabolize edemediği glikoz gibi ürünleri metabolize eder. Aynı zamanda oositlerdeki glutasyon içeriğinin arttırılmasını sağlar, antioksidan katalaz üretimi yoluyla oositi oksidatif stresin neden olduğu hasarlardan korur. Oositlerin metafaz II aşaması ile mayotik olgunlaşması, glikoliz yoluyla piruvat ve laktat üreten kümülüs hücreler tarafından desteklenir. Öte yandan, kümülüs hücreleri de oosit yokluğunda metabolik olarak yetersizdir. Granüloza hücrelerinden kümülüs oosit kompleksi oluşumu GDF9 ve BMP15 oosit tarafından salgılanan faktörler tarafından düzenlenir [3].

## 2.5. Ovariyan Metabolizma ve Homeostaz

Hücrel besin sensörleri hipotalamusta, hipofizde ve ovaryumda bulunur; burada lokal metabolitleri veya enerji taşıyan molekülleri etkiler, kadın üreme sisteminin işleyişini yönetmek için farklı hücrel etkenlerle iletişime girer. Bu besin sensörleri dişi üreme fonksiyonu üzerinde doğrudan veya dolaylı etkiler yaratır. Gamet, kendisini çevreleyen hücrelerle önemli bir ortaklık içindedir. Bu arada oosit, foliküler büyümenin sürdürülmesini sağlar. GDF9 ve BMP15 gibi faktörler aracılığıyla, granüloza ve teka hücreleri arası iletişim, folikülün büyümesini, farklılaşmasını ve ölümünü düzenler.

Ovaryumda artan amino asitlere ve büyüme sinyallerine yanıt olarak anabolik süreçleri destekleyen rapamisinin protein kompleksinin memeli hedefi (mTOR), diğer metabolik açıdan önemli fonksiyonların yanı sıra primordiyal folikül aktivasyonu ve granüloza hücre çoğalmasının düzenlenmesinde rol oynar. Benzer şekilde, hücrel enerjideki azalma ile etkinleşen bir besin sensörü olarak AMPK, puberte ile oosit olgunlaşmasına kadar uzanan organizmanın enerji homeostazisinin korunmasında rol oynar [9]. Hücrel besin sensörleri, besin algılama fonksiyonlarının yanı sıra, metabolik hormonların üreme fizyolojisindeki bazı etkilerini yönlendirici sinyal araçlarıdır. Adiponektin, mTOR inhibisyonunu ve AMPK aktivasyonunu indükleyebilirken, insülin kaskadı, mTOR aktivitesini artırma ve AMPK'yi inhibe etme kapasitesine sahiptir. Ancak bu ilişkilerin üreme işlevleri sırasında tanımlanması, dokuya özgü ve reseptör etkileşimler nedeniyle karmaşık hale gelmektedir [23].

Oositin gelişimi somatik hücrelere göre daha fazla enerji tüketir ve bunun avantajı embriyo gelişiminin ilk günleri için gerekli olan enerji üretimi için yeterli substratı sağlamasıdır. Bu nedenle, oositin iyi dengelenmiş enerji metabolizması, embriyo gelişimini ve kalitesini etkiler. Memeli hücresi için en yaygın enerji kaynakları glikoz veya yağ asitleridir. Hücrenin sitozolüne girerler ve asetil-CoA'ya dönüşürler, bu da sonunda enerji üretimi için ATP'ye oksitlenir. Yağ asitleri  $\beta$ -oksidasyon yoluyla kullanılırken, glikoz esas olarak glikoliz, pentoz fosfat yolu ve heksozamin yolu için substrattır. Her iki substratın oksidasyonu mitokondriyonda gerçekleşir. Yağ asitleri glikoza göre çok daha yüksek miktarda enerji elde edilmesini sağlar. Enerji üretimi süreçleri hassas bir şekilde kontrol edilir ancak aynı zamanda

hücrenin çevre koşullarına uyum sağlar. Metabolik dalgalanmaların temel nedenleri enzimlerin, substratların varlığından ve enzimlerin katalitik aktivitesinden kaynaklanmaktadır. Sınırlı substrat varlığı, hücrenin tercih edilen enerji metabolizması yolunu seçmesine değil, o anda var olan en uygun yolu kullanmasına yol açar.

Fertilite beslenme gibi fizyolojik birçok süreci birleştiren karmaşık bir düzenlenim içerir. Tüm bu parametreler yalnızca genel metabolik süreçleri etkilemekle kalmaz, aynı zamanda annenin lipid veya glukoz metabolizması bozuklukları yoluyla oosit ve embriyo kalitesini de etkileyebilir [24]. İnsanlarda aşırı kilolu veya obez kadınlarda gebelik ve canlı doğum oranları azalmış ve oosit kalitesi önemli ölçüde azalmıştır. Kümüls-oosit kompleksleri enerji metabolizmalarını glikoza dayandırır ve olgun kümülüs oosit kompleksleri, olgunlaşmamış olanlara göre iki kat daha fazla glukoz ve piruvat tüketir [25]. Oositin fertilizasyona hazırlanması sürecinde meydana gelen değişiklikler enerji ihtiyacının yüksek olduğunu gösterir. Oositin kendisi, düşük fosfofruktokinaz aktivitesi nedeniyle düşük glukoz metabolizması kapasitesine sahiptir. Ayrıca hidrofilik yapısı nedeniyle, glukoz membran boyunca yayılamaz ancak çözülmüş taşıyıcı ailenin besin taşıyıcıları aracılığıyla taşınır. Bu nedenle oositler GLUT taşıyıcıları nedeniyle *in vivo* veya *in vitro* maturasyon ortamında foliküler sıvıdaki glikozu absorbe eden kümülüs hücrelerinin metabolizmasından etkilenir [26]. Kümüls hücre katmanlarında glikozun geçişi dış katmanlardaki hücreler tarafından alınıp; hem kolaylaştırılmış transport hem de difüzyon yoluyla oluklu bağlantıları kullanarak korona radiataya ve oosite ilerlemesiyle gerçekleşir. Yüksek fosfofruktokinaz aktivitesi nedeniyle kümülüs hücreleri glikozu piruvat, laktat veya NADPH'ye dönüştürür ve bunlar ayrıca oositlere aktarılır. Piruvat ve laktat daha sonra TCA yoluyla metabolize edilir ve bunu oosit gelişimi için gerekli olan enerji oksidatif fosforilasyon yoluyla elde edilir. Oosit de kümülüs hücrelerindeki glikolitik genlerin artışını düzenleyerek piruvatın kullanımını sağlar. Piruvat, oosite doğrudan taşınması dışında kümülüs hücreleri tarafından da salgılanabilir ve oosit tarafından çevredeki ortamdan toplanabilir. Glikolizin up regülasyonu, oosit maturasyonuna bağlı olarak oosit tarafından salgılanan parakrin faktörler tarafından gerçekleştirilir, sadece maturasyonunu tamamlamış oosit bu kapasiteye sahiptir [27].

### 2.5.1. Enerji Metabolizması ve Mitokondriyal Fonksiyon

Granüloza hücrelerinin temel işlevlerinden biri oosit olgunlaşması için gerekli olan metabolitleri ve besin maddelerini taşımaktır. Foliküllerdeki granüloza hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması oosit olgunlaşmasıyla eş zamanlı gerçekleşir ve bu iki hücre metabolik olarak birbirine bağlıdır. Granüloza hücrelerinin mitokondriyonları tarafından üretilen piruvat, oositin glikozu metabolize etme kapasitesinin yetersiz olması nedeniyle oosit olgunlaşması sırasında temel enerji kaynağıdır.

Granüloza hücreleri, foliküler mikroçevredeki glikozu glikoliz yoluyla metabolize eder ve üretilen kendi piruvatlarını oluklu bağlantı yoluyla oosite sağlar.

Mitokondriyal genetik bozuklukların çoğu, oosit yoluyla anneden kalıtsaldır; bu nedenle annenin mitokondriyal genomu kritiktir. Fertilizasyon sonrası olaylar için fetüsün büyük miktarda enerjiye ihtiyacı vardır. Yine de mtDNA'daki mutasyonlar oksidatif fosforilasyon yolunu ve hücresel enerji üretimini bozarak düşüklere yol açar. Sperm gibi, oositteki mtDNA kopyalarının sayısı da hücre çoğalmasıyla doğrudan ilişkilidir; öyle ki, çoğalamayan hücreler, diğer hücrelere göre önemli ölçüde daha az mtDNA kopyasına sahiptir. Sonuç olarak, yetersiz mitokondriyal biyogenez veya sitoplazmik olgunlaşma nedeniyle düşük mtDNA içeriği oosit fertilitatesini olumsuz yönde etkileyebilir. Düşük mtDNA sayıları yaşlı kadınlarda infertilitenin önemli bir nedenidir [28].

Mitokondriyon, oosit olgunlaşması, fertilizasyon ve erken embriyonik gelişim sırasında transkripsiyon ve translasyonu desteklemek için enerji ve yapı taşları sağlar. Oositlerdeki mitokondriyonun kalitesi, oositin ve gelişen embriyonun kalitesini belirler [29]. Mitokondriyon, hücresel fonksiyon için gerekli olan çok sayıda metabolik, epigenetik, kalsiyum sinyalizasyonunu ve redoks sürecini koordine eder dolayısıyla da mitokondriyal fonksiyon bozukluğunun oosit yaşlanmasına önemli katkıda bulunduğu tartışılmaktadır [29].

Oositler oksidatif fosforilasyon yoluyla enerji üretirler. Oositin biyoenerjetik durumu onun gelişimsel yeterliliğini etkiler; önceki araştırmalar mitokondriyal

membran potansiyelinin ve oosit ATP içeriğinin embriyonik implantasyon yeterliliğini etkilediğini göstermiştir. Oositlerdeki mitokondriyal membran potansiyeli yaşlanmayla birlikte kademeli olarak değişmektedir ve mitokondriyal aktivitenin oosit gelişim yeterliliğinin bir göstergesi olduğu bilinmektedir. Yaşlı oositlerin maksimum solunum kapasitesi, ATP'ye bağlı solunum seviyelerinin azalmasıyla birlikte önemli ölçüde azalır. Azalan ATP üretimi, metabolik aktivitenin azalmasına yol açar ve ayrıca hücre döngüsü düzenlemesini, mitotik içciklerin oluşumunu, kromozomların ayrılmasını, fertilizasyonu, embriyo gelişimini ve implantasyonu etkiler. Başarılı oosit olgunlaşması için dengeli enerji tüketimi çok önemlidir ve uygunsuz mitokondriyal fonksiyon, son zamanlarda oosit gelişim yeterliliğinde strese bağlı bir azalma ile de ilişkilendirilmiştir. Bu kapsamda optimal mitokondriyal enerji üretimi, bir oositin fonksiyonel yeterliliğini ve fertilizasyondan sonra gelişen embriyo için önemli olduğunu gösterir [29].

## **2.6. Hücrede Enerji Stresi ve AMPK - AICAR İlişkisi**

Hücrelerin hayatta kalabilmesi için yeterli miktarda besin ve enerjiye ihtiyaçları vardır. Besinlerin ve enerjinin tükenmesi metabolik strese neden olur. Metabolik stres, hücre içi ATP'nin tükenmesi ve bunun sonucu hücre içi AMP seviyelerinde ortaya çıkan artış ile karakterizedir.

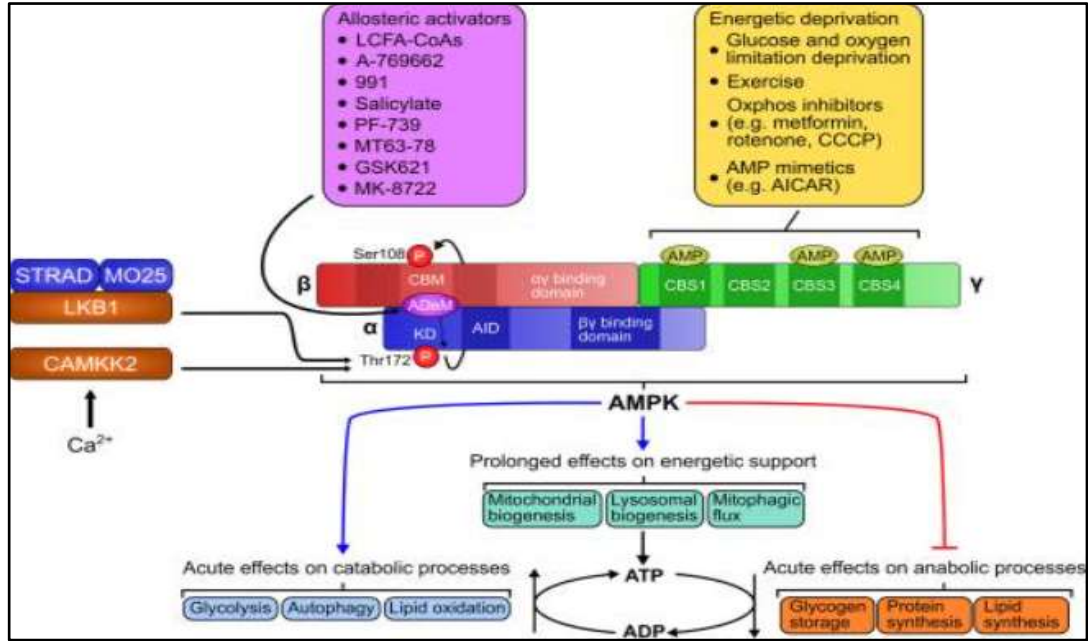
Enerji stresi başlangıçta enerji homeostazisini yeniden kurmaya çalışan adaptif tepkileri tetikler. Enerji stresinin neden olduğu önemli bir adaptif tepkiye, hücrenel enerji durumunun kritik bir sensörü olan AMPK aracılık eder. Enerji stresine yanıt olarak AMPK, AMP bağlanması, artan kinaz fosforilasyonu ve diğer mekanizmalar yoluyla etkinleştirilir. AMPK, aktive edildikten sonra, ATP üreten katabolik süreçleri uyarır ve ATP tüketen anabolik süreçleri engelleyerek enerji dengesini yeniden sağlar. Böylece enerji stresi koşulları altında hücre hayatta kalır. Bununla birlikte, aşırı ATP tükenmesi ile birlikte uzun vadeli enerji stresine bu tür adaptif tepkiler enerji dengesini sağlayamaz ise hücrenin apoptozu tetiklenir [30].

Enerji homeostazisinin korunması ve besin maddelerinin düşük olduğu dönemlerde adaptif tepkilerin yürütülmesi, tüm hücrelerin kritik işlevleridir. Etkili bir şekilde tüm ökaryotik hücrelerde hücrenel enerji durumunun temel sensörü AMPK'dır.



Genel olarak AMPK, AMP:ATP ve ADP:ATP oranlarındaki artışları algılayarak enerji stresine yanıt olarak etkinleşir ve ATP üreten katabolik süreçleri teşvik ederken ATP tüketen anabolik süreçleri inhibe ederek enerji dengesini sağlar. AMPK'nın aktivitesi, çoklu artan sinyaller tarafından kapsamlı bir şekilde düzenlenir. AMPK'nın bir enerji sensörü olarak primer rolü metabolizmayı koordine etmektir. Bu nedenle, AMPK'nin metabolizmayı yeniden programlama yeteneği, çeşitli metabolik hastalıkların özellikle diyabetin, aynı zamanda obezite, inflamasyon ve kanserin tedavisinde terapötik bir yol olarak araştırılmasına dikkatlerin yoğunlaşmasına yol açmıştır [31].

AMPK, bir katalitik alt birim ( $\alpha$  alt birim) ve iki düzenleyici alt birimden ( $\beta$ - ve  $\gamma$ -alt birimler) oluşan trimerik bir kompleks olarak bulunur. Memelilerde,  $\alpha$ -alt birimi iki izoformla kodlanır ve  $\beta$ - ve  $\gamma$ -alt birimleri sırasıyla iki ve üç izoformla kodlanır [32]. AMPK izoformlarının ekspresyon seviyeleri dokular arasında farklılık gösterir bu da farklı hücre tiplerinde farklı alt birim kombinasyonlarına yol açar. Her ne kadar farklı kompleksler işlevsel olarak çoğunlukla inaktif olsa da, farklı biyokimyasal özellikler sergileyebilir. AMPK $\alpha$ 1, AMPK $\beta$ 1 ve AMPK $\gamma$ 1 her yerde eksprese edilirken diğer izoformlar daha kısıtlı bir ekspresyon gösterir. AMPK  $\alpha$ 2, baskın  $\alpha$  alt birimi iskelet ve kalp kasında yüksek seviyelerde eksprese edilirken, karaciğerde ve diğer dokularda daha düşük seviyelerde eksprese edilir. Benzer şekilde AMPK $\beta$ 2, iskelet ve kalp kasında baskınken diğer birçok dokuda daha düşük seviyelerde bulunur. AMPK $\gamma$ 2 ve AMPK $\gamma$ 3'ün ekspresyonunun iskelet ve kalp dokusuyla sınırlı olduğu görülmektedir [31].



Şekil 2.4. AMPK yapısı [33].

Hücre içi enerji seviyeleri AMPK aktivitesinin temel belirleyicisi olmasına rağmen AMPK, reaktif oksijen türlerinin (ROS) hücrese seviyesine karşı oldukça duyarlıdır. Çoğu durumda oksidatif stres, hücre içi ATP tükenmesine neden olur. Ancak son çalışmalar, ROS'un hücrese ATP'de bir azalma olmadan bile AMPK aktivitesini uyarabildiğini ortaya çıkarmıştır. AMPK  $\alpha$  alt ünitesinin oksidatif modifikasyonu, AMPK'nın oksidatif stres koşulları altında aktive edilmesini sağlayan temel mekanizma gibi görünmektedir. Bu nedenle, hücre içi ROS oluşumunu indükleyebilen herhangi bir modülatör, ATP seviyelerinde azalma olmadan AMPK'yi aktive edebilir [34].

AMPK aktivatörü, 5-aminoimidazol-4-karboksamid ribozit (AICAR), adenosin taşıyıcıları tarafından hücrelere alınan ve adenosin kinaz tarafından fosforile edilen ve böylece AMP-mimetik AICAR monofosfatı (ZMP) üreten bir adenosin analogudur. Hücrese AMP'ye benzer şekilde ZMP, AMPK $\gamma$  alt birimindeki 3. bölgeye bağlanır. ZMP, ADP:ATP oranını değiştirmez veya mitokondriyal fonksiyonun inhibisyonu yoluyla birçok AMPK aktivatöründe meydana gelen oksijen alımını değiştirmez. ZMP, AMP'den çok daha zayıf bir AMPK aktivatörü olmasına rağmen, AICAR çoğu hücrede AMPK'yi doğrudan aktive eder çünkü ZMP, hücrelerde milimolar konsantrasyonlara kadar birikebilir. ZMP, pürin nükleotid sentetik

yolundaki doğal bir ara maddedir ve pürin nükleotid inosinatın sentezini katalize eden AICAR transformilazı tarafından metabolize edilir [34]. AMPK aktivasyonu, yağ asidi sentezini inhibe ederek ve yağ asidi oksidasyonunu teşvik ederek yağ asidi metabolizmasını düzenler [35]. Metformin ve AICAR'ın, AMPK farmakolojik aktivatörü olarak bilindiği rapor edilmiştir. AMPK, hücre içi ve tüm organ seviyelerinde enerji metabolizmasının düzenlenmesinde doğrudan rol oynadığına bilinen, heterotrimerik komplekse sahip, enerjiyi algılayan bir enzimdir. Hem enerji üreten yolların hem de enerji tüketen metabolik süreçlerin azalması AMPK tarafından kontrol edildiği bilinmektedir.

AICAR, AMPK'nın farmakolojik aktivatörü olarak kullanılmaktadır. AICAR'ın adenosin kinaz tarafından 5-aminoimidazol-4 karboksamid ribotide (ZMP) dönüştürülür. ZMP, AMP ile yapısal benzerliğine göre AMPK sinyal yolunu aktive eder[36].

### **2.6.1 AMPK ile Mitokondriyal Dinamiklerin Regülasyonu**

Mitokondriyon, dinamik ve birbirine bağlı bir ağ oluşturmak için sürekli olarak füzyon ve bölünme olaylarına maruz kalan oldukça hareketli organellerdir. OXPHOS'u, mitofajiyi ve apoptozu modüle etmek için farklı mitokondriyal morfolojiler gözlenmektedir. Özellikle, uzun mitokondriyon stres sırasında ATP üretimini sürdürdüğü, mitokondriyi mitofajiden koruduğu ve besin açlığı sırasında lipidler dahil biyomateryalleri dağıttığı ileri sürülmektedir [37] .

Buna karşılık, mitokondriyal solunum zinciri inhibitörleri de dahil olmak üzere diğer hücrel hareketlere yanıt olarak mitokondriyon, uygun membran potansiyeline sahip olmayan mitokondriyal parçalarının mitofajisini kolaylaştırır ve zamanında apoptoza izin vererek parçalanmaya maruz bırakır.

Mitokondriyal depolarizasyon ve mitokondriyal ATP sentezi inhibisyonu dahil olmak üzere çevresel koşulları, mitokondriyal füzyon oranlarını artırarak ve/veya mitokondriyal füzyon oranlarını azaltarak mitokondriyal parçalanmayı tetiklediği uzun zamandır bilinmektedir. Bununla birlikte, mitokondriyal inhibitörlerin

mitokondriyal ağın şeklini etkileme mekanizması, özellikle mitokondriyal membran potansiyelini etkilemeyen mitokondriyal inhibitörler için açıkça belirlenmemiştir .

Hücrede solunum zinciri inhibitörleri gibi mitokondriyal fragmentasyona neden olan uyaranlar da AMPK'nın güçlü aktivatörleridir. Mitokondriyal solunum zincirinin sırasıyla kompleks I ve kompleks III'ün inhibitörleri olan rotenon ve antimisin A tarafından indüklenen mitokondrinin parçalanması için AMPK'nın gerekli olduğu gösterilmiştir [38]. Mitokondriyal hasarın yokluğunda ise doğrudan AMPK aktivasyonu, mitokondriyal fisyonu tetiklemek için yeterlidir. Bundan dolayı AMPK'nın mitokondriyal dinamikler için önemli ve doğrudan düzenleyicisi olduğu ortaya konmuştur. AMPK'nin yeni substratlarını tanımlamak için yapılan proteomik ve biyoinformatik çalışmalar, mitokondriyal fisyonun çekirdek bileşeni olan mitokondriyal fisyon faktörü (MFF) üzerinde iki fosforilasyon bölgesini (Ser155 ve Ser173) tanımlamıştır. Mitokondriyal fisyon faktörü (MFF), mitokondriyal dış membran üzerindeki, fisyon sırasında mitokondrinin daralmasına aracılık eden Dinamin Benzeri Protein'in (DRP1) primer reseptörüdür. MFF'nin Ser155 ve Ser172 üzerinde AMPK tarafından fosforilasyonu, ETC inhibisyonundan sonra mitokondriyal parçalanma için AMPK'nin gerekliliğini ortaya koyar. Bu da mitokondriyal parçalanma için tek başına AMPK aktivatörlerinin yeterli olduğunu açıklayan potansiyel bir mekanizmadır. AMPK'nin aktivasyonu, DRP1'in mitokondride artışına bağlı olarak MFF'deki AMPK fosforilasyon bölgelerinin varlığına etki eder. Böylece AMPK, MFF'yi fosforile ederek ve DRP1'in lokalizasyonunu kontrol eder ve enerji stresi sırasında mitokondriyal ağın şeklini akut bir şekilde düzenler [38].

## 2.7. Polikistik Over Sendromu

Polikistik over sendromu (PKOS), yüksek androjen seviyeleri (hiperandrojenizm), kistik veya genişlemiş ovaryum, ovulasyonun olmaması gibi ovulasyon işlev bozukluğu, adet düzensizlikleri veya amenore ile karakterize oldukça yaygın bir endokrin-metabolik bozukluktur. Ayrıca PKOS sıklıkla infertilite, obezite, bozulmuş glukoz metabolizması ve insülin direnci, bozulmuş lipid profili, yüksek tansiyon ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir. Bazı çalışmalar renin anjiyotensin sistemi (RAS) PKOS'lu kadınlarda upregule olduğunu göstermiştir.

Histolojik PKOS tanısı alan kadınlar, büyük kistik foliküllerin hem teka hem de granüloza hücrelerinde renin ve anjiyotensin için yoğun işaretlenme sergilerken, normal oosit foliküllerinde immün boyama, teka hücre tabakasıyla sınırlıdır. PKOS hastalarında endometriyumda RAS bileşenlerinin ekspresyonunu değerlendirmiş ve ACE2 , AT1, AT2 ve MAS reseptörlerinin mRNA ekspresyon düzeyi PKOS tanılı kadınların endometriumunda yüksek bulunmuştur [39].

PKOS kadınlarda en sık görülen endokrin ve metabolik bozukluk hastalığıdır. Bu durum hipotalamo-hipofiz-ovaryan aksı bozukluğu, foliküler hücreleri veya granüloza hücreleri disfonksiyonu ve metabolik anormalliklerin bir sonucu olabilir. PKOS, düşük oosit kalitesi ve üreme yardımcı teknikleri ile klinik gebelik oranları dahil olmak üzere belirli üreme sağlığı komplikasyonlarıyla ilişkilidir. Yaşlanma karşıtı bir ajan olan metformin, PKOS tedavisi için onaylanmıştır [40]. Klinik ve gözlemsel çalışmalar, metforminin SIRT1 ile ilişkili yolaklar aracılığıyla PKOS'u önleyebileceğini veya hafifletebileceğini bulmuştur. Artmış testosteron seviyesi PKOS hastalarının patolojik özelliğidir ve PKOS hastaları Res ile tedavi edildiğinde serum testosteron seviyesi düşmekte, sekonder folikül sayısı artmakta, Graafian foliküller ise azalmaktadır. Ayrıca, metformin ve Res kombinasyonunun SIRT1 ve AMPK'yi aktive ederek PKOS'un antioksidan ve anti-inflamatuar sistemlerini indüklediği ve böylece PkOS'un kilo alımını, hormon seviyelerini ve foliküler hücre yapısını iyileştirdiği bulunmuştur. Tao ve arkadaşları, dehidroepiandrosteron ile indüklenen PKOS sıçan oluşumunda, PKOS grubundaki SIRT1 ekspresyonunun kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha düşük olduğunu ve östrus döngüsünün kaybını, folikülün dilatasyonunu, luteal sayının azaldığını ve foliküler hücre tabakasının kalınlaştığını göstermiştir. İnsan ovaryum granüloza hücrelerinde SIRT1'in devre dışı bırakılması östrojen sentez aktivitesini ve aromatazı inhibe eder. Daha önceki çalışmalarla SIRT1'in histon dışı aktiviteyi düzenlediğine ve aromataz transkripsiyon düzenlemesini etkilediği gösterilmiştir. SIRT1, PKOS'un oluşumunda ve gelişiminde önemli bir rol oynar ve bu da PKOS'un metabolizmasını ve üreme işlevini iyileştirmek için potansiyel terapötik yöntemlerin geliştirilmesi için bir temel sağlar [40].

Granüloza hücrelerinin disfonksiyonunun, anovulasyona ve anormal folikülogeneze neden olduğu bilinmektedir. PKOS'ta granüloza hücrelerinin mitokondriyal fonksiyon bozukluğu aynı zamanda oosit olgunlaşmasını ve gelişimini de etkiler. Ayrıca, düşük mtDNA kopya sayısına sahip oositlerin gelişme potansiyeli önemli ölçüde azalır, böylece blastosist oluşumu azalır; bu da PKOS'lu hastaların anovulasyon ve fertilitate gibi yaygın semptomlarıyla tutarlıdır. Granüloza hücrelerinin, foliküler gelişim ve olgunlaşmanın sonraki aşamalarında folikülün iç ortamının stabilitesinin sürdürülmesinde rol oynayan iki enerji metabolizma yoluna (mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ve glikoliz) sahiptir. Stabil mitokondriyal fonksiyon, foliküler gelişim sürecinde granüloza hücrelerinin enerji modunun glikoliz moduna dönüşümünü destekler. Ovaryum granüloza hücrelerinin enerji metabolizması fonksiyonundaki hasar, PKOS'lu hastalarda oosit geliştirme yeterliliğinin azalmasından sorumlu mekanizmalardan biri olabilir. Çalışmalar, granüloza hücrelerinin mitokondriyal fonksiyonunun ve glikolitik aktivitesinin, yüksek kaliteli oosit üretimi ve başarılı embriyonik gelişim için çok önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır. Granüloza hücrelerinde anormal enerji metabolizması disfonksiyonunun varlığı, insan üremesindeki ovulatuvar bozukluklarda gözlenen bozulmuş folikülogeneze de katkıda bulunabilir. Bununla birlikte, HIF-1 aktivitesinin insan primer granüloza hücrelerinde enerji metabolizması değişimini etkilediği mekanizmalar ve ayrıca PKOS hastalarda oosit geliştirme yeterliliğindeki azalmanın altında yatan mitokondriyal fonksiyon araştırılmamıştır. Bu konuyla ilgili daha ileri araştırmalara ihtiyaç vardır [41].

Oosit kalitesinin düşük olması nedeniyle PKOS'lu hastalarda in vitro fertilizasyonun (IVF) başarı oranı düşüktür. PKOS'ta oosit kalitesinin düşük olmasının temel nedeni henüz tam olarak anlaşılamamış olsa da, muhtemelen oositleri çevreleyen granüloza hücreleri bir enerji kaynağı sağlayarak oositlerin farklılaşmasında ve olgunlaşmasında önemli rol oynamaktadır; dolayısıyla granüloza hücrelerinin işlev bozukluğu olgun folikül sayısında azalmaya yol açabilir. Yüksek reaktif oksijen türleri (ROS) düzeyinin PKOS da dahil olmak üzere bir dizi kadın üreme hastalığıyla korelasyonu rapor edilmiştir ve artan ROS'un glikolitik enzim üzerindeki inhibitör etkisi yakın zamanda gözlemlenmiştir. Oosit ATP seviyesi, çevredeki granüloza hücrelerinin sayısı ve granüloza hücrelerinin glikoz alım hızı ile doğrudan ilişkilidir.

Bu nedenle PKOS'ta daha fazla sayıda olgunlaşmamış folikül varlığının, granüloza hücrelerinde glikoliz yolu düzenleyici enzimlerin ekspresyonundaki azalmaya bağlı olabileceği öne sürülmektedir. Ayrıca, yüksek düzeyde ROS ve düşük ATP içeriğinin, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile birlikte PKOS'ta olgunlaşmamış foliküllerin varlığıyla eş zamanlı olabileceğine inanılmaktadır [42].

## 2.8. Azalmış Over Rezervi

Over rezervi, doğumdan itibaren ovaryumda bulunan oosit sayısını ifade eder ve menarş yaşından önce yaklaşık 400.000 oosit varlığını sürdürür. Oositler, foliküler atrezi ve ovülasyon nedeniyle yaşla birlikte azalır ve menopoz döneminde 1000'den az oosit bulunur. Over rezervini tespit etmek için doğrudan bir yöntem olmamasına rağmen, anti-müllerian hormon (AMH), FSH ve inhibin B gibi bazı biyobelirteçler klinik uygulamada üreme potansiyelinin belirleyicileri olarak hizmet edebilir [43].

Over rezervi, kadın ovaryumda farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerin toplamını ve bu foliküllerin büyüme, gelişme ve fertilizasyon yeteneğini yansıtır. Yaş ilerledikçe foliküllerin sayısı ve işlevi giderek azalır. AOR oositlerin sayısında ve kalitesinde azalmayı ifade eder. Günümüzde esas olarak bazal folikül sayısında ve AMH azalmanın yanı sıra yüksek serum bazal FSH seviyeleri ile tanı konulmaktadır . AOR en yaygın klinik belirtileri adet düzensizliği, endokrin bozukluğu, ovaryan uyarımına zayıf yanıt ve infertilitedir. Erken tanı ve tedavi yapılmazsa, birkaç yıl içinde erken ovaryan yetmezliğine ilerler. AOR'un etiyojisi karmaşıktır ve temel olarak yaş, genetik, bağışıklık, psikoloji, çevre gibi faktörleri içerir.

AOR sık karşılaşılan ve önemli etkileri olan bir klinik durumdur. İn vitro fertilizasyon tedavisi sırasında kötü prognoz genellikle AOR'a atfedilir. AOR, benzer yaştaki kadınlarla karşılaştırıldığında ovaryum stimülasyonuna yanıtta veya fertilizasyonda azalmayı göstermeyi amaçlasa da, şu anda AOR'un tek tip olarak kabul edilmiş bir tanımı yoktur [44].

AOR üreme potansiyelinin zayıf olduğunu gösteren oositlerin miktarında ve/veya kalitesinde azalma olarak tanımlanır. Yüksek bazal FSH seviyeleri (>10 mIU/mL), düşük AMH seviyeleri (0,5-1,1 ng/mL) ve düşük antral folikül sayıları

(AFS<5-7 folikül) olan hastalar tanımlanmıştır. AOR prevalansı, IVF alan kadınlar arasında %32'dir ve gonadotropin stimülasyonuna zayıf yanıt vermesi nedeniyle yardımcı üreme teknikleri (ART) ile başarılı bir şekilde tedavi edilebilen en zorlu hastalıktır. ART'deki kadınların %50'sinden fazlasına 40 yaşına geldiklerinde tanı konulmaktadır ve bu durum çeşitli etiyolojiler arasında AOR ile güçlü bir şekilde ilişkilidir. Yaş faktörlerinin yanı sıra otoimmün hastalıklar, genetik hastalıklar, çevresel kimyasallar ve iyatrojenik hasarların tümü AOR'un başlangıcı ile ilişkilidir. Azalmış oosit verimi, artmış anöploidi oranları ve üreme endokrin anormallikleri birlikte AOR hastalarında önemli ölçüde daha yüksek infertilite ve düşük oranlarına katkıda bulunur [43].

Oosit sayısı ve kalitesi arasındaki ilişki hakkında iki temel düşünce ekolü ile büyük tartışmalar vardır. Bir görüşe göre, belirli bir yaşta anormal derecede düşük over rezervi miktarı, hızlandırılmış foliküler tükenmenin patofizyolojik bir sürecini ve dolayısıyla bir dereceye kadar erken ovaryan yaşlanmasını yansıtır ve buna mutlaka oosit kalitesinde eşzamanlı bir azalma eşlik eder. Oosit sayısı hakkında bilgi sahibi olmak oosit kalitesi hakkında da fikir verir. Düşük kalitenin miktarla ilişkisini destekleyen çalışmalar, over rezervini embriyo kalitesi, fertilité, anöploid gebelik ve düşük riski ile ilişkilendiren veriler sunmaktadır. Buna karşılık, alternatif ikinci bir düşünce, oosit sayısı ve kalitesindeki düşüşü nispeten bağımsız süreçler olarak görmektedir.

Son çalışmalar, IVF bir tedavi aracı olarak seçilse bile, ovulasyonu indükleyen ilaçlara düşük yanıt vermeleri nedeniyle AOR hastalarının gebelik oranının hala düşük olduğunu ve canlı doğum oranlarının normal ovaryum rezervine sahip kadınlara göre önemli ölçüde düşük olduğunu göstermiştir. Ayrıca, AOR hastalarında gebelik sırasında hipertansiyon görülme sıklığı ve IVF sonrası tekrarlayan abortus ve anöploid blastokist riski artmaktadır. AOR'un belirsiz etiyolojisi ve sınırlı terapötik etkisi nedeniyle, infertilitenin klinik tedavisindeki en büyük zorluklardan biri olmaya devam etmektedir [45].



## 2.9. Sirtuin Ailesi

Metabolizma, organizmanın ihtiyaçlarını karşılamak ve fizyolojik homeostazi sürdürmek için gerekli moleküllerin doğru zamanda ve doğru yerde bulunmasını sağlar. Anabolizma ve katabolizma olmak üzere iki genel süreç, bu süreçleri dengelemek için uyum içinde çalışır. Anabolizma, makromoleküller üretmek için ATP veya NADPH enerji kullanan bir biyosentez sürecidir. Buna karşılık katabolizma, büyük moleküllerin doğrudan anabolizmayı beslemek için kullanılacak daha küçük bileşiklere parçalanmasıdır. Bu iki süreç arasındaki hassas denge, fosfatidilinositol 3-kinaz/protein kinaz B (PI3K/AKT), mTOR, AMPK ve sirtuinler aracılığıyla oluşur. Bunlar arasında sirtuinler, metabolik kontrol ve epigenetik modifikasyon gibi çeşitli hücrel düzenleyici süreçlerde yer alan bir protein ailesi olarak bilinmektedir. Özellikle, sirtuinler aynı zamanda yaşam süresinin uzatılmasında kritik roller oynar, böylece metabolizma ve yaşlanma arasında güçlü bir bağlantı görevi görür. Sirtuin ailesi (Silent Information Regulator) SIRT1'den SIRT7 arasında değişen yedi üye içerir. Bunlardan SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 ağırlıklı olarak hücre içinde enerji metabolizması için temel organel olan mitokondride lokalize olur [46].

Metabolik stres ile karşılaşıldığında, hücreler tercihen katabolizmayı yönlendiren sinyal yollarını başlatır. AMPK hücre içi ATP seviyelerini algılar ve ATP seviyeleri düşük olduğunda, aktive olan AMPK metabolik homeostazi yeniden sağlamak için anabolik reaksiyonları kısmen mTOR fosforilasyonu yoluyla hızla bastırır. Buna ek olarak AMPK, glikoz alımını artırmak ve glikoliz enzimlerini aktive etmek de dahil olmak üzere glikolizi artırarak katabolizmayı teşvik eder. Ayrıca AMPK, mitokondriyal oksidasyon için yağ asitlerini serbest bırakmak üzere lipazı uyararak lipid kullanımını teşvik eder. AMPK, metabolik yolları doğrudan etkilemenin yanı sıra, metabolizma faktörlerinin transkripsiyonel mekanizmasını da düzenler [46].

Kalori kısıtlamasıyla aktive olan SIRT1'den SIRT7'ye kadar yedi üye içeren memeli sirtuin protein ailesidir. Her biri farklı hücre lokalizasyonuna sahiptir ve metabolizma düzenlemesi, epigenetik modifikasyon da dahil olmak üzere çok çeşitli hücrel süreçler üzerinde etkilidir. Çoğunlukla çekirdekte bulunan SIRT1, SIRT6 ve SIRT7, histonları modifiye eden deasetilazlardır.

SIRT1, SIRT3 ve SIRT5'in mural granüloza hücrelerinde ve Graafian folikülünün kümülüs hücrelerinde ekspresyonu kanıtlanmıştır. SIRT1'in granüloza hücrelerinin proliferasyonunun düzenlenmesindeki temel rolü, SIRT1 cDNA ile transfekte edilen domuz granüloza hücrelerinin, in vitro FSH stimülasyonuna yanıt olarak bir SIRT1 substratı olan NF- $\kappa$ B'nin önemli ölçüde azalmasıyla birlikte proliferasyon belirteçlerinin artan ekspresyonu gözlemlenmiştir [47]. Öte yandan, SIRT1'in 50 $\mu$ M'den daha yüksek resveratrol konsantrasyonları ile uyarılması granüloza hücrelerinin proliferasyonunu azaltmakta ve anahtar steroidojenik enzimlerin (STAR, LH-R ve P450Aromataz) ekspresyonunu ve progesteron salgılanmasını teşvik etmektedir. Buna bağlı olarak , başka çalışmalarla da desteklenmekle birlikte, SIRT1 granüloza hücrelerinin terminal farklılaşması ve luteinizasyonunda rol aldığı düşünülmektedir. Antiproliferatif alkilleyici ajan siklofosfamide yanıt olarak, insan granüloza hücresi hattı COV434'ün SIRT1 ve mRNA bağlayıcı proteini olan HuR'nin transkripsiyonunu aktive ettiği bildirilmiştir. SIRT1 ve HuR aynı kinetiğe sahip olarak artması, SIRT1'in granüloza hücrelerinin siklofosamid kaynaklı hasarına erken hücreyel yanıtta yer aldığını göstermiştir [48].

SIRT1'in granüloza hücrelerinde bir enerji sensörü olarak rolü, SIRT1 sinyalinin insan granüloza hücrelerinin insülin duyarlılaştırıcı metformine verdiği yanıtta rol oynadığının bulunmasıyla ortaya çıkmıştır. MetF'nin NAD<sup>+</sup>/NADH oranını ve SIRT1 aktivitesini doza bağlı bir şekilde artırdığı bulunmuştur [49].

Mitokondriyal sirtuinlere bakıldığında, granüloza hücrelerinde steroidojenik genlerin düzenlenmesinde, progesteron salgılanmasında ve ROS detoksifikasyonunda, SIRT3 SIRT1 ile işbirliği yaptığı düşünülmektedir. Dahası, SIRT3'ün glutamat dehidrojenaz gibi mitokondriyal enzimleri hedefleyerek insan granüloza hücrelerinde metabolik durumun önemli bir sensörü olduğu ortaya çıkmıştır [48]. Mitokondriyal sirtuinlerde meydana gelen değişiklikler mitokondriyal proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonlarını etkileyerek yaşlı folikülde metabolik değişikliklere neden olabileceği düşünülmektedir.

Sirtuinlerin fertilizasyon sonrası olaylardaki rolü, pan-Sirtuin inhibitörü NAM'ın in vitro fare embriyo gelişimini inhibe ettiği 1994 yılından beri bilinmektedir. Bu görüşe göre, Sirtuin inhibitörlerinin murin ve domuz IVF embriyolarında

gelişiminin durmasına neden olduğunu göstermiştir. Tüm Sirtuin'ler MII oositte eksprese edilir ve ilk bölünmeyi takiben ekspresyonları kademeli olarak azalır, bu da Sirtuin mRNA'larının oogenez sırasında depolandığını gösterir. Sirtuin inhibisyonu blastosist oluşumunu, blastosistteki toplam hücre sayısını azaltır, SIRT2 ve SIRT3 dahil olmak üzere genlerin aktivitesinin azalmasına neden olur [50].

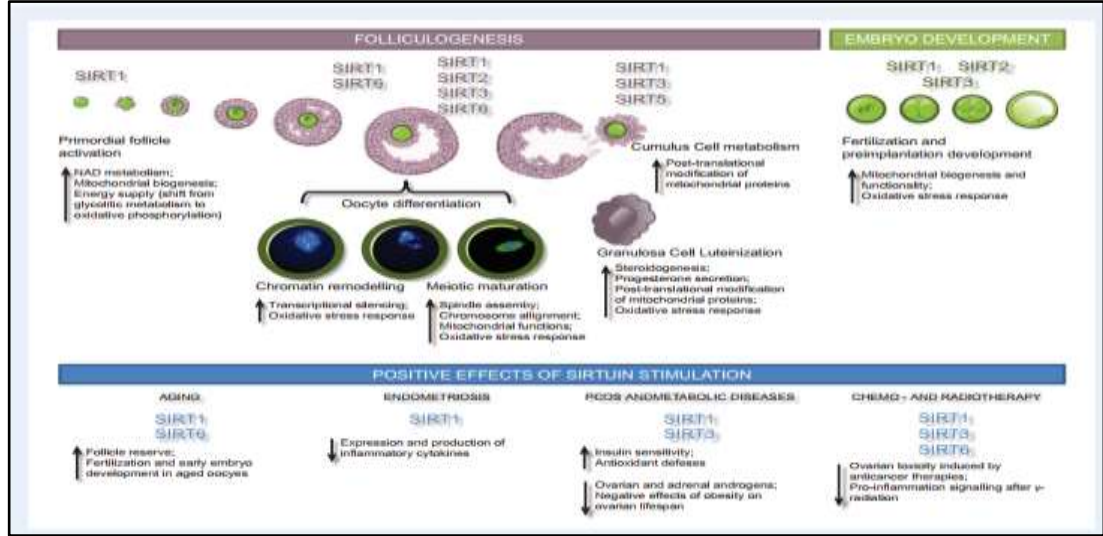
SIRT3 genin silindiği deneylerde, SIRT3'ün mitokondriyal işlevselliği koruyarak IVF ve embriyo kültürü sırasında embriyoları stres koşullarına karşı koruduğu açıkça gösterilmiştir. SIRT3 silindiği oositler sperm genotipinden bağımsız olarak IVF yapıldığında fertilizasyon ve blastosist oluşum oranları önemli ölçüde azalmış, bu da SIRT3'ün oogenez sırasında depolanmasının fertilizasyon ve preimplantasyon gelişimi için gerekli olduğu sonucunu desteklemiştir. SIRT3'ün yokluğunda, in vitro embriyolar, mitokondriyal ROS-p53 aracılı yoluyla oksidatif strese maruz kaldıklarında, gelişimsel duraklamaya uğradıkları gösterilmiştir [48].

Sirtuin 1, DNA hasarı ve oksidatif stresin neden olduğu apoptozu azaltır. Shirane ve arkadaşları SIRT1'in aktivasyonu ve artmış ekspresyonunun uterus reseptivitesinde önemli rol oynadığını ortaya koymuştur. Ayrıca, SIRT1 makrofajlar aracılığıyla inflamatuvar yolları inhibe eder ve metabolik sendromda da etkilidir. Başka çalışmalarda, mitokondriyal disfonksiyon, oksidatif stres ve inflamasyon durumları eklemde SIRT1 seviyelerinde azalma ile ilişkili bulunmuştur [51].

Sirtuinler, insan hücrelerinde çekirdekte (SIRT1, SIRT6 ve SIRT7), sitozolde (SIRT2) ve mitokondriyonda (SIRT3, SIRT4 ve SIRT5) bulunan yedi (NAD) bağımlı deasetilaz grubudur [52]. SIRT'ler metabolizma, inflamasyon, stres cevapları, yaşlanma, proliferasyon ve kanser gibi çok sayıda hücrenel süreçte yer alır. SIRT1'in yanı sıra SIRT3 ve SIRT5, foliküler gelişimin çeşitli aşamalarında farklı memelilerde (örneğin insanlar, sığırlar, domuzlar ve sıçanlar) oositin destek/yardımcı hücreleri olan foliküler granüloza hücreleri tarafından ifade edilir. SIRT1'in granüloza hücre proliferasyonu, apoptoz ve salgı aktivitesinin kontrolünde rol oynadığına dair kanıtlar vardır. Son zamanlarda, lutein granüloza hücrelerinde SIRT1'in cAMP odaklı ekspresyonu gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerdeki SIRT ekspresyon profilleri sağlıklı ve infertil kadınlar arasında farklılık göstermekte ve fertilitite/infertilitite ile ilgili işlevlere dahil olduğunu düşündürmektedir [52].

SIRT1 ve SIRT6'nın sitozolde de bulunur ve gen ekspresyonunda önemli rolü vardır. Deasetilasyona ek olarak, SIRT6 ve SIRT7 ADP-ribozil transferaz işlevine sahiptir. SIRT2 esas olarak sitoplazmada bulunur, ancak aynı zamanda çekirdekte de görülür ve hücre döngüsünü düzenler. SIRT3, SIRT4 ve SIRT5 ağırlıklı olarak mitokondriyonda bulunur ve bu nedenle genellikle mitokondriyal sirtuinler olarak adlandırılır. Özellikle, SIRT3 aynı zamanda çekirdekte de gözlemlenmiştir, heterokromatini stabilize etme ve insan mezenkimal kök hücrelerinde hücre yaşlanmayı durdurmuştur. SIRT5'in bir kısmı sitozol ve çekirdekte bulunur. Farelerde kalori kısıtlaması yapıldığında SIRT1, SIRT3 ve SIRT5 aktive olur. Bunlar arasında SIRT1 hücrel NAD seviyelerini algılar ve AMPK'yı, önemli bir AMPK kinazı olan karaciğer kinaz B1'in (LKB1) deasetilasyonu yoluyla aktive eder. Kalori kısıtlanması sırasında, mitokondriyonda artan SIRT3 seviyelerinin oksidatif stresi inhibe ettiği ve farelerde yaşlanmaya bağlı bozuklukları önlediği bildirilmiştir [46].

Metabolik düzenleme, çevresel veya hücre içi dalgalanmalarla birlikte ele alındığında yanıt olarak PI3K/AKT yolu, mTOR, AMPK ve sirtuinler dahil olmak üzere birçok sinyal ağı koordinasyonu gereklidir [53]. Hücreler ayrıca homeostazı korumak amacıyla hücrel metabolitlerin seviyelerini izlemek ve kontrol etmek için çok sayıda başka enerji sensörü kullanır. Buna karşılık, metabolit varlığındaki değişiklikler, transkripsiyonel veya epigenetik modülasyonlar yoluyla gen ifadesini etkiler. Sonuç olarak, metabolizma ve gen düzenlemesi arasındaki etkileşimler, hücrel işlevlere önemli katkılarda bulunur. Metabolik reaksiyonlar, hücrel homeostaz, gelişim, yaşlanma ve apoptozun sürdürülmesi için enerji ve temel kimyasal moleküllerin sağlanması için gereklidir. Metabolik ağlardaki değişiklikler gen ifadesinin tamamen yeniden programlanmasına, epigenetik modülasyona ve protein modifikasyonlarına yol açabilir. SIRT3, SIRT4 ve SIRT5'in ağırlıklı olarak bulunduğu mitokondriyon matriksi, metabolik reaksiyonların bir bağlantı noktasıdır. Mitokondriyal sirtuinler besin ve oksidatif seviyeleri algılar ve elektron taşıma zinciri reaksiyonları, TCA döngüleri, yağ asitleri oksidasyonu, amino asit katabolizması ve oksidatif strese verilen yanıtlar dahil olmak üzere mitokondriyon içindeki çok sayıda metabolik yollarda görev alır. Mitokondriyal sirtuin aktivitesindeki herhangi bir hasar, metabolik değişikliklere neden olabilir ve bu da hücre yaşlanmasına yol açar[54].



**Şekil 2.5.** Folikülogenez ve embriyo gelişiminin farklı aşamalarındaki temel Sirtuin fonksiyonları [48].

### 2.9.1. SIRT1 ve Granüloza Hücresi

Hücrede birçok önemli biyolojik sürecin regülasyonunda yer alan SIRT1 multipotent bir moleküldür. Bu biyolojik süreçler hücre metabolizması, hücre yaşlanması ve inflamasyonu kapsar. SIRT1 aktivitesinin artması, patolojik ve fizyolojik koşullarda meydana gelen enerji stresini hafifletici etkisi bilinmektedir [5]. SIRT1, karaciğerde lipit metabolizması ve glukoneogenez, yanı sıra sirkadiyen metabolizmasının düzenlenmesi, pankreasta insülin salgılanması gibi birçok çeşitli metabolik süreçlerde yer almaktadır.

Ovaryumda granuloza hücrelerinde de eksprese olduğu bilinen SIRT1, PKOS oksidatif stres, otofaji, ovulasyon bozukluğu ve insülin direnci gibi patofizyolojik süreçlere katıldığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır [6]. Normal fizyolojik koşullar altında, SIRT1'in aktivitesi ve ifadesi, birden fazla mekanizma tarafından düzenlenir ve çevresel strese uyum sağlamak için normal seviyede tutulur. Bununla birlikte, bozulmuş SIRT1 ekspresyonu ve aktivitesi, yaşlanma, nörodejeneratif ve metabolik hastalıklarda da rol oynar [7]. SIRT1'in aktivitesi, hücrede NAD<sup>+</sup> ile etkin bir şekilde düzenlenir [3]. NAD<sup>+</sup> hücrelerde çeşitli enerji metabolizması süreçlerine katılan esansiyel bir enzim kofaktörüdür. NAD<sup>+</sup> seviyelerindeki azalma, mitokondriyal disfonksiyonlarla birlikte hücre proliferasyonu değişikliklerine yol açar. Bu durumla ilişkili olarak PKOS hastalarının inflamatuvar sürecinde granüloza hücrelerinde

mitokondriyal disfonksiyon da bildirilmiştir [8]. SIRT1, hücrenin enerji durumu ve adaptif transkripsiyonel yanıtları arasında moleküler bağlantı sağlar. SIRT1'in kontrolü dinamiktir ve enerji tüketimi dahil olmak üzere NAD + / NADH oranını değiştiren çevresel stres tarafından düzenlenir.

AMPK etkilerinin birçoğunu SIRT1 aktivasyonu ile gösterir. AMPK ve SIRT1'in aktivitelerinin bağlantılı olduğu, birçok araştırma ile gösterilmiştir. AMPK'nın aşırı ekspresyonu SIRT1'i aktive eder ve bunun tersi de geçerlidir.

Somatik hücrelerde SIRT1, heterokromatinin düzenlenmesi ve gen susturulması, telomer bakımı ve DNA hasarının onarımı dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçlere katılır. SIRT1, üreme fonksiyonunun çeşitli düzeylerde temel düzenleyicisidir ve bugüne kadarki en kapsamlı şekilde değerlendirilen Sirtuin'dir. Farelerde Sirt1'in homozigot delesyonu, gelişimsel kusurlara ve kısmi embriyonik ölüme neden olur. Yetişkinliğe kadar hayatta kalan hem erkek hem de dişi fareler infertildir. Sirt1 -/- dişileri normal folikül gelişimine sahiptir ancak östrus döngüleri kusurludur ve ovulasyonda başarısız olurlar. Gonadotropinlerin Sirt1 -/- dişilere uygulanması ovulasyonu yeniden sağladığından, hipotalamik-hipofiz-gonadal aksında kusurlar muhtemelen primer fertilitenin fenotipinin temel nedenidir. SIRT1, hormon eksenini düzenlemenin yanı sıra oosit üretimini ve kalitesini de düzenler. Profaz I'deki oositler, yüksek dozda SIRT1 seçici inhibitör Ex527 ile muamele edildiğinde, yaklaşık %50'si mayoz bölünmeyi sürdürmekte başarısız olur ve MII metafazına ilerleyenlerde anormal içcik yüzdesi ve kromozom diziliminde hata meydana gelir. Benzer olarak, IVF sonrasında Sirt1 -/- ovulasyondan elde edilen embriyolarda, gelişim kapasitesi azalmıştır ve 2 hücreli aşamaya ulaşım daha azdır ve canlı yavru sayısının azalmasına neden olur. [55]

SIRT1, yaşlanma, hücresel yaşlanma ve enerji homeostazisi için gereklidir. AMPK enerji stresi altında aktive olan bir serin/treonin kinazdır. SIRT1'in aşırı ekspresyonu AMPK fosforilasyonunu ve aktivasyonunu uyarır. AMPK karşılıklı olarak SIRT1'i etkinleştirir. ACE2 mRNA seviyeleri ve SIRT1 protein seviyeleri, insan Huh7 hepatoma hücrelerinde AMP analogu AICAR tarafından upregüle edilir. AICAR, SIRT1'in ACE2 promoterindeki - 15,794 ila - 15,656 bp, - 15,621 ila - 15,521 bp ve - 15,607 ila - 15,505 bp bölgelerine bağlanmasını indükleyerek Huh7 hepatoma

hücrelerinde ACE2 transkripsiyonunu artırmıştır ve bu veriler ACE2 transkripsiyonunun SIRT1/AMPK eksenini yoluyla düzenlenebileceğini düşündürmektedir [56].

## 2.10. Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim (ACE2)

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) endokrin ve parakrin/otokrin sistemi içeren karmaşık öncüller, peptitler, enzimler ve reseptörler ağı içerir. RAS'ın temel bileşenleri olan renin, ACE, anjiyotensin II ve reseptörleri (AT1 ve AT2), Ang-(1-7) ve reseptörü MAS'in, farklı türlerin ovaryumlarında steroidogenezi, folikülogenezi, gamet olgunlaşmasını ve ovulasyonu uyardıkları gösterilmiştir[57]. Ang-(1-7), hedef hücreye bağlı olarak etkileri Ang II'nin etkilerine farklı, benzer veya zıt olabilen, ACE'den bağımsız yollardan oluşan bir heptapeptittir. Ang-(1-7)'yi doğrudan Ang II'den veya dolaylı olarak Ang I'den üretebilen ACE'nin bir enzim analogu olan ACE2'nin tanımlanmasından ve Ang-(1-7) için endojen bir reseptör olarak reseptör Mas'ın tanınmasından bu yana, RAS, biri ACE/Ang II/AT1'den ve diğeri ACE2/Ang-(1-7)/Mas'tan oluşan iki eksene bölünmüştür. [57]

RAS'ın ovaryum fizyolojisindeki rolü ve fonksiyonel aktivitesi, hayvan türüne ve deney modeline göre değişir. Kadınlarda IVF için ovulasyon indüksiyonu sırasında foliküler sıvıda renin ve Ang II artmış bulunmuş ve bu durum ovaryan foliküllerinin sayısı ile doğrudan ilişkili olduğu gösterilmiştir. Mono-ovulatör bir tür olan sığırlarda, foliküler sıvıda Ang-(1-7) ovülasyon öncesi LH dalgalanmasından sonra artış göstermesi, ovulasyon sürecinde ACE2/Ang-(1-7)/Mas'ın rol oynadığını ortaya koymuştur. Bu bilgiler ışığında ovaryum RAS'ının gonadotropin kontrolü altında olduğunu göstermektedir [57].

Folikülogenez sırasında, primordiyal foliküller histolojik ve hormonal değişikliğe uğrar. Bu değişikliklerde hücre proliferasyonu ve lokal kan desteğinin farklılaşmasıyla gerçekleşir. Bu süreçler FSH ve LH, steroidler ve peptid hormonları tarafından düzenlenir. Lokal peptid düzenleyiciler, otokrin ve parakrin yolları üzerinde etki gösterir ve gonadotropinlerin ağır basan etkisine maruz kalmalarına rağmen yüksek derecede özerkliği korurlar. Lokal RAS ovaryumdaki rolü belgelenmiştir, ancak dişi üreme sürecindeki fizyolojik rolü belirsizliğini

korumaktadır.[58] RAS'ın daha iyi bilinen aktif peptitlerinden biri, anjiyotensin-(1-7) dir. Ang-(1-7)'nin biyolojik etkileri RAS'taki tek aktif peptit olarak kabul edilen bir oktapeptit olan Ang II'nin antagonisti olmasıdır. Lokal ACE2/Ang-(1-7)/MAS1 yolağın aktivitesindeki değişiklikler ovaryan hastalıklarının tetiklenmesi yoluyla fertilité sorunlarına yol açabilir. Lokal ACE2/Ang-(1-7)/MAS1 insanlar da dahil olmak üzere memelilerin ovaryumda işlev görür [58].

İnsanlarda ovaryum, plazma proreninin en önemli kaynağıdır. Prorenin, anjiyotensinojenin Ang I'e dönüşümünü katalize eden proteolitik bir enzim olan reninin öncüsüdür. Ang I, Ang1-7'ye hidrolize edilebilir. Bununla birlikte, Ang II'nin tersine, foliküler sıvıdaki Ang1-7 konsantrasyonu, bu heptapeptidin plazmadaki seviyesi ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur. Ang-(1-7)'nin plazmada yarılanma ömrü kısadır ve hızla parçalanır. Ang II aynı zamanda insan ovaryumda ifade edilen ACE2 tarafından Ang-(1-7)'ye hidrolize edilebilir. Bu bulgu aynı zamanda Ang-(1-7)'nin insan ovaryumunda lokal olarak üretildiğini de göstermektedir. Folikülün stromal hücrelerinin Ang-(1-7), ACE2 ve MAS reseptörü için pozitif olduğu bulunmuştur; ancak menopoz sonrası kadınların ovaryan Ang-(1-7) ve MAS ifadenmesi daha azdır. Menopozal ovaryum esas olarak stromal hücrelerden oluşur. Bunlar, periferik doku tarafından östron aromatzé edilen yüksek gonadotropin salgılanması koşullarında androstenedion üretmek için steroidojenik kapasiteye sahiptir. Ovaryumdaki ACE aktivitesi menopoz sonrası kadınlarda menopoz öncesi kadınlara göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur [58].

Luteinize granüloza hücrelerinde; ACE, ACE2 ve MAS mRNA'sı bulunmuştur. Ayrıca izole granüloza hücrelerindeki MAS mRNA seviyeleri olgun oosit sayısı ile korele olduğu tespit edilmiştir. Ang-(1-7) ve MAS reseptörü ile ilgili olarak, primer foliküllerdeki granüloza hücreleri orta derecede ifadenme gösterirken, sekonder foliküller yoğun ifadenme gösterir. Preovulatuvar foliküller de ise oldukça zayıf immünreaktivite göstermiştir. Sekonder foliküllerin teka hücreleri Ang-(1-7) ve MAS için yoğun bir şekilde boyanırken, preovulatuvar foliküllerin hücrelerinde ise her ikisi için immünreaktivite görülmemiştir. Ovaryum renin-anjiyotensin sistemindeki bu tür farklılıklar, onun farklı fizyolojik rollerini düşündürmektedir. Ovaryal siklus boyunca RAS düzeyinde ve lokalizasyonunda



görülen değişiklikler, FSH ve LH'nin bu lokal peptit hormon sisteminin kontrolünde rolü olduğunu düşündürmektedir [58].

OVRAS'ın folikül gelişimi/atrezisi, ovulasyon ve steroid hormon salgılanması üzerinde önemli etkileri vardır. Anjiyotensin ve Anjiyotensin reseptörleri ovaryum folikülünde, ovulasyon öncesi teka ve granüloza hücrelerinde ve ovulasyon sonrası mural granüloza-lutein hücrelerinde yaygın olarak dağılır ve steroidogenezi düzenler. OVRAS'ın inhibisyonu oosit olgunlaşmasını ve ovulasyonu engeller. Patolojik olarak anormal OVRAS fonksiyonu infertilite, PKOS ile ilişkilendirilmiştir [39].

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmaya Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üremeye Yardımcı Tedaviler Kliniği'ne başvuran erkek infertilitesi nedeniyle yardımcı üreme teknikleri önerilmiş üreme çağındaki sağlıklı kadınlar (n=10), Polikistik Over Sendromu tanısı konmuş ve bu nedenle yardımcı üreme teknikleri önerilmiş üreme çağındaki kadınlar (n=4) ile Azalmış Over Rezervi tanısı konmuş ve bu nedenle yardımcı üreme teknikleri önerilmiş üreme çağındaki kadınlar (n=7) dahil edilmiştir. Olgular vücut kitle indeksi 18,5-24,9 kg/ m<sup>2</sup> aralığında olan bireylerden seçilmiştir. Komorbiditesi olan olgular araştırmaya dahil edilmemiştir. Ayrıca HGL5 (Immortalized Human Granulosa Cells (HGL5), cat: T0650, abm, Amerika Birleşik Devletleri) hücre hattı çalışma grubu olarak araştırmaya dahil edilmiştir.

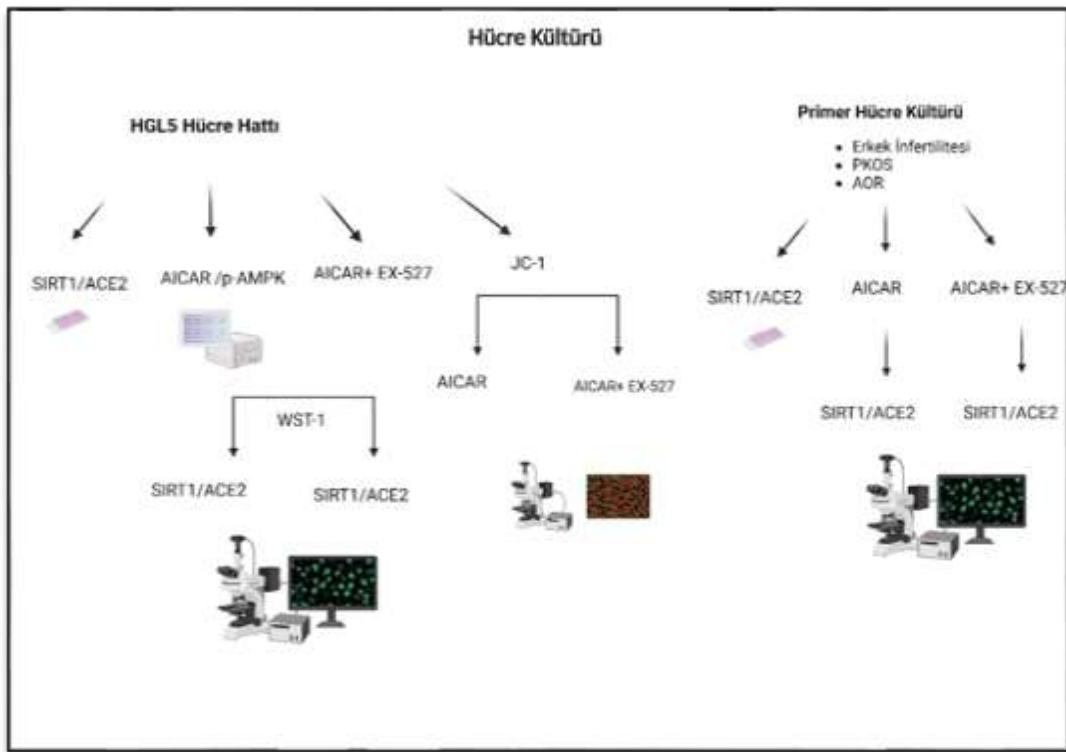
#### 3.1. Etik Kurul İzin Süreci

*“Enerji Stresinde Granüloza Hücrelerinin ACE2 ifadenmesinin SIRT1 İle İlişkisinin Değerlendirilmesi”* başlıklı proje çalışması 25 Ekim 2022 tarihinde T.C Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Çalışmalar Etik Kurulu tarafından gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Çalışma 2022/17-27 numaralı karar ile etik açıdan uygun bulunmuştur.

#### 3.2. Deney Gruplarının Belirlenmesi

Çalışmamızda araştırma sorularını cevaplamaya yönelik *in-vitro* olarak HGL5 hücre hattı, *in-vivo* kontrol grubu olarak erkek infertilitesi nedeniyle başvuran sağlıklı kadın granüloza hücreleri, polikistik over sendromu ve azalmış aosit rezervi olmak üzere dört temel grup oluşturuldu. Her bir grup için öncelikle herhangi bir uygulama yapılmadan SIRT1 ve ACE2 ifadenmeleri değerlendirildi. Ardından HGL5 granüloza hücrelerinde ELISA yöntemi ile fosforile AMPK dozu belirlendi. Altı saat boyunca 0,1 milimolar dozunda AICAR ile 37<sup>0</sup> C’de , nemli ve %5 CO<sub>2</sub> ortamda inkübe edilerek hücre stres modeli oluşturuldu. SIRT1 inhibe edip, ACE2 ifadenmesinde değişiklik olup olmayacağını değerlendirmek için 24 saat boyunca 37<sup>0</sup> C’de, nemli ve %5 CO<sub>2</sub> 20 mikromolar SIRT1 inhibitörü olan EX-527 uygulandı.

Tez çalışması HGL5 granüloza hücre kültürü, Üremeye Yardımcı Tedaviler (ÜYTE) Kliniğinde başvuran bireylerden elde edilen primer granüloza hücre kültürü, ELISA, AICAR ile metabolik hücre stresi modeli, JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü, hücre canlılık testi ve immüno Floresan analiz iş paketlerinden oluşmaktadır. Her iş paketi 3 tekrarlı olarak oluşturulmuştur. Çalışmanın tamamı Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya ait iş akışı Şekil 3.1'de şematize edilmiştir.



**Şekil 3.1.** Deney tasarımı. Bu şekil BioREnder uygulaması kullanılarak çizilmiştir.

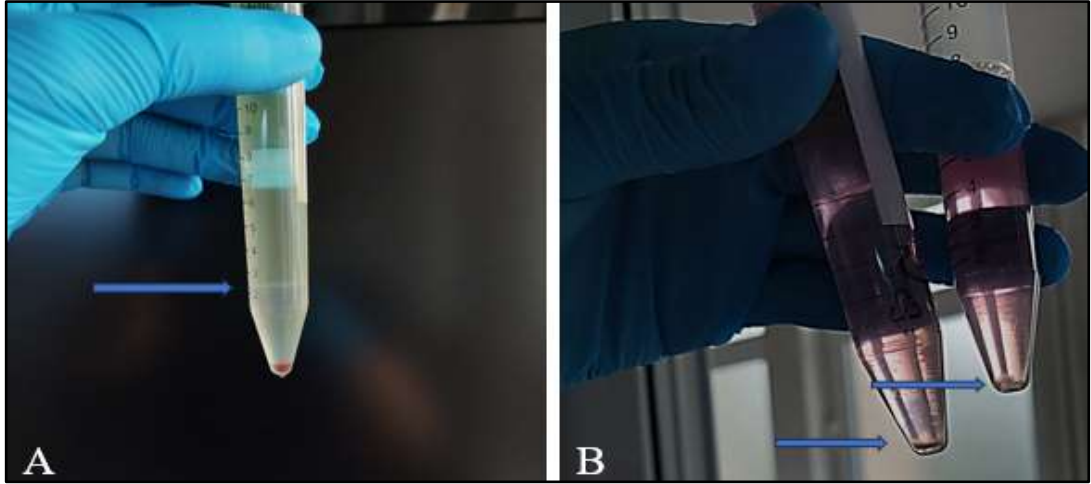
### 3.3. Folikül Sıvısının Temini

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Üremeye Yardımcı Tedaviler (ÜYTE) Kliniğinde in-vitro fertilizasyon için uygun bulunan on sağlıklı kadın, dört Polikistik Over Sendromu ve yedi Azalmış Over Rezervi tanılı kadın katılımcı araştırmaya dahil edildi. Hastalara yaşına, kilosuna, infertilite nedenine, bazal antral folikül sayısına, AMH/FSH seviyesine, daha önce ovulasyon indüksiyonu yapıldıysa buna verilen ovaryum cevabına göre gonadotropin uygulaması ile ovulasyon indüksiyonu yapıldı. Oosit toplama (oocyte pick up- OPU) işlemiyle alınan folikül

sıvısından oositler stereomikroskop altında toplandıktan sonra, araştırma amaçlı çalışma için aydınlatılmış onamı alınan hastaların kalan folikül sıvıları ve toplanan oositlerin denüstasyon işlemi yapıldıktan sonra kalan kumulus hücreleri steril koşullar altında Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma laboratuvarına getirildi.

### **3.4. Folikül Sıvısından ve Denüstasyon Artığından Granüloza Hücrelerinin İzolasyonu**

Folikül sıvısındaki granüloza hücrelerinden eritrosit, lökosit ve makrofajları ayırmak için Zırh ve arkadaşlarının yöntemi temel alındı [59]. Gradyent temelli olan bu izolasyon yöntemi kendi deneyimize göre modifiye edilerek kullanıldı. Steril santrifüj tüpü içinde hücre kültürü laboratuvarına getirilen folikül sıvıları laminar akım kabineye alındı. 1:1 oranında DPBS (Dulbecco's PBS (1x) w/o Ca & Mg, Capricorn Scientific, Almanya) ile dilüe edildi. Santrifüj tüpü içinde 3 mL Lymphosep (lymphocyte separation medium, density 1.077 g/mL, Capricorn Scientific, Almanya) ayırıştırma solüsyonu bulunan konik tabanlı 15 cc'lik faz oluşturacak şekilde 12 mL folikül sıvısı/DPBS karışımı konuldu. 30 dakika boyunca 2500 rpm (600g) hızında santrifüj edildikten sonra orta kısımda oluşan bulutsu faz (granüloza hücreleri) serolojik pipet ile alınarak yeni santrifüj tüpüne konuldu. Yeni santrifüj tüpünde biriktirilen granüloza hücreleri bazal medium (DMEM/Ham's F- 12, w/o L-Glutamine, with 15mM HEPES, Capricorn Scientific, Almanya) ile 15 mL'ye tamamlanıp 1200 rpm'de (260g) 5 dakika santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant atılıp pelet olan granüloza hücreleri 2 mL komplet besiyeri ile pipetaj yapılarak çözüldü. Komplet besi yeri: DMEM/F12 (DMEM/Ham's F-12, w/o L-Glutamine, with 15mM HEPES, Capricorn Scientific, Almanya), %5 FBS (Fetal Bovine Serum, Collected in South America, Capricorn Scientific, Almanya), %4 L-Glutamin (L-Glutamine, 200 mM, Capricorn Scientific, Almanya), %1 Penisilin-Streptomisin (Penicillin/Streptomycin Solution 100x, Capricorn Scientific) hacimlerinde hazırlanmış besiyeridir.



**Şekil 3.2.** Granüloza hücresi izolasyonu. A: Bulutsu Faz B: Granüloza hücresi peleti.

### 3.5. HGL5 ve Primer Granüloza Hücrelerinin Ekilmesi ve Çoğaltılması

Oluşan granüloza hücresi peletinin miktarına göre granüloza hücreleri, 6 kuyucuklu kültür kabı veya T25 kültür kabına komplet besiyeri ile ekildi. Kültür kapları optimum kültür koşullarındaki (37 0C, %5 CO2, nemli ortam) inkübatöre (Heraeus HeraCell 150 CO2 incubator, Almanya) kaldırıldı. Hücreler tutunduktan sonra besiyerleri iki günde bir komplet besiyeri ile değiştirildi. Araştırma laboratuvarımızdaki sıvı azot tankında (Carbide 35HC LN2, Taylor Wharton Union, Amerika Birleşik Devletleri) -196 0 C sıcaklığında kriyovialler (6122- SO, SSI Bio, Amerika Birleşik Devletleri) içinde saklanan HGL5 insan granüloza hücreleri laminar akım kabini içinde 37 0C 'de su banyosu içinde çözüldü. Çözülen HGL5 hücrelerini içeren besiyeri 10 katına kadar komplet besiyeri ile tamamlanarak 1200 rpm (260 g) hızında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırılarak pelet komplet besiyeri ile çözülüp T75 kültür kabına ekildi. Optimum kültür koşullarındaki nemli CO2 inkübatörüne kadırıldı. Hücreler tutunduktan sonra besiyerleri gün aşırı olmak üzere komplet besiyeri ile değiştirildi. Primer granüloza hücreleri 1. pasaja, HGL5 insan granüloza hattı hücreleri ise 4. pasaja kadar çoğaltılarak deneyler için kullanıldı.

### 3.6. Kültür Hücrelerinin Kaldırılması, Pasajlanması ve Dondurulması

Ekilen hücreler faz kontrast mikroskobu (TMS Inverted Microscope, Nikon, Japonya) ile gözlemlendi. Kültür kabında %80 konfluensiye ulaşan hücrelerin besiyeri uzaklaştırılarak 37 0C'ye ısıtılmış DPBS (Dulbecco's PBS (1x) w/o Ca & Mg,

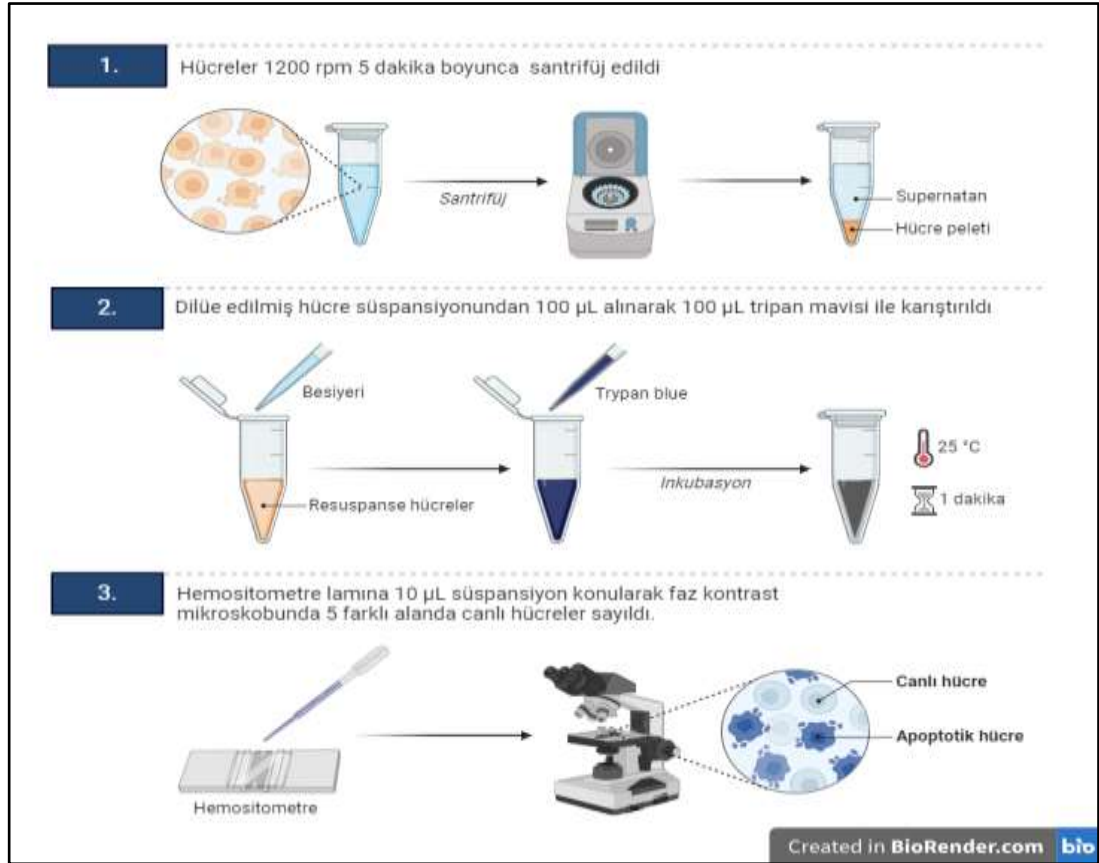
Capricorn Scientific, Almanya) ile yıkandı. Tripsin (Tyripsin %2,5, Capricorn Scientific, Almanya)

DPBS içinde 10 katına sulandırılarak %0,25 tripsin hazırlandı. Hücreler sonrasında en fazla 5 dakika olmak üzere önceden hazırlanmış ve 37 °C'ye ısıtılmış %0,25 tripsin ile muamele edilerek kaldırıldı. Tripsin, komplet besiyeri içindeki FBS ile durdurularak karışım 1200 rpm (260g) hızında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet komplet besiyerinde çözüldü. Komplet besiyeri ve Bioamf-1 ile yeni kültür kaplarına ekildi. Pasaj numarası bir artırılarak etiket bilgileri not alındı.

Faz kontrast mikroskopu ile gözlem sırasında %80 çoğalma yoğunluğuna ulaşmış ve pasajlanmayacak hücreler %0,25'lik tripsin ile kaldırıldı. Santrifüj edilerek süpernatant atıldı ve hücre peleti 700 µl DMEM-F12 besiyeri ile çözüldü. Hücre süspansiyonu kriyovial içine alındı. Üzerine 200 µl FBS (Fetal Bovine Serum, Collected in South America, Capricorn Scientific, Almanya) eklendi. Buz aküsü üzerine alınan kriyoviallere 100 µl dimetil sülfoksit (DMSO, D2650, Sigma Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri) eklendi. Daha sonra kriyovialler dondurma kabına (BCS-136 CoolCell, Biocision, Amerika Birleşik Devletleri) alınarak -80°C derin dondurucuya (DF290, Nüve, Türkiye) konuldu. Ertesi güne kadar derin dondurucuda bekleyen kriyovialler uzun süreli saklamak amacıyla sıvı azot tankına (-196 °C) alındı.

### 3.7. Kültür Hücrelerinin Sayılması

Kültür kaplarında çoğaltılan hücreler besiyeri uzaklaştırılarak %0,25 tripsin ile kaldırıldı. FBS içeren besiyeri tripsin durdurulduktan sonra 1200 rpm hızında 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atılarak pelet 1mL komplet besiyeri ile çözüldü. Hücre süspansiyonundan 100µL alınarak 1mL'ye tamamlandı. Dilüe edilmiş hücre süspansiyonundan 100µL alınarak 100 µL tripan mavisi ile karıştırıldı. Hemositometre lamına 10µL süspansiyon konularak faz kontrast mikroskopunda 5 farklı alanda canlı hücreler sayılarak ortalaması alındı. “Toplam hücre sayısı=Nx2x10x10<sup>4</sup> (N: Hemositometre lamında 5 farklı alanda sayılan hücrelerin ortalaması” formülü kullanılarak toplam hücre sayısı belirlendi (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3.** Bu şekil BioREnder uygulaması kullanarak çizilmiştir.

### 3.8. AICAR ile Hücre Enerji Stresi Modeli Oluşturulması

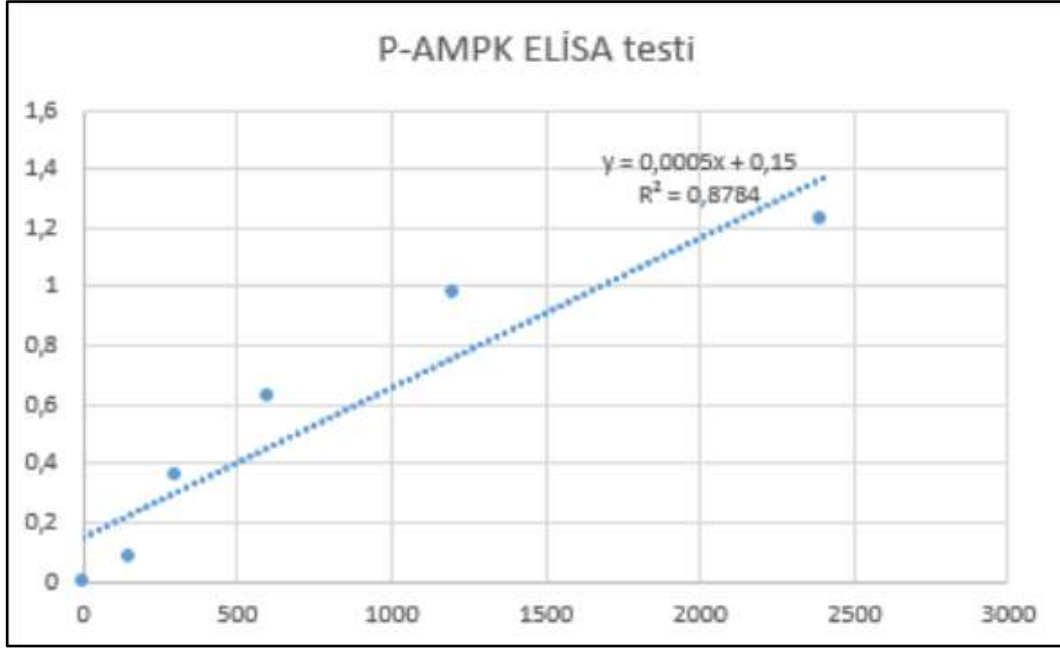
Hücre enerji stresi modeli deneyi için tripsin ile kaldırıldıktan sonra her kuyuda  $0.3 \times 10^6$  hücre olacak şekilde 6 kuyulu kültür kabına ekildi. Ekilen hücreler DMEM F-12 phenol red içermeyen ve %2 Fetal Bovine Serum, %4 L-Glutamine ve %1 Penisilin/Streptomisin ilave edilmiş besiyeri ile beslendi. 24 saat sonra hücreler AİCAR ile muamele edildi. Uygun dozu belirlemek için 6 saatlik inkübasyon için 0,1mM 1mM ve 5mM olmak üzere 3 farklı doz uygulandı. Altı saatlik inkübasyondan sonra hücrede total protein ölçümü ve ELISA deneyleri için hücre lizatı hazırlandı. Hücre lizatı hazırlamanın ilk aşamasında besiyeri çekildikten sonra, kuyuların içinde olan hücreler soğuk fosfat tamponu ile iki kere yıkandı. Sonra her kuyuya 5 µl proteaz ve fosfataz inhibitörleri ilave edilmiş 1ml RIPA tamponu kullanıldı. Tamponun homojen bir şekilde dağılması için 6 kuyulu kültür kabı hafifçe sallandı. Beş dakika sonra hücreler kazıldı ve pipetle mikrosantrifüj tüpüne alındıktan sonra 13000 rpm 30

dakika santrifüj edildi. Supernatan çekildikten sonra total protein ölçümü ve ELISA deneyi için mikrotüplere aktarılıp  $-20^{\circ}\text{C}$  saklandı.

Total protein ölçümü yapmak için 96 kuyulu kültür kabı 20  $\mu\text{l}$  standartlar sırasıyla yüklendi. Bundan sonra hücre lizatından her gruptan 3 kuyuya 20  $\mu\text{l}$  yüklendi. Son olarak kontrol dahil bütün kuyulara 50:1 Solution A ve Solution B karışımından her kuyuya 200er  $\mu\text{l}$  eklendi. Yarım saat inkübasyondan sonra mikropate okuyucuda 562 nm'ye ve  $37^{\circ}\text{C}$  ısısında okundu. Total protein ölçümünden sonra grafik oluşturuldu. Grafiğe uygun olan denklem ve  $R^2$  değeri hesaplandı. Bu sonuçların doğrultusunda ışıma değerleri protein konsantrasyonlarına dönüştürüldü.

ELISA ile fosforilasyonla aktive olan protein miktarı ölçüldü. Bütün malzemeler oda ısısında getirildikten sonra kullanılacak kadar kuyu çıkarıldı ve kit içinde yer alan, p-ampk antikorla kaplı özel plak ikişer kontrol olacak şekilde her kuyuya 50 $\mu\text{l}$  standartlar yüklendi. Örnek kuyulara 40 $\mu\text{l}$  hücre lizatı eklendi ve ardından 10 $\mu\text{l}$  anti-P-AMPK- $\alpha$ 1 antikorunu eklendi, ardından lizat kuyulara ve standart kuyulara 50 $\mu\text{l}$  streptavidin-HRP eklendi ve iyice karıştırıldı. Plak kapatıcıyla örtüldü ve  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 60 dakika inkübe edildi. Kapatıcı çıkarıldı ve plak 5 kez yıkama tamponuyla yıkandı. Her yıkama için kuyular 300ul yıkama tamponuyla 30 saniye ila 1 dakika süreyle bekletildi. Plak kağıt havluların üzerinde kurulandı. Her kuyuya 50 $\mu\text{l}$  substrat solüsyonu A eklendi ve ardından 50 $\mu\text{l}$  substrat solüsyonu B eklendi. Plak yeni bir kapatıcıyla kaplanmış olarak karanlıkta  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 10 dakika boyunca inkübe edildi. Her kuyuya 50 $\mu\text{l}$  Stop Solüsyonu eklendi, mavi renk hemen sarıya dönmeye başladı. Stop çözeltisini ekledikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'ye ayarlanmış mikropate okuyucu kullanarak her bir kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlendi. Grafik oluşturulduktan sonra, grafiğe uygun olan denklem ve  $R^2$  değeri hesaplandı. Bu sonuçların doğrultusunda ışıma değerleri protein konsantrasyonlarına dönüştürüldü Şekil (3.4).





Şekil 3.4. Fosforile AMPK ELISA grafiği.

### 3.9 İmmüno Floresan İşaretleme İçin Gerekli Malzeme ve Solüsyonların Hazırlanması

#### 3.9.1 Fosfat Tamponu (PBS)

- Sodyum klorür (NaCl, 58,44 g/mol, Kimetsan, Türkiye)
- Potasyum klorür (KCl, 74,56 g/mol, potassium chloride extra pure, Merck, Almanya)
- Disodyum hidrojen fosfat heptahidrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O, 268,03 g/mol diSodium hydrogen phosphate heptahydrate, Merck, Almanya)
- Sodyum dihidrojen fosfat dihidrat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*2H<sub>2</sub>O, 156,01 g/mol Sodium dihydrogen phosphate dihydrate, Merck, Almanya)

Hassas tartı üzerinde 80g sodyum klorür, 2g potasyum klorür, 107,212g disodyum hidrojen fosfat heptahidrat, 15,6g sodyum dihidrojen fosfat dihidrat tartıldı. Manyetik karıştırıcı üzerinde 1000 ml distile su içinde çözüldü. Elde edilen 10X PBS tampon solüsyonu +4 °C de saklandı. Kullanmadan önce distile su ile 1X PBS tamponu yapıp pH'ı 7,4'e ayarlanarak kullanıldı.

### 3.9.2. PBS-BSA Solüsyonu Hazırlanması

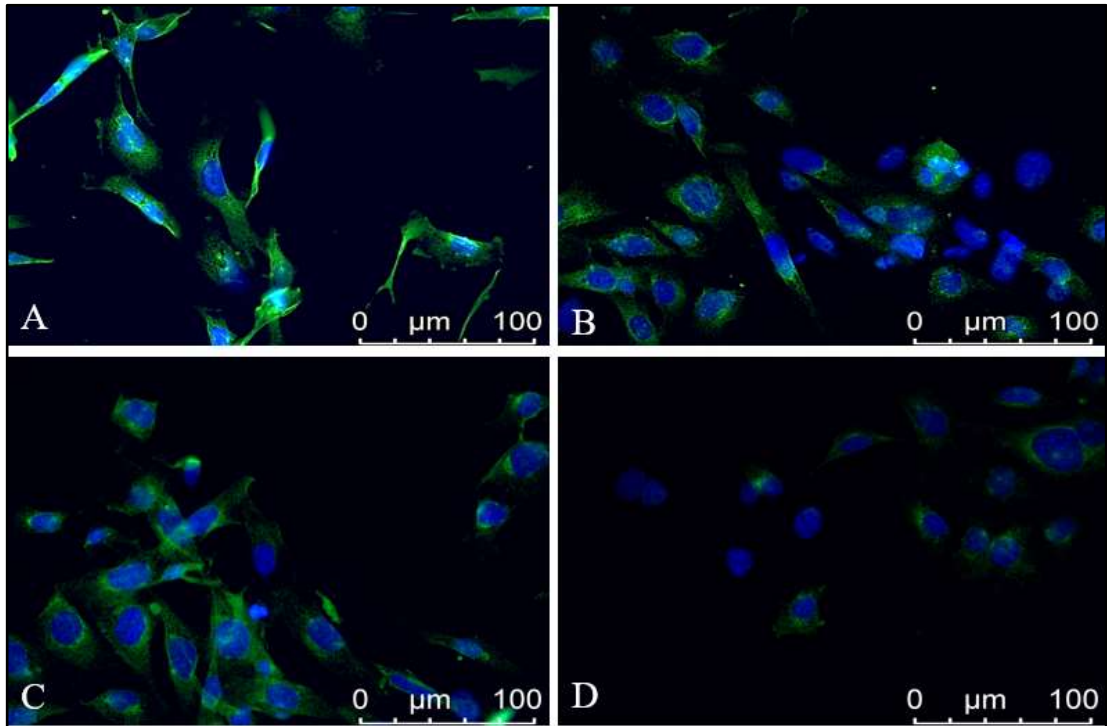
PBS içinde %2 sığır serum albümini (Bovine Serum Albumi,  $\geq 96\%$ , Sigma, Almanya) hazırlandı. PBS-BSA solüsyonu taze hazırlanarak kullanıldı.

### 3.9.3. Serum Blokajı Solüsyonu

PBS-BSA içinde %2 keçi serumu (Goat serum, Capricorn Scientific, Almanya) hazırlandı. Serum blokajı solüsyonu taze hazırlanarak kullanıldı.

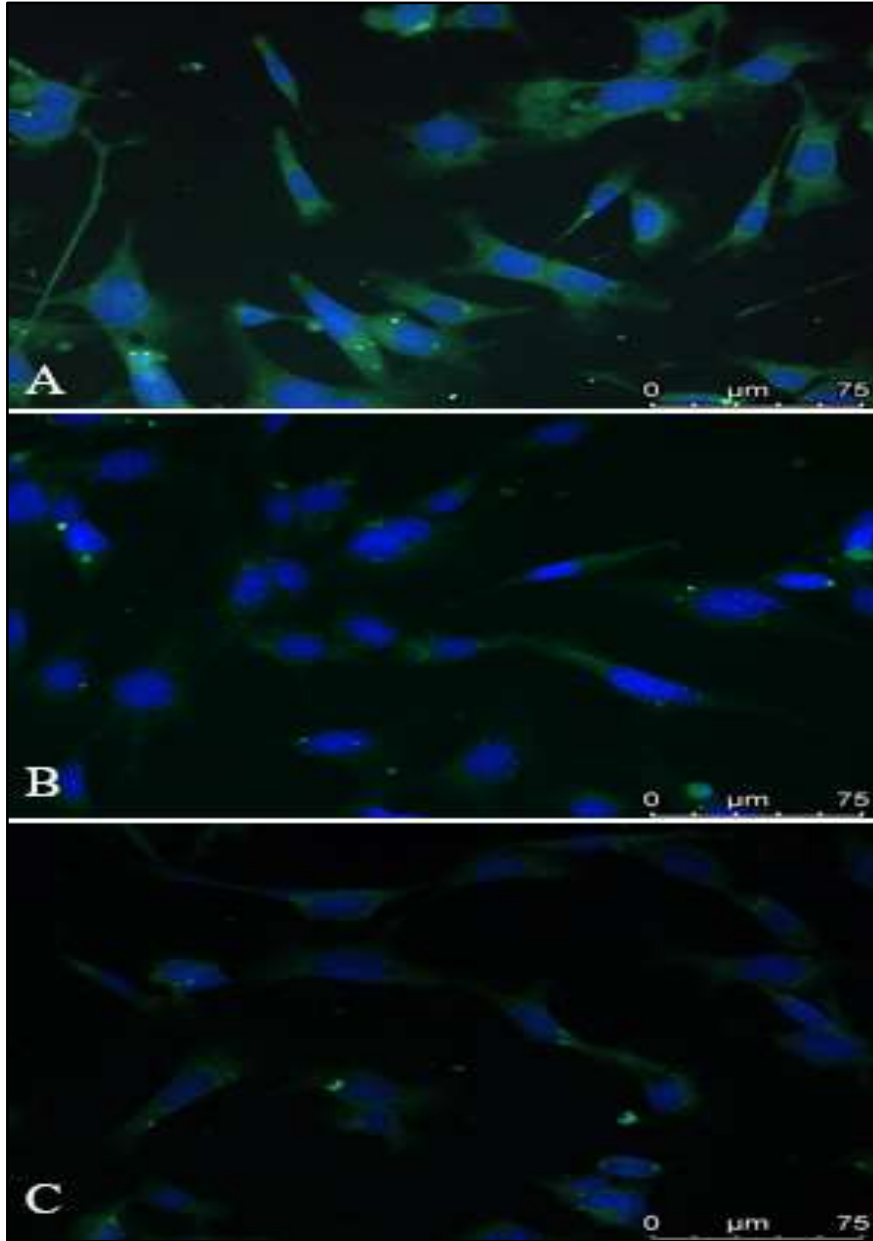
### 3.9.4. Primer Antikorlar

SIRT1 antikor ( Sirtuin1 Rabbit anti-human Polyclonal Antibody, cat: PAE912Hu01, CLOUD-CLONE CORP, Amertika Birleşik Devletleri). SIRT1 primer antikor için 1/100, 1/200, 1/300 ve 1/500 dilüsyonlarda ön deney yapıldı. Uygun konsantrasyonun 1/300 olduğu görüldü. Primer antikorlar PBS-BSA içinde 1/300 dilüsyonda hazırlandı. Solüsyon taze hazırlanıp kullanıldı.



**Şekil 3.5.** SIRT1 primer antikor dilüsyonları. A: SIRT1 primer antiokor 1/100 dilüsyonu B: SIRT1 primer antikor 1/200 dilüsyonu C: SIRT1 primer antikor 1/300 dilüsyonu D: SIRT1 primer antikor 1/500 dilüsyonu

ACE2 antikorunu ( ACE2 Rabbit Polyclonal Antibody, cat: bs-1004R, Bioss Antibodies, Amerika Birleşik Devletleri ) ACE2 primer antikorunu için 1/100, 1/200, ve 1/300 dilüsyonlarda ön deney yapıldı. Uygun konsantrasyonun 1/200 olduğu görüldü. Primer antikorlar PBS-BSA içinde 1/200 dilüsyonda hazırlandı. Solüsyon taze hazırlanıp kullanıldı (Şekil 3.6).



**Şekil 3.6.** SIRT1 primer antikor dilüsyonları. A: SIRT1 primer antikor 1/100 dilüsyonu B: SIRT1 primer antikor 1/200 dilüsyonu C: SIRT1 primer antikor 1/300 dilüsyonu D: SIRT1 primer antikor 1/500 dilüsyonu

### 3.9.5. Floresan İşaretli Sekonder Antikor

Sekonder antikor (Alexa Fluor® 488 AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L), cat: 111-545-144, Jackson ImmunoResearch, Amerika Birleşik Devletleri) primer antikorlara uygun olarak seçildi. 1/500, 1/800 ve 1/1000 dilüsyon oranlarında ön deney yapıldı. Uygun konsantrasyonun 1/1000 olduğuna karar verildi. Yeşil kanalda görüntülemeye uygun olarak Alexa Fluor® 488 (eksitasyon dalga boyu: 490 nm, emisyon dalga boyu:525 nm) konjuge olan sekonder antikor PBS-BSA içinde 1/1000 dilüsyonda kullanıldı. Taze hazırlanan solüsyon hemen kullanıldı. Çekirdek boyaması için DAPI (4, 6-diamidino-2-fenilindol) içeren kapatma ortamı (Antifade Mounting Medium with DAPI, VECTASHIELD®, cat: H-1200-10, Amerika Birleşik Devletleri) kullanıldı.

### 3.10. İmmüno Floresan İşaretlemenin Uygulaması

Kültüre edilmiş granüloza hücreleri, her kuyuda  $2 \times 10^4$  hücre olacak şekilde ekildi. Ertesi gün besiyeri atıldı ve 3 kere fosfat tampon solüsyonu ile yıkandıktan sonra ve %4 paraformaldehid ile 10 dakika fikse edildi. Fikse edilmiş hücreler tekrar fosfat tampon solüsyonu ile yıkandı ve membranların açılması için % 0,1 Tween 20 (Sigma, Almanya) kullanıldı. Bu basamakta tekrar 3 kere fosfat tampon solüsyonu yapıldı ve keçi serumu ile 15 dakika oda sıcaklığında inkube edildi. Serum blokajından sonra yıkama yapılmadan anti-SIRT1 1:300 ve anti-ACE2 1:200 ile gece boyu  $+4^{\circ}\text{C}$  bekletildi. Floresan işaretli sekonder antikor ile 1/1000 dilüsyonda bir saat oda sıcaklığında inkübe edildi. DAPI damlatılıp kapatılarak Leica-DM6B mikroskop DFC7000T kamerada görüntülendi. Floresan ışımaya yoğunluğunun sayısallaştırılması için görüntülerin ham verileri Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından sağlanan ImageJ görüntü analiz yazılımı ile incelendi. Sayısallaştırma işlemi için yalnızca yeşil kanalın ham görüntülerinde ölçüm yapıldı. Her hücrenin sınırı dahilindeki alanın ortalama ışımaya yoğunluğu ölçüldü ve zemin ışımaya yoğunluğu çıkarılarak analiz edildi.

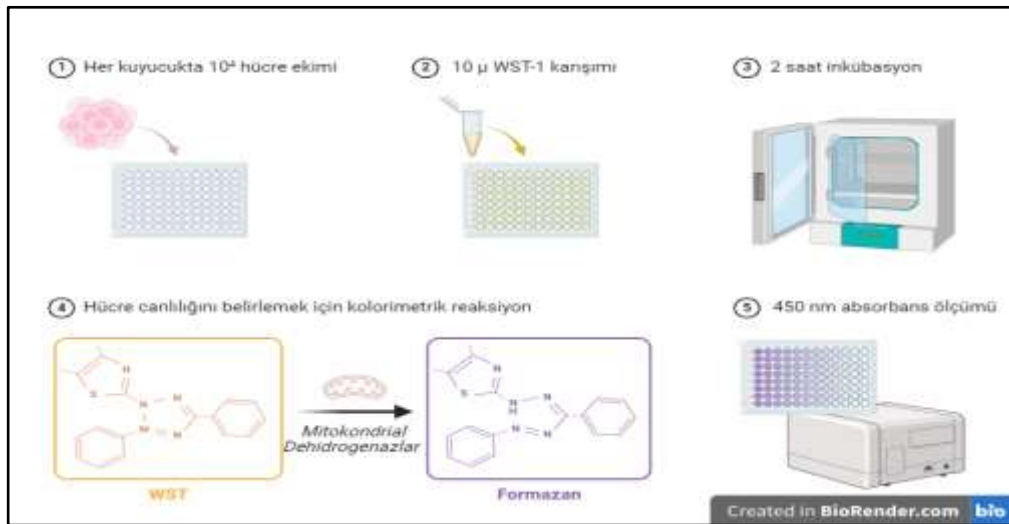
### 3.11. JC-1 Boyama Prosedürü

Üç hücre-bazlı tampon tabletleri 300 ml distile su içinde çözüldü. Ardından JC-1 Reaktif oda sıcaklığına getirildi. Reaktif için hücrelerimiz için kullandığımız

komplet besiyeri 1:10 oranında seyrelterek boyama çözeltisi hazırlandı. Çözelti homojen hale gelene kadar iyice karıştırıldı. Her kuyucukta  $2 \times 10^4$  olacak şekilde ekilmiş olan hücreler  $100 \mu$  JC-1 Reaktifi ile 20 dk boyunca  $37^0 C$ 'de , nemli ve %5  $CO_2$  ortamda inkübe edildi. Çoğunlukla JC-1 agregatlarına sahip sağlıklı hücreler, genellikle rodamin tespit üzere tasarlanmış filtre setleri ile tespit edildi (eksitasyon/emisyon = 540/570 nm). JC-1 monomerlerine sahip apoptotik hücreler ise, FITC'yi tespit etmek için tasarlanmış filtre setleri ile tespit edildi (eksitasyon/emisyon =485 /535 nm)

### 3.12. Wst-1 Proliferasyon Testi

96 kuyucuklu kültür kabına, her kuyucukta  $10^4$  hücre ekildi. Hücreler  $100 \mu$  l komplet besiyeri ile  $37^0 C$ , %5  $CO_2$  nemli inkübatörde inkübe edildi. Ertesi gün ilgili gruplara hücre stresi modeli, ve SIRT1 inhibisyonu uygulandıktan sonra WST-1 uygulaması için ilk önce WST-1 reaktifi ile Elektron Aracılı Çözelti 1:1 oranında karıştırıldı. Her kuyucukta  $10 \mu$  l WST karışımından damlatıldı ve 2 saat inkübe edildi. İnkübasyondan hemen sonra  $450 \text{ nm}$ 'ye ayarlanmış mikropalak okuyucu kullanarak her bir kuyucuğun optik yoğunluğunu (OD değeri) belirlendi ve yüzde olarak hücre canlılığı gösterildi (Şekil 3.7).



**Şekil 3.7.** Wst-1 hücre proliferasyon testi şeması. Bu şekil BioREnder uygulaması kullanılarak çizilmiştir.

### 3.13. İstatistiksel Analiz

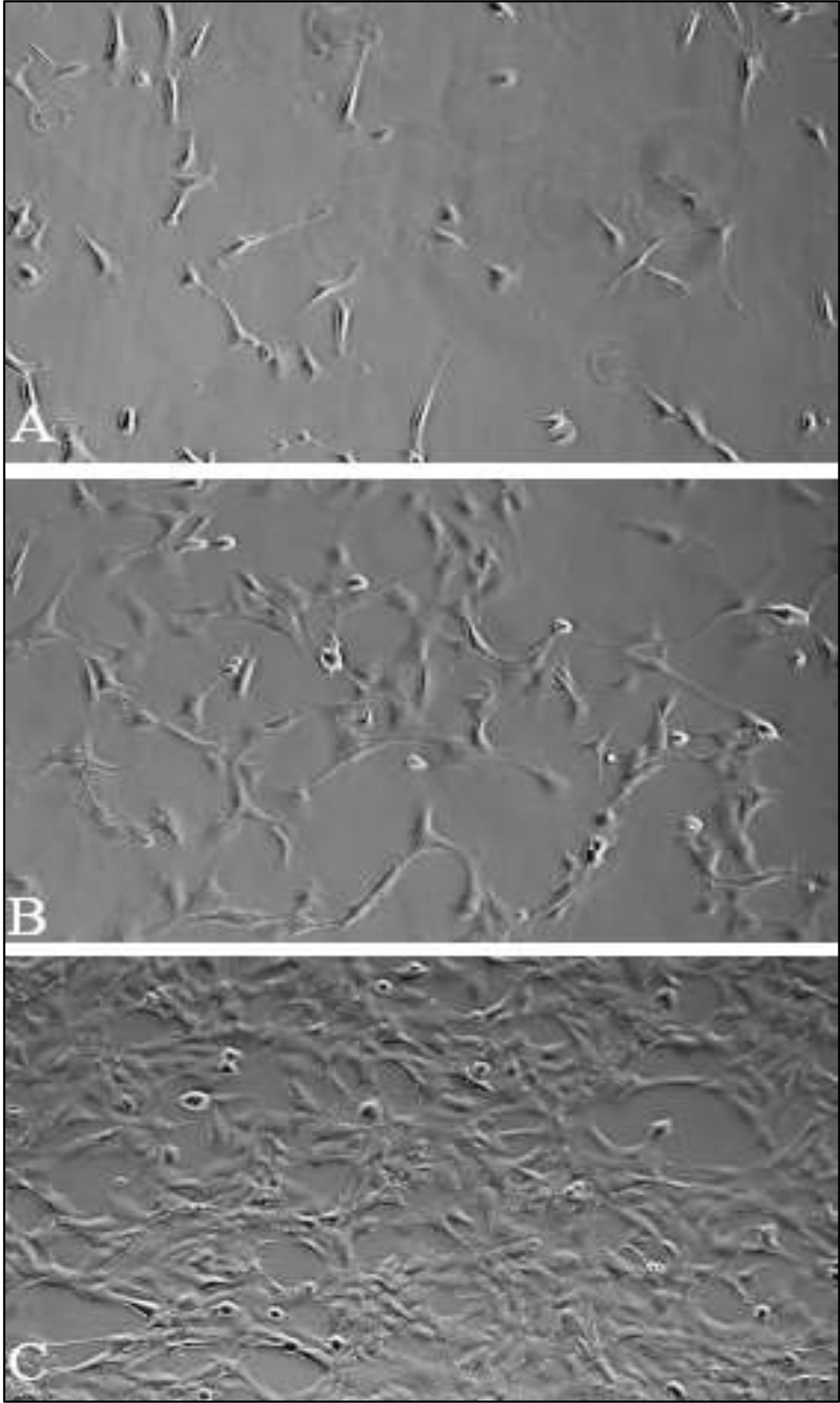
İstatistiksel değerlendirmeler için SPSSver.25 ve Graphpad yazılımlarından faydalanıldı. Araştırma hipotezi non-parametrik test varsayımlarının sağlandığından non-parametrik testler kullanılarak değerlendirildi. Çalışma için ihtiyaç duyulan örneklem genişliği nonparametrik testlere göre hesaplandı. Gruplar için her deneyde düzeltilmiş p değerleri hesaplandı ve  $p < 0,05$  anlamlı kabul edildi. Verilerin değerlendirilmesinde non-parametrik test olan Kruskal-Wallis, gruplar arasında ikili karşılaştırma testi yapıldı. Sonuçların grafiklendirilmesi için GraphPad Prism 8 programı kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Kültüre Edilen Hücrelerin Faz Kontrast Mikroskopunda İncelenmesi

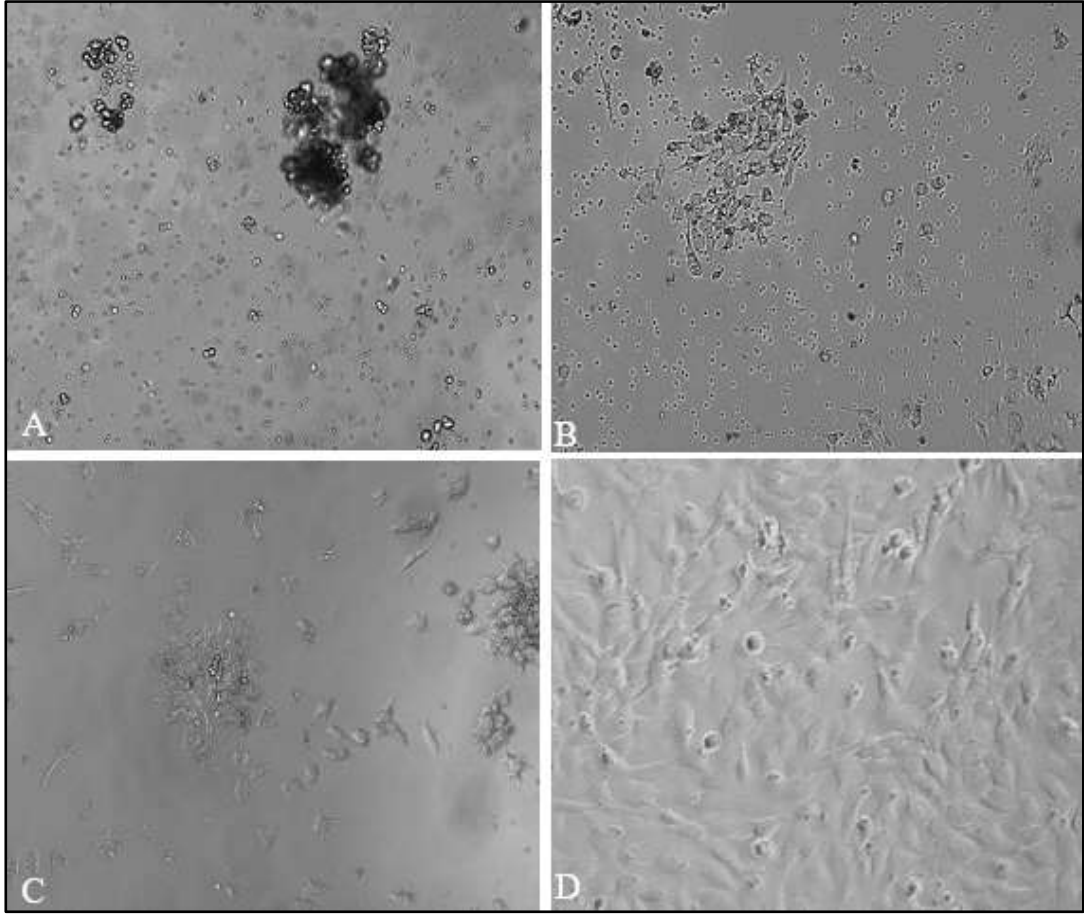
HGL5 granüloza hücreleri, epiteloid morfolojiye uygun olarak belirgin hücresel sınırları ve düzgün poligonal şekilleri ile gözlemlendi. Kültürün ilerleyen saatlerinde hücreler homojen dağılım sergiledi ve tipik epiteloid hücre morfolojisini korudukları izlendi. Hücrelerin birbirine yakın yerleşim ve proliferasyon göstererek 48 saatte tam konfluensiye ulaştıkları izlendi (Şekil 4.1).

Gruplardaki farklı bireylere yapılan ovulasyon indüksiyonu sonucunda farklı sayılarda folikül gelişimi gözlemlendi. Bu nedenle OPU işlemi sırasında elde edilen atık folikül sıvısı miktarı da değişkenlik gösterdi. Folikül sıvıları laboratuvarımız bünyesinde oluşturulan Zırh ve arkadaşları tarafından geliştirilen granüloza hücreleri izolasyonu metodu ile izole edildi bu sırada kan hücrelerinden ayrıştırıldı. Sağlıklı kadınların foliküler sıvısında izole edilen granüloza hücre peleti, PKOS ve AOR grubuna göre daha yoğundu. Ancak bu gruptan ekilen granüloza hücreleri PKOS ve AOR tanılı gruba kıyasla sayıca daha fazla olmalarına rağmen, tutunmaları ve proliferasyonu daha yavaş ilerlediği gözlemlendi (Şekil 4.2). Ayrıca PKOS grubunun granüloza hücreleri de AOR grubuna kıyasla daha yavaş proliferasyon hızı gösterdi. İzolasyonu takiben hücreler 24. saatte faz kontrast mikroskobu altında incelendiğinde hücrelerin çoğunda kısa sitoplazmik uzantıları gözlemlendi. İzolasyon sonrası ilk besleme 48. saatte yapılan hücrelerin ortamında metabolik atıklardan ve tutunamayıp apoptoza uğrayan hücrelerden kaynaklandığı düşündürülen sarı ve koyu renk besiyeri gözlemlendi (Şekil 4.3). Bütün grupların granüloza hücreleri epiteloid morfolojisi özellikleri taşımakla birlikte AOR grubunun granüloza hücrelerinin sitoplazmik uzantıları sağlıklı ve PKOS grubunun hücreleri ile kıyasla daha spiküler morfolojiye sahip oldukları izlendi (Şekil 4.4) .

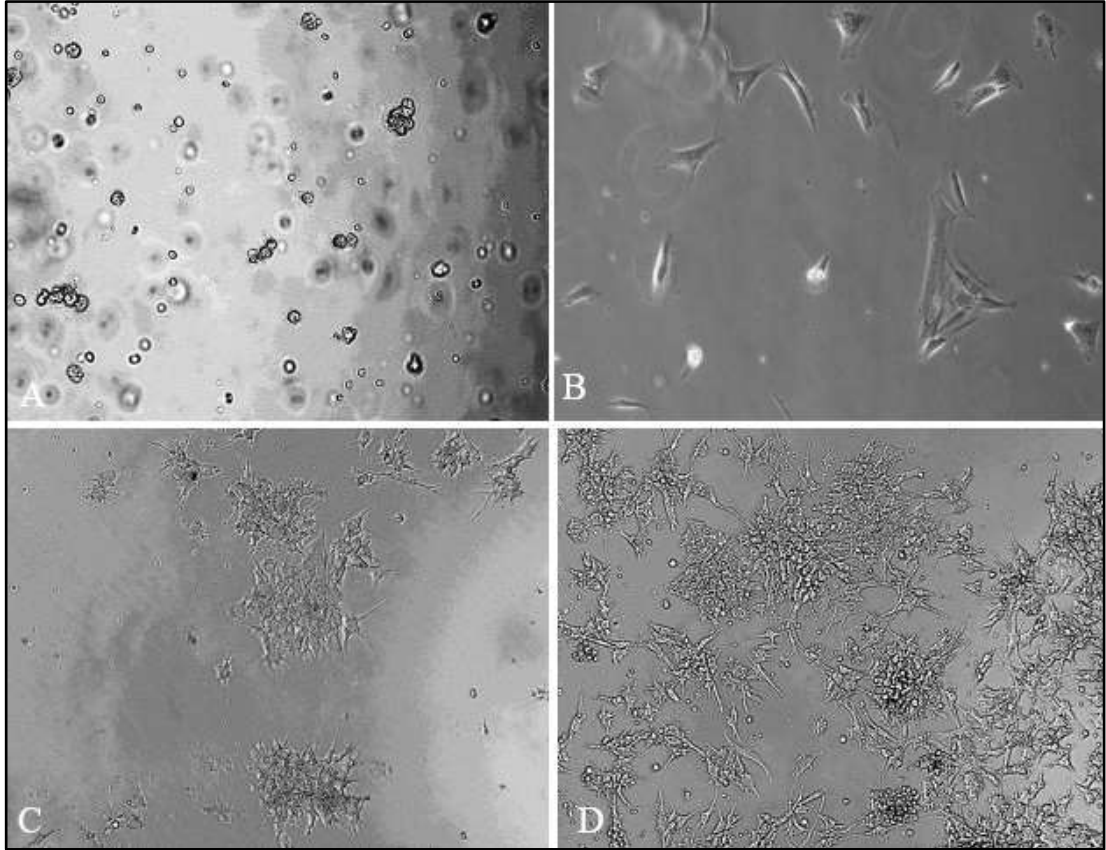


**Şekil 4.1.** HGL5 granüoza hücre hattı **A:** 8. saat **B:** 24. saat **C:** 48. saat

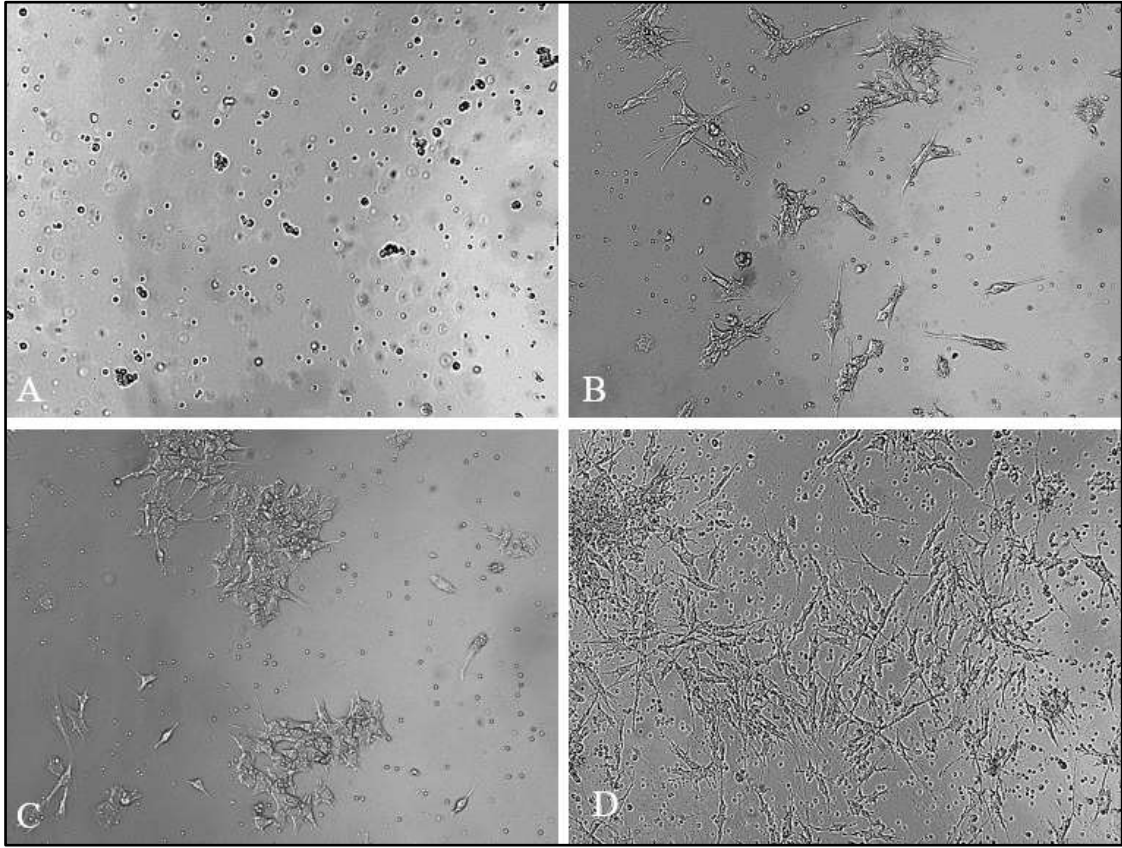




**Şekil 4.2.** Sağlıklı kadınların granüloza hücrelerinin primer kültür mikrografları. **A:** Primer kültürde 0. saat granüloza hücreleri. Hücreler küme halinde ekilmiştir ve henüz tutunmadıkları görülmektedir. **B:** Primer kültürde 24. saat granüloza hücreleri. **C:** Primer kültürde 48. saat granüloza hücreleri. **D:** Primer kültürde 1. hafta granüloza hücreleri.



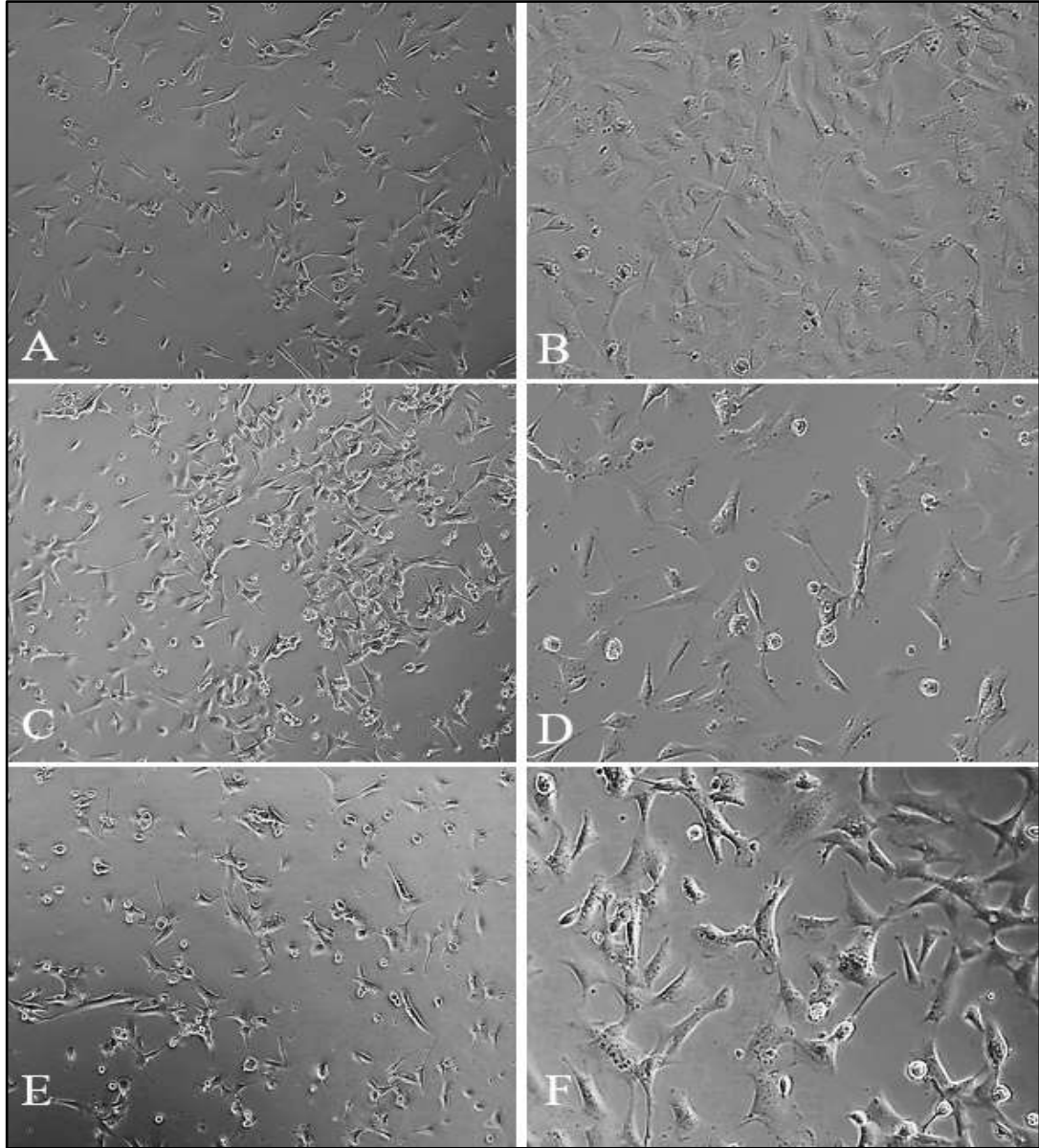
**Şekil 0.1.** PKOS kadınların granüloza hücrelerinin primer kültür mikrografları. **A:** Primer kültürde 0. saat granüloza hücreleri. Hücreler henüz tutunmadıkları görülmektedir. **B:** Primer kültürde 24. saat granüloza hücreleri. **C:** Primer kültürde 48. saat granüloza hücreleri. **D:** Primer kültürde 1. hafta granüloza hücreleri.



**Şekil 4.4.** AOR kadınların granüloza hücrelerinin primer kültür mikrografları. **A:** Primer kültürde 0. saat granüloza hücreleri. Hücreler henüz tutunmadıkları görülmektedir. **B:** Primer kültürde 24. saat granüloza hücreleri. **C:** Primer kültürde 48. saat granüloza hücreleri. **D:** Primer kültürde 1. hafta granüloza hücreleri

#### 4.2. HGL5 Hücrelerinin Stres Sonrası Faz Kontrast Mikroskobunda İncelenmesi

Kontrol HGL5 granüloza hücrelerinin mikroskobik yapıları epiteloid görünümlü olup tipik kaldırım taşı görünümü izlendi . Hücreler homojen dağılım gösterdi. Kontrol grubuna kıyasla, AICAR ile muamele edilen hücrelerde çeşitli yapısal değişiklikler gözlemlendi. Hücreler arası bağlantılarda azalma gözlemlendi ve hücrelerin daha izole bir hale gelip kümeleşmeleri dikkat çekti. Apoptotik süreçlerin başladığını düşündüren daha koyu ve yoğun hücre çekirdekleri görüldü. SIRT1 inhibe edilen grupta ise sitoplazmanın bazı kısımlarında parlaklığın kaybolduğu ve yoğun sitoplazmik granüllerin belirgin artışı görüldü (Şekil 4.5).



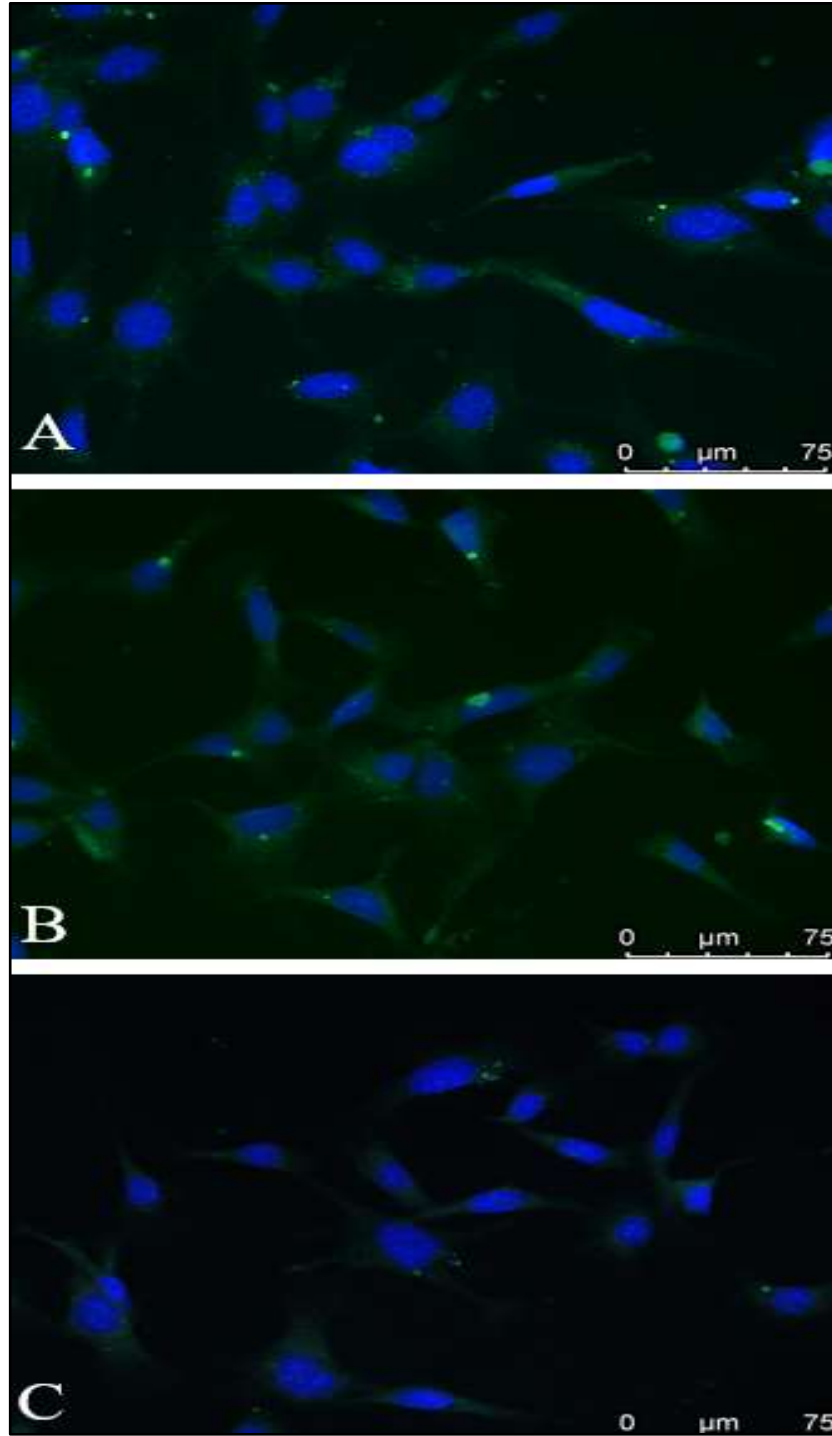
**Şekil 0.2.** **A:** HGL5 grubu, x10 objektif büyütmesi. **B:** HGL5 grubu, x20 objektif büyütmesi. **C:** AICAR sonrası HGL5, x10 objektif büyütmesi. **D:** AICAR sonrası HGL5, x10 objektif büyütmesi. **E:** SIRT1 inhibisyonu ve AICAR sonrası x10 objektif büyütmesi **F:** SIRT1 inhibisyonu ve AICAR sonrası x20 objektif büyütmesi.

## 4.2. İmmüno Floresan İşaretlenmenin Değerlendirilmesi

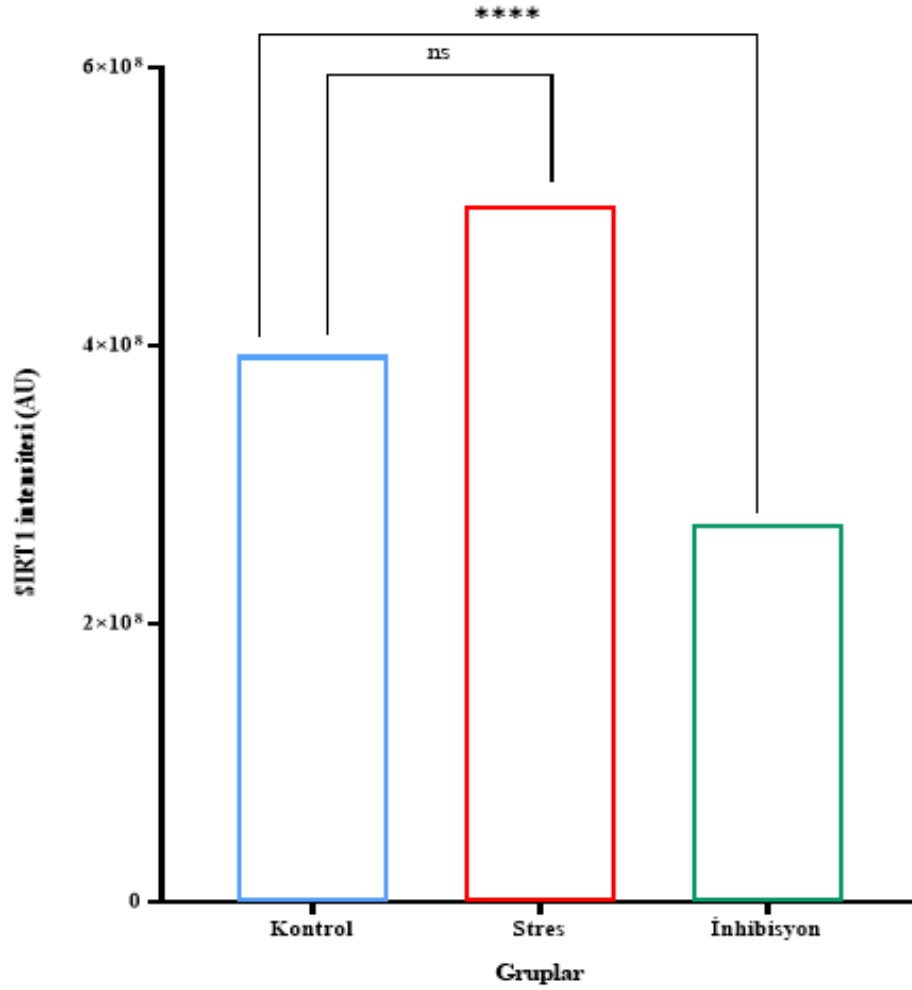
### 4.2.1 SIRT1 İmmüno Floresan İşaretlenmenin Değerlendirilmesi

HGL5 hücre hattında SIRT1 immünoişaretlenmesi uygulandı. SIRT1 ifadenmesi hücrenin sitoplazmasında yoğun izlendi. AICAR ile metabolik stres modellenmesi sonrası SIRT1 ifadenmesi sitoplazmik ve yer yer noktasal patern

gösterdi (Şekil 4.6). Stres sonrası SIRT1 ifadenmesi artsa da, istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p= 0.999$ ) (Şekil 4.7) .

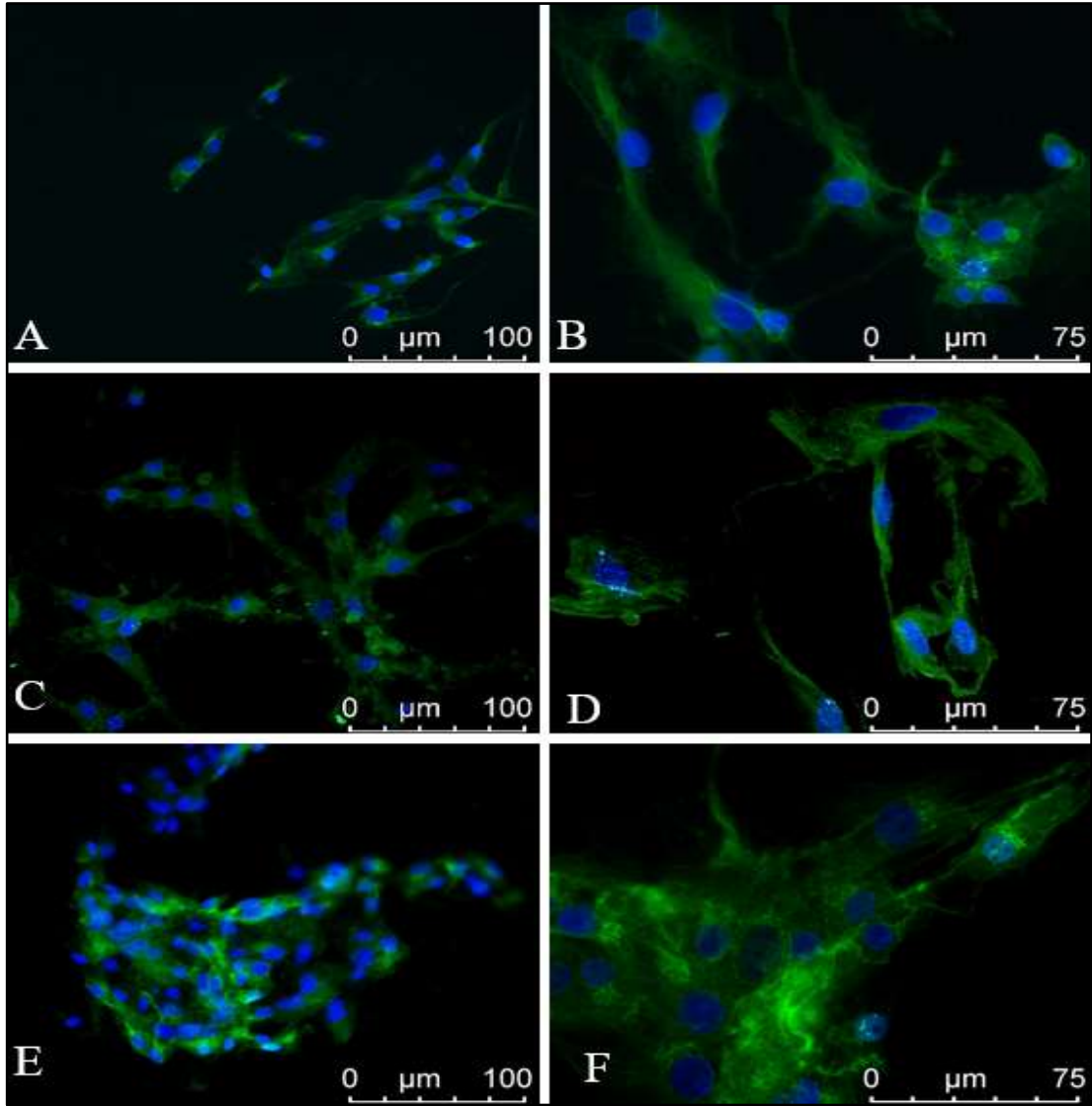


**Şekil 0.3.** **A:** HGL5 hücreleri SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **B:** HGL5 hücreleri AICAR sonrası SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **C:** HGL5 hücreleri AICAR+Ex-527 immünişaretleme, x40 büyütmesi

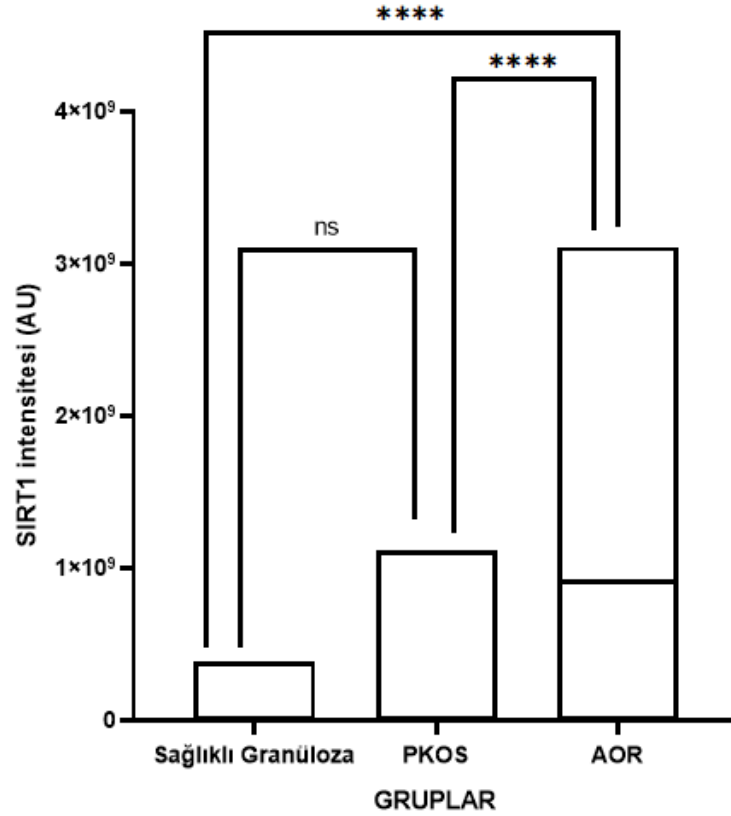


**Şekil 0.4.** HGL5 granüloza grubunda SIRT1 intesitesinin karşılaştırılması. Image J kullanılarak yapılan immüno Floresan yoğunluğu analizinde Kontrol ve Stres grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.999$ ). Kontrol ve İnhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\* ( $p=0.0001$ ). Stres ve inhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\* ( $p=0.0001$ ).

Sağlıklı granüloza (erkek infertilitesi), PKOS ve AOR gruplarında SIRT1 ifadesi izlendi. Her üç grupta işaretlenme paterni özellikle hücrenin sitoplazmasında yoğunlaşmıştı. PKOS grubunda daha fazla olmakla birlikte, üç grupta da hücre çekirdeğinde de SIRT1 ifadesi mevcuttu (Şekil 4.8). Gruplar arasında AOR grubunun SIRT1 ifadesi diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazlaydı ( $p=0.0001$ ). Sağlıklı granüloza (erkek infertilitesi) grubu ve PKOS grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $p=0.274$ ) (Şekil 4.9).



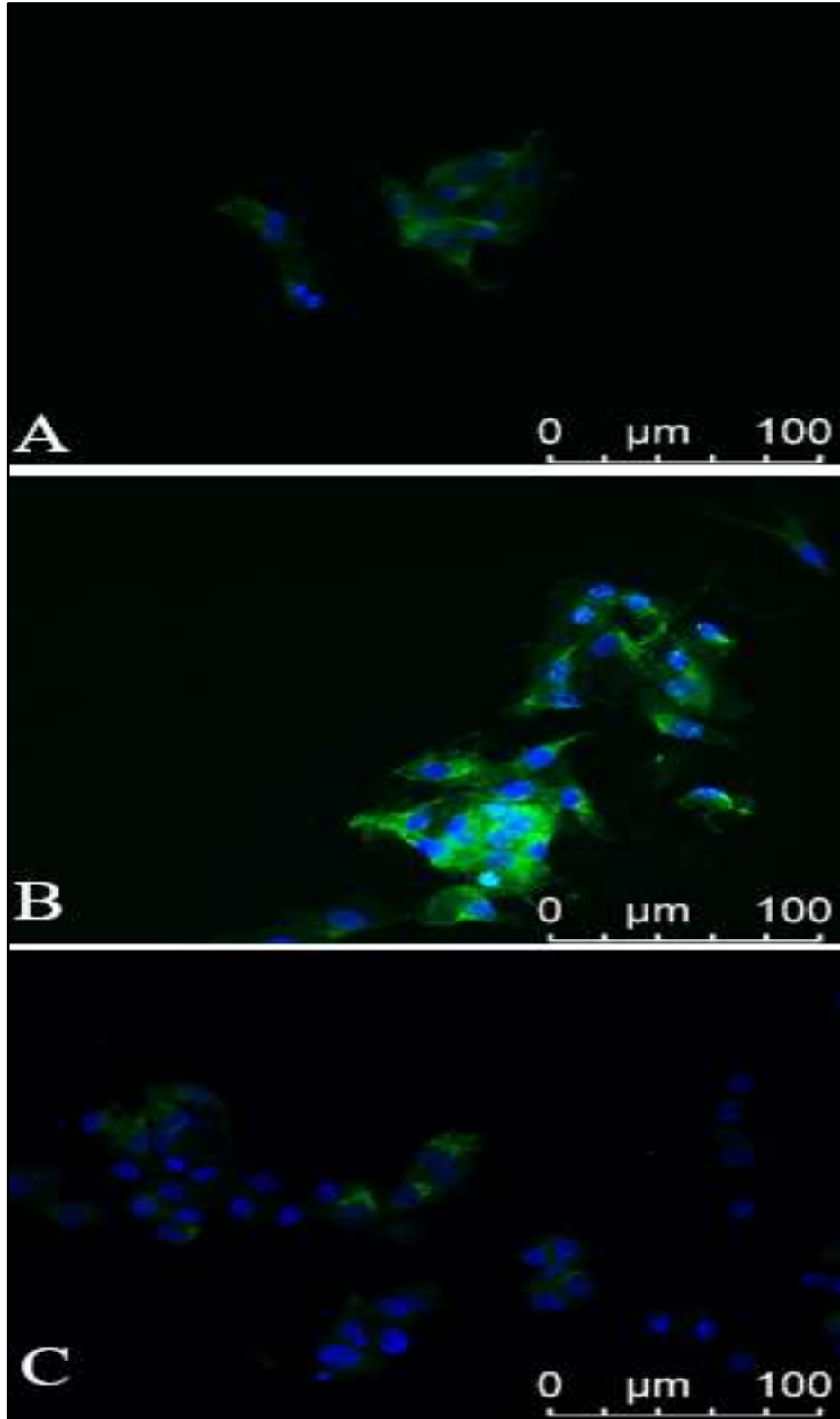
**Şekil 4.8.** **A:** Sağlıklı Granüloza Grubu SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **B:** Sağlıklı Granüloza Grubu SIRT1 immünişaretleme, x60 objektif büyütmesi. **C:** PKOS Grubu SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **D:** PKOS Grubu SIRT1 immünişaretleme, x60 objektif büyütmesi. **E:** AOR Grubu SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **F:** AOR Grubu SIRT1 immünişaretleme, x60 objektif büyütmesi.



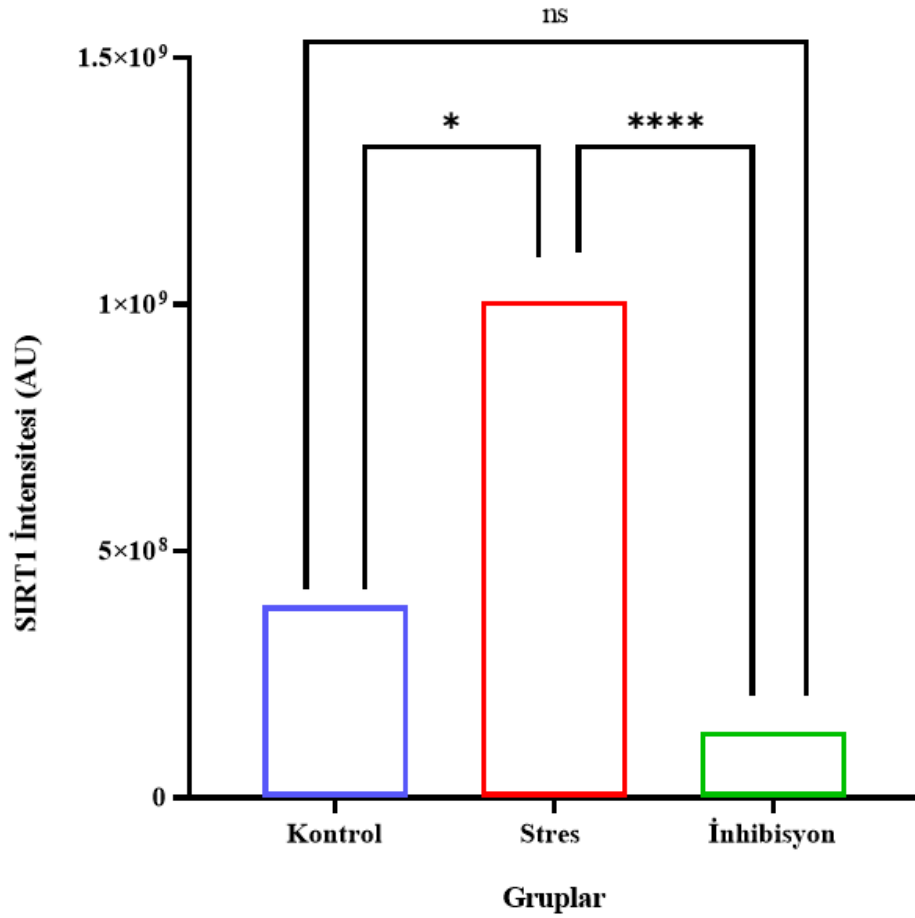
**Şekil 4.9.** Gruplarda SIRT1 intesitesinin karşılaştırılması. Image J kullanılarak yapılan immüno Floresan yoğunluğu analizinde sağlıklı granüloza grubu (erkek infertilitesi) ve PKOS grubu arasında önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.274$ ). Sağlıklı granüloza (erkek infertilitesi) grubu ve AOR grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\*\*( $p=0.0001$ ). PKOS grubu ve AOR grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\*\*( $p=0.0001$ ).

Sağlıklı granüloza grubu (erkek infertilitesi) hücrelerinde SIRT1 immünişaretleme ile SIRT1 ifadesi gözlemlendi. Aynı grubun incelenen bütün hücrelerinde, farklı metabolik aktivitelere bağlı olabileceğini düşündüren, aynı ifadenin yoğunluğunun olmadığı dikkat çekti. AICAR ile metabolik stres modellenmesi sonrası SIRT1 immünreaktivitesinin belirgin bir şekilde arttığı görüldü. SIRT1 ifadenin ağırlıklı olarak sitoplazmik olmasıyla birlikte, AICAR sonrası grubunda, uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücrelerine göre çekirdekteki yoğunluğu dikkat çekti (Şekil 4.10). Stres sonrası SIRT1 inhibe edilen grupta, az da olsa, sadece sitoplazmada sınırlı olarak SIRT1 ifadenin izlendi, ancak uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ( $p=0,0134$ ) (Şekil 4.11).





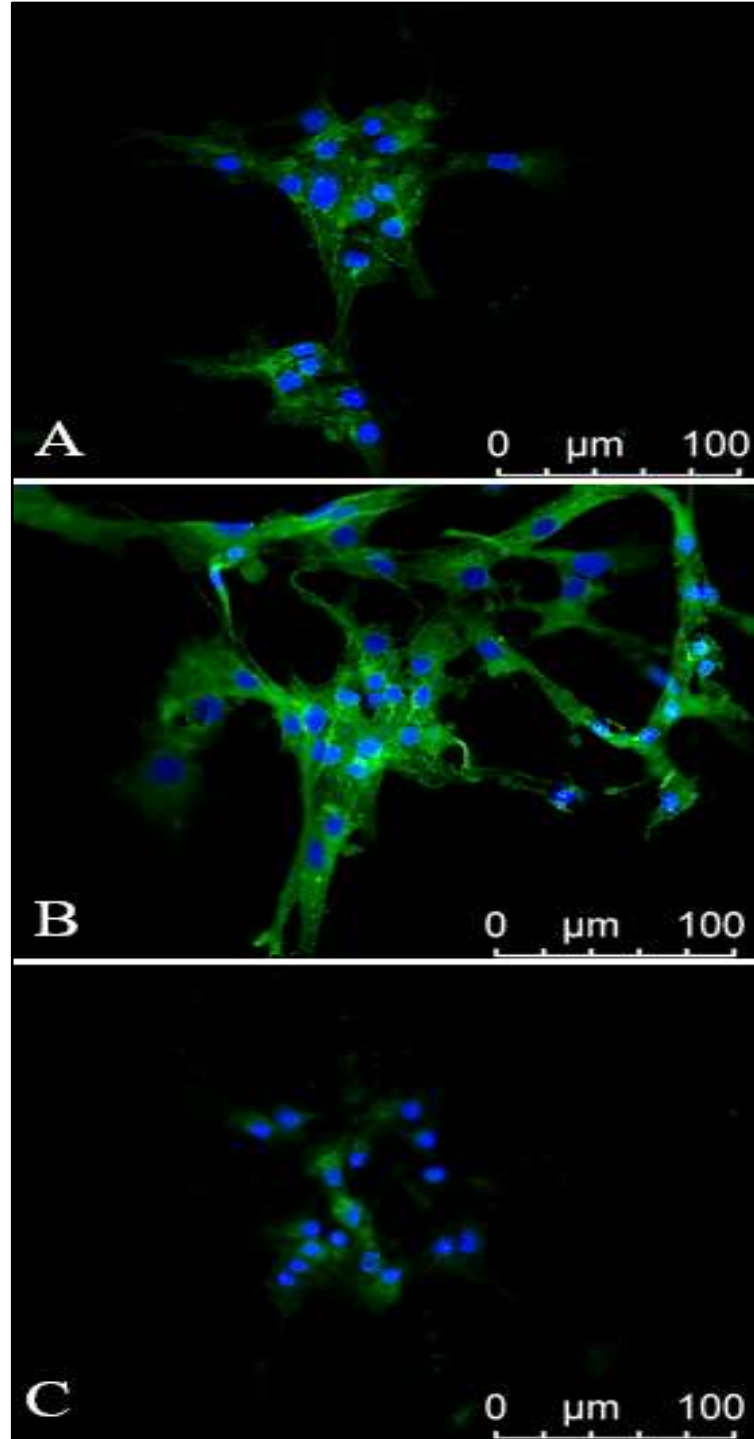
**Şekil 4.10.** **A:** Sağlıklı Granüloza Grubu SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **B:** Sağlıklı Granüloza Grubu AICAR sonrası SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **C:** Sağlıklı Granüloza Grubu AICAR+EX-527 sonrası SIRT1 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi.



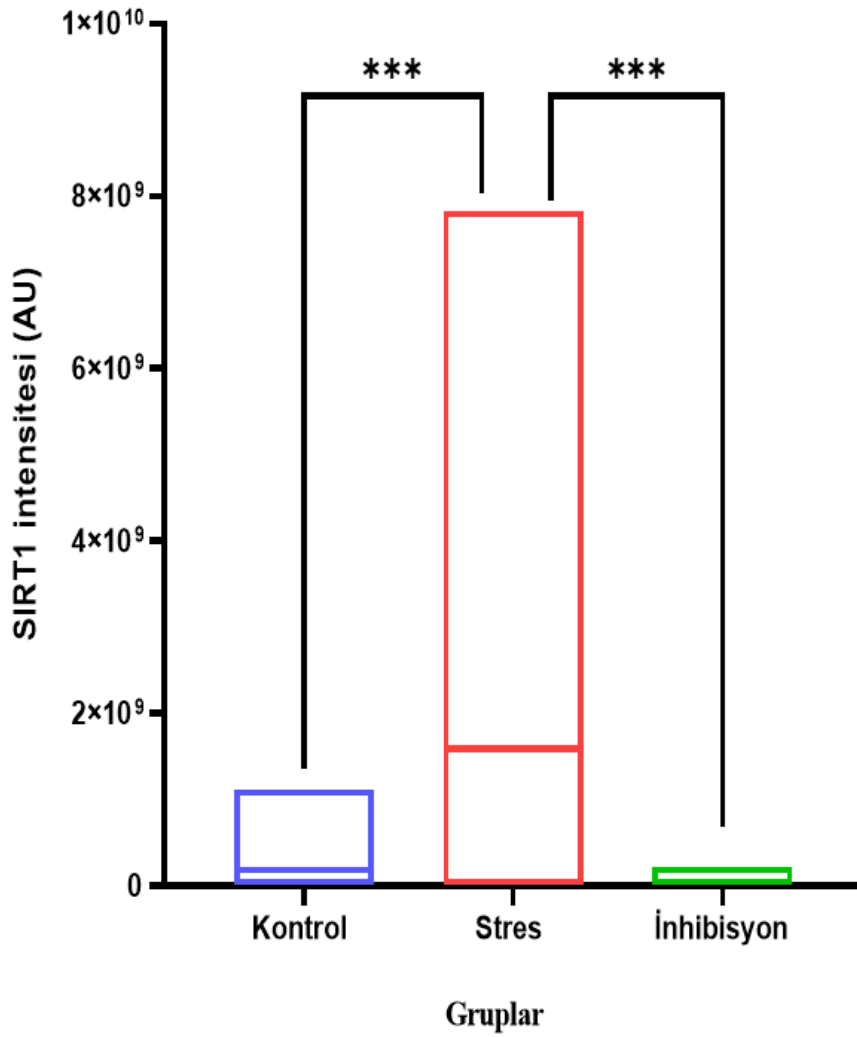
**Şekil 4.11.** Sağlıklı granüloza hücresi (erkek infertilitesi) grubunda SIRT1 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immüno Floresan yoğunluğu analizinde Stres grubunda Kontrol grubuna göre SIRT1 immünişaretleme ifadesinde istatistiksel olarak fark bulunmuştur \* (p= 0.013). Kontrol ve İnhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (p=0.15). Stres ve inhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\* (p=0.0001).

PKOS grubunun granüloza hücrelerinde SIRT1 ifadenmesi çoğunlukla sitoplazmik olmakla birlikte, çekirdekte de SIRT1 immünişaretleme görüldü. AICAR ile metabolik stres modellemesi grubunda ise SIRT1 ifadenmesinin belirgin bir şekilde arttığı görüldü. Uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücrelerinin çekirdeğindeki belirgin ifadenme, AICAR sonrası daha da yoğun izlendi. SIRT1 inhibisyonuna rağmen, çok zayıf da olsa birkaç hücrenin sitoplazmalarında SIRT1 ifadenmesi görüldü, ancak çekirdekte SIRT1 ifadenmesi yoktu (Şekil 4.12). Bu SIRT1 ifadenmesi sırasıyla uygulama yapılmamış (kontrol alt

grubu) ve stres grubunda daha azdı ve istatistiksel olarak bu fark anlamlı bulundu ( $p=0.0008$ ) (Şekil 4.13).



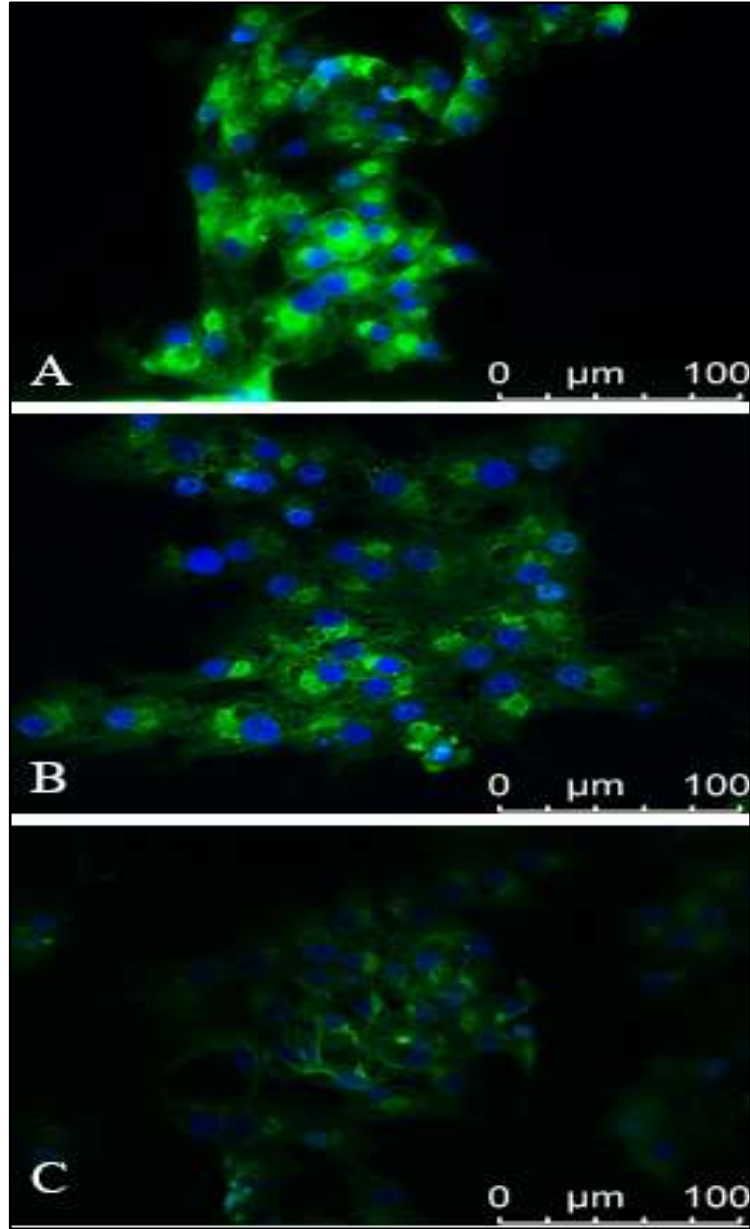
**Şekil 4.12.** **A:** PKOS Grubu SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **B:** PKOS Grubu AICAR sonrası SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. **C:** PKOS Grubu AICAR+EX-527 sonrası SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi.



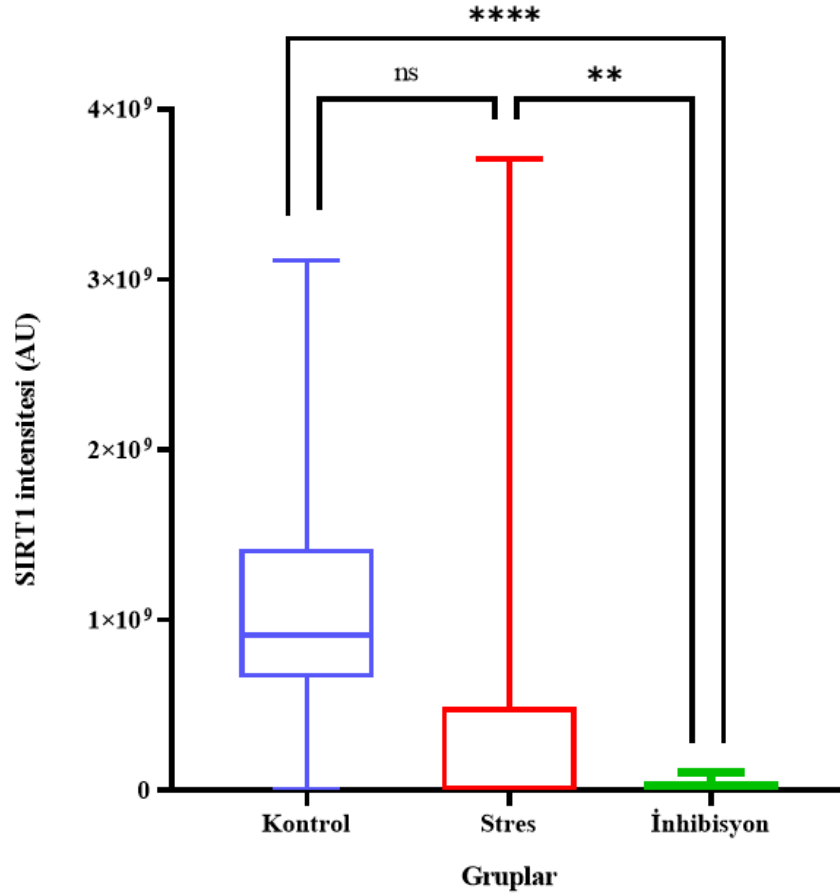
**Şekil 0.5.** Polikistik over sendromu grubunda SIRT1 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immünfloresan yoğunluğu analizinde Stres grubunda Kontrol grubuna göre SIRT1 ifadesi istatistiksel olarak önemli ölçüde arttığı bulunmuştur \*\*\* (p= 0.008). Kontrol ve İnhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır (p=0.147). Stres ve inhibisyon grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmuştur \*\*\*\* (p=0.0001).

AOR grubundaki SIRT1 ifadenmesi bütün gruplarda yoğun izlendi ancak uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücrelerinde SIRT1 ifadenmesi daha yoğundu. Bu ifadenme sitoplazma ve çekirdekte olmakla birlikte, sağlıklı ve PKOS grubundan farklı olarak sitoplazmada lipid damlacıklarını düşündüren vakuollü sitoplazma gözlemlendi (Şekil 4.14). AICAR sonrası sitoplazmik vakuolizasyonda artışı yanı sıra SIRT1 ifadenmesinde de belirgin yoğunluk izlendi. Sağlıklı granüloza hücresi ve PKOS grubunda da olduğu gibi SIRT1 inhibisyonu sonrası çok zayıf bir

ifadelenme görüldü, ancak çekirdekte ifadelenme yoktu. Uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücreleri ile SIRT1 inhibisyonu yapılmış grubu arasında SIRT1 ifadesinin istatistiksel olarak arttığı bulundu ( $p=0.001$ ). Uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücreleri ile AICAR ile metabolik stres modellemesi grubu arasında SIRT1 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.111$ ) (Şekil 4.15).



**Şekil 4.14.** A: AOR Grubu SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. B: AOR Grubu AICAR sonrası SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi. C: AOR Grubu AICAR+EX-527 sonrası SIRT1 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi

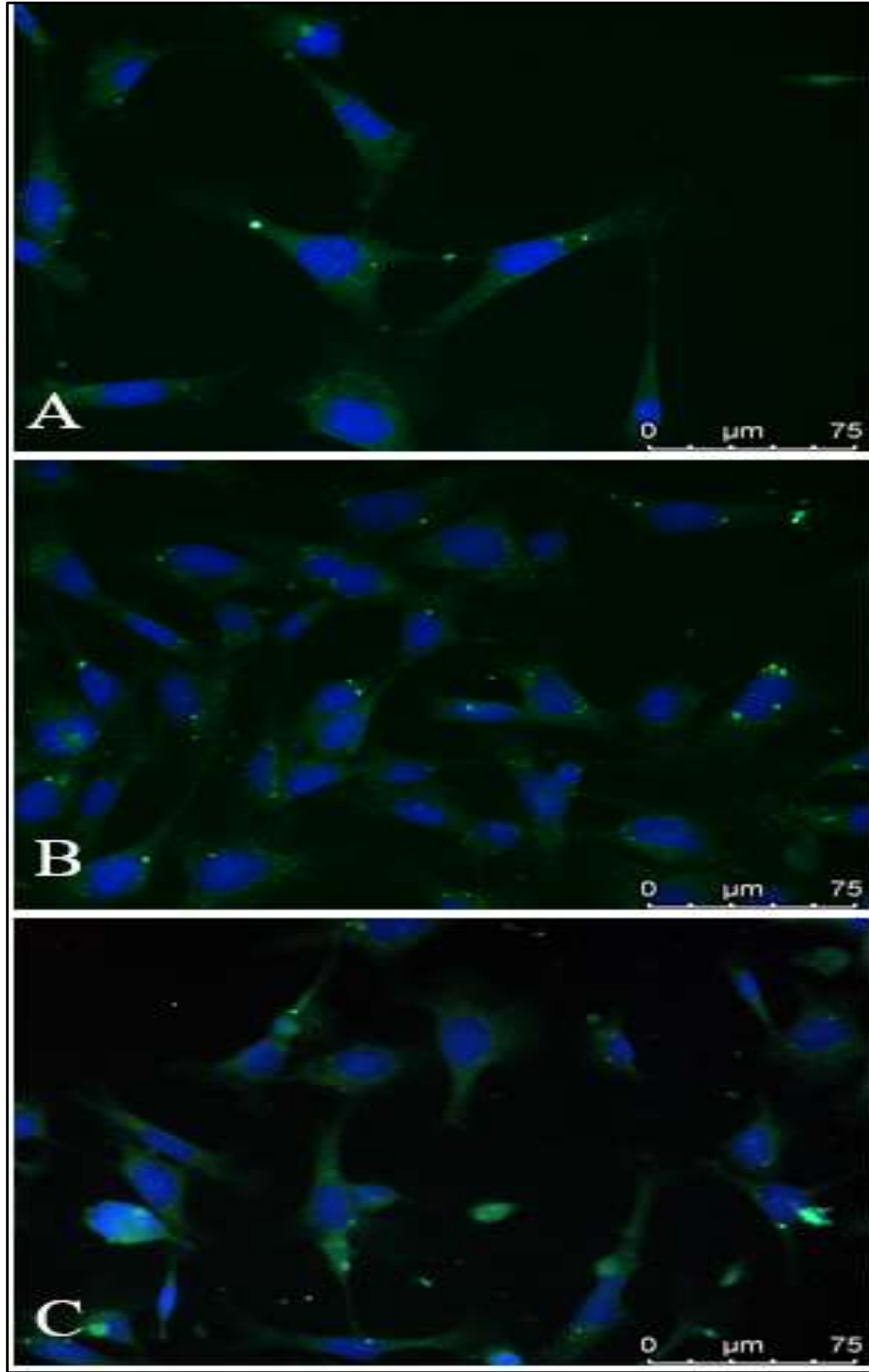


**Şekil 0.6.** Azalmış oosit rezervi grubunda SIRT1 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immünfloresan yoğunluğu analizinde Kontrol grubu ile Stres grubu arasında SIRT1 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p= 0.111$ ). Kontrol grubunda İnhibisyon grubuna göre SIRT1 ifadesi istatistiksel olarak önemli ölçüde arttığı bulunmuştur \*\*\*\* ( $p=0.0001$ ). Stres grubundaki SIRT1 ifadesi inhibisyon grubuna göre istatistiksel olarak arttığı bulunmuştur \*\* ( $p=0.002$ ).

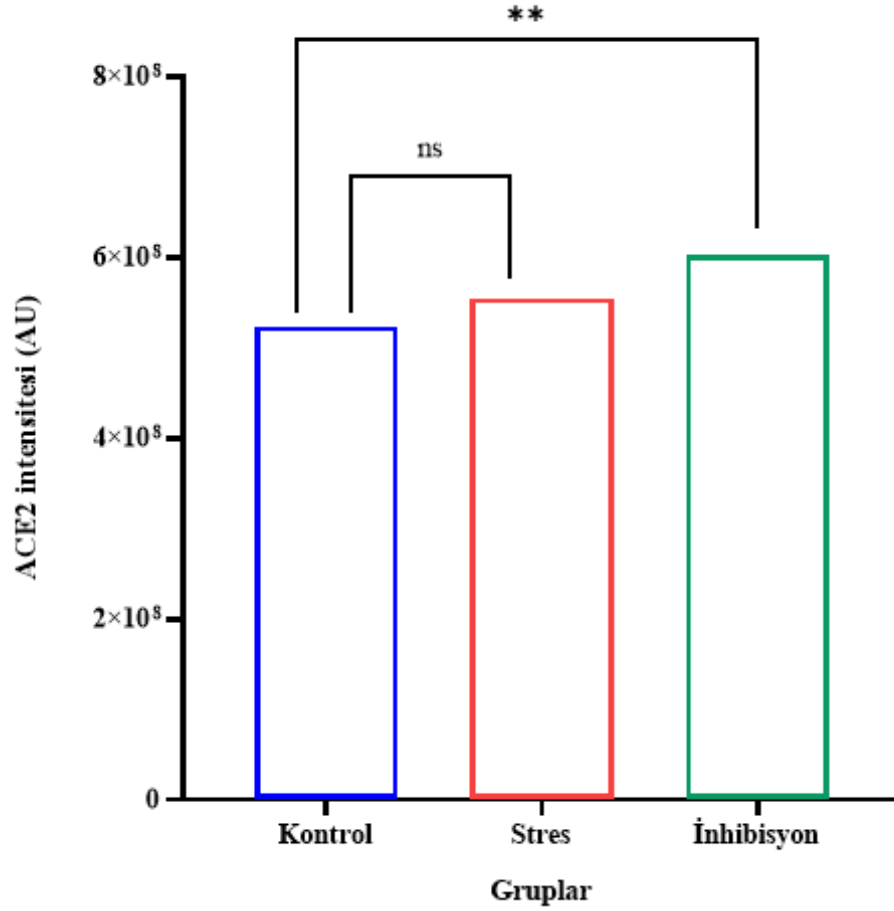
#### 4.3.1 ACE2 İmmünişaretlenmenin Değerlendirilmesi

HGL5 insan granüloza hücre hattında ACE2 immünişaretlemesi gerçekleşti. ACE2 ifadenmesi granüloza hücrelerinin sitoplazmasında belirgindi ve yer yer granüller patern dikkati çekti. AICAR ile metabolik stres modellemesi sonrası ACE2 immünişaretlemesi artış gösterdi ancak istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p=0.728$ ). SIRT1 inhibisyonu sonrası ACE2 immünişaretlemesi daha yoğun ve uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücrelerine kıyasla nerdeyse bütün

hücrelerin sitoplazmasında granüller işaretleme dikkati çekti (Şekil 4.16). Gözlenen bu farklılık istatistiksel olarak da anlamlıydı ( $p= 0.091$ ) (Şekil 4.17).



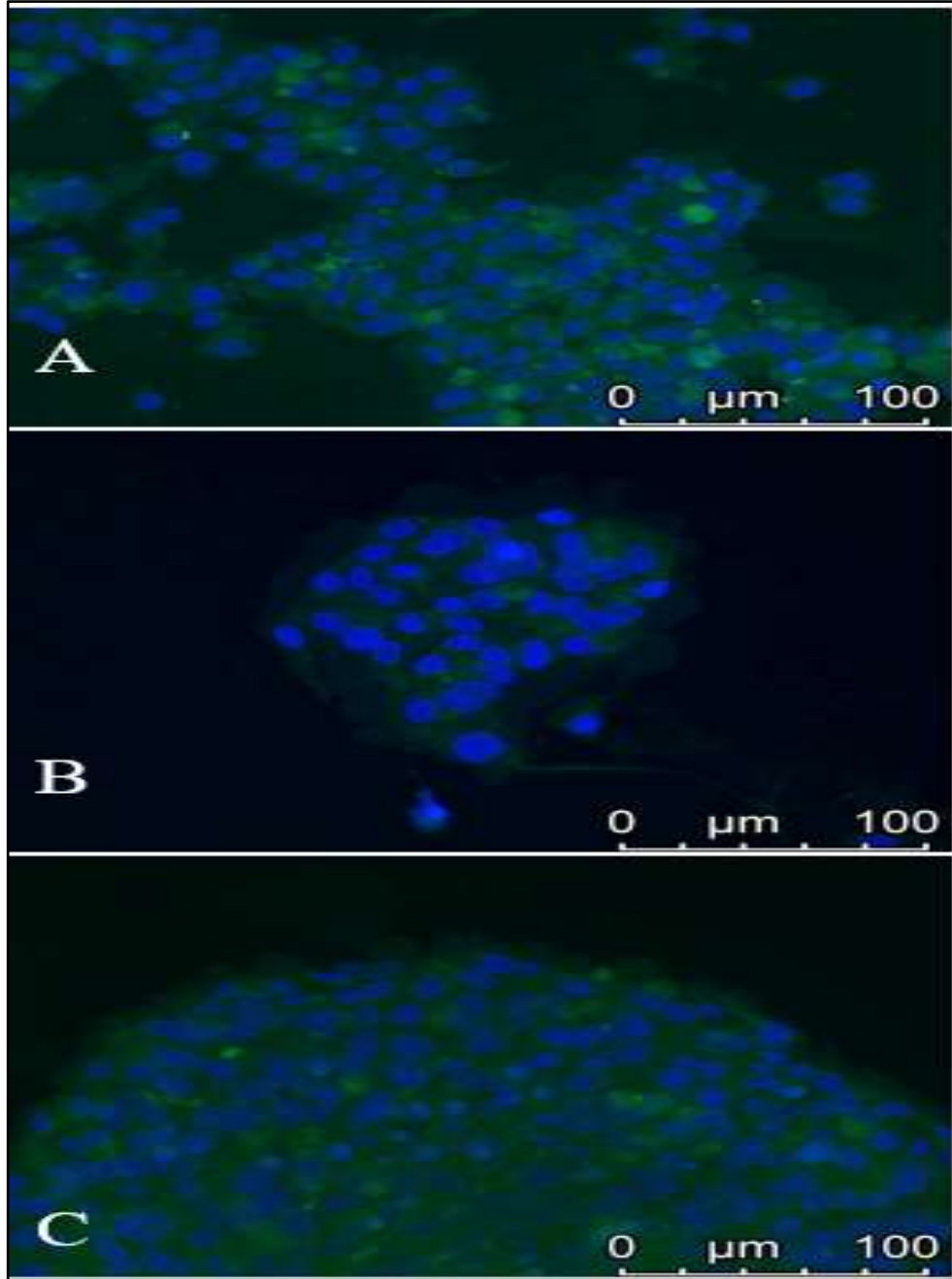
**Şekil 4.16.** **A:** HGL5 granüloza hücreleri ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **B:** HGL5 granüloza hücreleri AICAR sonrası ACE2 immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **C:** HGL5 granüloza hücreleri AICAR+EX527 sonrası ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi.



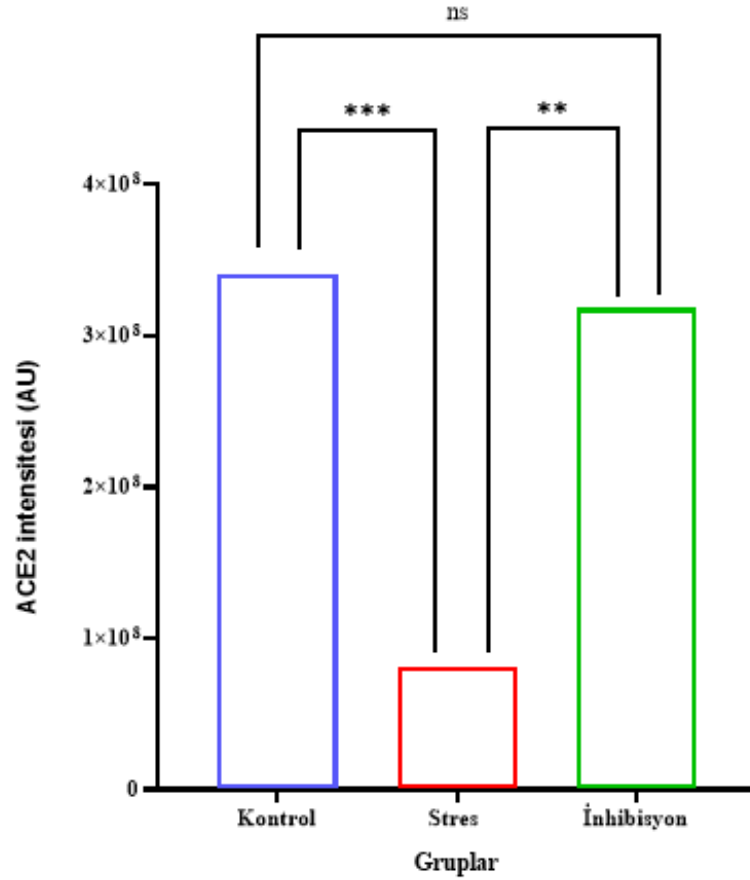
**Şekil 4.17.** HGL5 granüloza hücresi grubunda ACE2 intesitesinin karşılaştırılması. Image J kullanılarak yapılan immünofloresan yoğunluğu analizinde Kontrol ve Stres grubu arasında istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p= 0.728$ ). İnhibisyon grubunda Kontrol grubuna göre ACE2 ifadesi istatistiksel olarak arttığı bulunmuştur **\*\***( $p=0.009$ ). Stres ve inhibisyon grubu arasındaki ACE2 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.233$ ).

Sağlıklı granüloza grubunda (erkek infertilitesi) ACE2 floresan immünişaretlemesi yine sitoplazmik olmakla birlikte, HGL5 hücre hattında gözlemlediğimiz granüler patern yoktu. AICAR ile metabolik stres modellemesi sonrası ACE2 floresan immünişaretlemesi azaldı ancak stresteki hücrelerin SIRT1 EX-527 uygulayarak inhibe edilğinde ACE2 floresan immünişaretlemesi arttı (Şekil 4.18). Bu artış istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ( $p=0.017$ ) (Şekil 4.19).



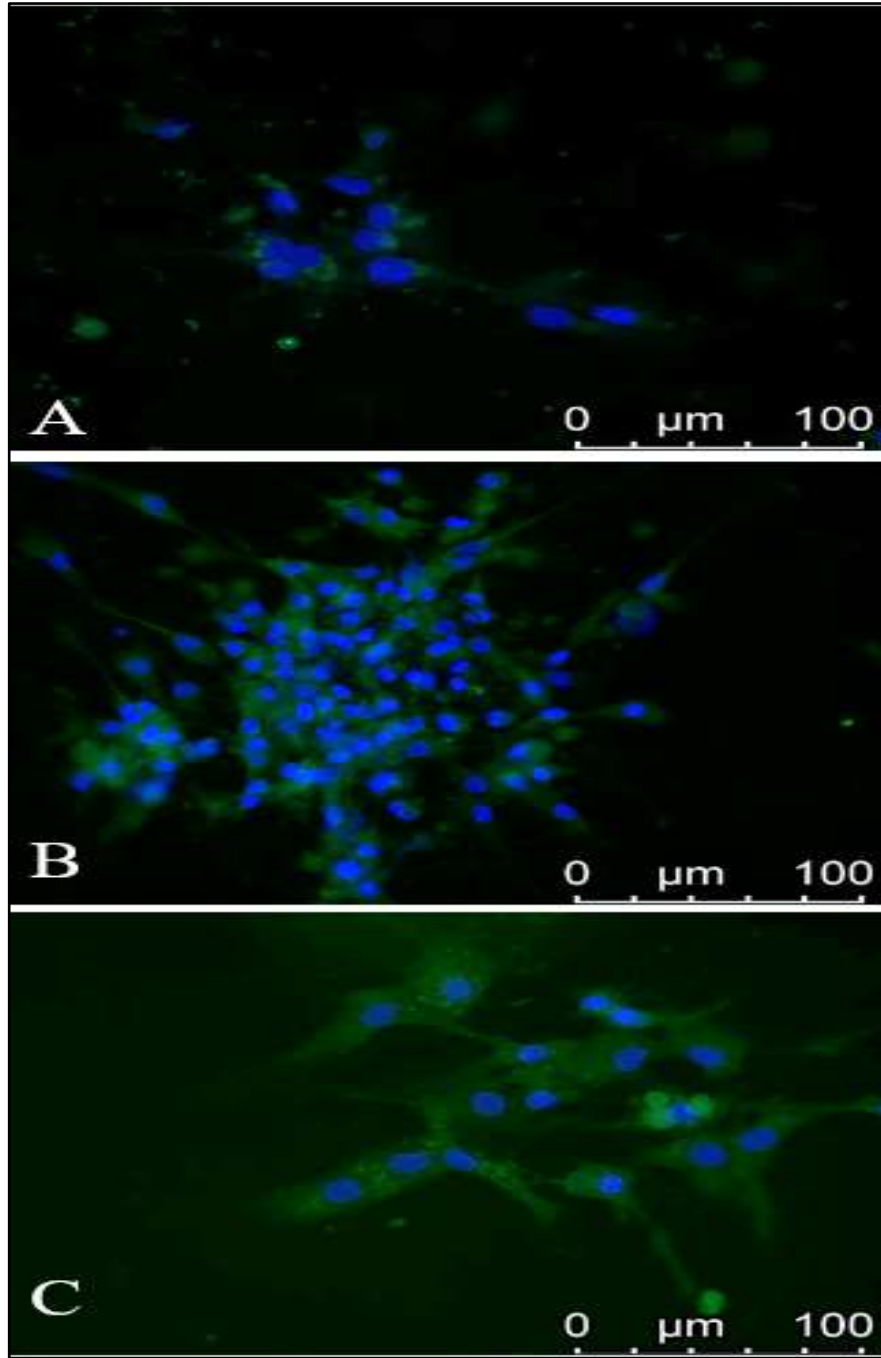


**Şekil 4.18.** **A:** Sağlıklı granüloza hücreleri ACE2 floresan immünişaretlemesi, x40 objektif büyütmesi **B:** Sağlıklı granüloza hücreleri AICAR sonrası ACE2 floresan immünişaretlemesi, x40 objektif büyütmesi **C:** Sağlıklı granüloza hücreleri AICAR+EX527 sonrası ACE2 floresan immünişaretlemesi, x40 objektif büyütmesi.

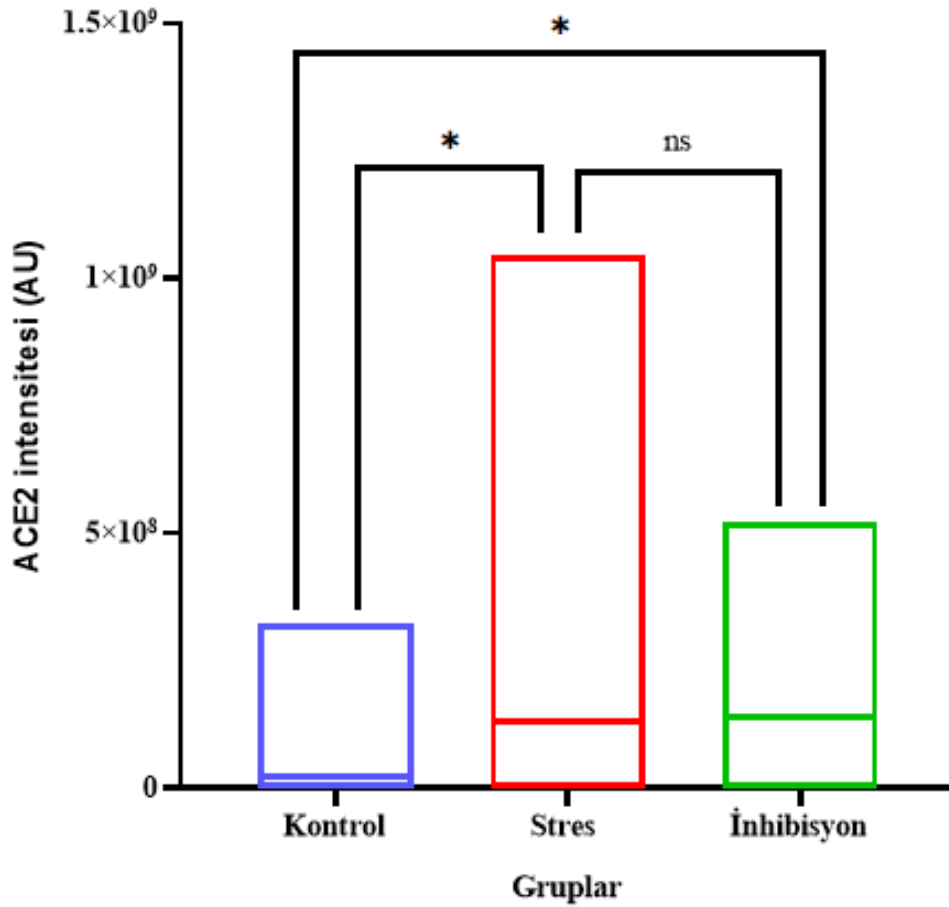


**Şekil 4.19.** Sağlıklı granüloza hücresi (erkek infertilitesi) grubunda ACE2 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immünofloresan yoğunluğu analizinde kontrol ve inhibisyon grubu arasındaki ACE2 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.999$ ). Kontrol grubunda ACE2 ifadesi stres grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır \*\*\* ( $p=0.0004$ ). İnhibisyon grubunda ACE2 ifadesi stres grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır \*\* ( $p=0.0017$ )

PKOS grubunda ACE2 floresan immünişaretlemesi sitoplazmada gözlemlendi. AICAR ile metabolik stres modellemesi ile ACE2 floresan immünişaretlemesi artış gösterdi. SIRT1 inhibe edildiğindeki immünişaretleme, uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücrelerindeki ACE2 ifadelenmesine göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttı ( $p=0.016$ ) (Şekil 4.20).

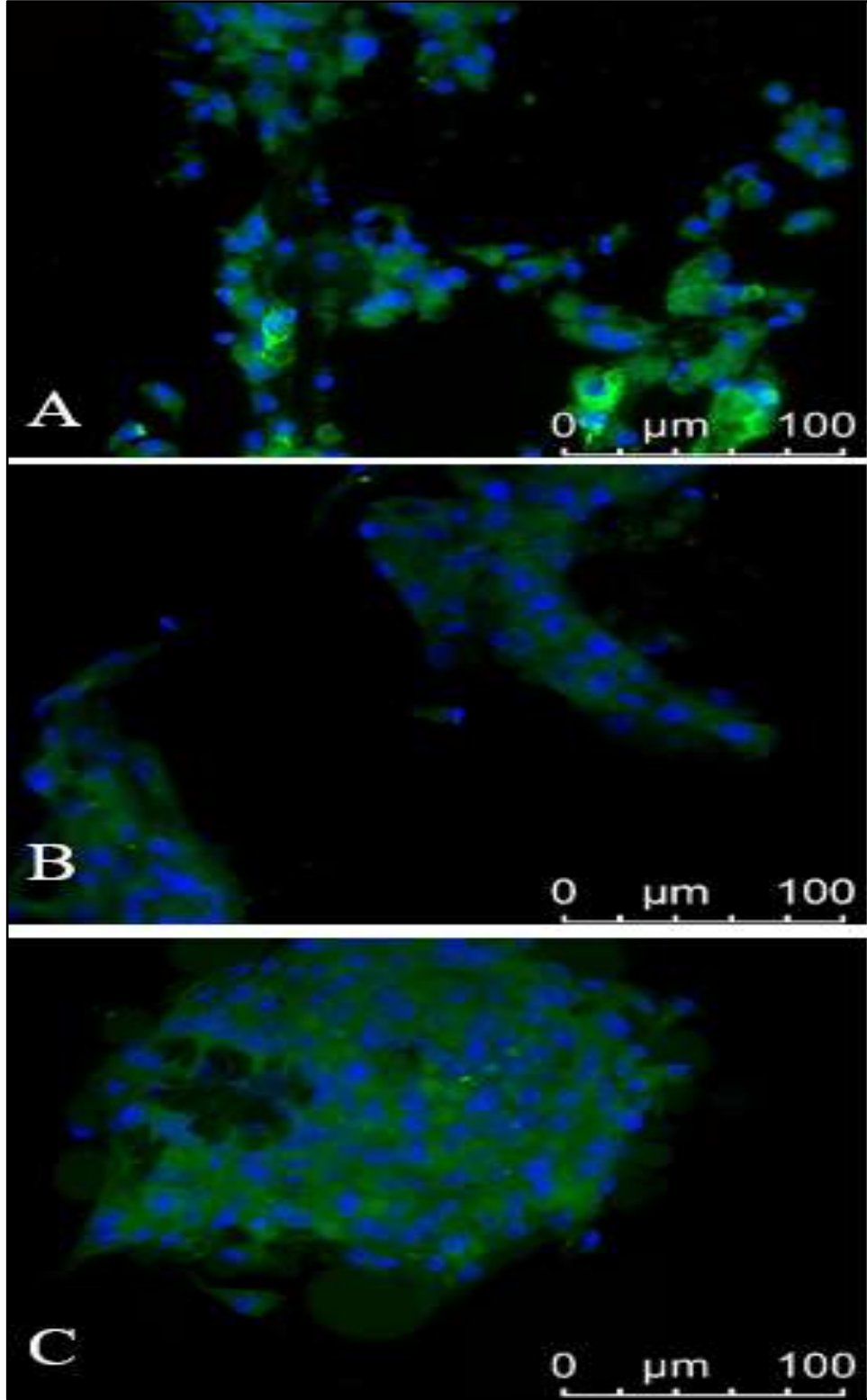


**Şekil 4.20.** **A:** PKOS grubu granüloza hücreleri ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **B:** PKOS grubu granüloza hücreleri AICAR sonrası ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **C:** PKOS grubu granüloza hücreleri AICAR+EX527 sonrası ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi.

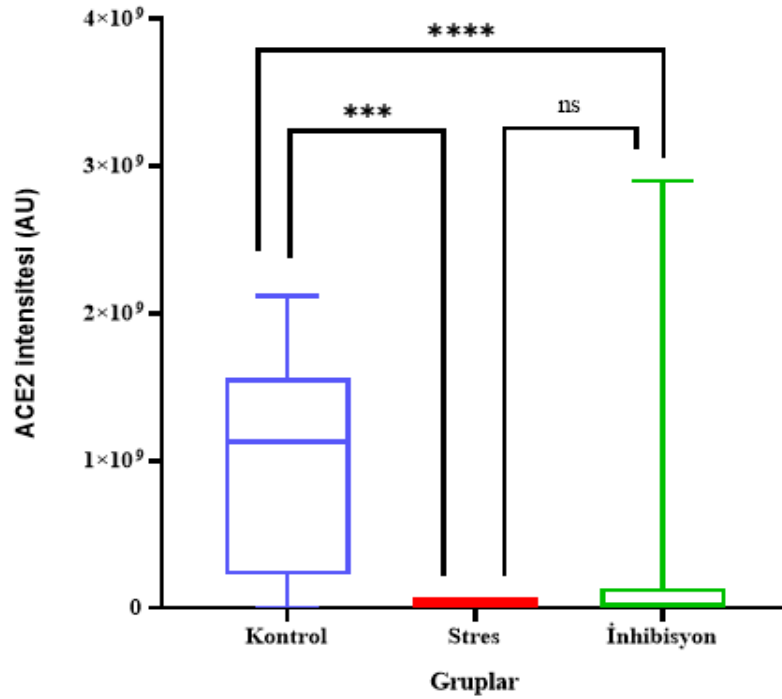


**Şekil 4.21.** Polikistik over sendromu grubunda ACE2 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immünofloresan yoğunluğu analizinde stres ve inhibisyon grubu arasındaki ACE2 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.999$ ). Stres grubunda ACE2 ifadesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır ( $p=0.0396$ ). İnhibisyon grubunda ACE2 ifadesi kontrol grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır ( $p=0.0164$ )

AOR grubunda ACE2 immünişaretlemesi sitoplazmada yaygın olarak izlendi. AICAR ile metabolik stres modellemesi ile ACE2 floresan immünişaretlemesi artış gösterdi. SIRT1 inhibe edildiğindeki ACE2 floresan immünişaretlemesi uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücrelerindeki immünişaretlemeye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde artış gösterdi ( $p=0.016$ ) (Şekil 4.22).



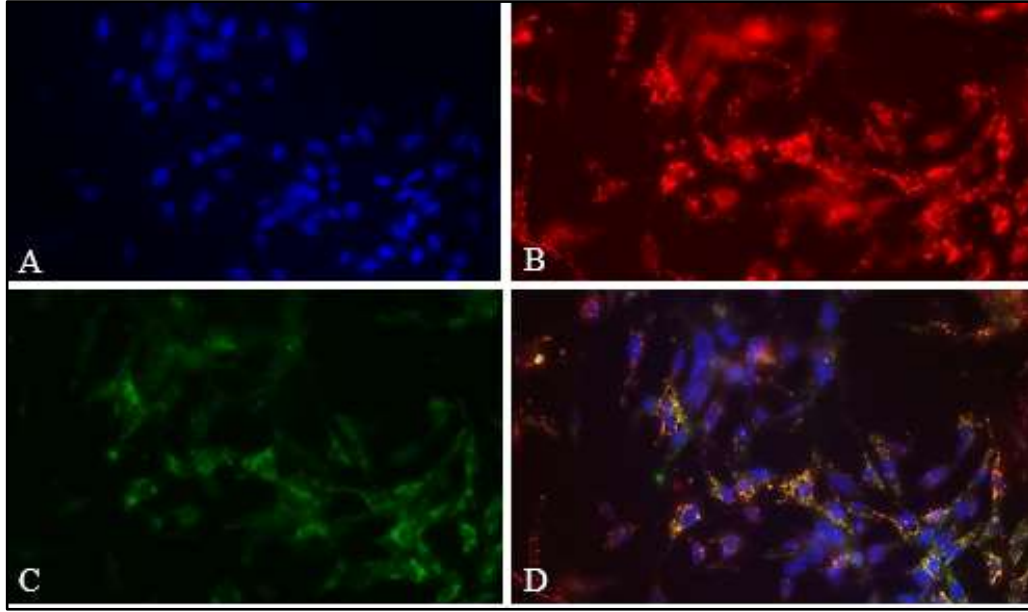
**Şekil 4.22.** **A:** AOR grubu granüloza hücreleri ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **B:** AOR grubu granüloza hücreleri AICAR sonrası ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi **C:** AOR grubu granüloza hücreleri AICAR+EX sonrası ACE2 floresan immünişaretleme, x40 objektif büyütmesi.



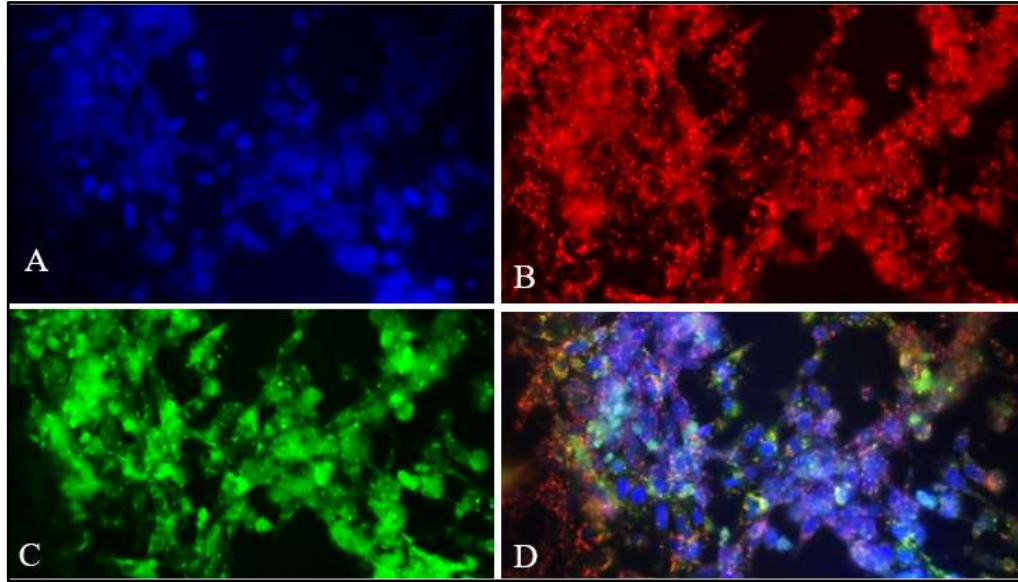
**Şekil 4.23.** Azalmış oosit rezervi grubunda ACE2 intesitesinin karşılaştırılması. Image J programı kullanılarak yapılan immüno Floresan yoğunluğu analizinde stres ve inhibisyon grubu arasındaki ACE2 ifadesinde istatistiksel olarak önemli fark bulunmamıştır ( $p=0.999$ ). Kontrol grubunda ACE2 ifadesi inhibisyon grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır \*\*\*\*( $p=0.0001$ ). Kontrol grubunda ACE2 ifadesi stres grubuna göre istatistiksel olarak artmıştır \*\*\*( $p=0.007$ ).

#### 4.4. HGL5 hücrelerinde JC-1 ile Mitokondrial Membran Potansiyeli değerlendirilmesi

HGL5 hücre hattında, uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücreleri, normal mitokondriyal membran potansiyeli göstergesi olan JC-1 kırmızı agregatların hücre çekirdeği etrafında yoğun olduğu izlendi (Şekil 4.24). AICAR ile metabolik stres modellemesi ile oluşturulan grupta ise sağlıklı mitokondriyon membran potansiyeli ile ilişkilendirilen JC-1 kırmızı monomerleri işaretlemesi tamamen kaybolmamış olsa da, hasarlı hücre ve düşük mitokondriyon membran potansiyeli ile ilişkilendirilen yeşil JC-1 monomerleri yoğunu (Şekil 4.25). SIRT1 inhibe olan grupta ise JC-1 kırmızı monomerler azalarak yerini hücrenin hasarlı olabileceğini düşündüren JC-1 yeşil monomerleri aldı (Şekil 4.26). Gruplar arasında olan bu değişiklikler istatistiksel olarak da anlamlı bulundu (Şekil 4.27).

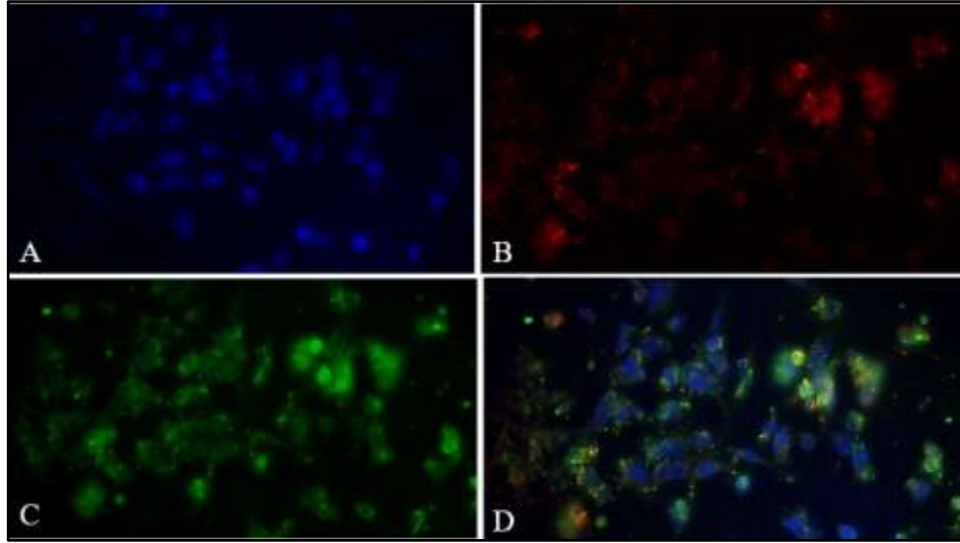


**Şekil 4.24.** HGL5 uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücreleri JC-1 ile mitokondriyal membran potansiyeli boyanması. **A:** DAPI ile boyanmış granüloza hücre çekirdekleri. **B:** Sağlıklı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 kırmızı monomerleri. **C:** Hasarlı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 yeşil monomerleri. **D:** JC-1 ile immünfloresan boyanan mitokondriyal membran potansiyelinin birleştirilmiş görüntüsü.

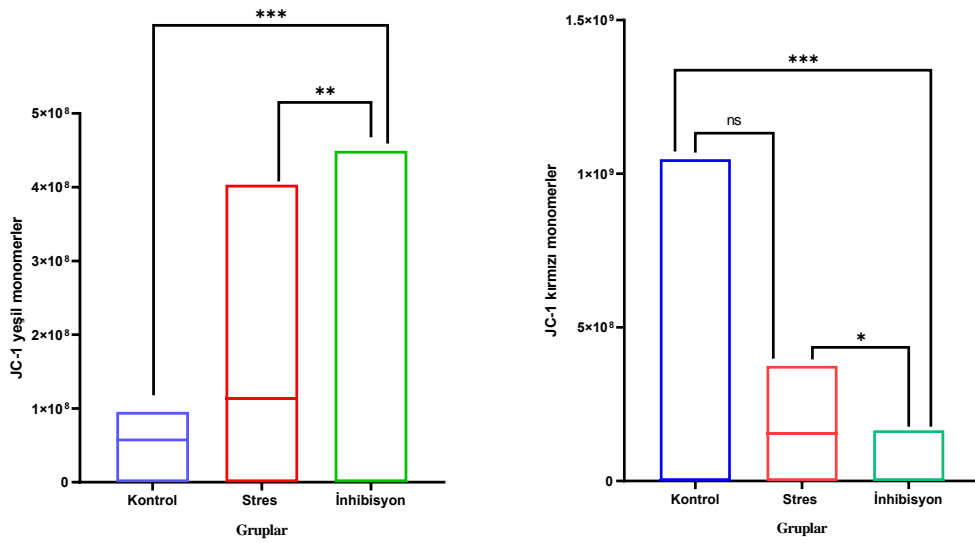


**Şekil 4.25.** HGL5 granüloza hücrelerinin AICAR ile metabolik stres modellemesi JC-1 ile mitokondriyal membran potansiyeli boyanması. **A:** DAPI ile boyanmış granüloza hücre çekirdekleri. **B:** Sağlıklı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 kırmızı monomerleri. **C:** Hasarlı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 yeşil monomerleri. **D:** JC-1 ile immünfloresan boyanan mitokondriyal membran potansiyelinin birleştirilmiş görüntüsü.





Şekil 4.26. HGL5 granüloza hücrelerinin SIRT1 inhibisyonu sonrası JC-1 ile mitokondriyal membran potansiyeli boyanması. A: DAPI ile boyanmış granüloza hücre çekirdekleri. B: Sağlıklı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 kırmızı monomerleri. C: Hasarlı membran potansiyelinin göstergesi olan JC-1 yeşil monomerleri. D: JC-1 ile immünfloresan boyanan mitokondriyal membran potansiyelinin birleştirilmiş görüntüsü.

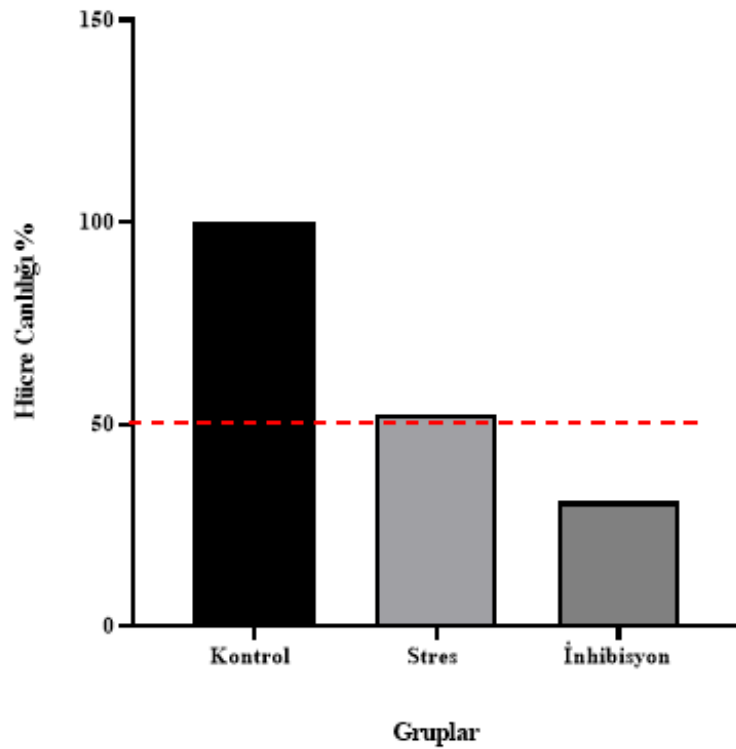


Şekil 0.27. JC-1 mitokondriyal membran potansiyeli ölçümü. Normal mitokondriyal membran potansiyeli göstergesi olan JC-1 kırmızı monomerlerin kontrol grubu ile stres grubu arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ( $p=0.556$ ). İnhibisyon grubu JC-1 kırmızı monomerler boyaması kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak azalmış bulundu \*\*\* ( $p=0.0003$ ). Hasarlı mitokondriyal membran potansiyeli göstergesi olan JC-1 yeşil monomerlerin inhibisyon grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak artmış bulundu \*\*\* ( $p=0.0001$ ). İnhibisyon grubu JC-1 yeşil monomerler boyaması stres grubuna kıyasla istatistiksel olarak artmış bulundu \*\* ( $p=0.0004$ ).



#### 4.5. HGL5 granüloza hücrelerinin Wst-1 Analizi ile Mitokondriyal Dehidrogenaz Aktivitesi

Hücrel mitokondriyal dehidrogenaz ile tetrazolium tuzundan formazan oluşumuna dayalı hücre proliferasyon oranı ve canlı hücrelerin kantitatif değerlendirmesinde uygulanan Wst-1 analizinde uygulama yapılmamış (kontrol alt grubu) granüloza hücreleri 96 kuyulu plakların ekiminde 10.000 hücre/ kuyu olan sağlıklı hücreleri 24 + 6 saat sonra yapılan ölçümünde 100000 olarak bulunurken, AICAR ile metabolik stres modellemesi sonrası hücre proliferasyonunda belirgin artış olmayıp ortalama 52.560 hücre düzeyinde kaldığı bulundu. EX-527 ile SIRT1 inhibisyonu gerçekleştirilen grupta ise hücre proliferasyonunun ortalama 30900 hücre ile sınırlı kaldığı bulundu. (Şekil 4.28).



Şekil 4.28. Wst-1 analizi grafiği.

## 5. TARTIŞMA

Granüloza hücrelerinin temel işlevlerinden biri, oosit olgunlaşması için gerekli olan metabolitleri ve besin maddelerini taşımaktır. Foliküllerdeki granüloza hücrelerinin çoğalması ve farklılaşması, oosit olgunlaşmasıyla eş zamanlı olarak gerçekleşir ve bu iki hücre, metabolik olarak birbirine bağlıdır. Primer kültürünü yaptığımız granüloza hücrelerinin farklı gruplar arasında faz kontrast mikroskopundaki morfolojik görüntüleri epiteloid karakter ve HGL5 hücre hattı ile benzerlik göstermeleri primer kültürün başarıyla gerçekleştiği ve başka hücre kontaminasyonu olmadığını göstermektedir.

Granüloza hücrelerinde yüksek düzeyde eksprese edilen proteinlerden biri olan SIRT1, enerji metabolizmasının ve mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesinde önemli bir role sahipken, bu düzenlenme, önemli bir enerji sensörü olan AMPK'nın katılımını gerektirir [60]. Mitokondriyon, apoptoz, kalsiyum homeostazisi ve oksidatif fosforilasyon olarak bilinen metabolik yol aracılığıyla ATP üretimi dahil olmak üzere çok sayıda hayati hücresel sürecin temel düzenleyicileri olarak görev yapan organellerdir [61]. Mitokondriyon membran potansiyeli membran geçirgenliğini korumaya yardımcı olur, böylece hücre homeostazisini korur. Mitokondriyon membran potansiyeli mitokondriyon işleyişini değerlendirmek için kullanılabilir etkili bir biyobelirteçdir [62]. SIRT1, glikasyon stresini ve oksidatif stresi azaltmak için mitokondriyondaki proteinlerini deasetilasyonu yoluyla düzenleyebilir ve ayrıca otofajiye katılmak veya temel mitokondriyon fonksiyonlarını sürdürmek için AMPK ile birlikte çalışabilir.

HGL5 hücre hattında araştırmamızda AICAR sonrası AMPK aktivasyonu sonucu mitokondriyon membran potansiyelinin azalıp, hücre hasarının arttığı bulundu. Sonuçlarımız, mitokondriyon membran potansiyeli SIRT1 inhibisyon grubunda, kontrol ve AICAR grubuna göre önemli ölçüde daha düşük olduğunu gösterdi; bu, JC1 monomerlerin yeşil ve kırmızı floresans yoğunluğu ile kanıtlandı. SIRT1 inhibisyonu sonrası mitondriyal fonksiyon bozukluğunun şiddetlenmesi SIRT1/AMPK yollağı üzerinden granüloza hücrelerinin ve dolaylı olarak oosit kalitesinin etkilenebileceğini düşündürdü. Yapılan araştırmalara göre benzer olarak PKOS ve AOR olan hastaların

granüloza hücrelerinin mitokondriyal disfonksiyona sahip olduğu gösterilmiştir [63]. Bundan yola çıkarak PKOS ve AOR olgularında bilinen bozulmuş oosit kalitesi ve mitokondriyon disfonksiyonun HGL5 granüloza hücrelerindeki SIRT1 inhibisyonu ile mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığını bulmuş olmamızın PKOS ve AOR olgularındaki bozulmuş oosit kalitesinin ve mitokondriyon disfonksiyonunun SIRT1/AMPK yoluyla ilişkili olabileceğini düşündürdü.

Araştırmamızda, HGL5 granüloza hücre hattında metabolik stres koşulları altında granüloza hücre proliferasyonunun sürdürülemediğini gözlemledik. Daha da önemlisi, SIRT1 inhibisyonunun bu durumu daha da kötüleştirerek granüloza hücre proliferasyonunda belirgin bir azalmaya yol açtığını tespit ettik. Bu bulgular, metabolik stresin hücre proliferasyonu üzerinde olumsuz bir etkisi olduğunu ortaya koymakla birlikte, SIRT1 varlığının bu olumsuz etkileri telafi edebileceği hipotezini desteklemektedir.

Ovaryum ve foliküller sıvısında çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve ilgili proteinler tanımlanmıştır. Bu moleküller steroidogenez, granüloza hücre proliferasyonu, foliküler büyüme ve gonadotropin reseptörü üzerinde lokal etkiler gösterebilir. Hücrelerin büyümeleri ve çoğalmaları, enerji kaynaklarını ve besin maddelerinin kullanılabilirliğini hücre içi sinyal ağ kompleksleri aracılığıyla kontrol edilir. Hücre içi ağ bileşenlerinin sinyalizasyon aktivitelerinin dengesi, uygun gelişim için gereklidir [36].

AMPK, AMP-ATP oranındaki artışlara, ATP üreten katabolik süreçleri indükleyerek ve protein sentezi dahil enerji tüketen, anabolik mekanizmaları baskılayarak yanıt veren heterotrimerik bir proteindir. AICAR'ın çeşitli raporlarda AMPK'nın farmakolojik aktivatörü olarak kullanıldığı bildirilmektedir [64]. Peptit hormonları, büyüme faktörleri, sitokinler ve kemokinler dahil olmak üzere protein sentezinin AMPK aracılı baskılanması, hücre büyümesine katkıda bulunan maddelerin inhibisyonu ile sonuçlanır [36].

AICAR uygulaması sonrası araştırmamızda faz kontrast mikroskopunda granüloza hücrelerinde gözlemlediğimiz kümeleşme, hücrelerin stresten korunması adına bir mikroçevre oluşturduklarını düşündürmüştür. Stresli koşullar altında,

hücrelerin çevresindeki ekstraselüler matrikste değişiklikler meydana gelebilir ve bu değişikliklerden dolayı hücrelerin hareketini ve konumunu etkileyerek kümeler oluşturmasına neden olmuştur.

AMPK'nın hücrelerin besini için önemli bir enerji sensörü olarak hizmet etmekle sınırlı olmadığını, aynı zamanda birkaç farklı strateji aracılığıyla üremenin düzenlenmesinde de yer aldığını araştırmalar ile göstermiştir [65]. AMPK, GnRH ve gonadotropinlerin salgılanmasını etkiler, hipotalamus ve hipofiz seviyesinde enerji durumunu fertilité ile bütünleştirir. Ayrıca AMPK gonadlarda da eksprese edilir, spermatogenezin ve foliküler gelişimin düzenlenmesinde rol oynar. AMPK'nin gonadotropinlerin transkripsiyon düzenlenmesinde de önemli rolü vardır. AMPK transkripsiyon faktörlerinin spesifik hedef dizilerine bağlanmasını etkileyerek üreme ile ilgili genlerin transkripsiyon verimliliğini değiştirebileceği bildirilmiştir [66].

Sirtuinler insan hücrelerinde, tipik olarak çekirdekte (SIRT1, SIRT6 ve SIRT7), sitozolde (SIRT2) ve mitokondride (SIRT3 SIRT4 ve SIRT5 ) bulunan yedi NAD<sup>+</sup> bağımlı deasetilazdan oluşan bir gruptur [52]. Araştırmamızda HGL5 hücre hattında SIRT1 immün işaretlemesi sitoplazmada görülmüştür. Primer kültürü yapılan olguların SIRT1 immün işaretlemesi ise hem sitoplazma hem çekirdekte gözlenmiştir. AICAR ile indüklenmiş stres sonrası ise granüloza hücre çekirdeğindeki ifadenme tüm grupların granüloza hücrelerinde artış göstermiştir. Bu bulgumuz granüloza hücresinde enerji stresi sürecinde SIRT1'n fosforilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlara uğrayarak çekirdeğe taşındığını düşündürmüştür. Bununla birlikte primer kültürü yapılan granüloza hücrelerindeki SIRT1 ifadenme profillerinin HGL5 hücre hattından farklı olmasının, olguların patogenezinin bağımsız, oosit manipülasyonu sırasında oluşabilecek mekanik, kimyasal veya oksidatif stresten kaynaklandığını düşündürmüştür.

Sirtuinlerin yalnızca önemli enerji durumu sensörleri olmadığı, aynı zamanda hücreleri metabolik strese karşı koruduğu çalışmalarla gösterilmiştir. Sirtuinlerin ve daha spesifik olarak SIRT1'in çok yönlü işlevleri, hücrelerin çekirdek, sitoplazma ve mitokondriyondaki enerji seviyelerindeki değişiklikleri algılamasına olanak tanıyan çeşitli hücresel konumlarıyla desteklenir [67].

Araştırmamızda AMPK aktivasyonu sonrasında HGL5 granüloza hücre grubunda ve AOR grubunda SIRT1 ifadenmesi, herhangi bir uygulama yapılmamış kontrol alt grubu granüloza hücrelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fark göstermemiştir. AOR patogenezi hakkında henüz çok bilgi bulunmamaktadır. Sonuçlarımıza dayanarak bu olguda SIRT1 artışı AMPK yolağından bağımsız ilerlediğini düşündürmektedir. Sağlıklı granüloza hücre grubunda (erkek infertilitesi) ve PKOS grubunda ise AMPK aktivasyonu ile SIRT1 ifadenmesi artmış olup bu bulgumuz granüloza hücresinde AMPK'nın rolünün ovaryan patogenezisine bağlı olabileceğini düşündürmüştür.

Granüloza hücreleri sıçan ve sığırdaki, AICAR veya metformin ile muamele edildiğinde AMPK aktivasyonu, MAPK ERK1/2'nin fosforilasyonunu inhibe edip, progesteron salgısını azaltarak, (3 $\beta$ -HSD) ve StAR protein ekspresyonunu etkilediği bildirmiştir [66].

Araştırmamızda ise granüloza hücrelerinin steroidogenezinde temel rolü olan ACE2 ifadenmesini incelediğimizde, sağlıklı granüloza ve AOR grubunda AMPK aktivasyonu ile azaldığı görülmüştür. PKOS grubunda ise ACE2 ifadenmesi AMPK aktivasyonu sonrası artış göstermiştir. AOR grubu hariç bütün gruplarda SIRT1 inhibe edildiğinde ACE2 ifadenmesinde artış saptanmıştır. Bunun nedeninin bu grubun granüloza hücresinin patofizyolojisinde SIRT1/AMPK yolağının ACE2 ile bir bağlantısının olmayabileceğini düşündürmüştür. SIRT1 ifadenmesini arttıran faktör ise metabolik stres değil, hipoksi veya oksidatif stresin dolaylı etkisi sonucu olabileceğini düşündürmüştür.

Polikistik over sendromu (PKOS), yüksek androjen seviyeleri, kistik ovaryum, ovulasyonun olmaması, adet düzensizlikleri gibi ovulasyon fonksiyon bozuklukları ile karakterize oldukça yaygın bir endokrin metabolik bozukluktur. PKOS sıklıkla infertilite, obezite, bozulmuş glukoz metabolizması ve insülin direnci, bozulmuş lipit profili, yüksek tansiyon ve kardiyovasküler hastalıklarla ilişkilidir. Bazı çalışmalar RAS bileşenlerinin PKOS'lu kadınlarda arttığını göstermiştir. RAAS içinde önemli bir rol oynayan ACE2, bu sistemle birlikte kardiyovasküler fonksiyonların yanı sıra bazı metabolik süreçleri de etkiler. İnsülin direnci ve obezite, PKOS'un iki karakteristik özelliğidir. Doğurgan kadınlarla karşılaştırıldığında PKOS'lu kadınların vücut kitle

indeksi daha yüksek ve SIRT1 seviyeleri daha düşük bulunmuştur (3). Yağ dokusu ayrıca, adipositlerdeki temel ROS üretim yolu olan NADPH oksidaz aktivitesini uyaran anjiyotensin II'yi de salgılayabilir. Dolayısıyla, düşük SIRT1 seviyelerine sahip kadınların, ilave adipositlerin ürettiği aşırı oksidan yüke karşı koyamadığı ve sonuç olarak artan oksidatif stres geliştirdiği sonucuna varılabilir (3). Araştırmamızda ACE2'nin PKOS olgularının granüloza hücrelerinde sitoplazmik ifadenmesini gösterdik. Stres sonrası ACE2'nin artışı, inflamasyon ve oksidatif stresten çok metabolik stresle ilişkili olabileceğini düşündürmüştür. SIRT1 inhibisyon sonrası ACE2 ifadenmesinin daha da artması bu çıkarımımızı kuvvetlendirmiştir. Burdan yola çıkarak PKOS patogenezindeki homeostaz ve insülin duyarlılığı AMPK-SIRT1 yolunun aktivasyonu ile sağlanıyor olabileceğini düşündürmüştür.

SIRT1'in embriyo, oosit ve insanların granüloza hücrelerinde eksprese edildiği ve inflamatuvar yanıtları baskıladığı yaygın olarak kabul edilmektedir. Yapılan çalışmalarda PKOS'lu hastalarda serum SIRT1'in daha az olduğu gösterilmiştir [68]. Bizim araştırmamızda da bu literatürle uyumlu olarak PKOS grubunun granüloza hücrelerinin SIRT1 immunişaretlenmesi sağlıklı erkek infertilitesi grubu ve AOR grubuna kıyasla önemli derecede düşük bulunmuştur. Yapılan çalışmalar PKOS'lu hastalarda SIRT1 ile insülin direnci arasında bir korelasyon olduğunu savunup, insülin direnci ile AMPK-SIRT1 moleküler yolu ve üreme fonksiyonu arasında önemli bir korelasyon olduğunu bildirmiştir [68]. Araştırmamızda AOR grubunun hiçbir şey uygulamaksızın SIRT1 ifadenmesi AMPK aktivasyonu olan gruptan daha yüksek olması, bu grubun patogenezinde AMPK-SIRT1 yolağının etkin olmadığı, ve SIRT1'nin metabolik stresin yol açtığı mekanizmalardan bağımsız olarak eksprese olabileceğini düşündürmüştür.

AMPK-SIRT1 yolağının bozulması yoluyla hiperandrojeneminin hem KGN hücre hattında hem de PKOS ile indüklenen sıçanlarda metabolizma bozukluğuna neden olabildiği bulunmuştur [68]. Önemli bir enerji sensörü olan AMPK, AMP/ATP'nin hücre içi durumunu izleyerek hücrel enerji metabolizmasındaki herhangi bir değişikliği algılayabilir ve sonuç olarak insülin duyarlılığını, glikolipid metabolizmasını ve yağ asidi oksidasyonunu düzenler. AICAR gibi AMPK agonistlerinin PKOS ile ilişkili endokrin ve üreme anormalliklerini iyileştirme

potansiyeline sahip olduğunu bildiren diğer araştırmacılarla uyumlu olarak sonuçlarımız da SIRT1/AMPK yoluna bağlı steroidogenezde rolü olan ACE2 etkilenir sonucuna ulaştırmıştır.

ACE2'nin doku/hücre tipi ifadesi epigenetik süreçlerle düzenlenir. Epigenetik, aynı DNA dizisi alternatif gen aktivite durumlarını sürdürebilen moleküller ve mekanizmaların incelenmesidir. Epigenetikte rol oynayan temel oyuncular, genom fonksiyonunu kontrol eden karmaşık bir düzenleyici ağ oluşturan DNA, histon, histon dışı kromozomal proteinler ve RNA'da yapılan kimyasal modifikasyonlardır [69].

Histon deasetilaz ailesinin üyesi olan SIRT1 etkisinin mekanizması bilinmemekle birlikte ACE2 transkripsiyonunun düzenlenmesinde yer alan bir transkripsiyon faktörünün deasetilasyonunu içerebilir.

Yapılan çalışmalar sonucunda hipoksik koşullar insan hepatoselüler karsinom Huh7 hücrelerinde ACE2 ekspresyonunu artırır [70]. ACE2 ekspresyonunun arttığını gözlemlemek için hücrelerin hipoksik koşullar altında birkaç gün gibi uzun süreli inkübasyonu gerektirir. Araştırmamızda AOR kontrol grubunda ACE2 ifadelenmesini stres ve SIRT1 inhibisyonu sonrasında kıyasla daha yüksek olduğunu saptadık. Bu sonuca göre AOR granüloza hücreleri foliküler mikroçevrede kronik bir hipoksik ortama maruz kaldığını düşündürmüştür.

Bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. İlk olarak, primer granüloza hücre kültürlerinde foliküler sıvıdan izole edilen granüloza hücrelerinin kullanılması, sınırlı hasta sayısı nedeniyle istatistiksel değerlendirmede kısıtlamalara yol açmıştır.. Ayrıca, bazı hücrelerin enfeksiyon nedeniyle hücre kültürüne adaptasyon sağlayamaması, hücre sayısında azalmaya ve dolayısıyla deneylerin tekrarlanabilirliğinde zorluklara neden olmuştur. Bunun yanı sıra, aynı patogeneze sahip örnekler arasında bireysel genetik farklılıklar, çalışmanın sonuçlarını etkileyebilecek önemli bir faktör olarak ortaya çıkmıştır.

Son olarak, granüloza hücrelerinin in vitro koşullarda doğal ortamlarındaki davranışlarını tam olarak yansıtamaması, çalışma bulgularının klinik uygulamalara doğrudan aktarılabilirliğini sınırlamaktadır. In vitro uygulamalar hücrelerin doğal

mikroçevresindeki etkileşimlerin tam olarak simüle edilememesi nedeniyle bazı biyolojik süreçlerin tam olarak anlaşılmasına engel olabilir. Bu kısıtlamalar göz önünde bulundurulduğunda, gelecekteki araştırmaların daha geniş hasta popülasyonları ile gerçekleştirilmesi, genetik çeşitliliğin etkilerinin daha ayrıntılı incelenmesi ve in vitro sonuçların in vivo modellerle desteklenmesi önerilmektedir. Bu sayede, granüloza hücrelerinin biyolojisi ve bu hücrelerin klinik uygulamalardaki potansiyeli daha iyi anlaşılacaktır.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda sonuç olarak:

- İnsan granüloza hücresinde SIRT1 ve ACE2 ifadenmesi vardır.
- Hücre enerji stresi modelinde SIRT1 inhibisyonu hücre proliferasyonunu olumsuz yönde etkiler.
- HGL5 insan granüloza hücre hattında AICAR ile oluşturulan hücre stresi modelinde mitokondriyon membran potansiyeli hasarına yol açar. Bu hasar SIRT1 inhibisyon sonrası daha belirginleşir.
- AICAR ile aktive edilen AMPK sonrası, deney grupları arasında farklı düzeyde SIRT1 ve ACE2 ifadenmesi vardır.
- Hücre enerji stresi oluşturulmadan önce AOR olguları en yüksek SIRT1 ifadenmesi gösterir.
- AOR olgularında bir uygulama yapılmamış kontrol grubu ile enerji stresi modeli sonrası SIRT1 ifadenmesinde istatistiksel olarak fark yoktur.
- AOR olgularında stres sonrası ACE2 ifadenmesinde görülen azalma, SIRT1 inhibisyonu sonrası daha belirgindir.
- Sağlıklı granüloza hücresi ile PKOS olgularında SIRT1 ifadenmesi stres sonrası anlamlı bir şekilde artış gösterir.
- Sağlıklı grubunda ACE2 ifadenmesi stres sonrası azalır ancak SIRT1 inhibisyon sonrası ACE2 ifadenmesi artar.
- PKOS olgularında hücre enerji stresi sonrası ACE2 ifadenmesinde artış görülür. SIRT1 inhibisyon sonrası ACE2 ifadenmesi artar.

Bu araştırma ile elde edilen sonuçlar metabolik stresin granüloza hücrelerinde steroidogenez üzerindeki etkilerini açıkça ortaya koymaktadır. Ancak PKOS ve

AOR gibi olguların patofizyolojisinde sadece metabolik stres değil, aynı zamanda hipoksi, oksidatif stres, inflamasyon, endokrin bozukluk ve genetik faktörler gibi çeşitli etkenler de rol oynadığından SIRT1/AMPK yolağı ile birlikte eş zamanlı olarak bu mikroçevre özelliğinde hücre içi metabolik süreçlerde adaptasyonla ilgili diğer sinyal moleküllerinin de araştırılmasının infertilite tedavisi alanında yeni terapötik stratejilerin geliştirilmesine ve hastaların fertilitelerinin korunarak yaşam kalitesinin artırılmasına önemli katkılar sağlayabileceği öngörülebilir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Pawlina, W., *Histology, A Text and Atlas With Correlated Cell and Molecular Biology*. 2021 8th edition.
2. Gartner, L.P., *Textbook of Histology*. 4th edition. 2017.
3. Carlson, B.M., *Human Embryology and Developmental Biology*. 6th ed. 2018.
4. Li, R. and D.F. Albertini, *The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2013. **14**(3): p. 141-52.
5. Oduwole, O.O., I.T. Huhtaniemi, and M. Misrahi, *The Roles of Luteinizing Hormone, Follicle-Stimulating Hormone and Testosterone in Spermatogenesis and Folliculogenesis Revisited*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(23).
6. Abraham L. Kierszenbaum, L.T., *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology* 4th edition 2020.
7. Gershon, E. and N. Dekel, *Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(12).
8. Mihalas, B.P., et al., *Molecular Mechanisms Responsible for Increased Vulnerability of the Ageing Oocyte to Oxidative Damage*. *Oxid Med Cell Longev*, 2017. **2017**: p. 4015874.
9. Athar, F., M. Karmani, and N.M. Templeman, *Metabolic hormones are integral regulators of female reproductive health and function*. *Biosci Rep*, 2024. **44**(1).
10. Ajafar, M.H., et al., *Dr Association of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 with litter size in livestock: a review study*. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 2022. **45**.
11. Andrade, G.M., et al., *Intrafollicular barriers and cellular interactions during ovarian follicle development*. *Anim Reprod*, 2019. **16**(3): p. 485-496.
12. Nillson E, S.M., *Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis*. 2001.

13. Robert, C., *Nurturing the egg: the essential connection between cumulus cells and the oocyte*. *Reprod Fertil Dev*, 2021. **34**(2): p. 149-159.
14. Sreerangaraja Urs, D.B., et al., *Mitochondrial Function in Modulating Human Granulosa Cell Steroidogenesis and Female Fertility*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(10).
15. Patel, S., et al., *Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on the Ovary*. *Biol Reprod*, 2015. **93**(1): p. 20.
16. Song, Y., et al., *In view of ovarian steroidogenesis and luteal construction to explore the effects of Bushen Huoxue recipe in mice of ovarian hyperstimulation*. *J Ethnopharmacol*, 2024. **318**(Pt A): p. 116913.
17. May-Panloup, P., et al., *Ovarian ageing: the role of mitochondria in oocytes and follicles*. *Hum Reprod Update*, 2016. **22**(6): p. 725-743.
18. Alberico, H.C. and D.C. Woods, *Role of Granulosa Cells in the Aging Ovarian Landscape: A Focus on Mitochondrial and Metabolic Function*. *Front Physiol*, 2021. **12**: p. 800739.
19. Guo, Y.X., et al., *Effects of nitric oxide on steroidogenesis and apoptosis in goat luteinized granulosa cells*. *Theriogenology*, 2019. **126**: p. 55-62.
20. Figueira, M.I., et al., *Hormonal regulation of c-KIT receptor and its ligand: implications for human infertility?* *Prog Histochem Cytochem*, 2014. **49**(1-3): p. 1-19.
21. Clarke, H.J., *Transzonal projections: Essential structures mediating intercellular communication in the mammalian ovarian follicle*. *Mol Reprod Dev*, 2022. **89**(11): p. 509-525.
22. Zhou, C.J., et al., *The beneficial effects of cumulus cells and oocyte-cumulus cell gap junctions depends on oocyte maturation and fertilization methods in mice*. *PeerJ*, 2016. **4**: p. e1761.
23. Chun, Y. and J. Kim, *AMPK-mTOR Signaling and Cellular Adaptations in Hypoxia*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(18).
24. Broughton, D.E. and K.H. Moley, *Obesity and female infertility: potential mediators of obesity's impact*. *Fertil Steril*, 2017. **107**(4): p. 840-847.

25. Imanaka, S., H. Shigetomi, and H. Kobayashi, *Reprogramming of glucose metabolism of cumulus cells and oocytes and its therapeutic significance*. *Reprod Sci*, 2022. **29**(3): p. 653-667.
26. Alcantara da Silva, J.V., et al., *The central role of pyruvate metabolism on the epigenetic maturation and transcriptional profile of bovine oocytes*. *Reproduction*, 2024. **167**(4).
27. Herta, A.C., et al., *Characterization of carbohydrate metabolism in in vivo- and in vitro-grown and matured mouse antral follicles*. *Biol Reprod*, 2022. **107**(4): p. 998-1013.
28. Rahimi Darehbagh, R., et al., *Effects of The Mitochondrial Genome on Germ Cell Fertility: A Review of The Literature*. *Int J Fertil Steril*, 2022. **16**(2): p. 70-75.
29. van der Reest, J., et al., *Mitochondria: Their relevance during oocyte ageing*. *Ageing Res Rev*, 2021. **70**: p. 101378.
30. Lee, H., et al., *Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis*. *Nat Cell Biol*, 2020. **22**(2): p. 225-234.
31. Garcia, D. and R.J. Shaw, *AMPK: Mechanisms of Cellular Energy Sensing and Restoration of Metabolic Balance*. *Mol Cell*, 2017. **66**(6): p. 789-800.
32. Kurumbail, R.G. and M.F. Calabrese, *Structure and Regulation of AMPK*. *Exp Suppl*, 2016. **107**: p. 3-22.
33. Trefts, E. and R.J. Shaw, *AMPK: restoring metabolic homeostasis over space and time*. *Mol Cell*, 2021. **81**(18): p. 3677-3690.
34. Kim, J., et al., *AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities*. *Exp Mol Med*, 2016. **48**(4): p. e224.
35. Krishnan, U.A., P. Viswanathan, and A.C. Venkataraman, *AMPK activation by AICAR reduces diet induced fatty liver in C57BL/6 mice*. *Tissue Cell*, 2023. **82**: p. 102054.
36. Kai, Y., et al., *A possible role for AMP-activated protein kinase activated by metformin and AICAR in human granulosa cells*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2015. **13**: p. 27.

37. Zhang, C.S. and S.C. Lin, *AMPK Promotes Autophagy by Facilitating Mitochondrial Fission*. Cell Metab, 2016. **23**(3): p. 399-401.
38. Herzig, S. and R.J. Shaw, *AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018. **19**(2): p. 121-135.
39. Palumbo, A., J. Avila, and F. Naftolin, *The Ovarian Renin-Angiotensin System (OVRAS): A Major Factor in Ovarian Function and Disease*. Reprod Sci, 2016. **23**(12): p. 1644-1655.
40. Lu, C., et al., *Novel Role of the SIRT1 in Endocrine and Metabolic Diseases*. Int J Biol Sci, 2023. **19**(2): p. 484-501.
41. Zhao, Y.K., et al., *Correlation between abnormal energy metabolism of ovarian granulosa cells and in vitro fertilization-embryo transfer outcomes in patients with polycystic ovary syndrome and obesity*. J Ovarian Res, 2023. **16**(1): p. 145.
42. Mazloomi, S., et al., *Granulosa cells from immature follicles exhibit restricted glycolysis and reduced energy production: a dominant problem in polycystic ovary syndrome*. J Assist Reprod Genet, 2023. **40**(2): p. 343-359.
43. Shen, H., et al., *The follicular fluid metabolome in infertile individuals between polycystic ovary syndrome and diminished ovarian reserve*. Arch Biochem Biophys, 2022. **732**: p. 109453.
44. Jaswa, E.G., et al., *Diminished ovarian reserve is associated with reduced euploid rates via preimplantation genetic testing for aneuploidy independently from age: evidence for concomitant reduction in oocyte quality with quantity*. Fertil Steril, 2021. **115**(4): p. 966-973.
45. Li, J., et al., *Metabonomic analysis of follicular fluid in patients with diminished ovarian reserve*. Front Endocrinol (Lausanne), 2023. **14**: p. 1132621.
46. Ji, Z., G.H. Liu, and J. Qu, *Mitochondrial sirtuins, metabolism, and aging*. J Genet Genomics, 2022. **49**(4): p. 287-298.
47. Sivakumar, K.K., et al., *Inhibition of Sirtuin-1 hyperacetylates p53 and abrogates Sirtuin-1-p53 interaction in Cr(VI)-induced apoptosis in the ovary*. Reprod Toxicol, 2022. **109**: p. 121-134.

48. Tatone, C., et al., *Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility*. Hum Reprod Update, 2018. **24**(3): p. 267-289.
49. Liu, H., et al., *Metformin suppresses calcium oxalate crystal-induced kidney injury by promoting Sirt1 and M2 macrophage-mediated anti-inflammatory activation*. Signal Transduct Target Ther, 2023. **8**(1): p. 38.
50. Fang, X., et al., *SIRT2 Is Critical for Sheep Oocyte Maturation through Regulating Function of Surrounding Granulosa Cells*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(9).
51. Engin-Ustun, Y., et al., *Sirtuin 1 Levels in Recurrent Implantation Failure*. Rev Bras Ginecol Obstet, 2017. **39**(10): p. 541-544.
52. Schmid, N., et al., *Sirtuin 1 and Sirtuin 3 in Granulosa Cell Tumors*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(4).
53. Lee, J., et al., *SIRT1 Promotes Host Protective Immunity against Toxoplasma gondii by Controlling the FoxO-Autophagy Axis via the AMPK and PI3K/AKT Signalling Pathways*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(21).
54. Betsinger, C.N. and I.M. Cristea, *Mitochondrial Function, Metabolic Regulation, and Human Disease Viewed through the Prism of Sirtuin 4 (SIRT4) Functions*. J Proteome Res, 2019. **18**(5): p. 1929-1938.
55. Vazquez, B.N., A. Vaquero, and K. Schindler, *Sirtuins in female meiosis and in reproductive longevity*. Mol Reprod Dev, 2020. **87**(12): p. 1175-1187.
56. Wang, C.W., H.C. Chuang, and T.H. Tan, *ACE2 in chronic disease and COVID-19: gene regulation and post-translational modification*. J Biomed Sci, 2023. **30**(1): p. 71.
57. Cavallo, I.K., et al., *Angiotensin-(1-7) in human follicular fluid correlates with oocyte maturation*. Hum Reprod, 2017. **32**(6): p. 1318-1324.
58. Dominska, K., *Involvement of ACE2/Ang-(1-7)/MAS1 Axis in the Regulation of Ovarian Function in Mammals*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(13).
59. Zirh, S., et al., *A new isolation and culture method for granulosa cells*. Cell Tissue Bank, 2021. **22**(4): p. 719-726.

60. Yang, Y., et al., *Metformin protects ovarian granulosa cells in chemotherapy-induced premature ovarian failure mice through AMPK/PPAR-gamma/SIRT1 pathway*. *Sci Rep*, 2024. **14**(1): p. 1447.
61. van der Blik, A.M., M.M. Sedensky, and P.G. Morgan, *Cell Biology of the Mitochondrion*. *Genetics*, 2017. **207**(3): p. 843-871.
62. Yatchenko, Y. and D. Ben-Shachar, *Update of Mitochondrial Network Analysis by Imaging: Proof of Technique in Schizophrenia*. *Methods Mol Biol*, 2021. **2277**: p. 187-201.
63. Dabravolski, S.A., et al., *Mitochondrial Dysfunction and Chronic Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(8).
64. Tsogbadrakh, B., et al., *AICAR, an AMPK activator, protects against cisplatin-induced acute kidney injury through the JAK/STAT/SOCS pathway*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019. **509**(3): p. 680-686.
65. Nguyen, T.M.D., *Role of AMPK in mammals reproduction: Specific controls and whole-body energy sensing*. *C R Biol*, 2019. **342**(1-2): p. 1-6.
66. Yang, W., et al., *Roles of AMP-Activated Protein Kinase (AMPK) in Mammalian Reproduction*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 593005.
67. Chang, H.C. and L. Guarente, *SIRT1 and other sirtuins in metabolism*. *Trends Endocrinol Metab*, 2014. **25**(3): p. 138-45.
68. Mihanfar, A., et al., *Ameliorative effects of fisetin in letrozole-induced rat model of polycystic ovary syndrome*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2021. **213**: p. 105954.
69. Beacon, T.H., G.P. Delcuve, and J.R. Davie, *Epigenetic regulation of ACE2, the receptor of the SARS-CoV-2 virus(1)*. *Genome*, 2021. **64**(4): p. 386-399.
70. Clarke, N.E., et al., *Epigenetic regulation of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) by SIRT1 under conditions of cell energy stress*. *Clin Sci (Lond)*, 2014. **126**(7): p. 507-16.