



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DENEYSEL HİPOTİROİDİNİN OVARYUM FOLLİKÜLLERİ ÜZERİNE  
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Fatma Betül SİLİNMEZ

KASIM 2024

DENİZLİ

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

**DENEYSEL HİPOTİROİDİNİN OVARYUM FOLLİKÜLLERİ ÜZERİNE  
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Fatma Betül SİLİNMEZ**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hülya ÇETİN**

**Denizli, 2024**

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Fatma Betül SİLİNMEZ

İmza :

## ÖZET

# DENEYSEL HİPOTİROİDİNİN OVARYUM FOLLİKÜLLERİ ÜZERİNE ETKİSİ

Fatma Betül SİLİNMEZ  
Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı  
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Hülya ÇETİN  
Kasım 2024, 86 Sayfa

Hipotiroidi, tiroid hormonlarının (T4 ve T3) yetersiz üretimi sonucu vücut fonksiyonlarının yavaşlamasına neden olan bir durumdur. Üreme sağlığını etkileyerek menstrüel siklus ve fertilitiyi bozabilir, tekrarlayan gebelik kayıplarına yol açabilir. Hayvan çalışmalarında, hipotiroidinin follikül olgunlaşmasını engellediği ve ovaryum fonksiyonlarını bozduğu gözlemlenmiştir. Epidermal büyüme faktörü (EGF), hücre büyümesi ve farklılaşmasında önemli rol oynayan bir polipeptittir; epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR) ise EGF'nin bağlandığı reseptördür. Tiroid hormonları, EGF ve EGFR seviyelerini etkileyebilir ve hipotiroidi, EGFR seviyelerinde azalmaya neden olabilir. EGF, granüloza hücrelerinin büyümesini ve follikül gelişimini destekler, oosit olgunlaşması ve yumurtlama için gereklidir. Bu çalışmanın amacı, yetişkin sıçanlarda indüklenen hipotiroidinin ovaryum follikülleri üzerindeki etkilerini ve hipotiroidi indüklenmiş ovaryum folliküllerinde EGFR etkisini incelemektir. Çalışmamızda 18 adet Wistar dişi sıçan kullanılmıştır. Rastgele seçilen ve içme suyuna 30 gün boyunca 10 mg/kg metimazol eklenen 10 adet sıçan hipotiroidi grubunu, geri kalan 8 adet sıçan kontrol grubunu oluşturmuştur. Metimazol ile indüklenmiş deneysel hipotiroidinin ovaryum üzerine biyokimyasal, histopatolojik ve mRNA ekspresyonu değişimi açısından etkileri araştırılmıştır. Metimazol verilen sıçanların serum T3 seviyesinde anlamlı derecede azalma olduğu gözlemlendi. Hipotiroidi grubundaki sıçanların ortalama vücut ve ovaryum ağırlıkları, primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde anlamlı derecede azalma olduğu tespit edildi. İmmünohistokimyasal olarak EGFR ekspresyonunun da hipotiroidi grubu sıçanlarda azaldığı görüldü. GZ-PZR analizi sonucunda kontrol grubuna göre metimazol grubu Sıçanların HB-EGF, EGFR, GPER1 ve ESR1 gen ekspresyonu artarken, RAF1 ekspresyonlarının azaldığı gözlemlendi. Metimazol sıçan ovaryum folliküler gelişimi ve oosit kalitesinde ciddi bozulmalara yol açmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Hipotiroidi, EGFR, Ovaryum, Rat

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No:2023SABE011)**

**ABSTRACT**  
**EVOLUATION OF EFFECT OF EXPERIMENTAL HYPOTHYROIDISM ON**  
**OVARIAN FOLLICLES**

SİLİNMEZ, Fatma Betül  
Master Thesis, Department of Histology and Embryology  
Thesis Supervisor: Prof. Dr. Hülya ÇETİN  
November 2024, 86 Pages

Hypothyroidism is a condition caused by the insufficient production of thyroid hormones (T4 and T3), leading to the slowing down of bodily functions. It can affect reproductive health by disrupting the menstrual cycle and fertility, and may result in recurrent pregnancy losses. Animal studies have shown that hypothyroidism inhibits follicular maturation and impairs ovarian function. Epidermal growth factor (EGF) is a polypeptide that plays a crucial role in cell growth and differentiation, while the EGF receptor (EGFR) is the receptor to which EGF binds. Thyroid hormones can influence EGF and EGFR levels, and hypothyroidism may lead to a reduction in EGFR levels. EGF supports the growth of granulosa cells and follicular development, and is essential for oocyte maturation and ovulation. The aim of this study is to investigate the effects of induced hypothyroidism on ovarian follicles and the impact of EGFR in hypothyroid-induced ovarian follicles in adult rats. In this study, 18 female Wistar rats were used. Ten rats, randomly selected, were assigned to the hypothyroidism group, receiving 10 mg/kg of methimazole in their drinking water for 30 days, while the remaining 8 rats constituted the control group. The effects of methimazole on the rats were evaluated biochemically in blood serum, histologically in ovarian tissue, and through immunohistochemical and GZ-PZR analyses. A decrease in serum T3 levels was observed in the hypothyroidism group. Significant reductions in the average body and ovarian weights, as well as in the number of primary, secondary, and tertiary follicles, were detected in the hypothyroidism group rats. Immunohistochemical analysis also revealed a decrease in EGFR expression in the hypothyroidism group. GZ-PZR analysis showed that while HB-EGF, EGFR, GPER1, and ESR1 gene expressions increased in the hypothyroidism group compared to the control group, RAF1 expression decreased. Methimazole leads to significant impairments in ovarian follicular development and oocyte quality in rats.

**Keywords:** Hypothyroidism, EGFR, Ovary, Rat

**This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects  
Coordination Unit through (Project number2023SABE011).**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince desteğini, önerilerini benimle paylaşan tez danışmanım Prof. Dr. Hülya ÇETİN'e, katkılarını esirgemeyen değerli hocam Prof Dr. Saim Özdamar'a,

Tez çalışmam süresince yardımını esirgemeyen ve değerli yorumlarıyla tezime katkı sağlayan İlknur LAFCI'ya ve Semih TAN'a,

Tez çalışmam da bana en çok yardımını dokunan arkadaşlarım Serpil Sude YERLİKAYA ve Fatma ALTINTAŐ'a teşekkür ederim.

Tez sürecimde sabır, ilgi ve anlayışlarıyla her ihtiyacım olduğunda yanımda olan Yasin ABALI'ya, maddi manevi beni destekleyen babam Sırrı SİLİNMEZ'e, sabır ve sevgileriyle bugünlere gelmeme yardımcı olan annem Hülya SİLİNMEZ'e ve ablam Şefika Selma SİLİNMEZ'e, sonsuz teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET</b> .....	<b>v</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vi</b>
<b>ŞEKİLLER</b> .....	<b>x</b>
<b>TABLolar</b> .....	<b>xi</b>
<b>SİMGE VE KISALTMALAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Amaç.....	3
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI</b> .....	<b>4</b>
2.1. Ovaryum .....	4
2.1.1. Ovaryum embriyolojisi .....	4
2.1.2. Ovaryum histolojisi .....	5
2.2. Tiroid Bezi .....	8
2.2.1. Tiroid embriyolojisi .....	9
2.2.2. Tiroid histolojisi .....	10
2.2.3. Tiroid hormonları .....	11
2.2.4. Tiroid hormonları üretimi .....	12
2.2.5. Tiroid hormonlarının salınımı .....	15
2.2.6. Tiroid hormonlarının etkileşimleri .....	15
2.2.7. Tiroid hastalıkları .....	18
2.2.8. Hipotiroidi.....	19
2.2.9. Hipotiroid ve ovaryum ilişkisi .....	20
2.3. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF).....	23
2.3.1. EGF reseptör sinyal yolları .....	25
2.3.2. EGFR ligand regülasyonları.....	27
2.3.3. EGFR ovaryum ilişkisi .....	29
2.4. Hipotiroid ve EGFR İlişkisi .....	30
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b> .....	<b>34</b>
3.1. Hipotiroid Oluşturulması ve Deney Prosedürü .....	34
3.2. Vajinal Smear .....	35
3.3. Sıçan Tartımı.....	37
3.4. Ovaryum Tartımı .....	37
3.5. Biyokimya Yöntemi.....	37
3.6. Histopatolojik İnceleme .....	37
3.6.1. Fiksasyon .....	37
3.6.2. Doku takip yöntemi.....	38
3.6.3. Hematoksiklen-Eozin boyama .....	39
3.6.4. Masson-trikron boyama .....	41
3.6.5. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi .....	42
3.6.6. Follikül sayımı yöntemi.....	43
3.7. Trizol Reagent ile Total RNA İzolasyonu.....	44
3.8. cDNA Sentezi.....	45
3.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR).....	46
3.10. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi .....	48
<b>4. BULGULAR</b> .....	<b>49</b>
4.1. Vajinal Smear Bulguları.....	49
4.2. Sıçan Tartımı Bulguları .....	49

4.3. Ovaryum Tartımı Bulguları.....	51
4.4 Biyokimya Bulguları.....	52
4.5. Makroskopik Bulgular .....	55
4.6. Hematoksilen Eozin Boyama Bulguları.....	56
4.7. Masson-Trikrom BoyamaBulguları .....	59
4.8. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları.....	61
4.9. Follikül Sayımı Bulguları.....	62
4.10 GZ-PZR Bulguları .....	64
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>66</b>
<b>6. SONUÇ .....</b>	<b>74</b>
<b>7. KAYNAKÇA.....</b>	<b>75</b>
<b>8. ÖZ GEÇMİŞ .....</b>	<b>84</b>
<b>EKLER</b>	



## ŞEKİLLER

	<b>Sayfa</b>
<b>Şekil 2.1.</b> Tiroid bezi genel görüntüsü.....	8
<b>Şekil 2.2.</b> Tiroid bezi gelişimi.....	10
<b>Şekil 2.3.</b> Tiroid bezi histolojik görüntüsü.....	11
<b>Şekil 2.4.</b> Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid kontrol sisteminin gösterimi.....	12
<b>Şekil 2.5.</b> Tiroid hormonunu aksiyon mekanizması.....	13
<b>Şekil 2.6.</b> Memeli hipotalamik-hipofiz-tiroid eksenini .....	14
<b>Şekil 2.7.</b> L-tiroksini (T4) ve ana metabolitleri olan triiyodotironin (T3) ve ters triiyodotironin (rT3)'in yapısı.....	14
<b>Şekil 2.8.</b> Çözünür ERBB ligandları, endokrin yoluyla reseptörlerine (EGFR gibi) bağlanabilir ve onları aktive edebilir.....	27
<b>Şekil 2.9.</b> EGFR sinyal ağı.....	29
<b>Şekil 2.10.</b> EGF reseptörü (EGFR) ve onun aşağı akış sinyal proteinleri.....	31
<b>Şekil 3.1.</b> Proöstrus, Östrus ve Diöstrus vajinal smear görüntüleri.....	36
<b>Şekil 4.1.</b> Hipotiroidi ve kontrol grubundaki sıçanların haftalık periyotta ağırlıklarının karşılaştırılması.....	51
<b>Şekil 4.2.</b> Hipotiroidi ve kontrol grubunun sağ ve sol overlerinin ortalama ağırlıklarının karşılaştırılması.....	52
<b>Şekil 4.3.</b> Kontrol ve hipotiroidi gruplarının ovaryum karşılaştırılması.....	55
<b>Şekil 4.4.</b> Kontrol ve hipotiroidi grubunda Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri.....	58
<b>Şekil 4.5.</b> Masson Trikrom boyama görüntüleri (X40) .....	60
<b>Şekil 4.6.</b> Kontrol ve hipotiroidi gruplarında EGFR ekspresyonunun immünohistokimyasal karşılaştırılması.....	62
<b>Şekil 4.7.</b> Hipotiroidi ve kontrol grubundaki ratların follikül sayımının karşılaştırılması.....	64
<b>Şekil 4.8.</b> Metimazol indüklenmiş hipotiroidi ve kontrol grubunda GZ-PZR sonuçlarının karşılaştırılması.....	65

**TABLolar**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 3.1.</b> GZ-PZR yönteminde kullanılan primerler .....	47
<b>Tablo 4.1.</b> Hipotiroidi ve kontrol grubundaki sıçanların haftalık ortalama ağırlıkları.....	50
<b>Tablo 4.2.</b> Hipotiroidi ve kontrol grubuna ait sıçanların sağ ve sol ovaryumlarının ortalama ağırlıkları.....	51
<b>Tablo 4.3.</b> 18 sıçandan alınan kan örneklerinde, östrojen, TSH, FSH, T3 ve T4 seviyelerinin biyokimya analiz sonuçları .....	63
<b>Tablo 4.4.</b> Hipotiroidi ve kontrol grubundaki sıçanların östrojen, T3, T4 kan değerlerinin karşılaştırılması (n=18).....	55
<b>Tablo 4.5.</b> Hipotiroidi ve kontrol grubundaki ratların follikül sayımının istatistiksel olarak karşılaştırılması .....	63

**SİMGE VE KISALTMALAR**

$\mu$ l	Mikrolitre
cAMP	Siklik adenozin monofosfat
EGF	Epidermal büyüme faktörü
EGFR	Epidermal büyüme faktör reseptörü
ERK1/2	Hücre dışı sinyal düzenleyici kinaz 1/2
FSH	Folikül uyarıcı hormon
GH	Büyüme hormonu
GnRH	Gonadotropin salgılatıcı hormon
LH	Lüteinize edici hormon
MAPK	Mitojen aktive protein kinaz
PI3K	Fosfatidilinositol 3-kinaz
PRL	Prolaktin
PTU	Propiltiourasil
SMG	Submandibular bez
T3	Triiyodotironin hormonu
T4	Tiroksin hormonu
TBG	Tiroksin bağlayıcı globulin
TH	Tiroid hormonu
TR	Tiroid hormon reseptörü
TRH	Tirotropin salgılatıcı hormon
TSH	Tiroid uyarıcı hormon

## 1. GİRİŞ

Hipotiroidi, tiroid bezinin yetersiz hormon üretimi ile karakterize edilir ve kadınlarda üreme fonksiyonları üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Bu bağlamda, hipotiroidi over fonksiyonlarına ve genel olarak üreme sağlığına etkileri kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır. Öte yandan, epidermal büyüme faktör reseptörü (EGFR), hücrel büyüme, proliferasyon ve farklılaşma süreçlerinde kritik bir rol alır ve over fonksiyonlarının düzenlenmesinde de önemli etkisi vardır (Weng ve ark., 2019; Richani & Gilchrist 2018).

Tiroid hormonları (TH), folliküler gelişim ve gonadotropin salgılanması için kritiktir ve hipotiroidi bu süreçleri olumsuz yönde etkileyebilir (Weng ve ark., 2019; Hatsuta ve ark., 2004). Hipotiroidi durumunda, overlerde lipid ve glikojen içeriği değişir ve bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonu artar, bu durum üreme fonksiyonlarını bozar (Mendez-Tepepa ve ark., 2020). Deneysel hipotiroidi oluşturulmuş sıçan modelinde çeşitli follikül aşamalarında azalma (Weng ve ark., 2019) ve yetişkin sıçanlarda yumurtalık atrofisi ve follikül atrezisi gözlemlenmiştir (Ortega ve ark. 1990; Meng ve ark. 2017). TH tedavisi, follikül atrezisini azaltır ve sağlıklı antral follikül sayısını artırır (Kobayashi ve ark., 2009). Ayrıca hipotiroid, yumurtalık ve rahim içindeki lipid ve glikojen içeriğini etkiler, yumurtalık çevresi yağ dokularında ve rahim içinde bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonunu tetikler (Mendez-Tepepa ve ark., 2020). Kadınlarda subklinik hipotiroidi, infertilite ile ilişkilendirilmiş olup doğurganlığı azaltmaktadır (Abalovich ve ark., 2007; Danilovic ve ark., 2016). Bunun yanı sıra östrus döngüsünde düzensizliklere ve yalancı gebelik durumlarına neden olabilmektedir (Hapon ve ark., 2010). TH'ler, hipotalamus-hipofiz-yumurtalık ekseninde düzensizliğe ve seks hormonu bağlayıcı protein düzeylerinde azalmaya sebep olur (Canipari ve ark., 2018).

EGFR, over fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemli bir etkidir. EGFR/ErbB reseptör ailesinin düzenlenmemesi epitelyal over kanserinin etiyojisine ve ilerlemesine katkı da bulunabilir ve gonadotropin indüklenmiş oosit olgunlaşmasında kritik bir rol alır. Epidermal büyüme faktörüne (EGF) yanıt veren yolak, over epitel hücrelerinde büyüme ve proliferasyonu düzenler (Abdollahi ve ark., 2003). EGFR, oosit olgunlaşmasında ve gonadotropin indüklenmiş oosit olgunlaşmasında görev alır. Luteinizan hormonun (LH) tetiklediği EGF moleküllerinin kümulus ooforus hücrelerinden salgılanmasıyla EGFR aktive olur ve bu aktivasyon, oositlerin mayoz bölünmesini indükler (Jamnongjit ve ark., 2005; Gilchrist ve ark., 2004). EGF ağı, oosit olgunlaşması sırasında kümulus hücrelerinden gelen sinyallerle mRNA translasyonunu düzenler ve bu süreç, fertilité için kritik öneme sahiptir. EGFR sinyalleme, PI(3)K-AKT-mTOR sinyalizasyonu ile maternal mRNA translasyonunu kontrol eder ve bu kontrol doğurganlık için gereklidir (Jamnongjit ve ark., 2005; Richani & Gilchrist 2018).

EGFR, tiroid hormonları ile eş zamanlı çalışarak ovaryum fonksiyonlarında görev alır. Tiroid hormonları, EGF ve EGFR üzerinden ovaryumda follikül gelişimini ve olgunlaşmasını destekler. Hipotiroidi, bu süreçleri bozarak üreme fonksiyonlarını olumsuz etkileyebilir. Bu nedenle, tiroid hormonlarının düzenli seviyede tutulması, sağlıklı ovaryum fonksiyonları için kritik öneme sahiptir (Mukku ve ark., 1984). EGFR sinyal yolları oositlerdeki ikincil habercilerin yeniden düzenlenmesini destekler ve mRNA translasyonunu sağlar (Gilchrist ve ark., 2004). Tiroid hormonlarının azalmasıyla birlikte, EGF ve EGFR'nin ifade düzeyleri etkilenir. Tiroid hormonlarının eksikliği, EGF içeriğinin ve mRNA birikiminin azalmasına sebep olur (Kasayama ve ark., 1989).

Tiroid hormonları, EGF ailesinin üyelerinin ifadesini somatik dokularda ve meme karsinomu hücrelerinde düzenler. Tiroid hormonları, hücre yüzeyindeki iodothironinlere bağlı G proteini reseptörleri ve mitojen aktive protein kinaz (MAPK) kaskadı aracılığıyla farklı büyüme faktörü sinyallerini modüle eder. Tiroksin (T4) hormonu, MAPK yolunu aktive ederek ERK1 ve ERK2'nin nükleusa taşınmasını sağlar ve bu da gen ekspresyonunu düzenler (Shih ve ark., 2004). Hipotiroidi durumunda, EGF seviyeleri azalır ve tiroid hormonlarının uygulanması bu seviyeleri geri getirebilir. Bu durum, tiroid hormonlarının EGF sinyalizasyonunu düzenleyici olarak etkilediğini göstermektedir (Fujieda ve ark., 1993).

Hipotiroidinin over fonksiyonları üzerindeki etkileri, EGFR'nin over fonksiyonlarıyla ilişkisi ve hipotiroidinin EGFR ekspresyonu ve aktivitesinin ovaryum üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalara ihtiyaç vardır.

### **1.1. Amaç**

Bu çalışmanın amacı, yetişkin sıçanlarda indüklenen hipotiroidinin ovaryum folliküllerine ve folliküler gelişim süreçlerine etkilerini incelemektir. Bu araştırmanın, yetişkinlerde hipotiroidinin over folliküler gelişimi ve üreme potansiyeli üzerindeki etkileri hakkında önemli bilgiler sağlayabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca, tiroid hormonları ile EGF / EGFR arasındaki ilişkiler bilinmekle birlikte, hipotiroidinin ovaryumdaki EGFR ekspresyonu üzerine net etkileri hakkında daha fazla bilgiye ihtiyaç duyulmaktadır. Hipotiroidi indüklenmiş sıçanların ovaryumundaki folliküller üzerinde EGFR etkisini inceleyerek, hipotiroidinin sıçan ovaryumunda EGFR ekspresyonunu ve histolojik olarak ovaryuma olan etkilerini araştırmayı amaçladık.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Ovaryum

Ovaryumlar, insan vücudunda yaklaşık 3 cm uzunlukta, 1.5 cm genişlikte ve 1 cm kalınlığında bulunan bir çift organlardır. Pelvis boşluğunun iki yanında ve uterusun her iki tarafında yer alırlar. Badem şeklinde ve pembemsi beyaz renkli olan bu üreme bezleri, dişi cins hücreleri olarak bilinen oositleri üretmekle görevlidirler. Ovaryumlar östrojen ve progesteron gibi hormonları salgılar; bu hormonlar sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişimi ve gebeliğin kontrolü gibi işlevlerde rol alır. Yapısal olarak, yumurtalıklar mesovaryum adı verilen peritoneal bir kıvrım aracılığıyla geniş ligamentin posterior yüzeyine bağlanır ve puberta öncesinde yüzeyleri düzgünken, üreme yaşamı boyunca tekrarlayan ovülasyonlar sebebiyle skarlaşabilir ve düzensizleşebilir. Postmenopozal kadınlarda ise, yumurtalıklar üreme dönemindeki boyutlarının yaklaşık dörtte biri kadardır (Moore ve ark., 2022; Özdamar & Çetin Sorkun, 2002; Ross ve ark., 2014).

#### 2.1.1. Ovaryum embriyolojisi

Ovaryum embriyolojisi, embriyonun erken dönemlerinde başlayan ve dişi üreme sağlığının temelini oluşturan bir süreçtir. Bu süreç, primordial germ hücrelerinin oluşumu ve göçü, cinsiyetin belirlenmesi ve özellikle folliküler gelişim evrelerini kapsar (Moore ve ark., 2022; Ross ve ark., 2003).

Erkek embriyolara kıyasla, dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaş ilerler. XX kromozomları tarafından taşınan genler ovarian gelişim için gereklidir. Overler 10. haftaya kadar histolojik olarak seçilemezler. Gonadal kordlar medulla içerisine doğru uzanır ve rudimenter yapı olan reteovari'i'yi oluşturur. Bu yapılar ve gonadal kordlar genellikle dejenere olarak kaybolur (Moore ve ark., 2022).

Erken fetal dönemde overin yüzey epitelinden köken alan kortikal kordlar, altta bulunan mezenkim dokusunun içine doğru ilerler. Bu epitel, peritonun mezotelinden gelişir. Kortikal kordların boyutları arttığında, primordial germ hücreleri bu kordların içine girer. Yaklaşık 16. haftada, bu kordlar izole hücre kümelerine parçalanır ve oluşan her bir primordial follikül, primordial germ hücrelerinden köken alan bir oogonium ve onu çevreleyen, yüzey epitel kökenli tek sıralı yassılaştırmış folliküler hücreler içerir. Fetal yaşam süresinde, overlerde aktif mitoz sonucunda oogoniumlarda meydana gelen binlerce primordial follikül oluşur (Moore ve ark., 2022).

Doğum sonrası dönemde oogonium oluşumu görülmez. Doğumdan önce birçok oogonium dejenerasyona uğrar, ancak iki milyon civarında hücre primer oositleri oluşturmak için kalır. Overin yüzey epiteli düzleşip tek tabakalı hale gelir; bu hücreler over lümeninde periton mezoteli ile devam eder. Yüzey epiteli, korteksteki folliküllerden, ince bir fibröz kapsül olan tunica albuginea ile ayrışır. Overler, gerileyen mezonefrozan ayrıldıktan sonra mezenteri olan mezovarium ile bağlantı kurarlar (Moore ve ark., 2022).

Bu süreçler sonucunda, dişi üreme sistemi embriyonik gelişimini tamamlar ve doğum sonrası dönemde, yaşamın ilerleyen dönemlerinde ovulasyon sürecine katılacak olan primer oositler hazır hale gelir. Bu gelişimsel süreçlerin her aşamasında, hücrelerin doğru zamanda ve doğru şekilde bölünmesi, farklılaşması ve yer değiştirmesi büyük önem taşır (Moore ve ark., 2022; Ross ve ark., 2003).

Ovaryumun embriyolojik gelişimi, folliküllerin oluşum evreleri ve dişi üreme fonksiyonlarının korunup devamlılığının sağlanmasını gerektiren bu aşamalar, hormonların ve diğer moleküler sinyallerin düzenleyici etkileri ile gerçekleşir. Bu süreçlerin her biri, üreme sağlığı açısından hayati öneme sahiptir (Zhou ve ark., 2019; Özdamar & Çetin Sorkun, 2002; Moore ve ark., 2022; Ross ve ark., 2003).

### **2.1.2. Ovaryum histolojisi**

Ovaryum histolojisi, dişi üreme sisteminin merkezi bileşenlerini oluşturur. Ovaryumun dış yüzeyi (germinal epitel), tek katlı yassı veya izoprizmatik hücrelerle çevrilidir. Bu epitel altında, yoğun bağ dokusundan oluşan tunica albuginea bulunur.



Ovaryum korteksi, gelişimin farklı evrelerindeki ovaryum folliküllerini barındırır. Bu folliküller, bir oosit ve çevresinde sıralanan granüloza ve stromal hücrelerden oluşur. Follikül gelişimi, primordial folliküllerin farklılaşmasıyla başlar ve oositin çevresindeki granüloza hücreleri, mitotik bölünmelerle çoğalarak zona pellucida adı verilen yapıyı oluşturur. Zona pellucida, follikülün çevresinde sıklaşan ovarium stromasıyla birlikte, Teka follikülü adı verilen yapıyı geliştirir (Moore ve ark., 2022; Ross ve ark., 2003). Ovaryumun iç yapısı ise, folliküler büyüme ve atrezinin başladığı fetüs döneminden itibaren değer kazanır. Folliküller, primordial, primer, sekonder ve tersiyer olmak üzere dört ana aşamada sınıflandırılır. Her aşama, folliküllerin yapısında ve işlevinde belirgin değişikliklerle gözlemlenir (Fox, 2011).

Histolojik olarak, primordial folliküller küçük, basit yapılı ve ince granüloza hücre tabakasına sahiptir. Primer folliküller daha büyük, kübik granüloza hücreli ve zona pellucida ile çevrilidir. Sekonder folliküller ise, daha fazla granüloza hücresi katmanına ve antrum boşluklarına sahiptir. Tersiyer folliküller, büyük antrum ve belirgin kümülüs oophorus yapısıyla ayırt edilebilir (Fox, 2011).

Primordial folliküller yaklaşık 25 mikrometre çapında olup fetal dönemin sonlarında ve doğumdan kısa süre sonra oluşan ilk follikül tipidir. Her bir primordial follikül, birincil oosit ve onu çevreleyen tek katlı yassı granüloza hücreleriyle çevrilidir. Bu folliküller, overin kortikal bölgesinde bulunur ve pubertaya kadar nispeten inaktif durumda bekler (Moore ve ark., 2022). Oosit, profaz I evresinde duraklamış olup, granüloza hücreleri oositin beslenmesini ve korunmasını sağlar (Fox, 2011).

Puberta ile hormonal değişiklikler, primordial folliküllerin primer folliküllere dönüşümünü tetikler. Primer folliküller 30-140 mikrometre çapındadır ve yassı granüloza hücrelerinin kübik hücrelere dönüşmesiyle karakterizedir. Granüloza hücrelerinin sayısı ve katmanı artarak oosit çevresinde çok katmanlı bir yapı oluşturur. Ayrıca, oositin çevresinde zona pellucida adı verilen glikoprotein yapıları bir zar oluşur. Zona pellucida, oositin korunmasında ve spermin oosite ulaşmasında görev alır (Fox, 2011).

Primer folliküllerin gelişimiyle sekonder folliküller oluşur ve bu süreç daha karmaşıktır. 140-200 mikrometre çapındadırlar. Granüloza hücreleri çoğalmasını

artırarak, follikülün çapını artırır ve follikül içi boşlukları (antrum) oluşturur. Bu dönemde, granüloza hücreleri arasında sıvı birikmeye başlar ve bu sıvı antrumu doldurarak follikülü genişletir (Moore ve ark., 2022). Antral folliküllerin gelişimi sırasında, granüloza hücreleri, hormon üretimi ve oositlerin olgunlaşması gibi temel fonksiyonları da düzenler. Bu hücreler, özellikle özelleşmiş ekstraselüler matriks yardımıyla, bazal lamina üzerinde yer alır ve folliküler atrezi veya oosit üretimi süreçlerine katılır. Endokrin sistem, bu süreçlerin düzenlenmesinde merkezi bir rol alır (Zhou ve ark., 2019). Ayrıca, teka interna ve teka externa olarak adlandırılan iki farklı hücre tabakası gelişir. Teka interna hücreleri androjen üretir ve bu androjenler granüloza hücreleri tarafından östrojene dönüştürülerek follikül gelişimini ve ovulasyonu teşvik eder (Fox, 2011).

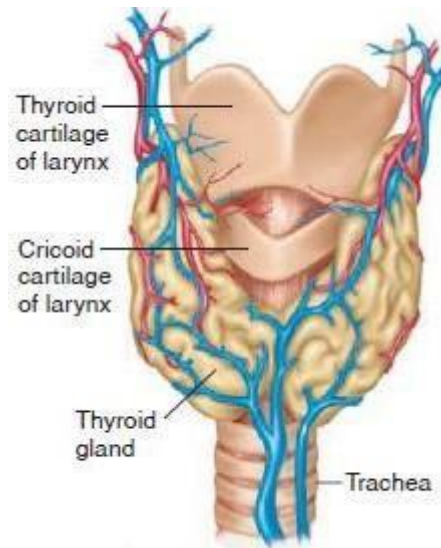
Tersiyer folliküllerin çapı 200 mikrometreden daha büyüktür, gelişim aşamasının son follikülleridir ve Graaf follikülleri olarak da bilinir. Bu folliküller, büyük bir antruma ve kalın granüloza hücre tabakasından oluşur. Tersiyer folliküllerde, oosit antrumun kenarında bir tarafa doğru yerleşir ve kumulus oophorus adı verilen hücreler tarafından desteklenir (Fox, 2011). Oosit, bu olgunlaşmış follikül içinde metafaz I safhasından itibaren bulunur. Follikül sıvısı, yüksek östrojen konsantrasyonu içerir ve bu östrojen, hipofizden LH salınımını tetikleyerek ovulasyonu başlatır ve II. mayoz bölünme başlar. Oosit, ovulasyon için hazırlık yapar ve bu süreç döllenmeye hazır olma sürecinin kritik bir aşamasıdır. Bu aşamada, hücre zarı ikiye bölünür ve iki yeni hücre oluşur: birincil oosit ve ikincil polar cisim. Her iki hücre de haploid (n) kromozom setine sahiptir. Bu süreç, oositin olgunlaşmasını tamamlayarak döllenmeye hazır hale gelmesini sağlar. Ovulasyon sırasında, olgunlaşmış oosit, fallop tüpüne doğru gider ve döllenmeyi bekler. Döllenme gerçekleşirse, oosit II. mayoz bölünme sonrasında birleşik bir yumurta hücresi (zigot) oluşturmak için döllenme ile ilgili olayları gerçekleştirir (Schoenwolf ve ark., 2021).

Folliküller gelişim, hipotalamus-hipofiz-ovaryum eksenini tarafından düzenlenir. Gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH), hipotalamustan salınarak hipofiz ön lobundan follikül uyarıcı hormon (FSH) ve LH salınımını uyarır. FSH, primordial folliküllerin primer folliküllere dönüşümünü ve granüloza hücrelerinin çoğalmasını desteklerken, LH, sekonder ve tersiyer folliküllerin gelişimini ve ovulasyonu destekler (Moore ve ark., 2022).

Folikül gelişimi sırasında, östrojen üretimi artar ve bu hormon, endometriumu kalınlaştırarak gebeliğe hazırlar. Ayrıca, yüksek östrojen seviyeleri, LH salınımını tetikleyerek ovulasyonu başlatır. Ovulasyon sonrası, boşalan follikül korpus luteum'a dönüşerek progesteron üretir ve bu hormon, endometriumu destekler. Folliküllerin her bir aşamasındaki histolojik değişiklikler, oositin olgunlaşmasını ve follikülün hormonal yanıtını düzenler. Bu süreçler, başarılı bir ovulasyon ve potansiyel gebelik için gereklidir (Fox, 2011).

## 2.2. Tiroid Bezi

Tiroid bezi, boynun ön kısmında yer alan ve kelebek şeklinde olan bir endokrin bezdir. Tiroid, endokrin bezler arasında en büyük olanıdır ve 20-25 gram ağırlığındadır. Tiroid bezi, insan vücudundaki en önemli hormonları üreten bezlerden biridir ve metabolizmayı düzenleyen, büyümeyi ve gelişmeyi düzenleyen tiroid hormonlarını (T3 ve T4) üretilip salgılar (Fox, 2011). Tiroid hormonlarının üretimi, hipofiz bezinden salgılanan tiroid uyarıcı hormon (TSH) tarafından kontrol edilir. Tiroid bezinin yapısal ve işlevsel özellikleri, hormon üretimi ve depolanması için optimize edilmiştir (Eroschenko, 2013; Fox, 2011).



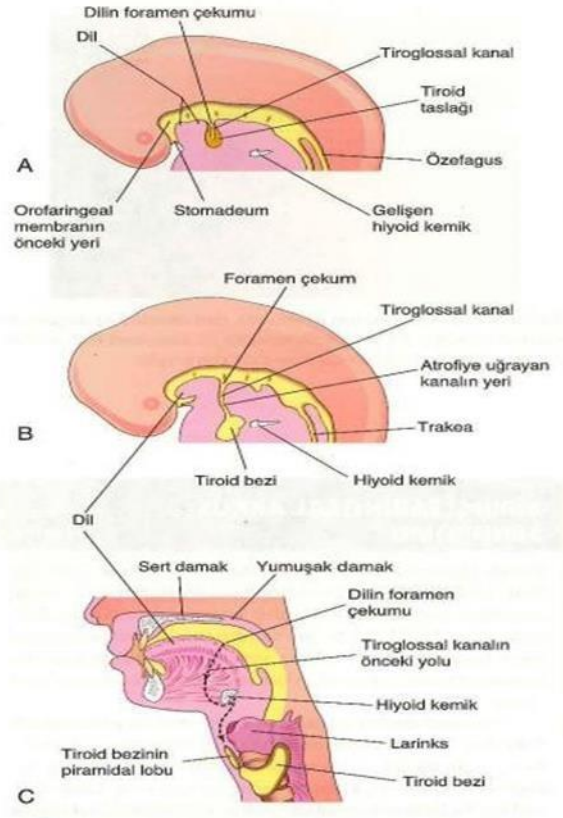
**Şekil 2. 1.** Tiroid bezi genel görüntüsü (Fox, 2011).

### 2.2.1. Tiroid embriyolojisi

Tiroid embriyolojisi, tiroid bezinin embriyolojik gelişimini ve oluşumunu ifade eder. Tiroid bezi, fertilizasyondan yaklaşık 24 gün sonra farinksin tabanındaki foramen cecum bölgesinde oluşur ve ardından faringeal bağırsak önünden ikili divertikül olarak aşağı iner (Moore ve ark., 2022). Bu göç sırasında tiroid, dile bir dar kanal olan tiroglossal kanal ile bağlı kalır, ancak bu kanal daha sonra kaybolur. Daha ileri gelişmeyle birlikte, tiroid bezi hiyoid kemiğin ve larinks kıkırdaklarının önünde konumlanır ve yedinci haftada trakeanın önünde nihai konumuna ulaşır. Burada, boynun ön kısmında yer alan ve sağ ve sol lob olmak üzere iki büyük lob ve ortada birbirini bağlayan istmus gelişir (Eroschenko, 2013; Fox, 2011).

Tiroid, folliküller adı verilen yapısal birimlerden oluşur. Tiroid bezi, yaklaşık üçüncü ayın sonunda etkin hale gelir ve bu dönemde kolloidi içeren ilk folliküller ortaya çıkar. Her bir follikül, tiroid hormonlarını depolamak için kolloid adı verilen bir madde içeren jelatinimsi yapıya sahiptir. Tiroid folliküllerinin etrafında, folliküler hücreler olarak bilinen hücreler T3 (triiodotironin) ve T4 hormonlarını üretir. Folliküler hücreler üretmiş oldukları kolloidi folliküllerin içinde depolar (Nilsson & Fagman, 2017a).

Tiroid bezinde, folliküler hücrelere ek olarak parafolliküler hücreler bulunur ve folliküler epitelde yer alır. Parafolliküler veya C hücreleri ultimobranchial cisimden türetilir ve kalsitonin üretimine katkı sağlarlar (Mense & Boorman, 2018). C hücreleri nöral krest kökenli hücrelerdir. Folliküler hücreler ise endodermal kökenli hücrelerdir (Moore ve ark., 2022).



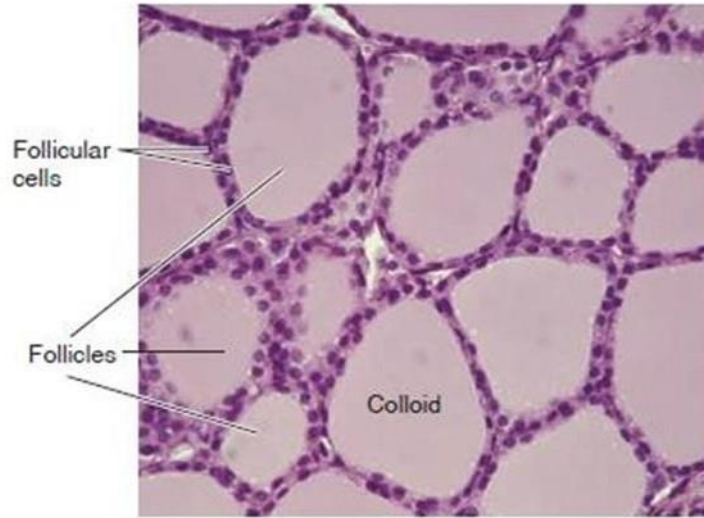
Şekil 2. 2. Tiroid bezi gelişimi (Moore ve ark., 2022).

### 2.2.2. Tiroid histolojisi

Tiroid taslağı ilk olarak katı endodermal hücre kütesinden gelişir. Bu hücreler daha sonra çevre vasküler mezenkim dokusuyla etkileşime girer ve epitel kordon ağını oluşturur. 10. haftada, bu kordonlar küçük hücre gruplarına bölünmeye başlar (Moore ve ark., 2022). Tiroid bezinde folliküler hücreler, tiroid hormonlarının sentezini ve depolanmasını sağlarken parafolliküler hücreler, kalsitonin gibi kalsiyum metabolizmasını düzenleyen hormonları üretir. 11. haftada bu folliküllerde kolloid görülmeye başlar (Moore ve ark., 2022).

Folliküller genellikle folliküler hücrelerden oluşan basit küboidal bir epitelyum tarafından kaplanır. Tangansiyel olarak kesilmiş folliküller genelde lümen sergilemez (Eroschenko, 2013). Folliküler hücreler, 20. Haftada tiroid hormonlarını sentezler ve salgılamaya başlar. Rutin histolojik hazırlıklarda kolloid genellikle folliküler duvarlardan geri çekilir. Parafolliküler hücreler folliküllerin çevresinde tek başlarına veya küme halinde bulunurlar (Moore ve ark., 2022; Eroschenko, 2013)

Parafoliküler hücreler hafif boyanırlar ve kalsitonin hormonunu sentezler ve salgırlar. Folliküler hücrelerin yüksekliği işlevlerine göre değişkenlik gösterir. Son derece aktif folliküllerde epitelyum küboidaldir (Arrangoiz ve ark., 2018; Eroschenko, 2013). Daha az aktif folliküllerde ise epitelyum yassı gibi görünür. Tiroid bezi, bol miktarda kan damarı içerir çünkü tiroid hormonlarının sentezi için gerekli olan besin maddeleri ve iyotun taşınması için kan dolaşımını önemlidir (Ross ve ark., 2014).



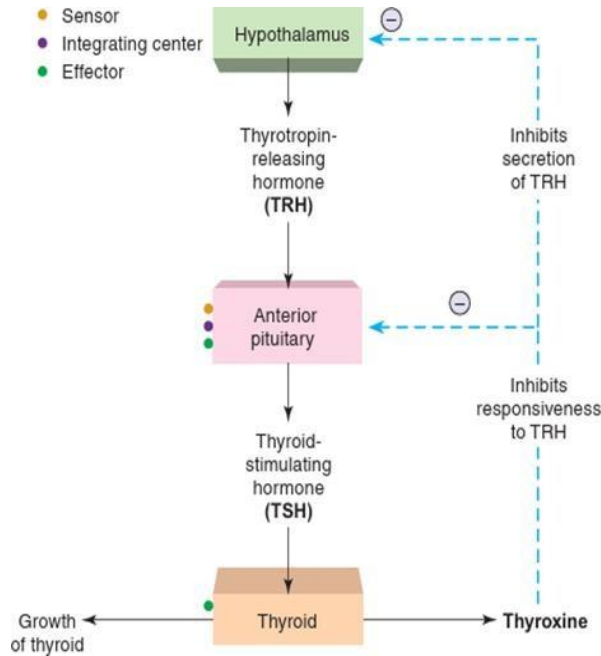
**Şekil 2. 3.** Tiroid bezi histolojik görüntüsü (Eroschenko, 2013).

### 2.2.3. Tiroid hormonları

Hipofiz bezi, beyin tabanında bulunur ve vücuttaki birçok önemli hormonun salınımını kontrol eder. Adenohipofiz, büyüme hormonu (GH), prolaktin (PRL), adrenokortikotropik hormon (ACTH), FSH, LH ve TSH gibi hormonları üretir ve salgılar (Fox, 2011; Zoeller ve ark., 2007). Hipotalamus, memelilerde tirotropin salgılatıcı hormon (TRH) veya memeli olmayanlarda kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) salgılayarak ön hipofizin TSH üretmesini uyarır (Thambirajah ve ark., 2021). TSH, daha sonra tiroid bezinde tiroid hormon üretimini uyarır (Burger & Patel, 1977; Thambirajah ve ark., 2021).

Tiroid bezinin folliküler hücreleri, tiroid hormonlarının üretiminden sorumludur ve bu işlevleri adenohipofizden salınan TSH tarafından düzenlenir. Etkili tiroid hormonları T3 ve T4 olarak adlandırılır ve bu hormonlar tiroid bezinden kan dolaşımına salınır (Silva ve ark., 2018; Eroschenko, 2013).

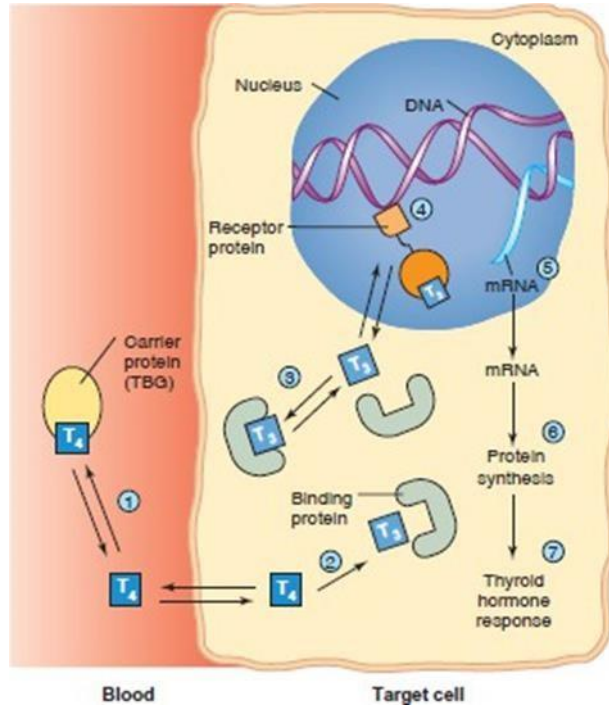
Tirozin amino asidinden türetilen TH'lerin iyodinli formları, öncelikle 3, 3', 5-triiodotironin ve tiroksin, tiroid bezi tarafından aktif iyodin taşınması ile slc5a5 geni tarafından kodlanır ve tiroid peroksidaz (TPO) aktivitesi aracılığıyla sentezlenir (Thambirajah ve ark., 2021).



Şekil 2. 4. Hipotalamus-Hipofiz-Tiroid kontrol sisteminin gösterimi (Fox, 2011).

#### 2.2.4. Tiroid hormonları üretimi

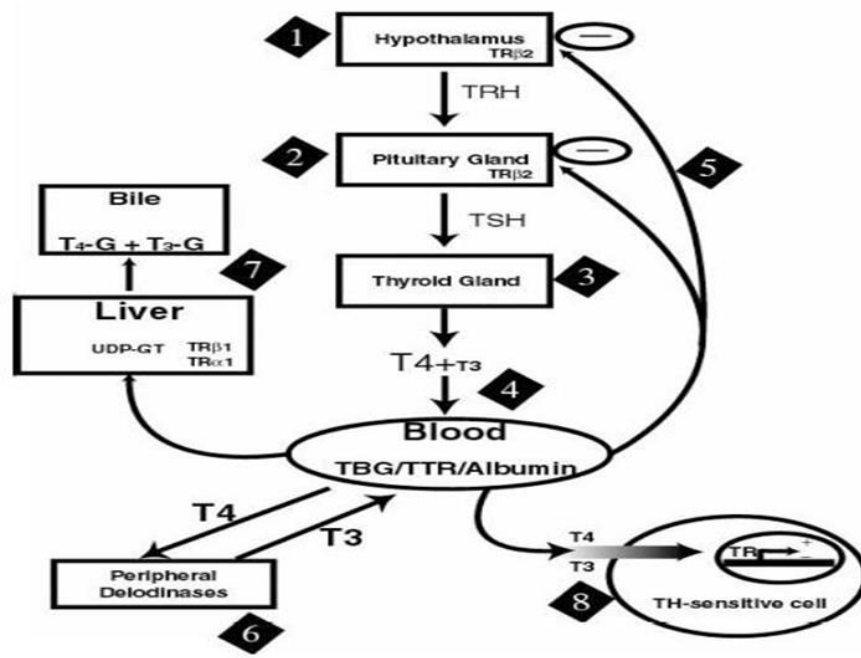
Düşük tiroid hormon seviyeleri, adenohipofizden TSH salınımını uyarır. TSH'nın uyarısına yanıt olarak, tiroid bezindeki folliküler hücreler, dolaşımdan iyot almak için folliküler bazal hücre membranında bulunan iyot pompasını kullanır. İyot, folliküler hücrelerde okside edilerek folliküler lümene taşınır. Lümende, iyot aminoasit tirozin grupları ile birleşerek iyotlu tiroglobulin oluşturur. T3 ve T4, iyotlu tiroglobulinin temel ürünleridir (Silva ve ark., 2018; Zoeller ve ark., 2007). Bu hormonlar, ihtiyaç duyulana kadar tiroid folliküllerinde inaktif formda bekler. Adenohipofizden salınan TSH, tiroid hormonlarını kan dolaşımına salmaya teşvik eder. TH'ler, çeşitli kan proteinleri aracılığıyla periferel dokulara taşınır (örneğin, memelilerde albümin ve esas olarak tiroksin bağlayıcı globulin (TBG) veya balıklar, amfibiler, kuşlar ve sürüngenlerde transtiretin (TTR)) (Thambirajah ve ark., 2021; Eroschenko, 2013; Fox, 2011; Ross ve ark., 2014).



Şekil 2. 5. Tiroid hormonunun aksiyon mekanizması (Fox, 2011).

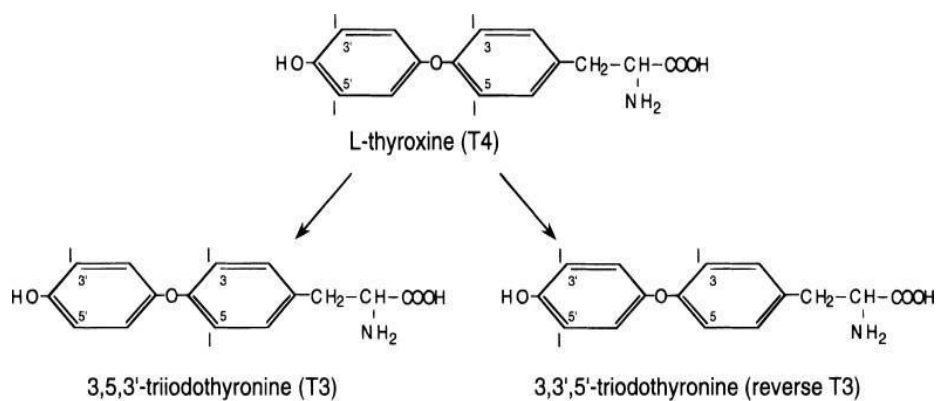
T<sub>4</sub> kandaki taşıyıcı proteinlere, özellikle TBG proteinine bağlı olarak dolaşır. Tiroid az miktarda T<sub>3</sub> hormonu da salgılar. Ancak taşıyıcı proteinler, T<sub>4</sub>'ü T<sub>3</sub>'ten daha yüksek bir afiniteyle bağlar; bu nedenle kandaki serbest T<sub>3</sub> miktarı, serbest T<sub>4</sub> miktarından yaklaşık olarak 10 kat daha fazladır. Kandaki T<sub>4</sub>'ün yaklaşık %99.96' sını taşıyıcı proteinlere bağlıdır ve geri kalan kısmı serbesttir. Yalnızca serbest T<sub>4</sub> ve T<sub>3</sub> hedef hücrelere girebilir (Fox, 2011; Zoeller ve ark., 2007).





Şekil 2. 6. Memeli hipotalamik-hipofiz-tiroid eksenini (Zoeller ve ark., 2007).

Serbest T<sub>4</sub> hedef hücrenin sitoplazmasına girdikten sonra enzimatik olarak T<sub>3</sub>'e dönüşür. Hedef hücreler içinde T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub>'ten daha aktif formda bulunur. Tiroid hormon reseptör proteinleri, tiroid hormon ligandı olmadan da nükleusta bulunabilir. Tiroid reseptörleri, ligandları tanımlanmadan keşfedilebilir ve genleri klonlanabilir. Günümüzde bilinen yaklaşık 70 nükleer reseptörün yalnızca yarısının ligandları tespit edilebilmiştir (Greenspan & Gardner, 2021; Fox, 2011; Zoeller ve ark., 2007).



Şekil 2. 7. L-tiroksin (T<sub>4</sub>) ve ana metabolitleri olan triiyodotironin (T<sub>3</sub>) ve ters triiyodotironin (rT<sub>3</sub>)'in yapısı (Brent, 1997).

### 2.2.5. Tiroid hormonlarının salınımı

Tiroid bezinin folliküler hücreleri tarafından salgılanan ana tiroid hormonu T4 dokularda, deiodinaz enzimi etkisiyle daha aktif olan T3'e dönüşür. Tiroid hormonlarının salınımı, foliküler hücrelerin tiroglobulini almasıyla başlar. Ardından, iyotlanmış tiroglobulin lizozomlar tarafından parçalanarak T3 ve T4 hormonları serbestleştirilir. Son olarak, bu hormonlar folliküler hücrelerden kan dolaşımına salınır. Dolaşıma katılan bu hormonlar vücudun metabolik hızını artırır; hücre metabolizmasını, büyümeyi, farklılaşmayı ve tüm vücutta gelişmeyi hızlandırır. Buna ek olarak, protein, karbonhidrat ve yağ metabolizmasını da hızlandırırlar. Tiroid hormonlarının etkileri, genellikle farklı dokularda ve organlarda ifade edilen tiroid hormon reseptörlerine (TR'ler) bağlanarak ortaya çıkar. Bu reseptörler, T3'ün biyolojik aktivitelerini transkripsiyonel düzenleme yoluyla yönetir. İki tür TR geni (TRa1 ve 2 ile TRb 1 ve 2), T3 bağlayıcı reseptörleri kodlar (Fedail ve ark., 2013; Eroschenko, 2013; Guyton & Hall, 2021).

Parafolliküler hücrelerin kan damarlarına salgılamış olduğu kalsitoninin ana işlevi, vücuttaki kan kalsiyum seviyelerini düşürmektir. Bu süreç, kemiklerdeki osteoklast aktivitesini azaltarak ve dolayısıyla kemik rezorpsiyonunu engelleyerek kalsiyum salınımını inhibe eder. Ayrıca kalsitonin, böbreklerden idrara kalsiyum ve fosfat iyonlarının atılımını artırır. Parafolliküler hücreler tarafından üretilen ve salınan kalsitonin, sadece kan kalsiyum seviyelerine bağlı olup adenohipofiz hormonlarından tamamen bağımsızdır (Eroschenko, 2013; Kasper ve ark., 2018).

### 2.2.6. Tiroid hormonlarının etkileşimleri

Her hormon, belirli hedef hücrelerde kendi karakteristik etkilerini gösterir, ancak aynı kimyasal kategorideki hormonlar genellikle benzer etki mekanizmalarına sahiptir. Bu benzerlikler, hücresel reseptör proteinlerinin etkileşim yerini ve hormonun reseptör proteinine bağlandıktan sonra hedef hücrelerde meydana gelen olayları içerir. Hormonlar kan yoluyla vücuttaki her hücreye taşınsa da sadece hedef hücreler bu hormonlara yanıt verebilir. Belirli bir hormona tepki verebilmek için bir hedef hücre, o hormon için belirli reseptör proteinlerine sahip olmalıdır. Hormonlar reseptörlere yüksek afiniteli veya düşük afiniteli olarak bağlanırlar (Fox, 2011; Meisenberg & Simmons, 2016).

TH'ler, metabolik dengeyi korumada önemli bir rol oynar. (Rodríguez- Castelán ve ark., 2022a). TH'ler, tüm omurgalıların büyüme, gelişim ve metabolizmasının önemli düzenleyicileridir (Forrest & Visser, 2013; Thambirajah ve ark., 2021). Tiroid hormonlarının büyüme, hücre solunum, metabolizma, embriyonik gelişim, doku farklılaşması ve olgunlaşma gibi çeşitli biyolojik süreçleri düzenlediği bilinmektedir (Fedail ve ark., 2013). T3'ün en yaygın incelenen etkilerinden biri, bazal metabolik hızın düzenlenmesidir. Hipertiroidide görülen hipermetabolik durum, mitokondriyal solunum zincirini açarak serbest radikal üretimine ve oksidatif stres ile hücre hasara yol açabilir (Venditti & DiMeo, 2006; Cano-Europa ve ark., 2011). Ancak, hipotiroidinin neden olduğu hipometabolik durum, toksinlerin neden olduğu oksidatif hasara karşı koruyucudur (Ören ve ark., 1996).

Tiroid fonksiyonlarının bozulması ve buna bağlı olarak tiroid hormonu üretimindeki değişiklikler, büyüme, gelişme ve metabolizmanın temel işlevlerini etkiler. Bazal metabolizma hızı, enerji üretimi, karbonhidrat ve lipit metabolizması gibi bu süreçler üzerinde önemli değişikliklere sebep olur. Ayrıca, tiroid hormonlarının uzun süreli düşük konsantrasyonunun, follikülogenezin bozulması, yumurtlama problemleri ve fertilizasyon oranında azalma gibi üreme sorunlarına neden olabileceğine dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (Meng ve ark., 2017).

Azalmış TH konsantrasyonu, hücrelerde daha az mitokondri ve azalmış ATP rejenerasyonu ile ilişkilendirilir. Bu durum, bazal proton sızıntısı ve oksijen tüketimi üzerinde de etkilidir (Harper&Seifer, 2008). Hipotiroidi durumunda, mitokondriyal zarlar daha akışkandır çünkü yağ asit bileşimi değişir (Brookes ve ark., 1998). Benzer şekilde, diyabetik kardiyomiyopati ve alkolsüz yağlı karaciğer hastalığı gibi farklı metabolik bozukluklar da mitokondriyal morfoloji ile fonksiyon arasındaki ilişki gözlemlenmiştir (Galloway & Yoon, 2013). Hipotiroidinin mitokondriyal morfolojiyi değiştirdiği ve sıçan serebellar gelişimi sırasında apoptojenik proteinlerin salınmasına yol açtığı da bulunmuştur (Singh ve ark., 2003; Danilovic ve ark., 2016).

Tiroid hormonu, homeotermlerde (örneğin insanlar ve diğer memelilerde) vücut sıcaklığının düzenlenmesinde temel bir rol oynar (Frare ve ark., 2021). Ayrıca, zebrafishler gibi soğukkanlı organizmalarda termal uyum mekanizmalarını etkiler (Little

ve ark., 2013). İnsanlarda, tiroid hormonunun ruh halinin düzenlenmesinde önemli katkıları vardır; örneğin, duygu durum bozuklukları ve enerji seviyeleri üzerinde belirgin etkiler gösterir. Kuşlar ve sürüngenler gibi diğer organizmalarda ise tiroid hormonunun çiftleşme davranışları, üreme başarısı ve yiyecek arama stratejileri üzerindeki rolleri araştırılmıştır (McNabb, 2000; Thambirajah ve ark., 2021).

Ayılarda kış uykusu sırasında tiroid hormonunun aktivitesi düşer, bu da metabolizma hızında bir düşüşe ve enerji tasarrufuna yol açar (Tomasi ve ark., 1998). Ayrıca, tiroid hormonu kardiyovasküler sistem üzerinde de önemli etkilere sahiptir, kalp atış hızını ve kan basıncını düzenler. Genel olarak, tiroid hormonunun biyolojik sistemlerdeki bu çeşitlilik gösteren rolleri, organizmaların sağlık ve uyum yeteneklerini sağlamada önemli bir yer tutar (Thambirajah ve ark., 2021).

Tiroid hormonları, genlerin etkinleştirilmesi yoluyla protein sentezini teşvik eder, sinir sisteminin olgunlaşmasını sağlar ve vücut dokularında hücre solunum oranını artırır. T4 T3'e dönüştükten bu mekanizmalar aracılığıyla bazal metabolik hızı artırır; bu da vücudun dinlenme halindeki kalori harcama hızını belirler (Fox, 2011).

Tiroid hormonları (TH), nükleer ve membran reseptörleri üzerinden metabolik yolları, hücre çoğalmasını ve farklılaşmasını düzenler. Ayrıca, merkezi sinir sistemi aracılığıyla, hipotiroidinin şiddeti, süresi ve doku/hücre tipine bağlı olarak hücre döngüsünü aktive edebilir veya inhibe edebilir ve apoptoz sinyallerini tetikleyebilir (López ve ark., 2013; Holsberger ve ark., 2003; Danilovic ve ark., 2016). TH sinyallemesi metamorfoz süreçlerinde, örneğin amfibilerde, lambri balıklarında ve pisi balıklarında (Gilbert & Frieden, 1981; Manzon & Manzon, 2017; Thambirajah ve ark., 2021), tiroid hormonu metabolik aktiviteleri ve doku dönüşümleri üzerinde doğrudan etkide bulunur. Salmonidlerde deniz suyuna uyum sağlama sürecinde tiroid hormonu önemli bir düzenleyicidir (Holzer & Laudet, 2015).

Kuşlarda tüy dökümü sürecinde, yılanlarda deri değişiminde ve insanlar da dahil olmak üzere memelilerde, doğum sırasında tiroid hormonunun nörolojik gelişim üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Bu hormon, nöronal migrasyon, nörit uzaması, sinaps oluşumu, miyelinizasyon ve gliyal hücre farklılaşması gibi temel beyin gelişim süreçlerini

düzenleyerek sinir sisteminin kompleks yapısının oluşumunu destekler (Thambirajah ve ark., 2021). Bu bağlamda, tiroid hormonu sinyallemesi omurgalıların sinir sistemi gelişiminde hayati bir rol oynarken çeşitli biyolojik süreçleri etkileyerek önemli katkılar sağlamaktadır (Martinez ve Gomes, 2002).

### **2.2.7. Tiroid hastalıkları**

Doğumsal hipotiroidi, neonatal dönemde sık rastlanan bir metabolik bozukluktur. Bu hastalık, TSH reseptörü ile tiroid transkripsiyon faktörlerini içeren çeşitli genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak çeşitli klinik belirtiler gösterebilir. Tedavi edilmediğinde sinir sistemi gelişimini olumsuz etkileyebilir ve üreme sorunlarına yol açabilir. Ayrıca, doğumsal hipotiroidili bebeklerde böbrek ve üriner sistem anomalileri sıkça görülme eğilimindedir (Rao ve ark., 2003; Moore ve ark., 2022).

Tiroglossal kanal ve tiroid anomalilerinde tiroglossal kistler, tiroid bezinin göç yolu boyunca çeşitli noktalarında oluşabilirler. Genellikle boyunun orta hattına yakın bir konumda bulunan bu kistler, tiroglossal kanalın kistik bir kalıntısı olarak tanımlanır. Bu kistlerin yaklaşık olarak yarısı hiyoid kemiğin yakınında veya doğrudan altında yer alırken, dil tabanı veya tiroid kıkırdağı gibi bölgelerde de gözlemlenebilirler (Schoenwolf ve ark., 2021).

Ektopik tiroid bezi, nadir görülen doğumsal anormalliktir ve genellikle tiroglossal kanal boyunca yerleşir. En sık rastlanan ektopik tiroid dokusu lingualtiroid dokusudur; klinik olarak ilişkilendirilme sıklığı tiroid hastalarının 4000'de biridir (Moore ve ark., 2022). Tiroid bezinin veya bir lobunun yokluğu nadir görülen Tiroid bezi agenezisidir. Tiroid hemiagenezisinde (tek taraflı gelişim yetersizliği) sıklıkla sol lob oluşmaz (Moore ve ark., 2022). Tiroid bezinde nodüller oluşabilir. Nodüller genellikle iyi huylu olsalarda, bazı durumlarda kanser riski taşıyabilirler. Nodüller hormon üretimini artırarak hipertiroidizme neden olabilir veya bezin büyümesine yol açarak guatr oluşumunu tetikleyebilir (Haugen ve ark., 2016).

Hipertiroidide en yaygın nedenlerinden biri otoimmün bir hastalık olan graves hastalığıdır. Graves hastalığında, bağışıklık sistemi tiroid bezine saldırır ve fazla hormon üretmesine neden olur. Gözlerde şişlik, öne çıkma ve kaş kaldırma gibi belirtiler gösterebilir (Kratzsch&Pulzer, 2008).

Hipertiroidi, tiroid bezinin aşırı miktarda tiroid hormonu (triiodotironin, T3 ve tiroksin, T4) üretmesi sonucu oluşur. Hipertiroidi, metabolizmanın düzenlenmesinde önemli rol oynayan hormonların fazlalığı nedeniyle vücutta çeşitli sistemlerde anormalliklere yol açar. Genellikle metabolik hızın artmasıyla ilişkilendirilir. Bu belirtiler arasında taşikardi, kilo kaybı, sinirlilik ve huzursuzluk, artan terleme, titreme, kas zayıflığı ve gözlerin dışarı doğru çıkması yer alır. Hipertiroidinin başlıca nedenleri arasında graves hastalığı, toksik nodüler guatr, tiroidit ve aşırı iyot alımı bulunur (Ross ve ark., 2014).

Hashimoto hastalığı, hipotiroidinin en yaygın nedenlerinden biridir. Hashimoto hastalığında bağışıklık sistemi tiroid bezine saldırarak bezin iltihaplanmasına ve hormon üretiminin azalmasıyla ilişkilendirilir (Schoenwolf ve ark., 2021).

### **2.2.8. Hipotiroidi**

Hipotiroidi, tiroid bezinin yeterli miktarda T4 ve T3 hormonları üretememesi durumudur. Bu durumun temel nedenlerinden biri iyot eksikliğidir. İyot, tiroid hormonlarının sentezi için hayati öneme sahiptir (König ve ark., 2011). Ön hipofiz bezinden salgılanan TSH hormonu, tiroid bezini tiroksin üretimi için uyarır ve ayrıca tiroid üzerinde büyümeyi teşvik edici bir etki yapar. Yeterli iyot alınmadığında, tiroid bezinin yeterli miktarda T4 ve T3 hormonları üretememesine neden olur. Bu durum, negatif geri bildirim mekanizmasının bozulmasına ve anormal şekilde yüksek TSH salınımına yol açabilir (Fox, 2011).

Hipotiroidi çeşitli etmenler tarafından tetiklenebilir. Otoimmün bir hastalık olan hashimoto tiroidisi, bağışıklık sisteminin tiroid bezine saldırarak iltihaplanmaya ve tiroid hormonlarının üretiminde azalmaya neden olduğu bir durumdur (Caturegli ve ark., 2014). Ayrıca, tiroid bezinin cerrahi olarak çıkarılması da hormon üretimini azaltabilir (Jonklaas,

2022). Boyun bölgesine uygulanan radyasyon tedavisi ise tiroid bezine zarar vererek hipotiroidiye yol açabilir (Jereczek-Fossa ve ark., 2004). Diğer bir neden ise, hipofiz veya hipotalamus işlev bozukluklarının tiroid bezini uyaran TSH hormonunun üretimini etkileyerek hipotiroidi oluşturabilmesidir (Persani, 2012).

Hipotiroidinin tiroksin eksikliği nedeniyle ortaya çıkan etkileri arasında, vücutta oksijen tüketiminde azalma, enerji üretiminin düşmesi ve metabolik hızın yavaşlaması bulunur. Bu durum, hipotiroidili hastalarında kilo alımı ve halsizlik gibi belirtilere yol açar (Cecconi ve ark., 2004). Ayrıca, yapılan çalışmalar hipotiroidili hastalarda serbest oksijen radikallerinin oranının arttığını göstermektedir (Yehuda- Shnaidman ve ark., 2014). Hipotiroidi, bağırsak hareketlerinin yavaşlaması sonucu kabızlık gibi sindirim problemlerine de neden olabilir (Yaylalı ve ark., 2009).

Fiziksel belirtiler arasında kuru cilt, saç dökülmesi ve kırılğan tırnaklar yer alır. Psikolojik semptomlar arasında ise depresyon, anksiyete ve konsantrasyon güçlüğü sayılabilir. Tiroksin eksikliği, soğuğa karşı hassasiyeti artırdığı gibi (Laurberg ve ark., 2005), strese uyum sağlama yeteneğini de azaltır. Yetişkinlerde şiddetli hipotiroidi, glikozaminoglikanlar ve sıvının deri altı bağ dokularında ve viseralarda birikerek ellerin, ayakların, yüzün ve göz çevresindeki dokunun şişmesine neden olduğu miksödem oluşabilir ve hatta miksödem komasına yol açabilir (Fox, 2011). Tiroksine olan ihtiyaç, beynin en hızlı geliştiği dönem olan prenatal yaşamın ilk üç aylık döneminden doğumdan sonraki altı aya kadar özellikle çok önemlidir. Bu dönemdeki hipotiroidi, kretenizme neden olabilir. Ön hipofizden büyüme hormonunun yetersiz salgılanması nedeniyle cücelik gelişen insanlardan farklı olarak, kretenizm yaşayan kişiler ciddi zihinsel gerilikle karşılaşır (Boas ve ark., 2011; Fox, 2011).

### **2.2.9. Hipotiroid ve ovaryum ilişkisi**

Tiroid hormon reseptörülerinin (TR) insan yumurtalık yüzey epitelinde yer aldığı ve yumurtalık follüküllerinde etkili olduğu, ayrıca bu follüküllerin granüloza hücrelerinde lokalize oldukları belirtilmiştir (Fedail ve ark., 2013). Hipotiroidi, kadın infertilitesi, fallop tüplerinde rahatsızlıklar ve hidrosalpinks ile ilişkilendirilmiştir. Hipotiroidi, yumurtalık ve rahim içindeki lipid ve glikojen içeriğini etkilediği gibi, yumurtalık çevresi

yağ dokularında ve rahim içinde bağışıklık hücrelerinin infiltrasyonunu tetikler (Méndez-Tepepa ve ark., 2020).

Hem hipo hem de hipertiroidizm, hipotalamik-hipofiz ekseninin bozulması ve yumurtalık folliküllerinin gelişimi ve işlevinin engellenmesiyle bağlantılıdır. Hipotiroidili sıçanlarda, primordial, primer, sekonder ve tersiyer folliküller gibi çeşitli follikül evrelerinde azalma eğilimi görülmektedir (Weng ve ark., 2019). Deneysel hayvan çalışmalarında, hipotiroidinin sıçanlarda gonadotropin salgılanmasını ve folliküllerin olgunlaşmasını engellediği gözlemlenmiştir (Hatsuta ve ark., 2004). T3'ün gonadotropik hormonlarla etkileşimi, teka hücrelerinin aşırı androjen üretimini inhibe etmekte ve granüloza hücreleri tarafından östrojen üretimini aromatisasyonu uyarmaktadır (Silva ve ark., 2018). Olgunlaşmamış sıçanlarda geçici hipotiroidi, polikistik over benzeri sendromlara neden olurken, yetişkin sıçanlarda yumurtalık atrofisi, organ ağırlığında azalma ve follikül atrezisi (Meng ve ark., 2017) gibi etkiler göstermektedir. Kadınlarda ise subklinik hipotiroidinin infertilite ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Abalovich ve ark., 2007; Danilovic ve ark., 2016).

Hipotiroidinin erken yaşlarda büyüme geriliği ile ilişkilendirildiği tespit edilmiştir. Önceki araştırmalar, tiroid hormonlarının büyüme ve gelişimi teşvik ettiğini öne sürmektedir; bu teşvik, büyüme faktörlerinin salınımını uyararak veya hedef dokulardaki büyüme faktörü reseptörlerinin seviyelerini değiştirerek gerçekleşebilir (Kung ve ark., 1992). 1997 yılında TR mRNA'sının çeşitli izoformlarının insan oositlerinde eksprese edildiği tanımlanmıştır (Rosales ve ark., 2020). TH'ler, hipotalamik-hipofiz-gonadal ekseninde düzensizliklere neden olarak ve seks hormonu bağlayıcı proteinlerin seviyelerini düşürerek, yumurtalıklar üzerinde dolaylı bir etki gösterebilir (Canipari ve ark., 2018). TH'lerin sıçan yumurtalıklarında büyüme hormonu mRNA ekspresyonunu baskıladığı, postnatal yaşamda ve yetişkinlikte büyüme hızını ve kemik mineral yoğunluğunu azalttığı gösterilmiştir (Fedail ve ark., 2013). Granüloza hücrelerinin hayatta kalması ve folliküler büyümenin gonadotropinler tarafından düzenlenmesi, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) / Akt yolunun aktivasyonuna bağlıdır. FSH ve T3'ün sekonder folliküler büyüme üzerindeki etkileşimi, aktive edilmiş PI3K/Akt yolu aracılığıyla gerçekleşir (Weng ve ark., 2019). T3, Akt'yi PI3K'ya bağımlı bir şekilde aktive eder (Canipari ve ark., 2018). TH'ler ayrıca, preovulatar folliküllerin ve fare kümülüs ooforus hücrelerinin olgunlaşmasında ERK1/2 sinyal yolunu da kullanır (Silva ve ark., 2018).



Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, tiroid hormonlarının biyosentezinde rol oynayan tiroid peroksidaz enzimine granüloza hücrelerinde ilk kez rastlanması, ovaryum follikülünün bağımsız bir tiroid hormonu üreten birim olduğunu desteklemektedir (Monteleone ve ark., 2017). Ayrıca ovaryumlarda oositlerin, granüloza hücrelerinin ve epitelyumun tiroid hormonu reseptörlerini ifade ettiği gösterilmiştir (Kobayashi ve ark., 2009). Tiroid bezinde iyot konsantrasyonu diğer organlardan daha yüksek olsada, yumurtalıklarda da iyot alımı ve birikimi tanımlanmıştır (Rosales ve ark., 2020). Bu bulgu, tiroid hormonlarının yumurtalık fonksiyonu üzerinde doğrudan bir etkisi olabileceğini göstermektedir (Kobayashi ve ark., 2009).

TSH, granüloza hücrelerinin proliferasyonunu teşvik etmede FSH ile sinerjik bir etkiye sahiptir. Ayrıca, tiroid hormonlarının folliküllerde FSH uyarımını düzenlediği ve apoptozu önlediği gösterilmiştir. Follikülogenez sürecinde, tiroid hormonları serum östrojen düzeyleri arttıkça TBG ile bağlanır. Bu olayların sonucunda serbest tiroksin azalır ve TSH düzeyleri artar (Kabodmehri ve ark., 2021).

Tiroid hormonu folliküler sıvıda bulunur ve follikül gelişiminde önemli bir rol oynar; bu sürecin düzensizleşmesi follikül gelişimini etkileyebilir (Kabodmehri ve ark., 2021). Tiroid fonksiyon bozukluğunun en sık görülen belirtileri arasında adet düzensizlikleri, gonadotropin salınımındaki değişiklikler ve üreme yeteneğinin azalması yer alır. Bu etkiler, yumurtalık üzerinde doğrudan etkili olan alfa ve beta T3 reseptörlerinin farklı izoformlarının somatik (stromal, granüloza ve kümülüs hücreleri) ve germ hücrelerindeki transkriptlerinin belirlenmesiyle açıklanabilir (Cecconi ve ark., 2004). Yetişkin sıçanlarda, hipotiroidi doğrudan infertiliteye yol açmaz, ancak gebeliğin ilk yarısında embriyonik yeniden emilimi artırır. Bu, daha küçük yavrulara ve fetal mortalitenin artmasını teşvik eder. Hipotiroidi doğurganlığı azaltmakla birlikte östrus döngüsü düzensizliklerine ve proöstrus ve östrus sırasında aşırı prolaktin salgılanmasının bir sonucu olduğu düşünülen spontan ardışık yalancı gebeliklerde yol açar (Hapon ve ark., 2010).

### 2.3. Epidermal Büyüme Faktörü (EGF)

EGF, 53 aminoasit kalıntısından oluşan bir polipeptittir ve ilk olarak 1962'de Stanle Cohen tarafından, yeni doğmuş erkek farelerde diş çıkmasını ve göz kapağı açılmasını hızlandıran bir madde olarak submandibular bezlerinin özütlerinden izole edilmiştir (Savage ve ark., 1972; Mitsudomi & Yatabe, 2010; Fisher & Lakshmanan, 1990). Sialoadenektomi sonrası plazma EGF düzeyi hızla azalmakta ve 3 hafta içinde tespit edilemez hale gelmektedir, bu da submandibular bezin dolaşımdaki EGF için ana kaynak olduğunu göstermektedir (Ketani ve ark., 2004).

Fare EGF'si, 1217 aminoasitlik bir öncül protein içinden türetilir ve bunun içinde 7 diğer EGF benzeri amino asit dizisi bulunmaktadır; insan EGF'si ise 1207 amino asitlik bir öncül protein içinden tasarlanır. EGF ailesi proteinleri, hücre yüzeyinde EGF reseptörü ile etkileşir. Bu yaklaşık 170.000 moleküler ağırlığa sahip transmembran glikoprotein olan EGFR, EGF ile etkileşir. EGF reseptörleri, hematopoetik hücreler dışında neredeyse tüm hücre tiplerinde bulunur; beyin, tiroid, akciğer, karaciğer, deri, plasenta ve fetal zarlar gibi dokularda reseptörlerin yoğun olduğu bilinmektedir (Fisher & Lakshmanan, 1990).

EGFR, hücre membranında bulunan ve içsel protein tirozin kinaz aktivitesine sahip olan bir reseptördür (Lopez-Gines ve ark., 2010). EGFR, Her-1 olarak da bilinir ve erbB ailesinin bir üyesidir. Diğer üyeleri ise Her- 2, Her-3 ve Her-4'tür. Bu aileye ait reseptörler, ekstraselüler ligand bağlayıcı bölge, transmembran bölge ve içsel protein-tirozin kinaz aktivitesi içeren bir intrasellüler domain'e sahiptir (Leibl ve ark., 2006). EGFR, 7. kromozomun kısa kolunda q22'de yer alır ve 110 kb DNA'yı 28 eksone bölünmüştür. Normal hücrelerde, EGFR'nin ifadesi hücre başına tahmini olarak 40.000 ila 100.000 reseptör arasında olduğu düşünülmektedir (Wee & Wang, 2017).

EGFR'nin biyokimyasal, yapısal ve genetik çalışmaları, genellikle ligand uyarısına yanıt olarak gerçekleşen reseptör trans-fosforilasyonunun moleküler mekanizmalarını ortaya koymuştur. Bu süreç, hücre yüzeyinden nükleusa bilgi taşıyan bir dizi sinyal yolunun aktive edilmesiyle gerçekleşir. Sonuç olarak, hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve farklılaşmadan sorumlu genler aktive edilir (Lemmon & Schlessinger, 2010; Sigismund ve ark., 2018). EGF ve pro-EGF mRNA'ları çoğu yetişkin kemirgen

dokusunda tespit edilmiş, ancak en yüksek mRNA seviyeleri tükürük bezlerinde ve böbreklerde tespit edilmiştir (Fisher & Lakshmanan, 1990).

EGF, birçok ekto ve mezodermal hücre ve doku tipi için güçlü mitojendir; bunlar arasında deri keratinositleri, konjonktival ve faringeal dokular, korneal endotelial hücreler, vasküler düz kas hücreleri, kondrositler, fibroblastlar, karaciğer hücreleri, tiroid folliküler hücreler, granüloza hücreler, meme bezleri ve plazmada nanogram miktarlarda bulunmaktadır. EGF'nin in vitro olarak GH, PRL, estradiol, testosteron ve kortizol sentezini değiştirebildiği ve in vivo olarak da kortizol, adrenokortikotropik hormon, T4, GH, PRL ve plasental laktojen salgısını etkileyebildiği bildirilmiştir (Fisher & Lakshmanan, 1990; Corcoran ve ark., 1986).

EGF, çeşitli hücre türlerinin büyümesi ve farklılaşması üzerinde birçok etkiye sahiptir. Hayvanlarda EGF üzerine yapılan ilk çalışmalar, epidermal proliferasyonu ve keratinizasyonu uyardığını ve apoptoza da engel olduğunu göstermiştir. Bu nedenle EGFR, genellikle bir proto-onkogen olarak da lanse edilmektedir (Wee & Wang, 2017). Folliküler granüloza, teka hücreleri ve korpus luteumda bulunan EGF, bu hücrelerde sentezlenen bir ligand olarak, hücre proliferasyonunu etkiler (Moreno-Cuevas ve ark., 1997). EGF, mide asidi salgısını engeller (Bower ve ark., 1975; Kasayama ve ark., 1989). EGF, laktasyon döneminde meme bezinde ve prostat bezinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Ayrıca tükürük, pankreas ve duodenal sıvı, safra, idrar, prostat ve seminal vezikül sıvıları ile farelerde ve insanlarda sütte de salgılanır (Wee & Wang, 2017). EGF, damak ve deri farklılaşması, saç follikülü büyümesi, göz açılması ve diş çıkarma gibi gelişimsel süreçlerle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca EGF, beyin, üreme yolları, cilt, gastrointestinal sistem gibi yapıların gelişiminde önemli rol oynar. Kardiyovasküler sistemin farklılaşması ve işlevi, epitelyal rejenerasyon (doku yenilenmesi) süreçleri ve korneal epitelde de EGF'nin etkileri bulunmaktadır (Wee & Wang, 2017).

EGF, fetal sıçanlar, kuzular ve tavşanlarda akciğer olgunlaşmasını teşvik ederken, organ kültürlerinde palatal gelişimi, gastrointestinal sistem, karaciğer ve pankreas olgunlaşması üzerinde de etkilidir. Ayrıca EGF, tiroid ve adrenal bezlerin büyümesini destekler, yara iyileşmesini hızlandırır ve meme bezi gelişimini uyarır (Wee & Wang, 2017). EGF'nin metabolizma ve rolüne dair bilgilerin büyük çoğunluğu

farelerden elde edilmiştir. Bu EGF etkilerinin muhtemelen oto-parakrin ve endokrin yollar aracılığıyla gerçekleştiği düşünülmektedir (Fisher & Lakshmanan, 1990; Ketani ve ark., 2004).

EGF, in vivo olarak ektodermal ve endodermal hücre büyümesini uyarır ve in vitro olarak epitelyal hücre ve fibroblast büyümesini uyarıcı mitojenik bir polipeptid hormondur (Ketani ve ark., 2004). Mitojenik etkisinin yanı sıra, EGF'nin hücre farklılaşması üzerinde de etkileri bulunmaktadır ve bu etkinin, ligand tarafından indüklenen cAMP üretimi ve cAMP etkisi yoluyla olabileceğine düşünülmektedir (Fisher & Lakshmanan, 1990). Ayrıca, EGF, in vitro olarak folliküler progesteron sentezini artırır. Progesteron sentezi, folliküler hücrelerin farklılaşma işlevini belirlediği için, EGF'nin hem folliküler hücrelerin çoğalmasını hem de farklılaşmasını etkilediği görülmektedir (Garnett ve ark., 2002).

### **2.3.1. EGF reseptör sinyal yolları**

EGF'nin reseptöre bağlanması, reseptörlerin oligomerik bir konfigürasyonunu stabilize ettiği, tirozin kinaz aktivitesini aktive ettiği ve reseptör otofosforilasyonunu indüklediği düşünülmektedir. Büyüme faktörleri tarafından başlatılan sinyaller, dinlenme halindeki hücreleri hücre bölünmesinin ilk boşluk fazı (G1) aşamasına ilerletir, G1 fazını geçer ve ardından DNA sentezine veya S fazına geçerler (Fisher & Lakshmanan, 1990).

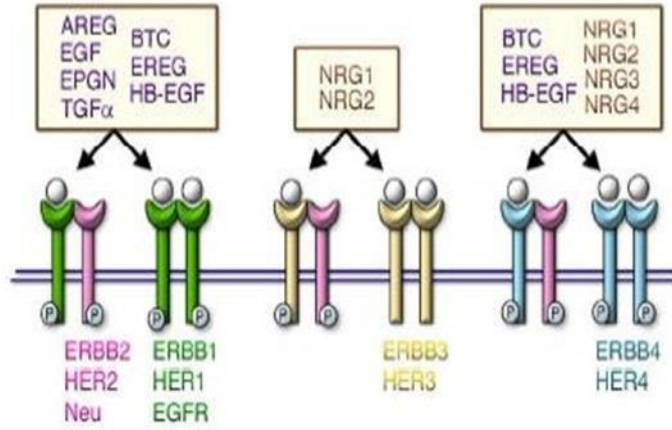
Hücreler, DNA sentezine ve G1 fazı geçişine karar vermeden önce EGF'ye en az 6-8 saat maruz kalmaları gerekmektedir. EGF/ErbB ailesi reseptörlerinin, epitel dokuların, özellikle de over yüzey epitelyumunun, normal gelişimi ve hücre büyümesinde (Abdollahi ve ark., 2003), hücre hayatta kalma, proliferasyon, yapışma, invazyon, hareketlilik ve anjiyogenezde önemli fizyolojik roller oynadığı bildirilmiştir (Wu ve ark., 2019).

EGFR'nin aktivasyonu, ligand bağlanmasıyla tetiklenir ve bu, hücrel proliferatif ve sağ kalım sinyal yollarının sıkı bir şekilde düzenlenmiş uyarılmasına yol açar; en dikkate değer olanları RAS/RAF/MEK/MAPK ve PI3K/Akt yollarıdır (Lopez-Gines ve ark., 2010).

EGF ailesi, 11 protein ve doğrudan bağlayıcı altı ligand üyeden oluşur. Bu üyeler arasında EGF, heparin bağlayıcı EGF-benzeri büyüme faktörü (HB-EGF), dönüştürücü büyüme faktörü- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), epigen (EPGN), neuregulinler 1-4 (NRG1-4), amfiregulin (AREG), epiregulin (EREG) ve betasellülin (BTC) bulunur. Bu EGF benzeri büyüme faktörleri, mitojenik aktiviteleriyle tanımlanmış ve özellikleri belirlenmiştir. Bu proteinler, yapısal ve işlevsel olarak birbirine oldukça benzeyen ligandlardır ve yapılan çalışmalar EGF'nin folliküler gelişim sırasında granüloza hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını kontrol etmede merkezi bir rol oynadığını göstermektedir (Conti ve ark., 2006; Garnett ve ark., 2002; Brandt ve ark., 2006; Richani & Gilchrist 2018).

ErbB ailesi, dört üyeden oluşan bir transmembran reseptör tirozin kinaz grubudur (Richani & Gilchrist 2018). EGF reseptörü (EGFR; erbB-1), erbB-2 (Her2), erbB-3 ve erbB-4. Reseptör tirozin kinazları (RTK'ler), hücre dışı ligand bağlanma alanı, transmembran alanı ve hücre içi tirozin kinaz alanı içeren yapıları bulunur ve hücrel sinyal iletimini, hücre dışı ligand bağlanması yoluyla sağlar (Wang & Hung, 2012).

Hücre yüzeyindeki EGFR, erbB-3 ve erbB-4, bir ekstrasellüler ligand bağlanma alanı, tek bir transmembran alan ve EGFR, erbB-2 ve erbB-4 için bir intrasellüler tirozin kinaz alanı içerir. Ligand bağlanmasıyla, EGFR ailesi proteinleri reseptör homo-dimerizasyonu veya hetero-dimerizasyonu ile dimerize olur ve ardından tirozin kinaz aktivitesi aktive olur. Aktive olan EGFR ailesi reseptörleri, fosfatidilinositol-3 kinaz (PI3K), MAPK, sinyal transdüser ve aktivatörü (STAT), fosfolipaz C gibi birçok sinyal yolunu tetikler. Bu sinyal aktiviteleri, proliferasyon, hareketlilik ve farklılaşma gibi birçok farklı hücre tipinde düzenlenir (Brandt ve ark., 2006).



**Şekil 2. 8.** Çözünür ERBB ligandları, endokrin yoluyla reseptörlerine (EGFR gibi) bağlanabilir ve onları aktive edebilir (Cheng ve ark., 2021).

### 2.3.2. EGFR ligand regülasyonları

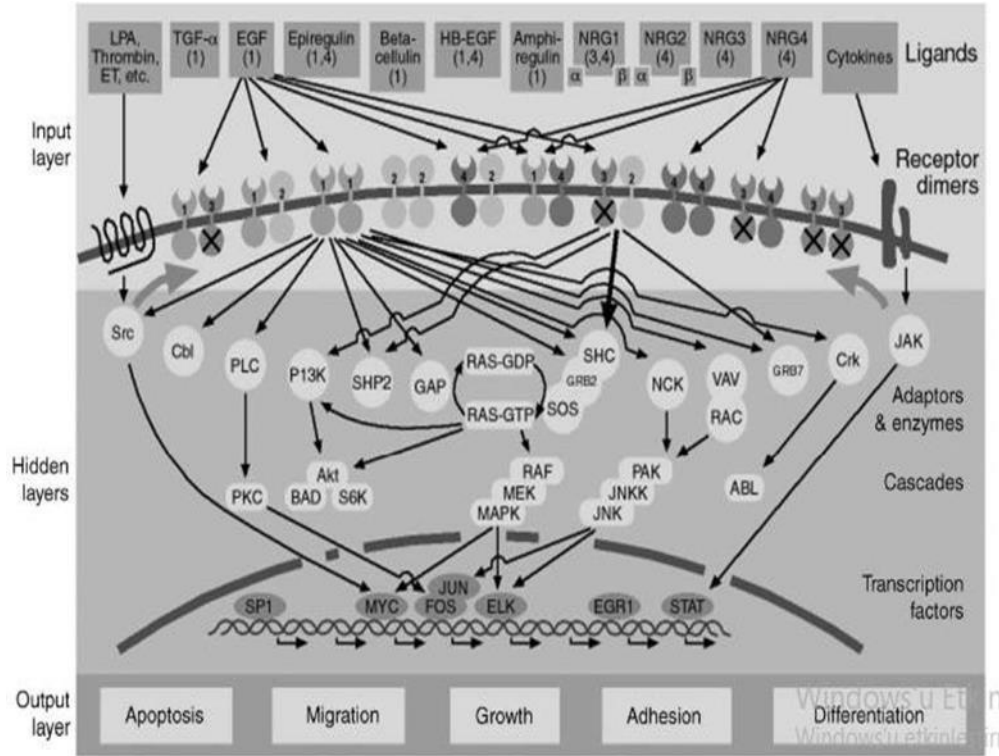
EGFR gen ekspresyonunu genetik, epigenetik ve hücresel düzeyde birçok faktör etkiler. Bu faktörlerin bir veya birkaçının kombinasyonu, normal düzenlemeyi bozabilir veya hastalıklara yol açabilir. EGF ailesi sinyal yollarındaki değişiklikler, insan kanserlerinde yaygın görülen genetik anormalliklerdir (Abdollahi ve ark., 2003). EGFR gen amplifikasyonları EGF reseptörünün aşırı üretilmesine yol açar. Amplifikasyonlar, gen ekspresyonunu artırarak EGFR sinyalizasyonunun sürekli aktif olmasına ve hücre büyümesinin artmasına neden olur (Sigismund ve ark., 2018). EGFR, ovaryum kansinomları, meme, mesane ve glioblastomalarda, amplifiye edilmiş kanser türlerinde sıkça mutasyona uğrar veya aşırı eksprese edilir (Abdollahi ve ark., 2003; Sigismund ve ark., 2018).

EGFR geninin kromozomal bölgesindeki delesyonlar veya translokasyonlar, genin normal regülasyonunu bozarak veya promotor bölgesini değiştirerek artmış ekspresyona neden olabilir (Ekstrand ve ark., 1992). Özellikle EGFR'nin ekzon 19 ve ekzon 21 bölgelerinde sıkça gözlemlenen nokta mutasyonları veya in-framedelesyonlar, reseptörün ligand bağlanma bölgesini değiştirir ve sürekli aktivasyona yol açar (Pao ve ark., 2004; Wee & Wang, 2017). EGFR, normal koşullarda bir ligand tarafından bağlandığında dimer oluşturarak aktive olur. Bu süreç, hücre içi sinyalizasyon yollarını etkinleştirir. Ancak bazı mutasyonlar veya kısaltmalar, EGFR'nin bu dimerizasyonu bağımsız olarak gerçekleştirmesine ve dolayısıyla sürekli olarak aktif halde olmasına

neden olabilir. Bu durum, hücre içi sinyalizasyon yollarının sürekli olarak uyarılmasına yol açabilir ve reseptörün endositozla down regülasyondan kaçmasına izin verebilir (Hynes & Lane, 2005). EGFR ligandları reseptöre bağlandığında, reseptör aktivasyonu ve intraselüler sinyalizasyon yolları etkinleşir. Bu süreç, EGFR gen ekspresyonunu dolaylı olarak düzenleyebilir; çünkü aktive olan EGFR sinyalizasyonu hücre içi transkripsiyon faktörlerini etkileyebilir ve böylece EGFR geninin transkripsiyonunu artırabilir veya azaltabilir (Brandt ve ark., 2006).

EGFR geninin transkripsiyonu, epigenetik modifikasyonlar tarafından da düzenlenir. Örneğin, DNA metilasyonu EGFR promotör bölgesinde arttığında, genin transkripsiyonel aktivitesi baskılanabilir ve bu da EGFR ekspresyonunun azalmasına veya kaybına yol açabilir (Alvarado ve ark., 2015). Tümörlerde, EGFR aşırı ifadesi, Ras/mitejenle aktive olan protein kinaz (MAPK), Src kinaz, Janus kinaz sinyal dönüştürücüve transkripsiyon aktivatörü (JAK/STAT) ve PI3K-Akt yolları gibi hücre proliferasyonu, hayatta kalma ve invazyonu indükleyen birçok sinyal yolunu aktive eder (Richani&Gilchrist 2018). Ras-MAPK veya PI3K-Akt yolları, EGFR sinyalizasyonunun aktive olmasını ve bu yolla EGFR geninin transkripsiyonunu düzenlemesini sağlayabilir. Bu genetik değişiklikler, EGFR reseptörünün aktivasyonunu artırarak hücre büyümesini ve proliferasyonu teşvik eder (Mitsudomi & Yatabe, 2010). Ayrıca EGFR'nin nükleusa transloke olması, hücre döngüsü ilerlemesini destekleyen genlerin transkripsiyonunu artırır (Wee & Wang, 2017).

EGFR'nin hücreSEL işlevleri ve diğer önemli sinyalleşme yollarıyla olan etkileşimi, gelişim ve doku yeniden şekillenmesi sırasında sıkı bir şekilde düzenlenmelidir. Reseptörün aşırı veya yetersiz ekspresyonu, otokrin ligand uyarımı veya sürekli aktif reseptör mutantları, bu hassas sinyalleşme sisteminin bozulmasına ve çeşitli yumurtalık patofizyolojilerine, ayrıca follikülogenezde başarısızlığa yol açabilir (Garnet ve ark., 2002).



Şekil 2. 9. EGFR sinyal ağı (Yarden, 2001).

### 2.3.3. EGFR ovaryum ilişkisi

EGFR/ErbB reseptör ailesinin düzenlenmemesi, epitelyal over kanserinin ilerlemesini teşvik eder. EGF yanıt veren yolak birçok hücre türünün büyüme ve proliferasyonunda dahil olmak üzere over epitel hücrelerinde kritik bir rol oynamaktadır (Abdollahi ve ark., 2003). EGFR aile genleri omurgalıların normal embriyogenezinde kritiktir (Wee & Wang, 2017) ve oosit olgunlaşmasını düzenler (Jamnongjit ve ark., 2005). Farelerde herhangi bir ErbB geninin null mutasyonları embriyonik veya perinatal ölüme sebep olabilir (Wee & Wang, 2017).

GnRH, hipotalamus-hipofiz-over eksenini tarafından düzenlenen üreme hormonlarının salgınmasına aracılık eder (Sun ve ark., 2018). Gonadotropin indüklenmiş oosit olgunlaşmasında, EGFR aktivasyonu kritik bir rol alır. EGFR, LH'nin tetiklediği EGF moleküllerinin kümüls hücrelerinden salgılanmasıyla aktive olur. Bu aktivasyon, oositlerin profaz I'den metafaz II'ye hücre bölünmesi sürecindeki ilerlemesini sağlar. Oositlerdeki EGFR sinyalleme, hücre bölünmesi ilerlemesi için gerekli olan ikincil habercilerin mobilizasyonunu destekler (Gilchrist ve ark., 2004). EGF ağı, oosit



olgunlaşması sırasında kümulus hücrelerinden gelen sinyallerle mRNA translasyonunu düzenler. Ayrıca, FSH'nin oosit translasyonunu düzenlemesi EGFR aracılığıyla gerçekleşir. EGF ağı ayrıca oosit içinde PI3K-Akt-mTOR sinyalizasyonu ile maternal mRNA translasyonunu kontrol eder (Richani&Gilchrist 2018; Jamnongjit ve ark., 2005).

ERK1/2 (MAPK3/1), peri-ovulatuvar follükülde ovulasyon uyarısında temel bir rol oynar. Farede, EGFR, ErbB2 ve ErbB3 hormon öncesi ve sonrası yumurtalıkta sürekli olarak ifade edilir ve granüloza ve kümulus hücrelerinde yerleşim gösterir (Wu ve ark., 2019). EGFR ve ERK1/2 bağımlı gen transkripsiyon aktivasyonu sonucunda kümülüs ve granüloza hücrelerinde EGF benzeri peptid üretimini artırır. Bu sinyal yolunun aktive edilmesi ve follükül boyunca EGF ağının sürdürülmesi, kümulus genişlemesi, ovulasyon ve granüloza hücrelerinin lüteinizasyonunu düzenlemek için önemlidir (Downs&Chen, 2008; Franciosi ve ark., 2016).

EGF benzeri peptidlerin EGFR aktivasyonu, MAPK, PI3K ve Janus kinaz/sinyal transdüktörleri ve transkripsiyon aktivatörleri (JAK/STAT) gibi çeşitli sinyal yollarını teşvik eder. EGFR-ERK1/2 aktivitesi, ovulasyonla ilgili olayların düzenlenmesi açısından hayati önem taşır (Rawlings ve ark., 2004; Richani&Gilchrist 2018).

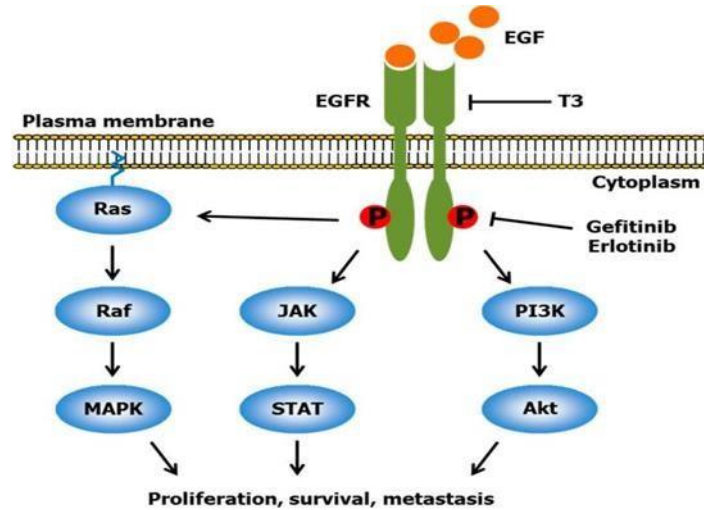
#### **2.4. Hipotiroid ve EGFR İlişkisi**

Tiroid hormonunun, özellikle transforman büyüme faktörü-alfa (TGF- $\alpha$ ) ve EGF reseptörü gibi EGF ailesinin üyelerinin ifadesini somatik dokularda ve meme karsinomu hücre kültürlerinde düzenlediği belirtilmiştir. Araştırmalar, tiroid hormonunun beyin homojenatlarında EGF mRNA ifadesini ve reseptör bağlanma aktivitesini modüle ettiğini göstermiştir (Carrocco ve ark., 2003).

Tiroid hormonu, insan hücrelerinde birçok sitokin ve büyüme faktörünün sinyallerini değiştirir. Bu etki, hücre yüzeyinde bulunan iodothironinlere bağlı G proteini reseptörleri ve MAPK sinyal yolunun aktivasyonu aracılığıyla gerçekleşir. Özellikle, T4 hormonu MAPK yolunu aktive ederek ERKs 1 ve 2 adlı kinazların çekirdeğe taşınmasını sağlar ve bunun sonucunda hızlı gen ekspresyonuna yol açar. Bu etkiler, fizyolojik T4

konsantrasyonlarında veya yüksek T3 düzeylerinde gözlemlenir. T4, EGF'nin MAPK aktivasyonu ve protoonkogen ekspresyonu üzerindeki etkilerini artırır. TGF $\alpha$ 'nın da plazma membran EGFR'yi kullandığı düşünüldüğünde, tiroid hormonunun TGF $\alpha$  sinyal iletimini potansiyelize edebileceği ileri sürülmüştür (Shih ve ark., 2004).

Mekanizma çalışmaları, T4'ün TGF $\alpha$  sinyalini MAPK aktivasyonuna yol açacak şekilde artırdığını, ancak TGF $\alpha$  tarafından indüklenen c-fos ekspresyonunu inhibe ettiğini göstermektedir. Bu, tiroid hormonunun TGF $\alpha$  tarafından indüklenen hızlı-erken gen ekspresyonu üzerindeki etkisinin, T4'ün cAMP bağımlı protein kinaz aktivitesi ile ilişkili olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca, T4'ün hücre yüzeyindeki G protein-duyarlı reseptör aracılığıyla MAPK yolunu aktive ettiği ve MAPK kaskadını uyarmasının, protein kinaz C ve Raf-1'in aktivasyonunu gerektirdiği gösterilmiştir. (Shih ve ark., 2004). Örneğin, in vitro deneylerde tiroid hormonunun bulunması, tümör hücrelerinde EGFR'nin iki doğal ligandı olan EGF ve TGF- $\beta$  arasında ayırım yapma seçeneği sunar. HeLa hücre çalışmalarında, tiroid hormonu eksikliğinde TGF- $\beta$  ve EGF bağlanmasının reseptördeki downstream sonuçları aynı iken, fizyolojik düzeylerde tiroid hormonu mevcut olduğunda bu sonuçlar farklılık gösterir, özellikle de c-fos ekspresyonunda. Bu farklılık, tiroid hormonunun tümör hücrelerindeki proliferatif etkisi ile ilgili olabilir (Cheng ve ark., 2010).



**Şekil 2. 10.** EGF reseptörü (EGFR) ve onun aşağı akış sinyal proteinleri (Eitsuka ve ark., 2016).

Tüm vücudun EGFR kaynağı olan submandibular EGF konsantrasyonu, androjenler, tiroid hormonları (Byyny ve ark., 1972), progestinler (Bullock ve ark., 1975) ve östrojen gibi hormonlar tarafından etkilenir. Fare tükürük bezlerinde EGF ve EGF pro-mRNA konsantrasyonlarının hem tiroid hormonları hem de testosteron tarafından ayrı ama potansiyel mekanizmalarla uyarıldığı bilinmektedir (Fisher & Lakshmanan, 1990). Tiroid hormon seviyelerindeki değişiklikler fare plazmasında ve böbrekte de EGF seviyelerini değiştirdiği bildirilmiştir (Ozawa ve ark., 1991). Tiroid hormonu, fare karaciğerinde, ciltte ve meme bez dokusunda EGF reseptörü düzeylerini artırmış ve karaciğerde EGF reseptörü mRNA seviyelerini yükseltmiştir (Fisher&Lakshmanan, 1990).

Doğuştan hipotiroid farelerde veya hipotiroid ile indüklenen farelerde EGF'nin belirgin şekilde azaldığı ve fizyolojik dozda tiroid hormonu uygulamasının EGF seviyesini geri getirdiği gösterilmiştir. Tiroid hormonunun EGF içeriğini artırması, EGF mRNA birikiminde de artışla birlikte olduğu görünmektedir (Fujieda ve ark., 1993).

Tiroid hormonlarının büyümeyi teşvik eden ve gelişimsel etkileri, örneğin, diş çıkışı ve göz kapağı açılması, EGF tarafından da uyarılır, bu da bu hormonlar arasında bir etkileşim olduğunu önermektedir (Mukku, 1984). Fare submandibuler bezinde, tiroid hormonları indüklemesi hücre farklılaşmasını hızlandırır ve submaksiller bez ve deri içeriğinde EGF seviyesinin yükselmesine ve idrarda EGF atılımının artmasına sebep olur (Corcoran ve ark., 1986). Farelerde normal postnatal gelişim şu sıralamayla gerçekleşir: diş çıkışı, göz kapağının açılması ve SMG'de EGF konsantrasyonunda artışın başlaması. Her olayın görünme zamanı değişebilir ancak ontogenetik sıra sabittir. Ayrıca, tiroid hormonu tedavisi ile kontrol grubuna göre bu üç olayın hepsi hızlandırılabilir, bu da ortak bir gelişimsel mekanizmanın varlığını göstermektedir (Hoath ve ark., 1983).

EGF doğrudan hipotalamo-hipofizer ve plasental hormon üretimi ve eylemleri üzerinden endokrin sistemlerle etkileşime girer ve adrenal, gonadal ve tiroid hormon salgılamalarını modüle eder (Fisher & Lakshmanan, 1990). EGF'nin yetişkin veya fetal koyunlara veya yetişkin maymunlara infüze edildiğinde hipofizer adrenal kortikal hormon ve salgılamayı uyardığı gösterilmiştir (Fisher & Lakshmanan, 1990). EGF'nin tiroid hücre büyümesinin düzenlenmesinde rol oynayabileceğine dair artan kanıtlar, EGF'nin tiroid dokusunda tritium işaretli timidin alımını uyardığını göstermiştir (Roger

& Dumont, 1982; Humphries ve ark., 1984). EGF'nin tiroid follikül hücrelerinde iyot alımı ve organogenezini büyük derecede inhibe eden ve morfolojik yeniden programlanmasıyla ilişkili güçlü bir in vitro etkisinin olduğu rapor edilmiştir (Corcoran ve ark., 1986). Tiroid bezinde, EGF sürekli olarak tiroid fonksiyonunu inhibe ederken in vitro koyun, köpek, domuz, buzağı ve insan kültürlü hücrelerde ve in vivo olarak tiroid büyümesini uyarabilir. EGF, adrenal, gonad, tiroid, plasenta ve çeşitli hipotalamik ve hipofiz kaynaklarından hormon üretimini modüle ederek çeşitli endokrin sistemlerin fonksiyonlarını etkiler (Ozawa ve ark., 1991).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 3.1. Hipotiroid Oluşturulması ve Deney Prosedürü

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleti Etik Kurulu tarafından PAUHADYEK-2023/08 numarasıyla onaylanmıştır (Ek 1). Çalışmamızda Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 9-10 haftalık 18 adet Wistar cinsi erişkin dişi sıçan kullanılmıştır. Deney protokolü süresince; sıçanlar  $21 \pm 1$  °C oda sıcaklığında, rutubeti uygun değerlerde tutulan, 12 saat ışık ve karanlık çevrimi olan sessiz bir odada, ayrı kafeslerde tutuldu. Hipotiroidi gruplarına, günlük düzenli olarak standart sıçan yemi olan pelet yem verilerek ad libitum olarak beslendi. Sıçan ağırlıkları (210-270 gr) ölçüldükten sonra rastgele 2 gruba ayrılarak işaretlendi.

1. *Grup (n:8) Kontrol Grubu (K):* Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir işlem yapılmadı,
2. *Grup (n:10) Hipotiroidi Grubu:* Bu gruptaki sıçanlara içme suyuna % 0.02 (10 mg/kg) metimazol eklenerek 30 gün boyunca sıçanların metimazol alması sağlandı.

Çalışmamızda, sıçanlara vajinal smear testi yapıldıktan 17-19 saat sonra anestezi uygulandı. Hipotalamo-hipofizer-ovaryan eksenindeki hormonal bozukluklar, östrus döngüsünün düzgün bir şekilde ilerlemesini engelleyebilir ve diöstrus evresinde uzun süre kalmasına yol açabilir. Bu bozukluklar, özellikle tiroid hormonlarının eksikliği nedeniyle gelişen hipotiroidide yaygındır. Metimazol verilen grubumuzda östrus siklusunun diöstrus evresinde beklediği tespit edildi. Bu nedenle kontrol grubumuzda yer alan sıçanlarımızın da sakrifiye öncesi diöstrus evresinde olmasına dikkat edildi. Sıçanlara anestezi işlemi, 50 mg/kg ketamin ve 5-10 mg/kg ksilazinhidroklorid ile intraperitoneal olarak uygulandı.

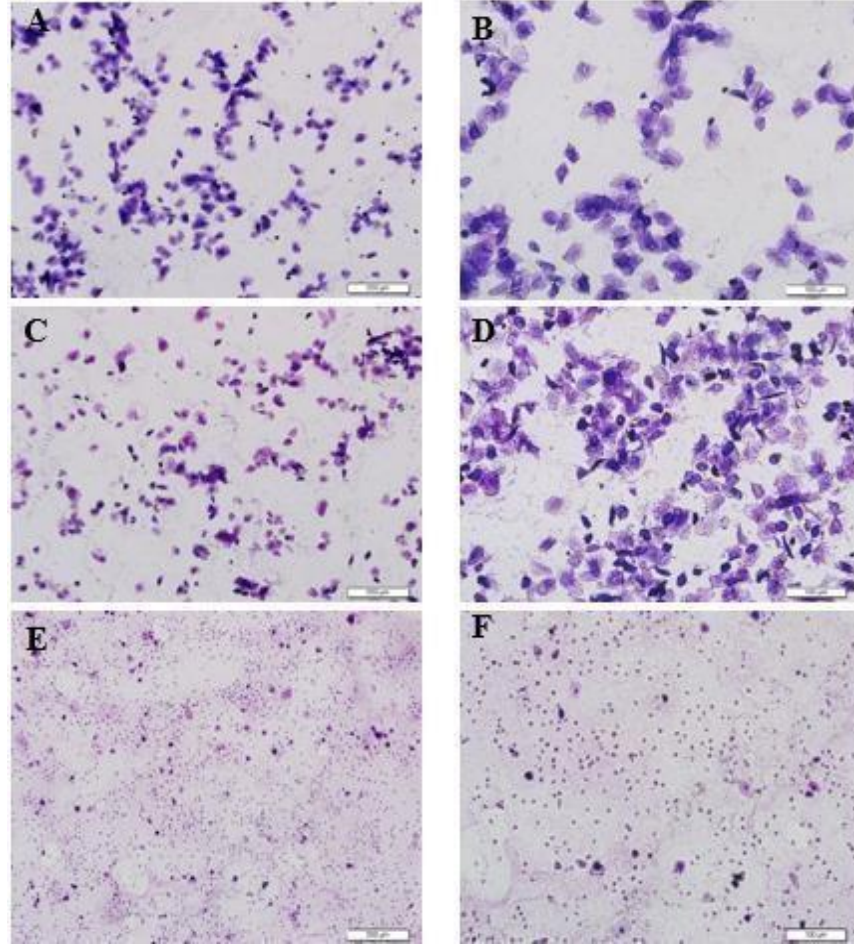
Genel anestezi altındaki sıçanlardan, kan örnekleri alınıp biyokimya yöntemiyle östrojen, TSH, FSH, T3 ve T4 değerlerine bakıldı. Sıçanların her iki over dokusu alındı. Sağ over dokusu histopatolojik inceleme için ayrılırken, sol over dokusu Gerçek Zamanlı Pzr (GZ-PZR) analizleri için trizole konup -80°'e kaldırıldı. Alınan sağ over dokuları %10 formaldehitte tespit edildi. Rutin doku takibi yöntemleri uygulandı ve kesitler alınarak histokimyasal ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için hazırlandı. Sol ovaryum dokularıda GZ-PZR analizi için total RNA ekstraksiyonu yapmak üzere trizole alındı.

### 3.2. Vajinal Smear

Deney prosedürü oluşturulduktan 13 gün sonra 18 sıçan için iki hafta boyunca her gün saat 09.00'da vajinal smear yapıldı ve östrus siklusları gözlemlendi. Vajinal yaymada her sıçan için serum fizyolojik, steril pastör pipeti ve lam kullanıldı. Vajinal yayma örneklerini alırken sıçanlar kuyruk ve kuyruk dibinden tespit edildi ve kaldırılarak kafası aşağıya gelecek ters bir biçimde tutuldu (Cora ve ark., 2015). Vajinal kanaldan hücre toplamak için, pipete 0,2 ml serum fizyoloji çekildi. Damlalığın ucu vajinal deliğe yaklaşık 5-10 mm derinlikte hafifçe sokuldu ve vajinaya akıtılıp 2 veya 3 kez geri çekildi. Numuneden küçük bir damla, ince bir tabaka (smear) halinde lam üzerine eşit şekilde yayıldı ve açık havada kurumaya bırakıldı (Macdonald ve ark., 2010). Kuruyan lamlar daha sonra DiffQuick boyama seti ile boyandı (Makker ve ark., 2012). DiffQuick Boyama;

1. Metanol (fiksasyon) 3dk bekletildi.
2. Xanthene (eozinofilik) 2 dk bekletildi.
3. Thiazine (bazofilik) 2 dk bekletildi.
4. Çeşme suyunda 2 saniyetutuldu.
5. Havada kurumaya bırakıldı.

Vajinal smear preparatları boyama işlemi tamamlandıktan sonra ışık mikroskopunda incelendi. Hücreler 10'luk 20'lik ve 40'luk büyütmede değerlendirildi. Östrus siklusu evreleri proöstrus, metöstrüs ve diöstrüs olarak sınıflandırıldı. Süperfisyal, intermedyer, parabazal hücreler ve lökositlerin (beyaz kan hücreleri) yoğunluğuna göre östrus evreleri değerlendirildi.



**Şekil 3. 1.** DiffQuick boyamada Proöstrus (A, B), Östrus (C, D) ve Diöstrüs (E, F), vajinal smear görüntüleri.

### **3.3. Sıçan Tartımı**

Hipotiroidi ve kontrol Grubuna ait sıçanlar bir aylık süre boyunca her hafta bir kere aynı gün ve saatte hassas terazide tartıldı. Deneyin başlangıcında tüm sıçanların ağırlıkları tartıldı ve 1. hafta olarak kaydedildi. Deney süresince, her bir sıçanın vücut ağırlığı, hipotiroidi durumunun fizyolojik etkilerini değerlendirmek üzere dikkatle izlenmiştir. Deneyin sonlanması ile anestezi işlemi uygulanmadan önce sıçan ağırlıkları tekrar ölçülerek kaydedildi ve 6. hafta değeri olarak verildi.

### **3.4. Ovaryum Tartımı**

Deney sonunda her bir sıçanın sağ ve sol ovaryumları, sıçanların satifikasyonu sonrasında dikkatle çıkarılmış ve çevre dokulardan arındırılarak hassas terazide tartılmıştır.

### **3.5. Biyokimya Yöntemi**

Özel bir tıbbi tahlil laboratuvarlarından Beckmancoulter Access 2 cihazıyla ve immünoassay yöntemiyle östrojen, TSH, FSH, T3 ve T4 seviyelerinin belirlenmesi için hizmet alımı yapılmıştır.

### **3.6. Histopatolojik İnceleme**

#### **3.6.1. Fiksasyon**

1. Nötral tamponlanmış formalin solüsyonu
2. %10'luk formalin
3. 100 ml Distile su
4. 900 ml Sodyum fosfat, monobazik, monohidrat
5. 4 gr Sodyum fosfat, dibazik, anhidroz 6.5 gr



Fiksatif için nötral tamponlanmış formalin solüsyonu hazırlanırken distile su, % 10'luk formalin, sodyum fosfat monobazik monohidrat ve sodyum fosfat dibazik anhidroz yukarıda belirtilen miktarlarda karıştırılıp, Ph metre yardımıyla Ph değeri 6,5 olması sağlandı. Her denekten alınan dokular farklı kaplarda olacak şekilde kaplar numaralandırıldı ve etiketlendi. Kaplar içerisine hazırlanan fiksatif solüsyonu eşit miktarlarda aktarıldı. Fiksatif miktarı dokunun en az 10 katı olacak şekilde eklendi. Alınan dokular 24-48 saat formaldehitte fikse edildi.

### **3.6.2. Doku takip yöntemi**

1. Alınan dokular 48 saat formaldehitte bekletildi.
2. Akan suda 60 dakika yıkandı.
3. % 70 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
4. % 80 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
5. % 90 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
6. % 100 Etil Alkol' de 1 saat bekletildi.
7. Ksilen I de 1 saat bekletildi.
8. Ksilen II de 1 saat bekletildi.
9. Parafin I de 1 saat bekletildi.
10. Parafin II de 1 saat bekletildi.
11. Dokular parafine gömülerek etiketleme işlemleri yapıldı.

Doku takip yöntemi tamamlanan ovaryum bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µ'luk kesitler alındı. Alınan kesitlere H+E, masson trikrom ve immünohistokimyasal boyama yöntemleri uygulandı.

### 3.6.3. Hematoksilen-Eozin boyama

Doku takip yöntemi tamamlanan ovaryum bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µ'luk kesitler alındı. Dokular etüvde 1 gece boyunca deparafinizasyona uğratıldı. Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi kullanılan etil alkol solüsyonları, % 100 etil alkol (Ethanol, IsoLab) ve distile su kullanılarak % 96, % 80, % 70, % 50 oranlarında hazırlandı. Kullanılacak ksilen (Xylol, Isımerengemisch, Supelco) miktarı kaplara alınarak kullanıma hazır hale getirildi. Etüvden alınan dokuların geçtiği aşamalar:

1. Ksilen I de 30 dakika bekletildi
2. KsilenII'de 30 dakika,
3. % 100 etil alkol'de 5 dakika,
4. % 90 etil alkol'de 5 dakika,
5. % 80 etil alkol'de 5 dakika,
6. % 70 etil alkol'de 5 dakika,
7. % 50 etil alkol'de 5 dakika,
8. Distile suda 10 dakika,
9. Hematoksilende 3 dakika bekletildi
10. Akan su altında 1 dakika yıkandı

11. Asit-alkol batırılıp çıkarıldı
12. Akan su altında yıkandı
13. Amonyak batırılıp çıkarıldı
14. Akan su altında yıkandı
15. Eozinde 3 dakika,
16. % 50 etil alkol'de 5 dakika,
17. % 70 etil alkol'de 5 dakika,
18. % 80 etil alkol'de 5 dakika,
19. % 90 etil alkol'de 5 dakika,
20. % 100 etil alkol'de 5 dakika,
21. Ksileni'de 5 dakika,
22. Ksileni'de 5 dakika bekletildi
23. Ksilenden alınan lamalar üzerine entellan (Merck) damlatılarak lamellerle kapatıldı.  
Kesitler ışık mikroskopunda incelenmeye hazır hale getirildi.

### 3.6.4. Masson-Trikron boyama

Doku takip yöntemi tamamlanan ovaryum bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µ'luk kesitler alındı ve ardından uygulanan protokol sırası şöyledir;

1. Lama alınmış dokular deparafinizasyonu için 60 ° C etüvde 2 saat bekletildi.
2. Reagent A (Weigert Iron Hematoksin A Sol) ve Reagent B (Weigert Iron Hematoksin B Sol) den eşit miktar da alınıp altışar damla damlatılarak 4 dakika bekletildi.
3. Lamlara direkt Reagent C (Picric acid alcoholic Sol) den 10 damla damlatılarak 4 dakika bekletildi.
4. Saf su ile yıkandı.
5. Reagent D (Ponceau acid fuchsin Sol) 'den 10 damla damlatıldı ve 10 dakika bekletildi.
6. Saf su ile yıkandı.
7. Reagent E (Phospho molybdic acid Sol) 'den 10 damla damlatılarak 10 dakika bekletildi.
8. Reagent F (Aniline blue Sol) 'den 10 damla damlatılarak 5 dakika bekletildi.
9. Artan alkol (% 80, 90, 95 alkol) serisinde dehidrate edildi.
10. Ksilen 1'de 3 dakika bekletildi.
11. Ksilen 2'de 3 dakika bekletilip kapatıldı.

### 3.6.5. İmmünohistokimyasal boyama yöntemi

Doku takip yöntemi tamamlanan doku bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 µm'lik kesitler alındı, kesitler benmariye bırakıldı ve devamında uygulanan aşamalar aşağıdaki gibidir:

1. Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.
2. Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C'de 1 gece bekletildi.
3. Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.
4. Ksilenden çıkarılıp havada kurutularak PAPPEN ile dokular işaretlendi.
5. Kesitler sırasıyla % 100, % 96, % 80, % 70, % 50'lik etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi.
6. Alkolden çıkan preparatlar distile su ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
7. Antijen retrieval işlemi için önceden hazırlanmış ve 37°C'de bekletilen Tripsin solüsyonu (200cc PBS + 0,2gr Tripsin) ile 37°C'de 30 dakika bekletildi.
8. 10 dakika PBS'de bırakıldı.
9. Dokulardaki endojenperoksidaz aktivitesi, %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Metanol (1:9) karışımı ile 10 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
10. Phosphate Buffered Saline (PBS) ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
11. Kesitler üzerine primer antikolar (EGFR) (Affinity Biosciences, Cat: AF6043) ilave edilerek 1 gece bekletildi. Primer antikor distile su ile dilüe edildi (dilüsyon 1/200).

12. Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye duyarlı sekonder antikorla (Thermo Scientific, Lot: PHLT811, Menşei: UK) 20 dakika muamele edildi.
13. Tekrar PBS ile yıkanan kesitlere, biotinlenmiş sekonder antikorlara kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) 10 dakika kadar muamele edildi.
14. Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB (Thermo Scientific, Lot: HD53495, Menşei: UK) 1:100 seyreltilerek 3- 10 dakika bekletildi.
15. Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilin ile zıt boyama yapıldı.
16. Kesitler akan suda yıkanarak ve sırasıyla % 50, % 70, % 80, % 96, % 100' lük etil alkol serisinde 2' şer dakika bekletildi.
17. Alkol serilerinden çıkan dokular ksilen I ve ksilen II'de 2 şer dakika bekletildi.
18. Ksilenden alınan dokular, üzeri kurumadan entellan ile kapatıldı.

### **3.6.6. Follikül sayımı yöntemi**

Doku takibinin ardından ovaryum dokuları parafin bloklara gömüldükten sonra mikrotom cihazıyla 5 mikronluk seri kesitler alındı. Tüm sıçanların ovaryum dokularından 1., 5. ve 10. kesitler su banyosunda bekletildikten sonra pozitif yüklü lamlara alındı ve taşıma sepetine yerleştirildi. 1 gece 37C°de inkübatörde bekletildi. Hematoksilin-Eozin boyama uygulamasının ardından ışık mikroskobu ile folliküller sayıldı. Follikül sayımında primordial, primer, sekonder, tersiyer ve atretik folliküllerin sayımı yapıldı. Aşağıda belirtilen kriterlere göre follikül sınıflandırması yapıldı (Myers ve ark., 2004).

Primordial Follikül: Oosit etrafında tek katlı yassı granüloza hücreleri ile çevrili,  
Primer Follikül: Oosit etrafında tek katlı kübik granüloza hücreleri ile çevrili,  
Sekonder Follikül: Oosit tek tabakadan fazla kübik granüloza hücreleri ile çevrili ve antral boşluğu bulunmayan folliküller,  
Tersiyer Follikül: Oositin etrafı çok katlı kübik granüloza hücreleriyle çevrili, antum boşluğu ve muhtemelen kümulus ooforus, teka tabakası bulunan folliküllerdir.

### 3.7. Total RNA İzolasyonu

Deney ve kontrol grubu sıçanlarından alınan ovaryum dokuları doku fiziksel olarak parçalanarak homojenize edildikten sonra mRNA düzeyinde ekspresyon değerlendirmesi yapabilmek amacıyla bütün gruplarda RNA izolasyonu Trizol Reagent ile gerçekleştirildi. Ardından direkt olarak RNA izolasyon kiti (MG-RNA-01-50, Lot: 0622-AK-2284, Hibrigen, Türkiye) kullanıldı.

1. Homejenize edilmiş dokulardan her doku başına 500 µl Trizol, ependorf tüplere (1 ml'lik) aktarıldı.
2. Her bir ependorf tüpe 200 µl kloroform eklenip ve pipetlendikten sonra buz üzerinde 10 dk inkübasyona bırakıldı.
3. Soğutmalı santrifüj ile +4°C' de 10.900 g'de 15 dk santrifüj edildi ve renksiz olan üst fazlar ayrı ependorf tüplere alındı.
4. Toplanan üst fazın üzerine ½ oranında soğutulmuş Etanol (% 100) eklendi, pipetlendi ve 10 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
5. Karışım filtreli tüpe aktarıldı ve +4°C'de 10.900 g'de 30 sn santrifüj edildi. Filtrenin altında kalan sıvı atıldı.
6. Pelet üzerine 500 µl RY1 eklendi ve +4°C'de 10.900 g'de 30 sn santrifüj edildi.

7. Süpernatant atılıp, pelet üzerine 500 µl RY2 eklendi, 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılıp +4°C'de 10.900 g'de 30 sn santrifüj edildi.
8. 7. adım tekrarlanır.
9. Pelet 10.900 g'de 2 dakika kuruması için santrifüj edildi
10. Filtre 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine yerleştirildi. Membran üzerine 30 100 µl DEPC ile muamele edilmiş su eklendi. 2 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı ve RNA'nın bu su içerisinde toplanması için 10.900 xg'de 2 dk santrifüj edildi.

İzole edilen RNA'nın konsantrasyonu ve saflığı Nanodrop cihazı (Thermo Scientific Nanodrop, 1000) ile ölçülmüştür. Nanodrop ile RNA örneklerinin ölçülmesi işleminde öncelikle uygun konsantrasyonlarda (cihazın ölçebileceği RNA konsantrasyon aralığı 2-3000 ng/µl'dir) sulandırılan RNA örnekleri, 1µl RNasefree su ile Nanodrop cihaz kasesi üzerine bir damla halinde pipetlenip ve bilgisayardaki program analizi ile kör alındıktan sonra, 1µl olacak şekilde pipetlenip 230, 260, 280 nm'de okundu.

### 3.8. cDNA Sentezi

İzole edilen RNA'lardan cDNA sentezi, cDNA Synthesis Kit (5X) (Nucleo Gene, Lot: NG20210223, Türkiye) kullanılarak oligo d(T) primeri ve Revers Transkriptaz enzimi ile üretici firmanın protokolü doğrultusunda gerçekleştirildi.

Protokol:

1. Kullanılmadan önce kit içerisindeki tüm bileşenler buzdolabından çıkarıldı, çözülmesi sağlandı ve iyice karıştırıldı.
2. Ependorf tüpünde, RT buffer, dNTP'ler, primerler ve Reverse Transkriptaz enzimini içeren bir mix hazırlandı. Karışımın homojenliği için kısa bir süre santrifüj yapıldı.



3. RNA'lar, kit protokolüne uygun olarak en yüksek konsantrasyona göre hesaplanarak, etiketlenen ependorf tüplerine konuldu.
4. Hazırlanan mix, RNA içeren ependorf tüplerine eşit şekilde dağıtıldı.
5. Reaksiyon hacmi 20 µL'ye tamamlanacak şekilde nükleaz-free water eklendi.
6. Protokole uygun olarak, tüpler 25°C'de 5 dakika, 50°C'de 30 dakika inkübe edildi. Ardından 85°C'de 5 dakika inkübasyon yapılarak cDNA sentezi tamamlandı.

### 3.9. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (GZ-PZR)

PZR çalışması, 96 kuyucuklu Qiagen Rotor-Gene cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. GRB2, SRC, MEK1, SHC2, ESR1, HB-EGF, RAF1, JNK, mTOR, KRAS, PI3K, EGFR, NCOA1 ve GPER1 primerleri GZ-PZR kullanılarak saptanmıştır. İlgili hücre dizininden TRI-Reagent kullanılarak total RNA izolasyonu yapılmış olup takiben elde edilen RNA'ların miktar ve kalitesi bulunmuştur. Sonrasında, total RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir. İlgili Nucleo Gene Qpcr Sybr Green Master Mix (Nucleo Gene, Lot: NG20200515, Türkiye) ile ekspresyon analizi gerçekleştirildi. Çalışmamızda kullanılan primer gen dizileri Tablo 3.1.'de gösterilmiştir.

GZ-PZR Protokolü:

Proses Adımı	Sıcaklık	Süre
İlk Denatürasyon	95°C	15 dakika
Denatürasyon	95°C	10-15 saniye
Primer Bağlanması	55-65°C	30-60 saniye
Uzama	68-72°C	10 saniye

**Tablo 3. 1.** GZ-PZR yönteminde kullanılan primerler.

Gen	Dizi (5'->3')	Kalıp iplik	Uzunluk	Başlangıç	Bitiş	Erime sıcaklığı	GC%	Kendiliği nden tamam- layıcılık	3' uç kendiliğin den tamamlay- ıcılık
MEK1	TGCTGAGTTGCAGG CTGTTT	Forward	20	16	35	60.75	50.0	5.0	0.0
	GCCTCCAGGTTGGT CTCGG	Reverse	19	142	124	62.32	68.4 2	4.0	1.0
RAF 1	TCAGTGCCCCGTCA CAAAGA	Forward	20	33	52	61.69	55.0	4.0	0.0
	GTCGCTTCACACAA AAGCA	Reverse	20	135	116	59.62	50.0	3.0	0.0
JNK	TCCAGTTCTCGTAC CCGCTA	Forward	20	403 7	405 6	60.04	55.0	4.0	3.0
	AGCATGGCGTGAC ACAGTAA	Reverse	20	417 1	415 2	59.97	50.0	5.0	1.0
kRAS	CTCTGAAGATGTGC CTATGGTCC	Forward	23	315	337	60.49	52.1 7	4.0	3.0
	GCATCGTCAACACC CTGTCT	Reverse	20	464	445	60.32	55.0	3.0	1.0
SHC 2	CTACCCGTCAGATC ATCGCC	Forward	20	713	732	60.04	60.0	5.0	3.0
	ACGGTGCTGATGA CACTCTG	Reverse	20	884	865	60.04	55.0	4.0	3.0
GRB 2	CGTACGTCCAGGC ACTCTTT	Forward	20	663	682	60.04	55.0	6.0	0.0
	GGGTGACATAATT GCGGGGA	Reverse	20	821	802	60.11	55.0	4.0	0.0
HBEGF	GTTGGTGACCGGTG AGAGTC	Forward	20	86	105	60.32	60.0	6.0	3.0
	GATCGGTCCCTTCC AAGTCC	Reverse	20	234	215	59.82	60.0	4.0	0.0
SRC	CCCGGCTCATAGA GGACAAC	Forward	20	125 0	126 9	59.89	60.0	4.0	0.0
	CTCTGCCCTTAGTG GTGAGC	Reverse	20	140 8	138 9	60.11	60.0	5.0	2.0
PI3K	TGCTCTTGGCTCGG TATGAC	Forward	20	92	111	59.82	55.0	2.0	2.0
	CAAGCTCAGCAAG ACGAGGA	Reverse	20	218	199	60.04	55.0	5.0	0.0
coA (Nco1)	GCTTCAGGTGTTTG CTGACG	Forward	20	486 5	488 4	60.04	55.0	4.0	2.0
	TAGCTGCTGAAGG AGGCTCT	Reverse	20	501 2	499 3	60.33	55.0	5.0	3.0
GPER1	TCCCTGCAAGCAGT CTTTCC	Forward	20	921	940	60.25	55.0	6.0	1.0

(Tablo 3.1. Devam)

	TCGTCTTCTGCGCC ACATAC	Reverse	20	107 5	105 6	60.46	55.0	4.0	2.0
mTOR	CACCCATCCAACCT GATGCT	Forward	20	707 0	708 9	60.03	55.0	4.0	1.0
	ATCGAGACCGGTA ACCTCCA	Reverse	20	723 1	721 2	60.03	55.0	6.0	0.0
EGFR	CAACAACCAGAAG GGCCAAAG	Forward	21	214 8	216 8	59.93	52.3 8	4.0	0.0
	GCGGCGTAGTGTA CGTTTTTC	Reverse	20	228 5	226 6	59.91	55.0	5.0	0.0
ESR 1	CGAGTCCTGGACA AGATCAACG	Forward	22	165 3	167 4	60.99	54.5 5	7.0	2.0
	GTGCCGGATATGG GAAAGGAT	Reverse	21	177 2	175 2	59.93	52.3 8	4.0	2.0
$\beta$ - actin	AGGAGTACGATGA GTCCGGC	Forward	21						
	CGCAGCTCAGTAA CAGTCC	Reverse	20						

### 3.10. Verilerin İstatistiksel Olarak Değerlendirilmesi

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 yazılım (Armonk, NY: IBM Corp.)) paket programıyla analiz edilmiştir. Sürekli değişkenler ortalama  $\pm$  standart sapma, ortanca, çeyrekler arası aralık (ÇAA) ve en küçük-en büyük değerler olarak ifade edilmiştir. Bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis Varyans Analizi (post hoc: Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanılmıştır. PZR verilerinin analizi AACT metodu kullanılarak bilgisayar programı ile kantasyonu yapıldı. Web tabanlı "RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan, Volcano Plot analizleri kullanıldı. Metod, iki ekspresyon sonucunun  $\pm 3SD$  karşılaştırılması esasına dayanmaktaydı. Böylelikle, primer ekspresyonunun karşılaştırılması yapılan durumlarda gruptaki primerlerin ekspresyon değerleri rölaf olarak belirlendi. Grupların karşılaştırılması "RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Data Analysis" programında bulunan "Student t-testi" analizi ile istatistiksel olarak değerlendirildi. Tüm analizlerde  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Vajinal Smear Bulguları

Metimazol ile hipotiroid indüksiyonu sonrası 13. günden itibaren tüm sıçanların vajinal smearleri yapıldı ve östrus siklusları gözlemlendi. Tüm sıçanlara ait vajinal smear preparatları Diff Quick boyama işleminin ardından ışık mikroskobu altında incelendi. Hücreler X10, X20 ve X40 büyütmelerde yoğunluk ve şekilsel özelliklerine göre östrus siklusu evreleri proöstrus, östrus ve diöstrus olarak değerlendirildi. Kontrol grubuna ait tüm sıçanların vajinal smearlerinin boyalı preparatlarında proöstrus, östrus ve diöstrus evreleri gözlemlendi. Ancak metimazol ile indüklenen gruptaki sıçanların östrus siklusunun, diöstrus evresinde durduğu tespit edildi. Proöstrus ve östrus evreleri gözlenemedi.

### 4.2. Sıçan Tartımı Bulguları

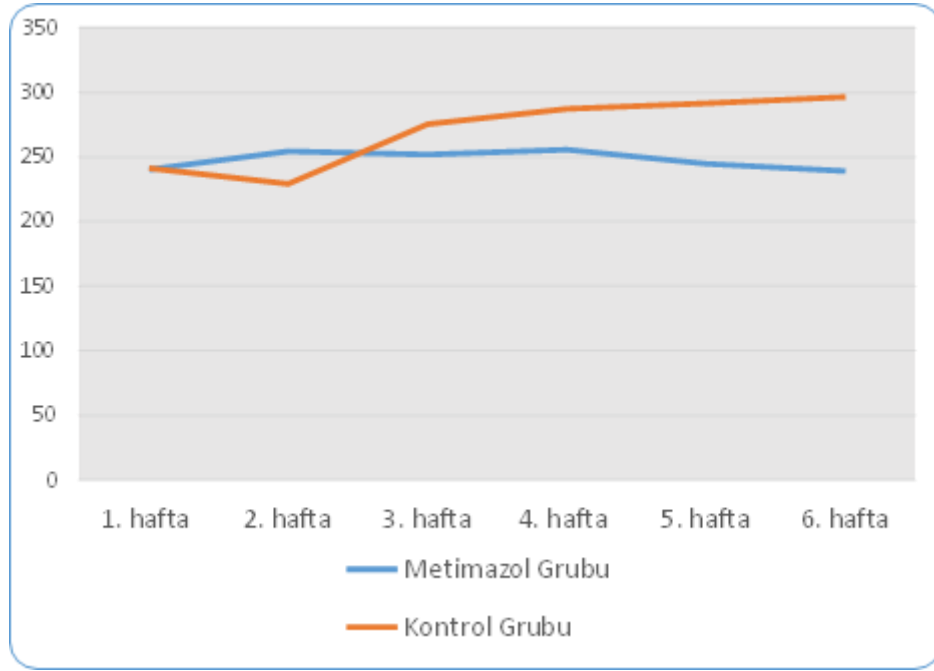
Bu çalışmada, metimazol ile hipotiroidi indüklenmiş hipotiroidi grubundaki (n=10) ve kontrol grubundaki (n=8) sıçanların haftalık ağırlık değişimleri istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.1. 'de sunulmuştur. 1. haftada, hipotiroidi grubundaki sıçanların ortalama ağırlığı (240.40±8.017 g) ile kontrol grubu sıçanlarının ortalama ağırlığı (241.17±27.766 g) arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0.950). 2. haftada, hipotiroidi grubunun ortalama ağırlığı (254.50±16.050 g) kontrol grubunun ortalama ağırlığına (229.17±24.959 g) göre daha yüksek olmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildi (p=0.131). 3. haftadan itibaren, hipotiroidi grubu sıçanların ortalama ağırlığı (251.80±11.736 g) kontrol grubuna (275.33±19.694 g) göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0.009). 4. haftada, hipotiroidi grubunun ortalama ağırlığı (255.60±14.804 g) kontrol grubuna (287.33±24.328 g) göre anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0.006). 5. haftada, hipotiroidi grubunun ortalama ağırlığı

(244.70±12.010 g) daha azalmış buna karşılık kontrol grubundaki ağırlık artışının devam etmesiyle birlikte (291.50±24.436 g) iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur (p=0.001). İki grup arasındaki ağırlık farkı 6. haftada daha fazla artarak hipotiroidi grubunun ortalama ağırlığı 239.10±20.502 g iken kontrol grubunun ortalama ağırlığı 296.50±21.925 g olarak tespit edilmiştir. Bu durumda hipotiroidi grubunun ortalama ağırlığı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur (p=0.001). Bu bulgular, metimazol ile hipotiroidi indüklenen sıçanlarda ağırlık kaybının belirgin olduğunu ve bu etkinin zamanla arttığını göstermektedir. Hipotiroidi ve kontrol grubundaki sıçanların haftalık periyotta ağırlıklarının karşılaştırılması Şekil 4.1.'de gösterilmiştir.

**Tablo 4. 1.** Hipotiroidi ve kontrol grubundaki sıçanların haftalık olarak ortalama ağırlıkları.

	<b>Hipotiroidi grubu (n=10) ort ± S.S.</b>	<b>Kontrol grubu (n=8) ort ± S.S.</b>	<b>İstatistiksel analiz p</b>
1. hf	240.40±8.017	241.17±27.766	p= 0.950
2. hf	254.50±16.050	229.17±24.959	p= 0.131
3. hf	251.80±11.736	275.33±19.694	p= 0.009
4. hf	255.60±14.804	287.33±24.328	p= 0.006
5. hf	244.70±12.010	291.50±24.436	p= 0.001
6. hf	239.10±20.502	296.50±21.925	p= 0.001

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı. s.s.: standart sapma



**Şekil 4. 1.** Hipotiroidi ve kontrol grubundaki sıçanların haftalık periyotta ağırlıklarının karşılaştırılması.

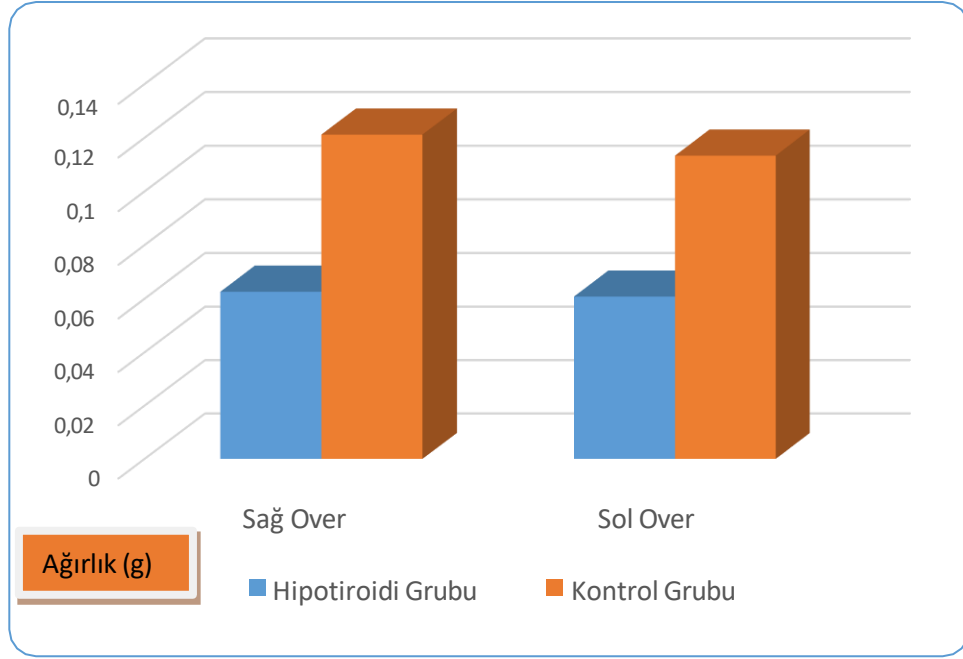
### 4.3. Ovaryum Tartımı Bulguları

Sıçanlar sakrifiye edilerek sağ ve sol ovaryumları çıkarılmış ve hassas terazi ile tartılmıştır. Elde edilen veriler istatistiksel analizlere tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlar Tablo 4.2. ve Şekil 4.2.'de sunulmuştur. İstatistiksel analiz sonuçları, hipotiroidi grubunun ovaryum ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüş olduğunu göstermiştir ( $p < 0,05$ ).

**Tablo 4. 2.** Hipotiroidi ve kontrol grubuna ait sıçanların sağ ve sol ovaryumlarının ortalama ağırlıkları.

	Hipotiroidi grubu (n=10) ort $\pm$ S. S.	Kontrol grubu (n=8) ort $\pm$ S. S.	İstatistiksel analiz <i>p</i>
Sağ over	0.06260 $\pm$ 0.024	0.12117 $\pm$ 0.030	$p = 0.001$
Sol over	0.06080 $\pm$ 0.026	0.11333 $\pm$ 0.011	$p = 0.001$

$p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı. s.s.: standart sapma



**Şekil 4. 2.** Hipotiroidi ve kontrol grubunun sağ ve sol overlerinin ortalama ağırlıklarının karşılaştırılması.

#### 4.4 Biyokimya Bulguları

Hipotiroidi durumu, tiroit hormonlarının (T3 ve T4) düşmesine ve TSH seviyelerinin artmasına neden olur. FSH ve östrojen seviyeleri ise hipotiroidi durumunda değişiklik gösterebilir ve genellikle bozulmuş üreme fonksiyonlarını yansıtır. Spesifik çalışma koşullarına bağlı olarak bu değerler değişiklik gösterebilir. Bu değerlendirmelere göre kontrol ve hipotiroidi gruplarındaki sıçanların T3 ve T4 seviyelerinin referans aralıkları karşılaştırıldığında metimazol ile indüklenen sıçanlarda T3 değerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüş görülmüştür. T4 ve östrojen seviyesinde hipotiroidi grubunda bir miktar düşüş olduğu gözlenmiş ancak istatistiksel olarak anlamlılık bulunamamıştır. FSH ve TSH değerleri okunamamıştır. Bu durum deney süresinde 30 gün boyunca metimazol indüklemesinin yetersiz kaldığını ve daha uzun süreli bir çalışma yapılması gerektiğini düşündürmüştür.

**Tablo 4. 3.** 18 sıçandan alınan kan örneklerinde, östrojen, TSH, FSH, T3 ve T4 seviyelerinin biyokimya analiz sonuçları.

Sıçanlar	Östrojen pg/ml	FSHmIU/mL	T3pg/mL	T4ng/dL	TSH $\mu$ IU/mL
<b>K1</b>	42,5	<1,0	2,6	1,1	0,01
<b>K2</b>	5,8	<1,0	2,5	0,9	0,01
<b>K3</b>	9,9	<1,0	2,6	1,2	0,01
<b>K4</b>	7,6	<1,0	2,8	1,1	0,01
<b>K5</b>	24,5	<1,0	2,4	0,8	0,01
<b>K6</b>	6,6	<1,0	2	1	0,01
<b>K7</b>	8,7	<1,0	2,40	1	0,01
<b>K8</b>	23,6	<1,0	2,56	1	0,01
<b>M1</b>	9,2	<1,0	2,3	1	0,01
<b>M2</b>	6	<1,0	1,9	1	0,01



(Tablo 4.3. Devamı)

<b>M3</b>	7,3	<1,0	1,0	0,8	0,01
<b>M4</b>	8,7	<1,0	1,9	0,9	0,01
<b>M5</b>	22,3	<1,0	2,4	1	0,01
<b>M6</b>	31,6	<1,0	2,2	0,9	0,01
<b>M7</b>	7,2	<1,0	2,1	1	0,01
<b>M8</b>	6,8	<1,0	2,2	0,9	0,01
<b>M9</b>	7,6	<1,0	2	0,9	0,01
<b>M10</b>	<1,0	<1,0	2	0,9	0,01

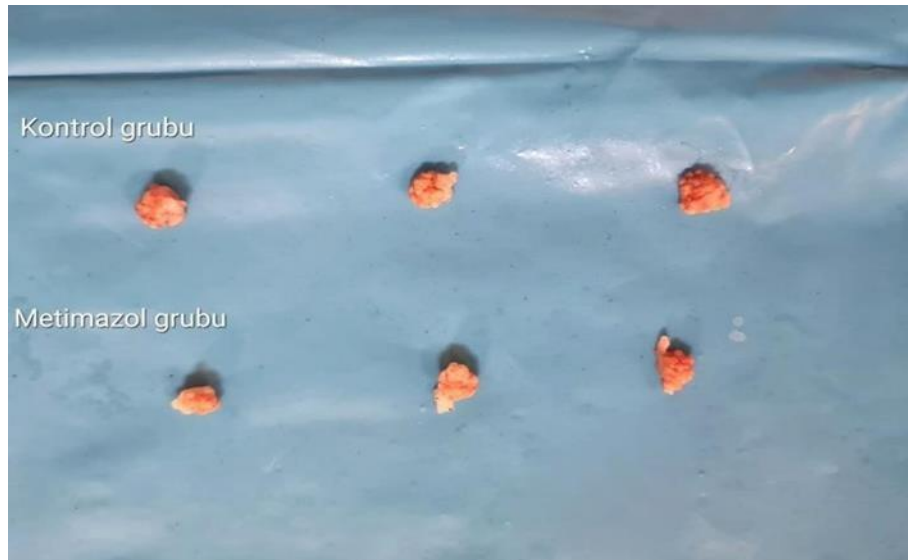
**Tablo 4. 4.** Hipotiroidi ve kontrol grubundaki sıçanların östrojen, T3, T4 kan değerlerinin karşılaştırılması.

	Gruplar	N	Ort±s.s.	Median	Minimum	Maksimum	
Östrojen (pg/ml)	Kontrol	8	16.15±14.65	8.75	5.80	42.5	P= 0.814
	Hipotiroidi	10	11.85±8.91	7.60	6.00	31.6	
T3 (pg/ml)	Kontrol	8	2.48±0.27	2.55	2.00	2.8	P= 0.012*
	Hipotiroidi	10	2.00±0.38	2.05	1.00	2.4	
T4 (ng/dl)	Kontrol	8	1.017±0.14	1.05	0.80	1.2	P= 0.221
	Hipotiroidi	10	0.93±0.067	0.90	0.80	1.0	

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı. s.s.: standart sapma

#### 4.5. Makroskobik Bulgular

Yapılan makroskobik incelemede kontrol grubu sıçanlarının her iki ovaryum dokusu normal görünümdeydi. Hipotiroidi grubu sıçanların ovaryum dokuları genellikle kontrol grubu ovaryum dokularından daha küçük görünümdeydi. Ayrıca hipotiroidi grubu sıçanların ovaryum dokusunun yüzeyi daha mat ve düzensizdi.



**Şekil 4. 3.** Kontrol ve hipotiroidi gruplarının ovaryum karşılaştırılması.

#### 4.6. Hematoksilen Eozin Boyama Bulguları

Kontrol grubu ovaryum kesitleri incelendiğinde farklı evrelerde çok sayıda follikül yapısı olduğunu ancak hipotiroidi grubunda ise follikül sayısında azalma olduğunu gözledik (Şekil 4.4. A, B).

Follikül yapılarını incelediğimizde kontrol grubu sıçanlarda oositi çevreleyen granuloza hücrelerinin bazal lamina yüzeyinde prizmatik hücrelerden, diğer granuloza hücrelerinin de birbirine yakın çapa sahip morfolojik olarak benzer hücreler olduklarını gözledik. Primordial folliküllerin dinlenme halinde olması, hücre döngüsüne (G0 fazında) katılmadıkları için çevresel ve hormonal değişimlerden daha az etkilenirler. Bu nedenle hipotiroidi grubu sıçanların erken primer folliküllerinde bazal lamina yüzeyine tutunan hücreleri prizmatik olarak seçilebilmekteyken geç primer ve sekonder folliküllerde bu düzenlenme genellikle ayırt edilememekteydi (Şekil 4.4. B, D, F). Granuloza hücrelerinde düzensizlikler söz konusuydu. Bu durum, granuloza hücrelerinin proliferasyonunda, yani çoğalma ve yayılma süreçlerinde azalma olduğuna işaret etmektedir.

Bunun yanı sıra, doku yapısında hücresel dağılımlar homojen olmaktan uzaktır. Yani granuloza hücreleri doku içinde düzensiz bir şekilde dağılmış ve yapılarını koruyamamışlardır. Bu doku yapısındaki bozulma ve hücresel dağılımlardaki homojen olmayan durum, granuloza hücrelerinin normal işlevlerini yerine getirmekte zorlandıklarını göstermektedir.

Ayrıca hipotiroidi grubuna ait folliküllerin granuloza hücrelerinin bazılarında belirgin piknotik çekirdekler gözlemlendi (Şekil 4.4. D, F, H). Piknotik çekirdekler, hücre çekirdeklerinde yoğunlaşma ve küçülme ile karakterize olan bir durumdur ve hücre hasarının yanı sıra apoptotik süreçlerin bir göstergesi olarak bilinmektedir. Bu durum, hipotiroidi nedeniyle granuloza hücrelerinde meydana gelen hasarın bir göstergesi olarak değerlendirildi.

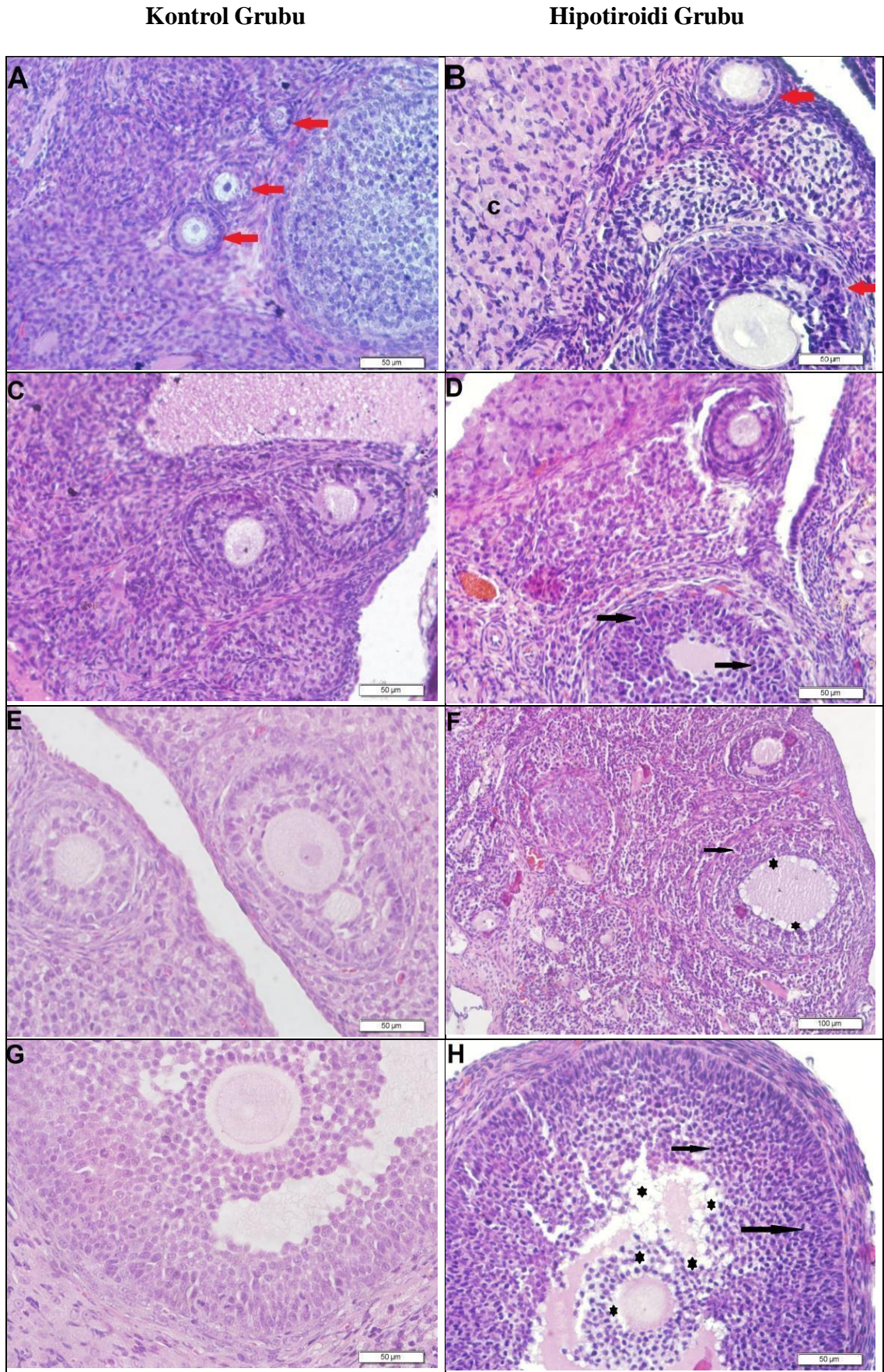
Kontrol grubu sıçanlara ait oosit hücreleri yuvarlak şekilli sitoplazmik bakımdan homojendi. Aynı zamanda zona pellusidası belirgin olarak seçilebilmekte ve her bölgesi eşit kalınlığa sahipti (Şekil 4.4. C, E, G). Hipotiroidi grubu sıçanların oositlerinde yapısal

bozulmalar tespit edildi. Normalde yuvarlak ve düzgün bir yapıya sahip olması gereken oositlerde, düzensizlikler ve şekil bozuklukları gözlemlendi. Oositleri çevreleyen zona pellusida tabakasında da düzensizlikler mevcuttu. Zona pellusidanın bazı bölgeleri kalınlaşmış, bazı bölgelerinin incelmış olduğu görüldü (Şekil 4.4. B, F, H). Bu bulgular, hipotiroidinin oosit kalitesi üzerindeki olumsuz etkilerini ortaya koymakta ve zona pellusidanın bu şekilde farklı kalınlıklara sahip olmasının, oosit korumasında ve sperm penetrasyonunda potansiyel problemlere yol açabileceğini düşündürmektedir.

Ayrıca, hipotiroidi grubuna ait sıçanların oosit sitoplazmasında vakuolizasyonlar gözlemlendi (Şekil 4.4. D, F, H). Sitoplazmada gözlenen bu vakuoller, hücre içi dengesizliklerin ve olası metabolik bozuklukların bir göstergesi olarak değerlendirildi. Aynı zamanda hipotiroidi grubuna ait folliküllerde folliküler sıvıda da vakuolize alanları gözledik (Şekil 4.4. F, H).

Çalışmamızda hipotiroidi grubu ovaryum kesitlerinde incelenen bazı oositler dejenere oosit özellikleri gösterdi. Atrezi, folliküllerin dejenerasyonu ve ölümünü ifade eden bir durumdur. Hipotiroidi, oositlerde dejenere değişimlere neden olarak fertilitiyi olumsuz etkileyebilir. Hipotiroidi grubumuza ait ovaryum kesitlerinde genellikle sekonder veya tersiyer folliküllerinin varlığı belirgin bir şekilde azalmıştır. Bu durum, follikül gelişiminin normal seyrinden sapması ve bu folliküllerin gerekli olgunluğa ulaşamaması şeklinde kendini göstermektedir.

İncelenen preparatlarda korpus luteum yapısının her iki grubumuzda normal olduğu gözlemlendi. Korpus luteum, ovulasyon sonrası oluşan ve progesteron salgılayan bir yapıdır. Bu bulgu, hipotiroidinin korpus luteum yapısını etkilemediğini, ancak diğer ovaryum yapılarında belirgin değişikliklere neden olduğunu göstermektedir.



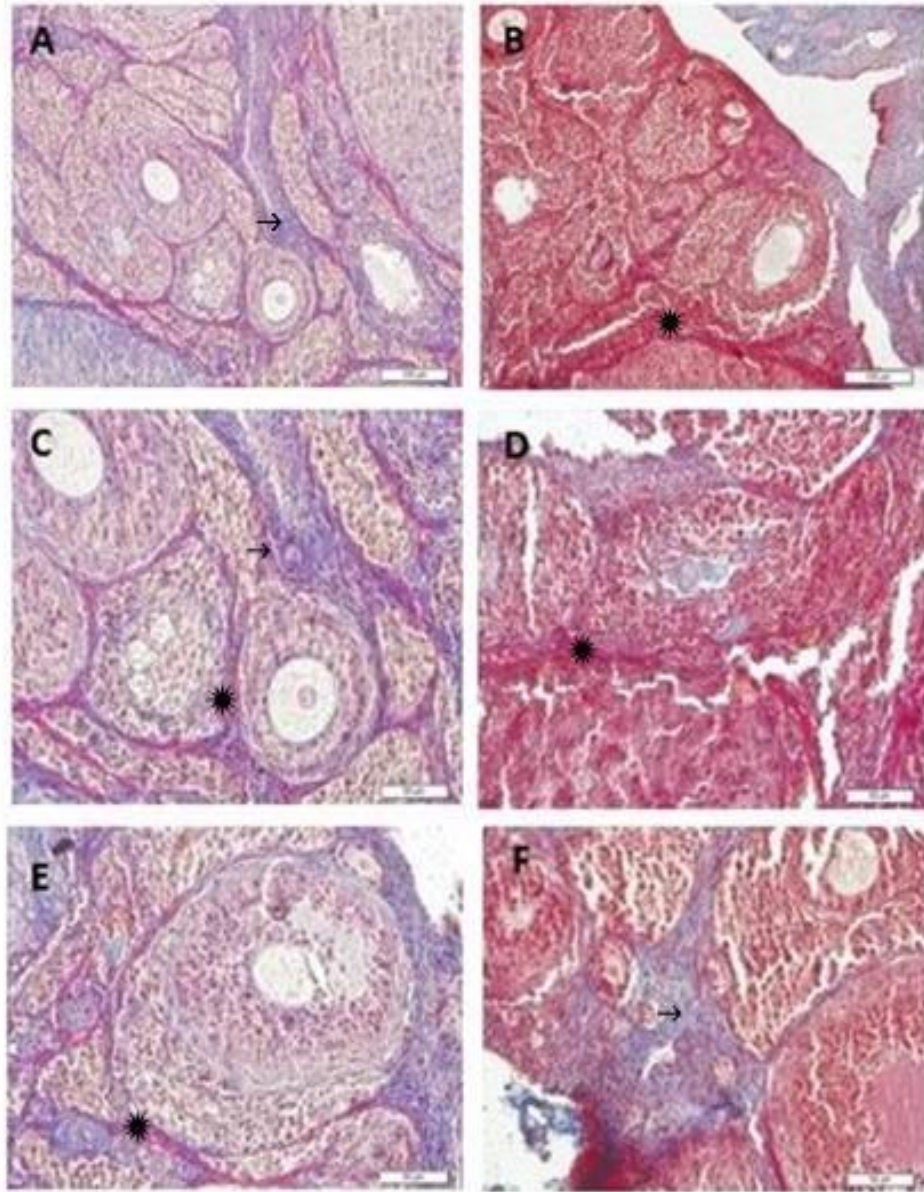
**Şekil 4. 4.** Kontrol ve hipotiroidi grubunda Hematoksilen-Eozin boyama görüntüleri. Piknotik çekirdekler (□) (D, F, H), vakuolizasyon (\*) (F, H), gelişmekte olan follüküller (□) (A, B), korpus luteum (B).

#### **4.7. Masson-Trikrom Boyama Bulguları**

Bağ doku yapısının değerlendirilmesi sonucunda, belirgin bir artış gözlemlenmemiştir; bu durum, kolajen içeriğinde anlamlı bir değişiklik yaşanmadığını ve bağ dokusunda herhangi bir değişiklik meydana gelmediğini gözlemledik. Dolayısıyla, fibrotik doku oluşumuna rastlanmamıştır. Kan damarları yapısına bakıldığında ise damarlar normal görünümdeydi ve fibrotik doku ile çevrili olmadıkları tespit edilmiştir. Bu bulgular, kan dolaşımının sağlıklı ve bozulmamış olduğunu göstermektedir. Şekil 4.5'te Masson Trikrom boyama görüntüleri sunulmuştur.

## Kontrol Grubu

## Hipotiroidi Grubu



**Şekil 4. 5.** Masson Trikrom boyama görüntüleri (X40). Bağ dokusu (□) (A,C,F) Kan damarları (\*) (B,C,D,E).

#### 4.8. İmmünohistokimyasal Boyama Bulguları

Hipotiroidi grubu kesitlerinde EGFR primer antikoru ile yapılan boyamalarda, kontrol grubunda EGFR ekspresyonunun belirgin olduğu gözlemlenmiştir. EGFR, hücre membranlarında yoğun bir şekilde bulunmakta olup, metimazol ile indüklenen hipotiroidili gruplarda EGFR ekspresyonunun azaldığı görülmüştür.

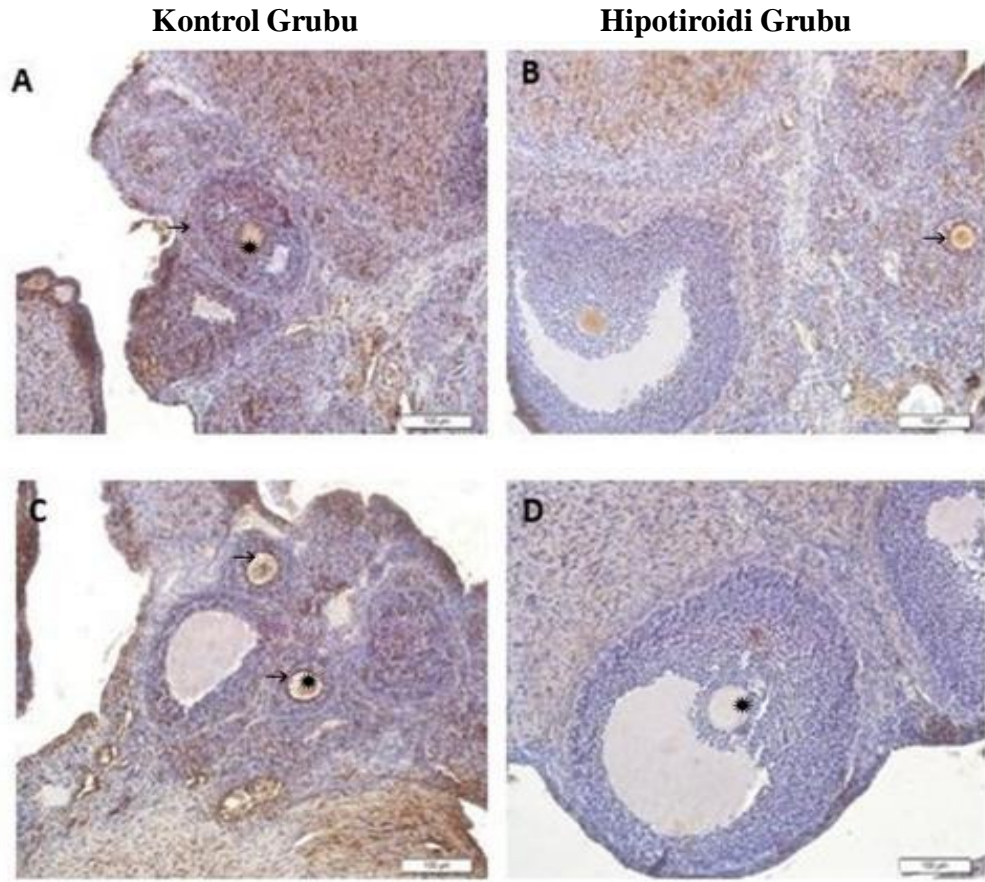
Normalde granüloza hücreleri folliküllerin iç kısmında düzenli ve yoğun şekilde yer alırlar. Granüloza hücrelerinde, kontrol grubunda EGFR'nin yoğun bir şekilde boyandığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.6. A, B, C). Hipotiroidi grubu kesitlerinde granüloza hücrelerinin yoğunluğunda azalma ve dolayısıyla hücrelerin proliferatif aktivitesinde düşüş gözlemlenmiştir.

Normalde follikülün dış tabakasında bulunan teka hücreleri, granüloza hücrelerine göre daha az yoğunlukta ve daha büyük hücrelerdir. Bu kesitte teka hücrelerinde kontrol grubuna göre hipotiroidi grubunda EGFR pozitifliğinin azaldığı görülmektedir. Bu, androjen üretimi ve follikül gelişimi, proliferasyon üzerinde olumsuz etkiler yaratabilir.

Oositler normalde follikülün merkezinde bulunur. Kontrol grubunda oosit çevresindeki hücrelerde belirgin EGFR ifadesi vardır. Hipotiroidi grubunda, oositlerde EGFR ekspresyonunun normalden düşük olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.6. A, C, D). Bu durum, oosit maturasyonu ve ovulasyon süreçlerini olumsuz etkileyebilir.

Ovaryum stromasında, kontrol grubuna kıyasla hipotiroidi grubunda hücresel yoğunlukta ve EGFR ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir. Bu, genel doku yapısının ve fonksiyonlarının bozulmasına işaret edebilir.





**Şekil 4. 6.** Kontrol ve hipotiroidi gruplarında EGFR ekspresyonunun immünohistokimyasal karşılaştırılması. Granüloza hücreleri (□) (A, B, C). Oositler (✱) (A,C,D).

#### 4.9. Follikül Sayımı Bulguları

**Primordial Folliküller:** Hipotiroidi grubundaki sıçanların primordial follikül sayıları ( $2.10 \pm 0.994$ ), kontrol grubundaki ratların sayıları ( $2.67 \pm 1.751$ ) ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark göstermemiştir ( $p=0.418$ ) (Tablo 4.5.). Bu sonuç, metimazol indüksiyonunun primordial follikül sayıları üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını göstermektedir.

**Primer Folliküller:** Primer follikül sayıları, hipotiroidi grubunda ( $3.00 \pm 0.816$ ) kontrol grubuna ( $6.500 \pm 0.548$ ) kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p=0.001$ ) (Tablo 4.5.). Bu bulgu, hipotiroidi indüksiyonunun primer follikül sayısını önemli ölçüde azalttığını göstermektedir.

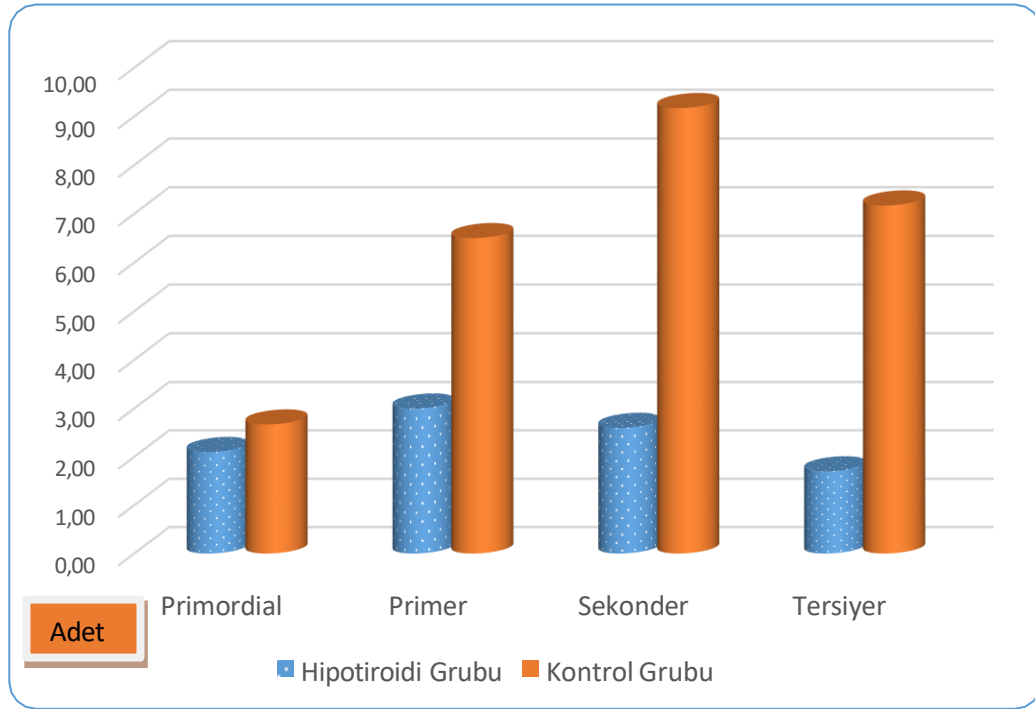
**Sekonder Folliküller:** Sekonder follikül sayıları, hipotiroidi grubunda ( $2.60 \pm 1.350$ ) kontrol grubuna ( $9.17 \pm 0.983$ ) kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p=0.001$ ) (Tablo 4.5.). Bu sonuç, hipotiroidi indüksiyonunun sekonder follikül sayısını belirgin bir şekilde azalttığını ortaya koymaktadır.

**Tersiyer Folliküller:** Tersiyer follikül sayıları, hipotiroidi grubunda ( $1.70 \pm 0.823$ ) kontrol grubuna ( $7.17 \pm 3.430$ ) kıyasla anlamlı derecede düşük bulunmuştur ( $p=0.002$ ) (Tablo 4.5. ve Şekil 4.7.). Bu bulgu, hipotiroidi indüksiyonunun tersiyer follikül sayısını da önemli ölçüde azalttığını göstermektedir.

**Tablo 4.5.** Hipotiroidi ve kontrol grubundaki ratların follikül sayımının istatistiksel olarak karşılaştırılması.

	<b>Hipotiroidi grubu (n=10) ort <math>\pm</math> S. S.</b>	<b>Kontrol grubu (n=8) ort <math>\pm</math> S. S.</b>	<b>İstatistiksel analiz <i>p</i></b>
<b>Primordial</b>	2.10 $\pm$ 0.994	2.67 $\pm$ 1.751	$p > 0.05$
<b>Primer</b>	3.00 $\pm$ 0.816	6.500 $\pm$ 0.548	$p < 0.05$
<b>Sekonder</b>	2.60 $\pm$ 1.350	9.17 $\pm$ 0.983	$p < 0.05$
<b>Tersiyer</b>	1.70 $\pm$ 0.823	7.17 $\pm$ 3.430	$p < 0.05$

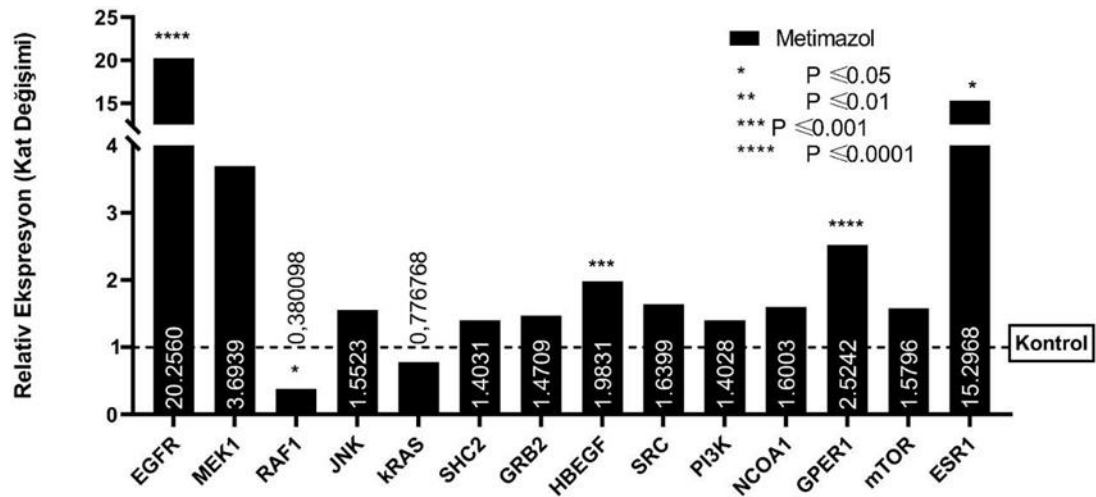
$p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı s.s.: standart sapma



**Şekil 4. 7.** Hipotiroidi ve kontrol grubundaki ratların follikül sayımının karşılaştırılması.

#### 4.10 GZ-PZR Bulguları

Metimazol verilen sıçanlarda HB-EGF, EGFR, GPER1 ve ESR1 mRNA ekspresyon düzeyleri artarken, RAF1 ekspresyonu azalmıştır (Tablo 4.8.). HB-EGF'nin artışı, progesteron üretimini ve granülosa-lutein hücrelerinin hayatta kalmasını desteklerken, RAF1'in azalması, hücresel çoğalmayı kontrol altında tutmaya yönelik bir yanıtı temsil etmektedir. Bu bulgular, hormonal dengesizlikler karşısında ovaryum fonksiyonunu korumak için vücudun telafi mekanizmalarını aktive ettiğini gösterebilir.



**Şekil 4. 8.** Metimazol indüklenmiş hipotiroidi ve kontrol grubunda GZ-PZR sonuçlarının karşılaştırması.

Yapılan GZ-PZR çalışmamızda, metimazol uygulamasının kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı değişikliklere yol açtığı genler belirlenmiştir. EGFR, metimazol grubunda 20,2560, GPER1 gen ekspresyonu 2,5242 kat artış göstermiştir ve bu artışlar son derece anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.0001$ ). HBEGF 1,9831 kat artmış ve anlamlı olarak saptanmıştır ( $p < 0.001$ ). ESR1 15,2968 kat artış göstermiş ve bu artış da anlamlı bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Tablo 4.9.). Bu bulgular, metimazol uygulamasının özellikle EGFR, HBEGF, GPER1 ve ESR1 genleri üzerinde anlamlı etkiler yarattığını göstermektedir.

RAF1 0,380098 ve KRAS 0,77678 kat kat azalırken, JNK 1,5523 kat, , SHC2 1,4031 kat, GRB2 1,4709 kat, SRC 1,16399 kat, PI3K 1,4028 kat, NCOA1 1,6003 kat ve mTOR 1,5796 kat artış göztermiştir. Ancak bu değişiklikler kontrol grubuna kıyasla anlamlı bulunmamıştır.

## 5. TARTIŞMA

Tiroid fonksiyonlarının bozulması ve buna bağılı olarak tiroid hormonu üretimindeki değişiklikler, büyüme, gelişme ve metabolizmanın temel işlevlerini etkiler. Bazal metabolizma hızı, enerji üretimi, karbonhidrat ve lipit metabolizması gibi bu süreçler üzerinde önemli değişikliklere sebep olur (Meng ve ark., 2017). Hem hipotiroidi hem de hipertiroidi, hipotalamus-hipofiz ekseninde meydana gelen mekanizmaların bozulması sonucu ortaya çıkan sağlık sorunlarıdır (Weng ve ark., 2019). Hipotiroidi, tiroid bezinin yeterli miktarda T4 ve T3 hormonları üretememesi durumudur (König ve ark., 2011). Ayrıca, tiroid hormonlarının uzun süreli düşük konsantrasyonunun, follikülogenezin bozulması, çeşitli follikül evrelerinde ve fertilizasyon oranında azalma gibi üreme sorunlarına neden olabileceğine dair önemli kanıtlar bulunmaktadır (Meng ve ark., 2017; Weng ve ark., 2019). Literatürde hipotiroidi indüksiyonunun sıçanlarda diöstrus süresini uzattığı da ortaya konmuştur (Hapon ve ark., 2003; Mattheij ve ark., 1995).

Çalışmamızda metimazol verdiğimiz sıçanların serum T3 değerlerinin anlamlı olarak düştüğü, T4 ve östrojen seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı olmasa da bir miktar düşüş olduğu gözlenmiştir. Metimazol verdiğimiz ve hipotiroidi grubu olarak adlandırdığımız bu gruptaki sıçanların vajinal smearlerinde östrus döngüsünün diöstrus fazında beklediği tespit edilmiştir. Çalışmamız bu yönüyle literatür ile paralellik göstermekte ve hipotiroidinin, özellikle üreme çağındaki dişilerde, hipofizer gonadotropin salınımını olumsuz etkileyerek, östrojen sentezinin azalmasını ve fertilité üzerinde olumsuz etkiler yaratabileceğini ortaya koymaktadır.

Dijkstra ve arkadaşları (1996) ile Silva ve arkadaşları (2004), PTU (propiltiyourasil) ile indüklenen kronik hipotiroidinin sıçanlarda over ağırlığını önemli ölçüde azalttığını, sekonder ve tersiyer folliküller ile korpus luteumun sayısını azalttığını gözlemlemişlerdir (Dijkstra ve ark., 1996; Silva ve ark., 2004). Bizim çalışmamızda primordial follikül sayısında bir değişiklik gözlemleyemedik. Primordial foliküllerde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemesi, bu foliküllerin hücre döngüsüne aktif olarak katılmamalarından

kaynaklandığını düşündürdü. Ancak, primer, sekonder ve tersiyer follikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit ettik. Korpus luteum yapısında farklılık gözlemleyemedik.

Yapılan çalışmalarda erken infantil hipotiroidi gösteren yavrularda artan sayıda primer ve sekonder follikül gözlenmiştir; bu, follikülogenez sürecinin daha hızlı gerçekleştiğini ve folliküllerin erken kaybına neden olduğunu göstermektedir (Radovanovic ve ark., 1993; Radovanovic ve ark., 2012; Reddy ve ark., 2008).

PTU ile indüklenen maternal hipotiroidi modelinde, dişi yavrularda erken follikül aktivasyonu ve bunu izleyen geç infantil, ergenlik öncesi ve ergenlik döneminde atreziler gözlemlenmiştir. Follikül ve korpus luteum sayısındaki azalma ile stromal interstisyel hücrelerin hiperplazisi ve hipertrofisi de ergenlik çağındaki sıçanların overlerinde prematür over yetmezliğine işaret etmektedir (Radovanovi'c ve ark., 2012; Danilovic ve ark., 2016). Bizim çalışmamızda hipotiroidi grubundaki sıçanların primordial follikül sayısında bir değişiklik gözlemleyemedik. Primordial foliküllerde herhangi bir değişiklik gözlemlenmemesinin nedeninin bu foliküllerin hücre döngüsüne aktif olarak katılmamalarından kaynaklandığını düşündürdü. Ancak, primer, sekonder ve tersiyer follikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit ettik. Korpus luteum yapısında farklılık gözlemleyemedik.

Çalışmamızda, metimazol ile hipotiroidi indüklenen sıçanlarda, kontrol grubuna kıyasla vücut ve ovaryum ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, hipotiroidinin metabolik ve üreme sistemleri üzerindeki etkilerini ortaya koymaktadır. Benzer bir çalışmada, hipotiroid farelerde, propiltiourasil (PTU) tedavisi vücut ağırlığı artışını durdurmuş ve serum T4 seviyelerini önemli ölçüde azaltmıştır. T3 tedavisi ise bu etkileri tersine çevirmiştir. Northernblot analizleri, PTU tedavisiyle EGF mRNA miktarının azaldığını ve T3 uygulamasıyla tekrar arttığını göstermiştir. Run-off testleri, T3'ün EGF gen transkripsiyonunu artırdığını doğrulamıştır (Shih ve ark., 2004).

Hipotiroid farelerde PTU ve T3'ün vücut ağırlığı, SMG ağırlığı ve serum T4 konsantrasyonu üzerindeki etkileri incelenmiş ve EGF mRNA düzeyleri değerlendirildiğinde, hipotiroidinin EGF mRNA miktarını azalttığı, T3 tedavisinin ise bu miktarı artırdığı gözlenmiştir. Transkripsiyonel düzeyde, T3'ün EGF gen ifadesini

artırdığı ve bu etkinin hücresele düzeyde doğrulandığı belirlenmiştir (Fujieda ve ark., 1993; Gresik ve ark., 1981).

Yapılan bir çalışmada hipotiroidi, kontrollerle karşılaştırıldığında glandüler epitelyumun kalınlaşmasını ve uterus bezlerinin füzyonunu teşvik etmiştir. Hipotiroidili tavşanlarda, endometriyumda büyük bir bağışıklık hücresi infiltrasyonu ve iltihaplanma noktaları gözlenmiştir. Kontrol grubunda miyometriyumun düzenli kas lifleri görülürken, hipotiroid grupta ayrılmış kas lifleri ve iltihaplanma noktaları etrafında daire veya oval şekilli düz kas hücresi grupları gözlemlenmiştir. Ayrıca, hipotiroidi tavşanları daha düşük T4 konsantrasyonuna ve serbest T4 indeksine sahip olma eğilimindedir ve T3 konsantrasyonlarında önemli bir azalma göstermiştir. Hipotiroidi hayvanlarda TR ekspresyonu artmış, ancak implantasyon döneminde uterus boynuzunda TR ve TSHR ekspresyonu azalmıştır (Rodríguez-Castelán ve ark., 2019).

Tiroid hormonlarının farelerde cilt, göz, böbrek ve idrardaki EGF (EGF) konsantrasyonlarını artırdığı gösterilmiştir (Lakshmanan&Perheentupa, 1986). Hipotiroidi durumunda, böbrek pro-EGF mRNA düzeylerinin tiroid hormonuna duyarlı olduğu ve EGF düzeylerinin tiroid hormonu tedavisi ile normale döndüğü bulunmuştur. Ayrıca, hipotiroid farelerde T4 enjeksiyonlarının cilt EGF konsantrasyonlarını artırdığı ve yüksek doz T4'ün, EGF seviyelerini kontrollerden anlamlı derecede farklılaştırdığı gözlemlenmiştir. T4 uygulaması, göz kapağı açılmasını hızlandırırken, hipotiroidi bu gelişimi geciktirmiştir (Hoath ve ark., 1983).

Yapılan bir diğer çalışmada hipotiroidi, tiroidektomi veya metimazol kullanımı ile indüklenmiş ve bu durumun dalak, kalp, karaciğer, akciğer ve böbrek dokuları üzerindeki etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Dalak dokusunda, tiroidektomi ile indüklenen hipotiroidinin normal dalak histolojisini etkilemediği görülmüştür. Ancak, metimazol ile indüklenen hipotiroidi, dalak yapısında bozulmalara yol açmıştır. Kalp dokusunda ise metimazol kullanımı, çizgilenme ve çekirdek kaybına neden olmuştur. Karaciğer dokusunda, metimazol ile indüklenen hipotiroidi, hepatositlerin radyal dağılımında kayıp ve hiper kromatik hücreler gibi değişikliklerle karakterizedir. Akciğer dokusunda, tüm gruplarda normal akciğer mimarisinin bozulduğu ve hücresele atrofi gözlemlendiği belirtilmiştir. Böbrek dokusunda, metimazol ile indüklenen hayvanlarda

glomerüloskleroz, ödem ve distal ile proksimal tübüllerde hücrel atrofi gözlenmiştir. Hipertiroid ve hipotiroid sıçanların yumurtalık histolojik kesitleri incelendiğinde, sağlıklı follikül sayısının kontrol sıçanlara göre önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur (Fedail ve ark., 2013).

Literatürde, tiroid hormonlarının insan oositlerinin olgunlaşmasını etkilediği ve bu hormonların reseptörlerinin mural granüloz hücrelerinde ve olgun oositlerde bulunduğu gösterilmiştir (Vissenberg ve ark., 2015; Xie ve ark., 2010). Ayrıca, tiroid hormonlarının üretimini düzenleyen enzimlerin granüloza hücrelerinde bulunduğu ve folliküler sıvıda tiroid hormonları ve reseptörlerinin varlığının, follikülogenez ve ovulasyon süreçlerinde önemli bir rol oynayabileceği öne sürülmektedir (Colicchia ve ark., 2014; Rosales ve ark., 2020). Çalışmamızda da, hematoksilen eozin ile boyanmış kesitlerde, ovaryumun normal fonksiyonlarını bozduğu gözlemlenmiştir. Patolojik değişiklikler arasında follikül gelişimindeki anomaliler, granüloza hücrelerinde düzensizlikler ve piknotik çekirdekler, oosit yapısındaki bozulmalar ve zona pellusida tabakasındaki düzensizlikler yer almaktadır. Bu bulgular, hipotiroidinin ovarium fonksiyonlarını olumsuz yönde etkileyerek, dokuların normal işlevlerini yerine getirmekte zorlanmalarına ve dolayısıyla ovarium sağlığı ile üreme kapasitesine zarar verebileceğini düşündürmektedir.

Ötiroid ve hafif hipotiroid farelerin meme bezlerinden hazırlanan membranlarda yapılan analizlerde, hipotiroid farelerde EGF bağlanma düzeyinin, ötiroid farelere göre %35-50 daha düşük olduğu bulunmuştur. Hem ötiroid hem de hipotiroid farelere T4 tedavisi uygulandığında, hipotiroid dokularındaki reseptör düzeyleri ötiroid seviyelerine dönmüş, ötiroid farelerde ise bir değişiklik gözlenmemiştir. Ayrıca, hipotiroid farelerin karaciğer membranlarındaki EGF bağlanma düzeyi, ötiroid kontrollerin yalnızca %25-50'si kadar olmuştur (Lin ve ark., 2011).

İmmünohistokimyasal boyamalar, EGFR'nin hücre membranlarında yoğunlaştığını ve hipotiroidinin EGFR ekspresyonu üzerinde olumsuz etkiler yarattığını ortaya koymaktadır. Ketani ve arkadaşlarının (2004) çalışmasında, EGFR ekspresyonunun kontrol gruplarında granüloza hücrelerinde yüksek olduğu, ancak hipotiroidi ile ilişkili sıçanlarda EGFR seviyelerinin belirgin bir şekilde azaldığı



gözlemlenmiştir. Sialoadenektomi uygulanan sıçanlarda, granüloza hücrelerinde yalnızca hafif boyama görülürken, kontrol grubunda granüloza hücrelerinde güçlü boyama tespit edilmiştir (Ketani ve ark., 2004). Bizim immünohistokimyasal analizlerimizin sonucunda hipotiroidili sıçanların ovaryum kesitlerinde oositlerde ve granüloza hücrelerinde, EGFR ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. Ayrıca, oosit yapılarında değişiklikler tespit edilmiştir. Bu bulgularımız, hipotiroidinin ovaryum fonksiyonları üzerinde geniş kapsamlı olumsuz etkilere sahip olabileceğini göstermektedir. EGFR konsantrasyonu ve EGF bağlanma düzeylerinin azaldığı ve epitel hücre mitojenlerinin çoğalmasının baskılanabileceğini düşündürmektedir. Bu durum, hücrel proliferasyonun azalmasına ve doku fonksiyonlarının bozulmasına katkıda bulunabilir.

Koyunlarda yapılan çalışmada, EGF infüzyonunun dolaşan T4 ve T3 düzeylerinde azalmaya neden olduğu tespit edilmiştir. Bu bulgular, EGF'nin tiroid hormonu üretimi ve eylemi üzerindeki negatif etkisinin, tiroid hormonları tarafından uyarılan EGF salınımını dengeleyen bir geri bildirim kontrol mekanizması olabileceğini göstermektedir. Bu sonuçlar, tiroid hormonlarının EGF reseptörleri üzerindeki düzenleyici rolünü vurgulamaktadır (Kung ve ark., 1992).

HB-EGF'nin (Heparin Bağlayıcı EGF) yukarı düzenlenmesi, çoğalma ve farklılaşma dahil olmak üzere çeşitli hücrel süreçlerde kritik bir rol oynadığı gösterildiğinden özellikle dikkat çekicidir. Ovaryum fonksiyonu bağlamında, HB-EGF'nin granüloza-lutein hücrelerinde ERK1/2 sinyal yolu aracılığıyla progesteron üretimini teşvik etmede ve steroidojenik akut düzenleyici proteinin (StAR) ekspresyonunu artırmada rol oynadığı gösterilmiştir (Cheng ve ark., 2021). Bu durum, hormonal dengenin bozulduğu hipotiroidi koşullarında, ovaryumun HB-EGF ekspresyonunu artırarak vücut fonksiyonlarını desteklemeye ve üreme sağlığını korumaya yönelik bir mekanizma olabileceğini düşündürmektedir.

EGF reseptörünün HB-EGF tarafından aktive edildiği ve hücrenin hayatta kalmasını ve çoğalmasını destekleyen bir sinyalleme dizisine yol açtığı bilinmektedir. EGFR ifadesinin genellikle hormonal değişiklikler dahil olmak üzere çeşitli stres faktörlerine yanıt olarak yukarı düzenlendiğini görülmüştür. EGFR sinyal yollarının aktivasyonu, ayrıca ovaryum hücrelerinin çoğalmasını artırabilir ve bu, hipotiroidide

azalan tiroid hormonu seviyelerini dengelemeye yönelik bir telafi mekanizması olarak işlev görebilir. Gper1 (G proteinine bağlı östrojen reseptörü 1) ve esr1'in de (östrojen reseptörü 1) yukarı düzenlenmesi, ovaryumlarda telafi edici mekanizmalar kavramını daha da desteklemektedir. Östrojen sinyallemesi, ovaryum fonksiyonunun sürdürülmesi için çok önemlidir ve reseptörleri genellikle tiroid disfonksiyonunun neden olduğu değişiklikler de dahil olmak üzere hormonal seviyelerdeki değişikliklere yanıt olarak yukarı düzenlenir (Hsieh ve ark., 2007). Bu, ovaryumların östrojen reseptörlerinin ekspresyonunu artırarak mevcut östrojene duyarlılığı artırabileceğini ve böylece hipotiroid koşullarına rağmen normal fizyolojik işlevleri sürdürmeye çalışabileceğini göstermektedir.

RAF1 (Hızlı hızlandırılmış fibrosarkoma 1), genellikle büyüme faktörlerine yanıt olarak aktive edilen, hücre çoğalması ve hayatta kalması için çok önemli olan MAPK/ERK sinyal yolunun temel bir bileşenidir (Wu ve ark., 2021). Bizim çalışmamızda RAF1'in aşağı düzenlenmesi ilgi çekicidir. RAF1'in aşağı düzenlenmesi hipotiroidide hormonal sinyallemenin tehlikeye girdiği bir durumda aşırı hücre büyümesini önlemek için adaptif bir yanıtı yansıtabilir. Sıçanlarda RAF1'in aşağı düzenlenmesi, hücresel çoğalma için azalmış bir kapasiteyi veya tiroid hormonu eksikliği bağlamında çoğalmadan ziyade hayatta kalmaya öncelik veren sinyal yollarında bir değişimi gösterebilir.

Hipotiroid farelerin karaciğer membranlarındaki EGF bağlanma düzeyi, ötiroid kontrollerin yalnızca %25-50'si kadardır. Hipotiroidide, tiroid hormonlarının EGF reseptör düzeylerini negatif yönde etkilemiş ve tiroid hormonlarının EGF gen ifadesini transkripsiyonel düzeyde düzenlediği bildirilmiştir. T3 tedavisi, EGF mRNA seviyelerini artırmış ve hücre proliferasyonunda iyileşmeye yol açmıştır (Lin ve ark., 2011)

EGFR aşırı ekspresyonunun, HRas, RAF1, MEK2 gibi ERK1/2 sinyal yolunda yer alan genlerin yanı sıra c-Myc gibi aşağı akım genlerin ekspresyonunu artırdığı gösterilmiştir. Araştırmalar, E2F4'ün EGFR ekspresyonunu ve granüloza hücre proliferasyonunu ERK1/2 yolu aracılığıyla teşvik ettiğini ortaya koymaktadır (Wu ve ark., 2019).

Hipotiroidinin beyin gelişimi üzerindeki etkileri incelendiğinde, farelerde EGFR ekspresyonunun geciktiği ve özellikle granül hücre tabakasında (EGL) EGFR-IR hücre oranının düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu durum, hücre göçünde gecikmelere ve hücre bağlantılarının bozulmasına neden olarak purkinje hücrelerinin gelişimini olumsuz etkilemektedir (Carrasco ve ark., 2003). Öte yandan, hipotiroidi tükürük bezlerinde EGF sentezini azaltarak dolaşımdaki EGF seviyelerini düşürebilmektedir (Walker ve ark., 1982). Cilt homojenlerinde de EGF seviyelerinin azaldığı ve tiroid hormonlarının eksikliğinin çeşitli doku ve organlarda hücre fonksiyonları bozduğu bildirilmiştir (Hoath ve ark., 1983; Mukku, 1984).

Böbreklerde ise tiroid hormonları EGF üretimini düzenlemekte önemli bir rol oynar. T3 hormonu enjeksiyonu, hipofizektomize farelerin böbreklerinde EGF seviyelerini artırmakta ve ekstrakte edilebilir olgun EGF, EGF prekürsör proteini ve EGF mRNA seviyelerinde yükselmeye yol açmaktadır. Bu durum, böbrek sağlığı ve fonksiyonları üzerinde olumlu bir etki yaratmaktadır (Rogers ve ark., 1995). Over dokusunda da EGFR ifadesi kritik öneme sahiptir; tiroid hormonu EGF gen ekspresyonunu artırarak hücre sağ kalımı ve farklılaşmasını düzenlemekte ve bu süreçte çeşitli sinyal yollarını aktive etmektedir (Garnett ve ark., 2002).

EGFR hücre büyümesini ve proliferasyonunu teşvik eder, hücre farklılaşmasını düzenler, apoptoz sürecini kontrol eder ve doku yenilenmesini hızlandırır. Ayrıca, tümör büyümesi ve metastaz süreçlerine katkıda bulunabileceği belirtilmektedir. Tiroid hormonları, biyolojik süreçlerde kritik rol oynayan EGF gen ifadesini ve EGFR seviyelerini düzenleyerek çeşitli önemli fonksiyonları etkiler. Bu fonksiyonlar arasında hücre homeostaz, nöro-gelişimsel süreçler, enerji metabolizması, termoregülasyon ve doku yenilenmesi bulunur. Aynı zamanda, üreme sistemlerinin düzenlenmesinde de kritik bir rol oynar; follikül gelişimi, ovülasyon, spermatogenez gibi süreçleri kontrol eder. Hipotiroidi durumunda, tiroid hormonlarının eksikliği bu düzenleyici işlevleri bozar ve hem üreme sistemleri hem de diğer sistemler üzerinde çeşitli olumsuz etkilere yol açabilir. Tiroid hormonlarının eksikliği follikül gelişimini ve oosit morfolojisi üzerindeki etkilerini, oosit ve granüloza hücrelerinin proliferasyonunu ve apoptotik süreçlerini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu bulgular, tiroid hormonlarının üreme sistemi üzerindeki etkilerini daha iyi anlamamıza yardımcı olmakta ve hipotiroidinin ovaryum fonksiyonları üzerindeki zararlı etkilerini ortaya koymaktadır. Gelecekteki araştırmalar,

bu süreçlerin moleküler mekanizmalarını daha ayrıntılı olarak inceleyerek, tiroid hormonlarının ve EGF faktörünün üreme sağlığı üzerindeki etkilerini daha kapsamlı bir şekilde ortaya koyabilir.

## 6. SONUÇ

Yapılan literatür taraması sonucunda, çalışmamız hipotiroidinin hem ovaryum hem de ovaryumdaki EGFR üzerindeki etkilerini araştıran mevcut çalışmalara kıyasla bir öncülük teşkil etmektedir. Sonuç olarak, yaptığımız çalışmada hipotiroidinin sıçan ovaryumları ve EGFR üzerindeki etkilerinin belirlenmesinde önemli bir adım atılmıştır. Bu bulgular, hipotiroidinin follikül gelişimi, oosit kalitesi ve ovaryumdaki EGFR ekspresyonu üzerinde olumsuz etkiler yarattığını ve bu etkileşimlerin hormon düzeyleri ile uyumlu olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak yaptığımız çalışmada:

1. Hipotiroidili grupta, kontrol grubuna kıyasla follikül sayısında, sıçan ağırlıklarında ve ovaryum ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlemledik.
2. Histolojik incelemelerde, granüloza hücrelerinde piknotik çekirdekler, oosit yapısında bozulmalar ve zona pellusida tabakasında düzensizlikler tespit ettik. Ayrıca, oosit sitoplazmasında vakuolizasyonlar ve atretik oosit özellikleri belirledik.
3. Korpus luteumun yapısının normal olduğu ve bağ dokuda herhangi bir anormal bulguya rastlanmadığını saptadık.
4. İmmün boyama sonuçlarında, granüloza hücrelerinde EGF reseptörünün yoğunluğunun azaldığını gözlemledik.
5. Hipotiroidi grubu sıçanlarında HB-EGF, EGFR, GPER1 ve ESR1 ve RAF1'in mRNA ekspresyon düzeylerinde gözlemlenen değişiklikler, hormonal dengesizlik karşısında ovaryum fonksiyonunu ve hücrel homeostazisi korumayı amaçlayan kompanse edici mekanizmaların karmaşık bir etkileşimini göstermektedir. RAF1'in aşağı regülasyonu stres koşulları altında kontrolsüz çoğalmayı önlemek için gerekli bir ayarlamayı yansıtabilir.

Sonuç olarak, 10 mg/kg dozunda, 30 gün içme suyuna verilen metimazol kaynaklı hipotiroidi, Wistar yetişkin dişi sıçanlarda ovaryum ve follikül hasarının gelişmesine neden olmuştur. EGFR ekspresyonunu azaltmıştır.

## 7. KAYNAKÇA

- Abalovich, M., Mitelberg, L., Allami, C., Gutierrez, S., Alcaraz, G., Otero, P., & Levalle, O. (2007). Subclinical hypothyroidism and thyroid autoimmunity in women with infertility. *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 23(5), 279-283. <https://doi.org/10.1080/09513590701259542>
- Abdollahi, A., Gruver, B. N., Patriotis, C., & Hamilton, T. C. (2003). Identification of epidermal growth factor-responsive genes in normal rat ovarian surface epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(1), 188-197. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(03\)01140-9](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(03)01140-9)
- Arrangoiz, R., Cordera, F., Caba, D., Muñoz, M., Moreno, E., & De León, E. L. (2018). Comprehensive Review of Thyroid Embryology, Anatomy, Histology, and Physiology for Surgeons. *International Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery*, 07(04), 160-188. <https://doi.org/10.4236/ijohns.2018.74019>
- Alvarado, S., Rajakumar, R., Abouheif, E., & Szyf, M. (2015). Epigenetic variation in the Egfr gene generates quantitative variation in a complex trait in ants. *Nature Communications*, 6, 6513. <https://doi.org/10.1038/ncomms7513>
- Boas, M., Feldt-Rasmussen, U., & Main, K. M. (2011). Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 355(2), 240-248. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.005>
- Bower, J. M., Cambie, R., Gregory, H., Gerring, E. I. & Willshire, I. R. (1975). The inhibition of gastric acid secretion by epidermal growth factor. *Experientia* 32,825-826.
- Brandt, B., Meyer-Staekling, S., Schmidt, H., Agelopoulos, K., & Buerger, H. (2006). Mechanisms of egfr gene transcription modulation: Relationship to cancer risk and therapy response. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(24), 7252-7260. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-0626>
- Brent, G. (1997). Thyroid hormones (T4, T3). P. M. Conn & S. Melmed, *Endocrinology: Basic and Clinical Principles*.
- Brookes, P. S., Buckingham, J. A., Tenreiro, A. M., Hulbert, A. J., & Brand, M. D. (1998). The proton permeability of the inner membrane of liver mitochondria from ectothermic and endothermic vertebrates and from obese rats: Correlations with standard metabolic rate and phospholipid fatty acid composition. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*, 119(2), 325-334. [https://doi.org/10.1016/s0305-0491\(97\)00357-x](https://doi.org/10.1016/s0305-0491(97)00357-x)
- Burger, H. G., & Patel, Y. C. (1977). Thyrotrophin releasing hormone—TSH. *Clinics in Endocrinology and Metabolism*, 6(1), 83-100. [https://doi.org/10.1016/S0300-595X\(77\)80057-1](https://doi.org/10.1016/S0300-595X(77)80057-1)
- Bullock, L. P., Barthe, P. L., Mowszowicz, I., Orth, D. N., & Bardin, C. W. (1975). The effect of progestins on submaxillary gland epidermal growth factor: Demonstration of androgenic, synandrogenic and antiandrogenic actions. *Endocrinology*, 97(1), 189-195. <https://doi.org/10.1210/endo-97-1-189>

- Byyny, R. L., Orth, D. N., & Cohen, S. (1972). Radioimmunoassay of Epidermal Growth Factor. *Endocrinology*, *90*(5), 1261-1266. <https://doi.org/10.1210/endo-90-5-1261>
- Canipari, R., Mangialardo, C., Di Paolo, V., Alfei, F., Ucci, S., Russi, V., Santaguida, M. G., Virili, C., Segni, M., Misiti, S., Centanni, M., & Verga Falzacappa, C. (2018). Thyroid hormones act as mitogenic and pro survival factors in rat ovarian follicles. *Journal of Endocrinological Investigation*, *42*(3), 271-282. <https://doi.org/10.1007/s40618-018-0912-2>
- Cano-Europa G. E., Blas-Valdivia, V., Franco-Colin, M., Gallardo-Casas, C. A., & Ortiz-Butrón, R. (2011). Methimazole-induced hypothyroidism causes cellular damage in the spleen, heart, liver, lung and kidney. *Acta Histochemica*, *113*(1), 1-5. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.07.004>
- Carrasco, E., Blum, M., Weickert, C. S., & Casper, D. (2003). Epidermal growth factor receptor expression is related to post-mitotic events in cerebellar development: Regulation by thyroid hormone. *Brain Research. Developmental Brain Research*, *140*(1), 1-13. [https://doi.org/10.1016/s0165-3806\(02\)00539-4](https://doi.org/10.1016/s0165-3806(02)00539-4)
- Caturegli, P., De Remigis, A., & Rose, N. R. (2014). Hashimoto thyroiditis: Clinical and diagnostic criteria. *Autoimmunity Reviews*, *13*(4-5), 391-397. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.01.007>
- Cecconi, S., Rossi, G., Coticchio, G., Macchiarelli, G., Borini, A., & Canipari, R. (2004). Influence of thyroid hormone on mouse preantral follicle development in vitro. *Fertility and Sterility*, *81 Suppl 1*, 919-924. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.11.014>
- Cheng, J., Han, X., Meng, Q., Guo, Y., Zhang, B., Song, T., ... & Sun, Y. (2021). HB-EGF upregulates star expression and stimulates progesterone production through erk1/2 signaling in human granulosa-lutein cells. *Cell Communication and Signaling*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00983-4>
- Cheng, S.-Y., Leonard, J. L., & Davis, P. J. (2010). Molecular aspects of thyroid hormone actions. *Endocrine Reviews*, *31*(2), 139-170. <https://doi.org/10.1210/er.2009-0007>
- Colicchia, M., Campagnolo, L., Baldini, E., Ulisse, S., Valensise, H., & Moretti, C. (2014). Molecular basis of thyrotropin and thyroid hormone action during implantation and early development. *Human Reproduction Update*, *20*(6), 884-904. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmu028>
- Conti, M., Hsieh, M., Park, J.-Y., & Su, Y.-Q. (2006). Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *20*(4), 715-723. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0185>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, *43*(6), 776-793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- Corcoran, J. M., Waters, M. J., Eastman, C. J., & Jorgensen, G. (1986). Epidermal growth factor: Effect on circulating thyroid hormone levels in sheep. *Endocrinology*, *119*(1), 214-217. <https://doi.org/10.1210/endo-119-1-214>
- Danilović Luković, J., Korać, A., Milošević, I., Lužajić, T., Puškaš, N., Kovačević Filipović, M., & Radovanović, A. (2016). Altered state of primordial follicles in neonatal and early infantile rats due to maternal hypothyroidism: Light and electron microscopy approach. *Micron (Oxford, England: 1993)*, *90*, 33-42. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2016.08.007>
- Dijkstra, G., de Rooij, D. G., de Jong, F. H., & van den Hurk, R. (1996). Effect of hypothyroidism on ovarian follicular development, granulosa cell proliferation and peripheral hormone levels in the prepubertal rat. *European Journal of Endocrinology*, *134*(5), 649-654.

- <https://doi.org/10.1530/eje.0.1340649>
- Downs, S. M., & Chen, J. (2008). EGF-like peptides mediate FSH-induced maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 75(1), 105-114. <https://doi.org/10.1002/mrd.20781>
- Eitsuka, T., Tatewaki, N., Nishida, H., Nakagawa, K., & Miyazawa, T. (2016). Synergistic Anticancer Effect of Tocotrienol Combined with Chemotherapeutic Agents or Dietary Components: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(10), 1605. <https://doi.org/10.3390/ijms17101605>
- Ekstrand, A. J., Sugawa, N., James, C. D., & Collins, V. P. (1992). Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(10), 4309-4313. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.10.4309>
- Eroschenko, V. P. (2013). diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations (11th ed.). Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Fedail, J. S., Zheng, K., Wei, Q., Kong, L., & Shi, F. (2013). Roles of thyroid hormones in follicular development in the ovary of neonatal and immature rats. *Endocrine*, 46(3), 594-604. <https://doi.org/10.1007/s12020-013-0092-y>
- Fisher, D. A., & Lakshmanan, J. (1990). Metabolism and effects of epidermal growth factor and related growth factors in mammals. *Endocrine Reviews*, 11(3), 418-442. <https://doi.org/10.1210/edrv-11-3-418>
- Forrest, D., & Visser, T. J. (2013). Thyroid hormone signaling. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1830(7), 3859. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.03.001>
- Fox, S. I. (2011). *Human physiology* (12th ed.). McGraw-Hill.
- Franciosi, F., Manandhar, S., & Conti, M. (2016). FSH Regulates mRNA Translation in Mouse Oocytes and Promotes Developmental Competence. *Endocrinology*, 157(2), 872-882. <https://doi.org/10.1210/en.2015-1727>
- Frare, C., Williams, C. T., & Drew, K. L. (2021). Thermoregulation in hibernating mammals: The role of the “thyroid hormones system”. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 519, 111054. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111054>
- Fujieda, M., Murata, Y., Hayashi, H., Kambe, F., Matsui, N., & Seo, H. (1993). Effect of thyroid hormone on epidermal growth factor gene expression in mouse submandibular gland. *Endocrinology*, 132(1), 121-125. <https://doi.org/10.1210/endo.132.1.8419117>
- Galloway, C. A., & Yoon, Y. (2013). Mitochondrial morphology in metabolic diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(4), 415-430. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4779>
- Garnett, K., Wang, J., & Roy, S. K. (2002). Spatiotemporal expression of epidermal growth factor receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: Follicle stage-specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. *Biology of Reproduction*, 67(5), 1593-1604. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.005470>
- Gilbert, L.I., Frieden, E., (1981). *Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology*. Plenum Press, New York and London.
- Gilchrist, R. B., Ritter, L. J., & Armstrong, D. T. (2004). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animal Reproduction Science*, 82-83, 431-446. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.017>
- Greenspan, F. S., & Gardner, D. G. (2021). *Basic and clinical endocrinology* (11th ed.). McGraw-Hill Education.
- Gresik EW, Schenkein I, van der Noen H, Barka T 1981 Hormonal regulation of epidermal growth factor and protease in the submandibular gland of adult mouse. *Endocrinology*



109:924-929

- Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2021). *Guyton and Hall textbook of medical physiology* (14th ed.). Elsevier.
- Hapon, M. B., Gamarra-Luques, C., & Jahn, G. A. (2010). Short term hypothyroidism affects ovarian function in the cycling rat. *Reproductive Biology and Endocrinology: RB&E*, 8, 14. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-8-14>
- Hapon, M. B., Simoncini, M., Via, G., & Jahn, G. A. (2003). Effect of hypothyroidism on hormone profiles in virgin, pregnant and lactating rats, and on lactation. *Reproduction*, 126(3), 371–382.
- Harper, M.-E., & Seifert, E. L. (2008). Thyroid Hormone Effects on Mitochondrial Energetics. *Thyroid*, 18(2), 145-156. <https://doi.org/10.1089/thy.2007.0250>
- Hatsuta, M., Tamura, K., Shimizu, Y., Toda, K., & Kogo, H. (2004). Effect of thyroid hormone on CYP19 expression in ovarian granulosa cells from gonadotropin-treated immature rats. *Journal of Pharmacological Sciences*, 94(4), 420-425. <https://doi.org/10.1254/jphs.94.420>
- Haugen, B. R., Alexander, E. K., Bible, K. C., Doherty, G. M., Mandel, S. J., Nikiforov, Y. E., Pacini, F., Randolph, G. W., Sawka, A. M., Schlumberger, M., Schuff, K. G., Sherman, S. I., Sosa, J. A., Steward, D. L., Tuttle, R. M., & Wartofsky, L. (2016). 2015 American Thyroid Association Management Guidelines for Adult Patients with Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer: The American Thyroid Association Guidelines Task Force on Thyroid Nodules and Differentiated Thyroid Cancer. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 26(1), 1-133. <https://doi.org/10.1089/thy.2015.0020>
- Hoath, S. B., Lakshmanan, J., Scott, S. M., & Fisher, D. A. (1983). Effect of thyroid hormones on epidermal growth factor concentration in neonatal mouse skin. *Endocrinology*, 112(1), 308-314. <https://doi.org/10.1210/endo-112-1-308>
- Holsberger, D. R., Jirawatnotai, S., Kiyokawa, H., & Cooke, P. S. (2003). Thyroid hormone regulates the cell cycle inhibitor p27Kip1 in postnatal murine Sertoli cells. *Endocrinology*, 144(9), 3732-3738. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0389>
- Holzer, G., & Laudet, V. (2015). Thyroid hormones: A triple-edged sword for life history transitions. *Current Biology: CB*, 25(8), R344-347. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.02.026>
- Hsieh, M., Lee, D., Panigone, S., Horner, K., Chen, R., Theologis, A., ... & Conti, M. (2007). Luteinizing hormone-dependent activation of the epidermal growth factor network is essential for ovulation. *Molecular and Cellular Biology*, 27(5), 1914-1924. <https://doi.org/10.1128/mcb.01919-06>
- Humphries, H., Mac Neil, S., Munro, D. S., & Tomlinson, S. (1984). Interaction of epidermal growth factor with receptors on human and porcine thyroid membranes. *The Journal of Endocrinology*, 102(1), 57-61. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1020057>
- Hynes, N. E., & Lane, H. A. (2005). ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews. Cancer*, 5(5), 341-354. <https://doi.org/10.1038/nrc1609>
- Jamnongjit, M., Gill, A., & Hammes, S. R. (2005). Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(45), 16257-16262. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508521102>
- Jereczek-Fossa, B. A., Alterio, D., Jassem, J., Gibelli, B., Tradati, N., & Orecchia, R. (2004). Radiotherapy-induced thyroid disorders. *Cancer Treatment Reviews*, 30(4), 369-384. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2003.12.003>

- Jonklaas, J. (2022). Optimal Thyroid Hormone Replacement. *Endocrine Reviews*, 43(2), 366-404. <https://doi.org/10.1210/endrev/bnab031>
- Kabodmehri, R., Sharami, S. H., Sorouri, Z. Z., Gashti, N. G., Milani, F., Chaypaz, Z., & Ghalandari, M. (2021). The relationship between thyroid function and ovarian reserve: A prospective cross-sectional study. *Thyroid Research*, 14(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s13044-021-00112-2>
- Kasayama, S., Yoshimura, M., & Oka, T. (1989). The regulation by thyroid hormones and androgen of epidermal growth factor synthesis in the submandibular gland and its plasma concentrations in mice. *The Journal of Endocrinology*, 121(2), 269-275. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1210269>
- Kasper, D. L., Fauci, A. S., Hauser, S. L., Longo, D. L., Jameson, J. L., & Loscalzo, J. (2018). Harrison's principles of internal medicine (20th ed.). McGraw-Hill Education. (Principles of Medical Biochemistry" - Gerhard Meisenberg, William H. Simmon)
- Ketani, M., Kaloğlu, C., Ketani, Ş., & Uysal, E. (2004). Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Immunolocalization in the Sialoadenectomized Rat Ovaries. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 18(2), 135-140. <https://doi.org/10.1080/13102818.2004.10817101>
- Kobayashi, N., Orisaka, M., Cao, M., Kotsuji, F., Leader, A., Sakuragi, N., & Tsang, B. K. (2009). Growth differentiation factor-9 mediates follicle-stimulating hormone-thyroid hormone interaction in the regulation of rat preantral follicular development. *Endocrinology*, 150(12), 5566-5574. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0262>
- König, F., Andersson, M., Hotz, K., Aeberli, I., & Zimmermann, M. B. (2011). Ten repeat collections for urinary iodine from spot samples or 24-hour samples are needed to reliably estimate individual iodine status in women. *The Journal of Nutrition*, 141(11), 2049-2054. <https://doi.org/10.3945/jn.111.144071>
- Kratzsch, J., & Pulzer, F. (2008). Thyroid gland development and defects. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 22(1), 57-75. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2007.08.006>
- Kung, A. W., Hui, W. M., & Ng, E. S. (1992). Serum and plasma epidermal growth factor in thyroid disorders. *Acta Endocrinologica*, 127(1), 52-57. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1270052>
- Lakshmanan, J., & Perheentupa, J. (1986). Reduced urinary epidermal growth factor levels in Snell dwarf mutant mice. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*, 112(4), 461.
- Laurberg, P., Andersen, S., & Karmisholt, J. (2005). Cold adaptation and thyroid hormone metabolism. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones Et Metabolisme*, 37(9), 545-549. <https://doi.org/10.1055/s-2005-870420>
- Leibl, S., Bodo, K., Gogg-Kammerer, M., Hrzjenjak, A., Petru, E., Winter, R., Denk, H., & Moifar, F. (2006). Ovarian granulosa cell tumors frequently express EGFR (Her-1), Her-3, and Her-4: An immunohistochemical study. *Gynecologic Oncology*, 101(1), 18-23. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.10.009>
- Lemmon, M. A., & Schlessinger, J. (2010). Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, 141(7), 1117-1134. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.011>
- Lin, J., Jia, Y., & Zhang, C. (2011). Effect of epidermal growth factor on follicle-stimulating hormone-induced proliferation of granulosa cells from chicken prehierarchical follicles. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 12(11), 875-883. <https://doi.org/10.1631/jzus.B1100023>
- Little, A. G., Kunisue, T., Kannan, K., & Seebacher, F. (2013). Thyroid hormone actions are temperature-specific and regulate thermal acclimation in zebrafish (*Danio rerio*). *BMC Biology*, 11, 26. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-11-26>

- López, M., Alvarez, C. V., Nogueiras, R., & Diéguez, C. (2013). Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. *Trends in Molecular Medicine*, 19(7), 418-427. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.04.004>
- Lopez-Gines, C., Gil-Benso, R., Ferrer-Luna, R., Benito, R., Serna, E., Gonzalez-Darder, J., Quilis, V., Monleon, D., Celda, B., & Cerdá-Nicolas, M. (2010). New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 23(6), 856-865. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2010.62>
- MacDonald, A., Herbison, G. P., Showell, M., & Farquhar, C. M. (2010). The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: A systematic review with meta-analysis. *Human reproduction update*, 16(3), 293-311.
- Makker, A., Goel, M. M., Das, V., & Agarwal, A. (2012). PI3K-Akt-mTOR and MAPK signaling pathways in polycystic ovarian syndrome, uterine leiomyomas and endometriosis: An update. *Gynecological Endocrinology*, 28(3), 175-181. <https://doi.org/10.3109/09513590.2011.583955>
- Manzon, R. G., & Manzon, L. A. (2017). Lamprey metamorphosis: Thyroid hormone signaling in a basal vertebrate. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 459, 28-42. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.06.015>
- Martinez, R., & Gomes, F. C. A. (2002). Neuritogenesis induced by thyroid hormone-treated astrocytes is mediated by epidermal growth factor/mitogen-activated protein kinase-phosphatidylinositol 3-kinase pathways and involves modulation of extracellular matrix proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 49311-49318. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209284200>
- Mattheij J. A. M., Swarts, J. J. M., Lokerse, P., Van Kampen, J. T., & Van der Heide, D. (1995). Effect of hypothyroidism on the pituitary-gonadal axis in the adult female rat. *Journal of Endocrinology*, 146(1), 87-94.
- McNabb, A., 2000. Thyroids. In: Sturkie's Avian Physiology, fifth ed. Academic Press, London, UK.
- Méndez-Tepepa, M., Zepeda-Pérez, D., Espindola-Lozano, M., Rodríguez-Castelán, J., Arroyo-Helguera, O., Pacheco, P., Nicolás-Toledo, L., & Cuevas-Romero, E. (2020). Hypothyroidism modifies differentially the content of lipids and glycogen, lipid receptors, and intraepithelial lymphocytes among oviductal regions of rabbits. *Reproductive Biology*, 20(2), 247-253. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.02.004>.
- Mense, M. G., & Boorman, G. A. (2018). Thyroid Gland. İçinde *Boorman's Pathology of the Rat* (ss. 669-686). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391448-4.00034-4>.
- Meisenberg, G., & Simmons, W. H. (2016). Principles of medical biochemistry (4th ed.). Elsevier.
- Meng, L., Rijntjes, E., Swarts, H. J. M., Keijer, J., & Teerds, K. J. (2017). Prolonged hypothyroidism severely reduces ovarian follicular reserve in adult rats. *Journal of Ovarian Research*, 10(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13048-017-0314-7>
- Mitsudomi, T., & Yatabe, Y. (2010). Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *The FEBS Journal*, 277(2), 301-308. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07448.x>
- Monteleone, P., Faviana, P., & Artini, P. G. (2017). Thyroid peroxidase identified in human granulosa cells: Another piece to the thyroid-ovary puzzle? *Gynecological Endocrinology: The Official Journal of the International Society of Gynecological Endocrinology*, 33(7), 574-576. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1296424>
- Moore, K. L., & Persaud, T. V. N. (2022). Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi (2. Baskı). *H. Dalçık, M. Yıldırım (Çev.). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri.*

- Moreno-Cuevas, J., & Khan-Dawood, F. S. (1997). Epidermal growth factor receptors in rat ovarian tissue. *Tissue & Cell*, 29(1), 55-62. [https://doi.org/10.1016/s0040-8166\(97\)80072-9](https://doi.org/10.1016/s0040-8166(97)80072-9)
- Mukku, V. R. (1984). Regulation of epidermal growth factor receptor levels by thyroid hormone. *The Journal of Biological Chemistry*, 259(10), 6543-6547.p
- Nilsson, M., & Fagman, H. (2017a). Development of the thyroid gland. *Development*, 144(12), 2123-2140. <https://doi.org/10.1242/dev.145615>
- Oren, R., Dotan, I., Papa, M., Marravi, Y., Aeed, H., Barg, J., Zeidel, L., Bruck, R., & Halpern, Z. (1996). Inhibition of experimentally induced cirrhosis in rats by hypothyroidism. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 24(2419-423). <https://doi.org/10.1053/jhep.1996.v24.pm0008690414>
- Ortega, E., Rodriguez, E., Ruiz, E., & Osorio, C. (1990). Activity of the hypothalamo-pituitary ovarian axis in hypothyroid rats with or without triiodothyronine replacement. *Life Sciences*, 46(6), 391-395. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(90\)90081-2](https://doi.org/10.1016/0024-3205(90)90081-2)
- Ozawa, S., Sheflin, L. G., & Spaulding, S. W. (1991). Thyroxine increases epidermal growth factor levels in the mouse thyroid in vivo. *Endocrinology*, 128(3),1396-1403. <https://doi.org/10.1210/endo-128-3-1396>
- Özdamar, S., & Çetin Sorkun, H. (2002). *Genel embriyoloji*. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları No: 69.
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., Singh, B., Heelan, R., Rusch, V., Fulton, L., Mardis, E., Kupfer, D., Wilson, R., Kris, M., & Varmus, H. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13306-13311. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405220101>
- Persani, L. (2012). Clinical review: Central hypothyroidism: pathogenic, diagnostic, and therapeutic challenges. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(9), 3068-3078. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-1616>
- Radovanovic, ´A., Roksandic, ´D., Simi ´c, ´M., Markovic, ´D., Gledic, ´D., 2012. Effects of induced maternal hypothyroidism on the ovarian development of offspring rats. *Acta Vet.- Beograd*. 62 (5–6), 483–493, <http://dx.doi.org/10.2298/ AVB1206483R>.
- Radovanovic, A., 1993. Effect of maternal hypothyroidism and perinatal hypothyroidism on juvenile rats ovaries. MSc thesis. Faculty of Veterinary medicine, University of Belgrade.
- Rao, J. N., Liang, J. Y., Chakraborti, P., & Feng, P. (2003). Effect of thyroid hormone on the development and gene expression of hormone receptors in rat testes in vivo. *Journal of Endocrinological Investigation*, 26(5), 435-443. <https://doi.org/10.1007/BF03345199>
- Rawlings, J. S., Rosler, K. M., & Harrison, D. A. (2004). The JAK/STAT signaling pathway. *Journal of Cell Science*, 117(8), 1281-1283. <https://doi.org/10.1242/jcs.00963>
- Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hämäläinen, T., Peng, S. L., Lan, Z.-J., Cooney, A. J., Huhtaniemi, I., & Liu, K. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5863),611-613. <https://doi.org/10.1126/science.1152257>
- Richani, D., & Gilchrist, R. B. (2018). The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Human Reproduction Update*, 24(1), 1-14. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx029>
- Rodríguez-Castelán, J., Del Moral-Morales, A., Piña-Medina, A. G., Zepeda-Pérez, D., Castillo-Romano, M., Méndez-Tepepa, M., Espindola-Lozano, M., Camacho-Arroyo, I., & Cuevas-Romero, E. (2019). Hypothyroidism induces uterine hyperplasia and

- inflammation related to sex hormone receptors expression in virgin rabbits. *Life Sciences*, 230, 111-120. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.063>
- Rodríguez-Castelán, J., Zepeda-Pérez, D., Rojas-Juárez, R., Aceves, C., Castelán, F., & Cuevas-Romero, E. (2022a). Effects of hypothyroidism on the female pancreas involve the Regulation of estrogen receptors. *Steroids*, 181, 108996. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.108996>
- Roger, P. P., & Dumont, J. E. (1982). Epidermal growth factor controls the proliferation and the expression of differentiation in canine thyroid cells in primary culture. *FEBS Letters*, 144(2), 209-212. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(82\)80639-x](https://doi.org/10.1016/0014-5793(82)80639-x)
- Rogers, S. A., Miller, S. B., & Hammerman, M. R. (1995). Triiodothyronine stimulates renal epidermal growth factor expression in adult rat. *The American Journal of Physiology*, 268(1 Pt 2), F128-134. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.1995.268.1.F128>
- Rosales, M., Nuñez, M., Abdala, A., Mesch, V., & Mendeluk, G. (2020). Thyroid hormones in ovarian follicular fluid: Association with oocyte retrieval in women undergoing assisted fertilization procedures. *JBRA Assisted Reproduction*. <https://doi.org/10.5935/1518-0557.20200004>
- Ross, D. S., Burch, H. B., Cooper, D. S., Greenlee, M. C., Laurberg, P., Maia, A. L., Rivkees, S. A., Samuels, M., Sosa, J. A., Stan, M. N., & Walter, M. A. (2014). 2014 American Thyroid Association Guidelines for Diagnosis and Management of Hyperthyroidism and Other Causes of Thyrotoxicosis. *Thyroid: Official Journal of the American Thyroid Association*, 26(10), 1343-1421. <https://doi.org/10.1089/thy.2016.0229>
- Ross, M. H., Kaye, G. I., & Pawlina, W. (2003). *Cartilage. Histology: A text and atlas with cell and molecular biology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Savage, C. R., Inagami, T., & Cohen, S. (1972). The Primary Structure of Epidermal Growth Factor. *Journal of Biological Chemistry*, 247(23), 7612-7621. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)44569-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)44569-9)
- Schoenwolf, G. C., Bleyl, S. B., Brauer, P. R., & Francis-West, P. H. (2021). *Larsen's human embryology* (6th ed.). Elsevier
- Shih, A., Zhang, S., Cao, H. J., Tang, H.-Y., Davis, F. B., Davis, P. J., & Lin, H.-Y. (2004). Disparate effects of thyroid hormone on actions of epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  are mediated by 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase II. *Endocrinology*, 145(4), 1708-1717. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0742>
- Sigismund, S., Avanzato, D., & Lanzetti, L. (2018). Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology*, 12(1), 3-20. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12155>
- Silva C. M., Serakides, R., Oliveira, T. S., Ocarino, N. M., Nascimento, E. F., & Nunes, V. A. (2004). Histomorfometria e histoquímica dos ovários, tubas e útero de ratas hipotireoideas em metaestro-diestro. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 56(5), 628-639.
- Silva, J. F., Ocarino, N. M., & Serakides, R. (2018). Thyroid hormones and female reproduction. *Biology of Reproduction*, 99(5), 907-921. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox115>
- Singh, R., Upadhyay, G., & Godbole, M. M. (2003). Hypothyroidism alters mitochondrial morphology and induces release of apoptogenic proteins during rat cerebellar development. *The Journal of Endocrinology*, 176(3), 321-329. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1760321>
- Sun, J., Hui, C., Xia, T., Xu, M., Deng, D., Pan, F., & Wang, Y. (2018). Effect of hypothyroidism on the hypothalamic-pituitary-ovarian axis and reproductive function of pregnant rats. *BMC Endocrine Disorders*, 18(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s12902-018-0258-y>
- Thambirajah, A. A., Wade, M. G., Verreault, J., Buisine, N., Alves, V. A., Langlois, V. S., &

- Helbing, C. C. (2021). Disruption by stealth—Interference of endocrine disrupting chemicals on hormonal crosstalk with thyroid axis function in humans and other animals. *Environmental Research*, 203, 111906. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111906>
- Tomasi, T. E., Hellgren, E. C., & Tucker, T. J. (1998). Thyroid Hormone Concentrations in Black Bears (*Ursus americanus*): Hibernation and Pregnancy Effects. *General and Comparative Endocrinology*, 109(2), 192-199. <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.7018>
- Venditti P, Di Meo S. Thyroid hormone-induced oxidative stress. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63:414–34
- Vissenberg, R., Manders, V. D., Mastenbroek, S., Fliers, E., Afink, G. B., Ris-Stalpers, C., Goddijn, M., & Bisschop, P. H. (2015). Pathophysiological aspects of thyroid hormone disorders/thyroid peroxidase autoantibodies and reproduction. *Human Reproduction Update*, 21(3), 378-387. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmv004>
- Wang, Y.-N., & Hung, M.-C. (2012). Nuclear functions and subcellular trafficking mechanisms of the epidermal growth factor receptor family. *Cell & Bioscience*, 2(1), 13. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-13>
- Walker, P., Coulombe, P., and Dussault, J. H. (1982) *Endocrinology* 111, support and helpful suggestions. The technical assistance of DiAnn 1133-1139 s
- Wee, P., & Wang, Z. (2017). Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. *Cancers*, 9(5), 52. <https://doi.org/10.3390/cancers9050052>
- Weng, X., Ma, X., Wang, Q., Xu, K., Hu, X., Liu, W., & Zhang, C. (2019). Effect of hypothyroidism on CYP51 and FSHR expression in rat ovary. *Theriogenology*, 138, 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.07.012>
- Wu, Y., Lin, Y., Li, S., Yao, X., Cheng, M., Zhu, L., ... & Liu, H. (2021). MicroRNA-194 is increased in polycystic ovary syndrome granulosa cell and induce kgn cells apoptosis by direct targeting heparin-binding egf-like growth factor. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-021-00850-w>
- Wu, Y., Xiao, H., Pi, J., Zhang, H., Pan, A., Pu, Y., Liang, Z., Shen, J., & Du, J. (2019). EGFR promotes the proliferation of quail follicular granulosa cells through the MAPK/extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 18(20), 2742-2756. <https://doi.org/10.1080/15384101.2019.1656952>
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 37 Suppl 4, S3-8. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(01\)00230-1](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(01)00230-1)
- Yaylali, O., Kirac, S., Yilmaz, M., Akin, F., Yuksel, D., Demirkan, N., & Akdag, B. (2009). Does hypothyroidism affect gastrointestinal motility? *Gastroenterology Research and Practice*, 2009, 529802. <https://doi.org/10.1155/2009/529802>
- Yehuda-Shnaidman, E., Kalderon, B., & Bar-Tana, J. (2014). Thyroid hormone, thyromimetics, and metabolic efficiency. *Endocrine Reviews*, 35(1), 35-58. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1006>
- Zhou, J., Peng, X., & Mei, S. (2019). Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. *International Journal of Biological Sciences*, 15(4), 726-737. <https://doi.org/10.7150/ijbs.30369>
- Zoeller, R. T., Tan, S. W., & Tyl, R. W. (2007). General Background on the Hypothalamic-Pituitary-Thyroid (HPT) Axis. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(1-2), 11-53. <https://doi.org/10.1080/10408440601123446>
- Xie D, Chen CC, Ptaszek LM, Xiao S, Cao X, Fang F, Ng HH, Lewin HA, Cowan C, Zhong S. Rewirable gene regulatory networks in the preimplantation embryonic development of three mammalian species. *Genome Res*. 2010; 20:804- 15. PMID: 20219939

## EKLER

### Ek 1. Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 17.02.2023-E.333119



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-333119  
Konu : Başvurunuz Hk.

17.02.2023

Sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR

İlgi : 30/01/2022 tarihli dilekçeniz. 10.20.1.110  
97255  
20.02.2023

"Deneysel Hipotiroidinin Ovaryum Follikülleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi"  
(PAUHADYEK-2023/08) konulu çalışmamız 20.01.2023 tarih ve 2023/01 sayılı toplantımızda  
görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmamın Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun  
olduğuna ve 16 adet sıçan kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Habip ATALAY  
Kurul Başkanı



## Ek 2. Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 15.05.2023-E-367191



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-367191  
Konu : Başvurunuz Hk.

15.05.2023

Sayın Prof. Dr. Hülya ÇETİN

İlgi : 13/04/2023 tarihli dilekçeniz. 10.20.1.95

374

16.05.2023

"Deneysel Hipotiroidinin Ovaryum Follikülleri Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi" (PAU/HADYEK-2023/08) konulu çalışmada istediğiniz yürütücü değişikliği talebiniz 03.05.2023 tarih ve 2023/03 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanızda istediğiniz değişiklik talebinizin Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan uygun olduğuna oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Habip ATALAY  
Kurul Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile onaylanmıştır.

Bölge Dairesi Başkanlığı, 25110 DÜZCE, Pk. No: 61 102  
Adres: Topraklı Mahallesi, Düzce  
Telefon: (0271) 8 140 00 (250) 206 17 65  
e-Posta: bddk@pau.edu.tr / Elektronik Ad: http://www.pau.edu.tr  
Kısa Adres: pau.edu.tr/bddk

Bölge Tüketim Alanı - https://www.tuketim.gov.tr/pau/bddk

Bölge Sayısı: SSK/100.100  
Ücretsiz Bilgiye Açık



Bu belge, güvenli elektronik imza ile onaylanmıştır.