



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI



**PREMATÜR OVARYAN YETMEZLİĞİ MODELİNDE
ASPROSİNİN FOLİKÜL GELİŞİMİNE ETKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Bahar POMAK ADALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA-2024

Bahar POMAK ADALI

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANA BİLİM DALI



**PREMATÜR OVARYAN YETMEZLİĞİ MODELİNDE
ASPROSİNİN FOLİKÜL GELİŞİMİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Bahar POMAK ADALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN:

Prof. Dr. F. Zehra MİNBAŞ

**Proje no: TYL-2023-1498 – B.U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
BURSA-2024**

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYAN

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “**Prematür Ovaryan Yetmezliği Modelinde Asprosinin Folikül Gelişimine Etkisinin Araştırılması**” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Bahar POMAK ADALI

12/07/2024



TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

12/07/2024

Adı Soyadı : Bahar POMAK ADALI
Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Tez Konusu : Sıçan İn Vivo Prematür Ovaryan Yetmezliği Modelinde Asprosin Uygulamasının Ovaryan Foliküllerin Gelişimine Etkisi

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Ünvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Zehra MİNBAŞ

İmza:

İÇİNDEKİLER

ETİK BEYAN.....	II
KABUL ONAY SAYFASI.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET	VIII
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ.....	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Dişi Üreme Sistemi	3
2.1.1. Ovaryum anatomisi	3
2.1.2. Ovaryum embriyolojisi	4
2.1.3. Ovaryum histolojisi.....	5
2.1.4. Gelişimin farklı basamaklarındaki foliküller	7
2.1.4.1. Primordiyal foliküller.....	7
2.1.4.2. Primer foliküller.....	8
2.1.4.3. Sekonder (antral) foliküller	9
2.1.4.5. Atretik foliküller.....	11
2.2. Sıçan Dişi Üreme Sistemi	12
2.2.1. Sıçan ovaryum anatomisi	12
2.2.2. Sıçan Ovaryum Embriyolojisi ve Foliküler Gelişim.....	13
2.2.3. Sıçan östrus döngüsü.....	15
2.3. Prematür Ovaryan Yetmezlik (POI).....	16
2.4. 4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD).....	19
2.5. Primordiyal Folikül Aktivasyonunun Moleküler Mekanizmaları.....	20
2.6. ASPROSİN	22
3. GEREÇ VE YÖNTEM	24
3.1. Deney Hayvanları.....	24
3.2. Deney Grupları.....	24
3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulama Yöntemi.....	26
3.4. Kan Örneklerinin Alınması	26
3.5. Vajinal Smear ile Östrus Döngüsünün Evrelerinin Tayini	28
3.6. Deneysel Prematür Ovaryan Yetmezliği (POI) Modeli Oluşturulması	29
3.7. Asprosin Enjeksiyonu	30
3.8. Deneklerin Sakrifikasyonu.....	30
3.9. Doku Takibi	31
3.10. Kesit Alma	32
3.11. Hematoksilen – Eozin (H&E) Boyama.....	32
3.14. ELISA	35
3.15. İstatistiksel Değerlendirme.....	35
4. BULGULAR	36
4.1. Denek Vücut ve Ovaryum Ağırlıkları Ölçümü.....	36
4.1.1. Vücut ağırlıkları ölçümü	36
4.1.2. Ovaryum ağırlık ölçümleri.....	37
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular	38

4.2.1. Histomorfolojik bulgular	38
4.2.2. Morfometrik Bulgular	47
4.2.3. İmmünohistokimyasal bulgular	48
4.3. Biyokimyasal Bulgular	52
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
5.1. VCD Yardımı İle POI Modelinin oluşturulması	55
5.2. POI Modeli ve Asprosin Uygulaması	56
5.3. POI Modelinin ve Asprosin Uygulamasının Vücut Ağırlığına Etkisi.....	58
5.4. POI Modelinin ve Asprosin Uygulamasının Ovaryum Ağırlığına Etkisi	59
5.6. POI Modelinin ve Asprosin Uygulamasının Ovaryum Foliküllerine Etkisi	60
5.7. POI Modelinin ve Asprosin Uygulamasının E2 ve AMH Seviyelerine Etkisi ..	61
6. KAYNAKLAR	63
7. EKLER.....	73
8. SİMGELER VE KISALTMALAR	74
9. TEŞEKKÜR	75
10. ÖZGEÇMİŞ.....	76

TÜRKÇE ÖZET

Prematüre over yetmezliği (POI), hipoöstrojenik ve hipergonadotropik amenore ile karakterize, 40 yaşından önce bireylerin normal yumurtalık fonksiyonlarını kaybettiği, subfertilite/infertilite ile sonuçlanan patolojik bir durumdur. Günümüzde kullanılan hormon replasman tedavisinin, ovaryum fonksiyonlarını normale döndürmede yetersiz kalması ve kanser riski gibi yan etkileri nedeniyle alternative tedavi arayışları sürmektedir. Beyaz yağ dokusunda eksprese edilen adipokinlerin dişi ve/veya erkek bireylerde fertilite üzerinde etkilerinin olduğu bilinmektedir.

Asprosin, glukojenik ve oreksijenik etkili bir adipokindir. “Asprosin, dişi fertilesini olumsuz etkileyen POI’de azalmış ovaryan rezervini, ovaryum foliküllerinin gelişimi uyararak artırır” hipotezinin test edilebilmesi için planlanan bu çalışmada, asprosinin POI’de azalan ovaryum rezervini ve bozulan ovaryan folikül gelişimini etkileyip etkilemediğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda 4-vinilsikloheksen diepoksit (VCD) ile oluşturulan POI sıçan modelinde asprosinin etkisi, histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirildi. 60 günlük deneklere, 8 hafta boyunca intraperitoneal yolla asprosin (500 ng/kg/gün) ya da serum fizyolojik verildi. 1. ,15. ve 71. günlerde alınan kan örneklerinde serum AMH ve östrojen konsantrasyonları ölçüldü. Deneklerin ovaryumlarından hazırlanan ve hematoksilen-eosin ile PCNA ile boyanan kesitlerde ovaryan foliküller sayıldı, granülosa hücre proliferasyonu değerlendirildi. Biyokimyasal bulgular, POI oluşturulan deneklere göre AMH ve östrojen konsantrasyonlarının asprosin uygulanması ile anlamlı olarak yükseldiğini; histolojik ve immünohistokimyasal bulgular ise asprosinin, primordial foliküllerin yanı sıra gelişmekte olan folikül sayılarında ve granülosa hücrelerinin proliferasyonunda anlamlı artışa neden olduğunu gösterdi.

Sonuç olarak çalışmamız, asprosinin, primordial foliküllerin aktivasyonuna neden olarak over rezervini ve folikül gelişimini olumlu yönde etkilediğini gösterdi. Bu bağlamda çalışmamızın asprosinin, primordial foliküllerin aktivasyonunu ve folikül gelişimini etkileyen çeşitli faktörlerin ve mekanizmalar üzerindeki araştırılacağı yeni çalışmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler: asprosin, adipokin, POI, infertilite, ovaryan folikül gelişimi

İNGİLİZCE ÖZET

Investigation of the Effect of Asprosin on Follicle Development in a Model of Premature Ovarian Insufficiency

Premature ovarian insufficiency (POI) is a pathological condition characterized by hypoestrogenic and hypergonadotropic amenorrhea, where individuals lose normal ovarian functions before the age of 40, resulting in subfertility or infertility. The search for alternative treatments continues due to the inability of currently used hormone replacement therapy to normalize ovarian functions and side effects such as cancer risk. Adipokines expressed in white adipose tissue are known to have effects on fertility in female and/or male individuals. Adipokines expressed in white adipose tissue are known to have effects on fertility in female and/or male individuals.

This study, planned to test the hypothesis that "Asprosin increases the decreased ovarian reserve in POI, which negatively affects female fertility, by stimulating the development of ovarian follicles", was aimed to show whether asprosin affects the decreased ovarian reserve and impaired ovarian follicle development in POI. For this purpose, the effect of asprosin on the 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD)-induced POI rat model was evaluated by histological, immunohistochemical and biochemical methods. Sixty-day-old rats were intraperitoneally given asprosin (500 ng/kg/day) or physiological saline for 8 weeks. Serum AMH and estrogen concentrations were measured in blood samples taken on the 1st, 15th and 71st day. Ovarian follicles were counted and granulosa cell proliferation was evaluated on the sections which were prepared from the ovaries of the rats and stained with hematoxylin-eosin or PCNA,. Biochemical findings showed that AMH and estrogen levels were increased significantly with asprosin administration compared to POI group; histological and immunohistochemical findings showed that asprosin caused a significant increase in the number of developing follicles as well as primordial follicles and the proliferation of granulosa cells.

In conclusion, our study showed that asprosin positively affects ovarian reserve and follicle development by causing activation of primordial follicles. In this context, we think that our study will lead to new studies in which asprosin will be investigated on various factors and mechanisms affecting the activation of primordial follicles and follicle development.

Keywords: asprosin, adipokine, POI, infertility, ovarian follicle development

BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA
HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ

					
		■		■	
					
					

Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “**Prematür Ovaryan Yetmezliği Modelinde Asprosinin Folikül Gelişimine Etkisinin Araştırılması**” başlıklı tez **3., 5.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Prematüre over yetmezliği (POI), 40 yaşın altındaki kadınların yaklaşık %1'ini etkileyen subfertilite veya infertilite ile sonuçlanan patolojik bir durumdur. Biyokimyasal olarak hipoöstrojenik ve hipergonadotropik koşullara sahip amenore ile karakterize olan bu tabloda bireyler 40 yaşından önce normal yumurtalık fonksiyonlarını kaybederler (Webber ve ark., 2016).

Günümüzde POI'li kadınlar için en etkili tedavi hormon replasmanıdır. Hormon replasman tedavisi, hastaların yaşam kalitesini iyileştirse de, ovaryum fonksiyonlarını tam olarak normale döndüremede yetersiz kalmakla birlikte, yüksek kanser riski gibi yan etkilerinden dolayı birçok kadın için yarardan çok zarar verebilmektedir (Madalinska, Beurden, Bleiker, & Valdimarsdottir, 2006). Bu nedenle birçok bilim insanı, kök hücre temelli stratejilerin kullanımı gibi alternatif terapötik yaklaşımlar geliştirmeye çalışmaktadır. Kemik iliği, adipoz doku, plasenta, endometriyum ve umbilikal kord gibi çeşitli doku ve organlardan izole edilen mezenkimal kök hücreler, folikül büyümesini uyarmak ve oosit kalitesini, ovülasyonu ve fertiliteyi iyi hale getirmek için POI tedavisi olarak kullanılmıştır (Byers ve ark., 2012; Cakiroglu, ve ark., 2020; Wang, Wang, Yang, Li, & Yang, 2017).

Adipoz doku, eksprese ettikleri adipokinler aracılığıyla endokrin, parakrin ve nöroendokrin sinyaller üreterek çok sayıda fizyolojik ve patolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynar (Mohamed-Ali, Pinkney, & Coppack, 1998). Yakın zamanda yapılan araştırmalar adipokinlerin dişi ve/veya erkek bireylerde fertilite üzerinde olumlu veya olumsuz etkilerinin olduğunu göstermektedir. Yeni tanımlanan bir adipokin olan asprosinin reseptörlerinin devre dışı bırakılmasının sperm canlılığını ve morfolojisini etkilemezken, erkeklerde fertilitenin azalmasıyla sonuçlanan spermde önemli ölçüde progressif motilite kaybına neden olduğu ve asprosin tedavisi ile progressif sperm motilitesinin önemli ölçüde iyileştiği gösterilmiştir. Ek olarak, asprosin uygulamasının yaşa bağlı sperm motilitesindeki azalmayı iyileştirdiği ve doğurganlıktaki yaşa bağlı düşüşü tersine çevirdiği ve testosteron seviyelerini yükselterek testiküler fonksiyonları iyileştirdiği bildirilmiştir (Wei, Long, & Wang, 2019).

Ovaryumlar ve adipoz doku arasında, adipokinlerin aracılık ettiği yakın bir ilişki vardır. Literatürde vaspin, omentin, apelin, leptin, kemerin, irisin, adiponektin gibi bazı adipokinlerin ovaryan steroidogenezi regüle ettiklerine ilişkin veriler bulunmaktadır. Asprosinin, dişi sığırlarda, teka hücrelerinin fonksiyonlarını ve folikül büyümesini etkilediği ve hücre kültürü çalışmalarında granüloza hücre fonksiyonlarını doz bağımlı olarak düzenlediği gösterilmiştir (Maylem, Spicer, Batalha, & Schutz, 2021). Ayrıca, menstrual siklus evrelerine göre asprosin seviyesinin değişmesi, foliküler sıvıda asprosin ve mRNA düzeyinde reseptör ekspresyonuna ek olarak hem sağlıklı hem de neoplastik over dokusunda asprosin ve reseptör proteinlerinin ekspresyonu, asprosinin ovaryan foliküllerin gelişiminde etkisinin olduğunu göstermektedir.

Bu tez projesinde hipotez “Asprosin peptiti, dişi fertilitelerini etkileyen patolojilerden biri olan prematür ovaryan yetmezliğinde azalmış ovaryan rezervini, ovaryum foliküllerinin gelişimi uyararak arttırır” şeklinde kurulmuştur.

Hipotezin test edilebilmesi için önerilen projede, asprosinin POI’de azalan ovaryum rezervini ve bozulan ovaryan folikül gelişimini etkileyip etkilemediğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda iki hedef belirlenmiştir:

Hedef 1: Prematür ovaryan yetmezliği (POI) sıçan modelinin oluşturulması ve histolojik ve biyokimyasal olarak kontrol grubu ile kıyaslanarak doğrulanması.

Hedef 2: POI sıçan modelleri oluşturulmuş deneklerde asprosinin ovaryan rezerve etkisinin histolojik ve biyokimyasal olarak belirlenmesi.

Sunulan çalışma aşağıda belirtilen nedenlerle özgün değer taşımaktadır:

1. Asprosinin POI modelinde etkinliğini gösteren literatürdeki ilk çalışma olması.
2. Asprosin peptitinin, POI’de bozulan hücrenel ve moleküler mekanizmalarda inhibitör ya da aktivatör olarak kullanılabilme potansiyelinin belirlenmesi,
3. Asprosinin, dişi genital sistem patolojilerinde tek başına veya kombin tedavilerde uygulanabilirliğini araştıran yeni çalışmaların önünü açabilecek ön veriler sunması,
4. Klinikte bu peptitin kullanılabileceği efektif yeni tedavi protokollerinin oluşturulabilmesi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Sistemi

2.1.1. Ovaryum anatomisi

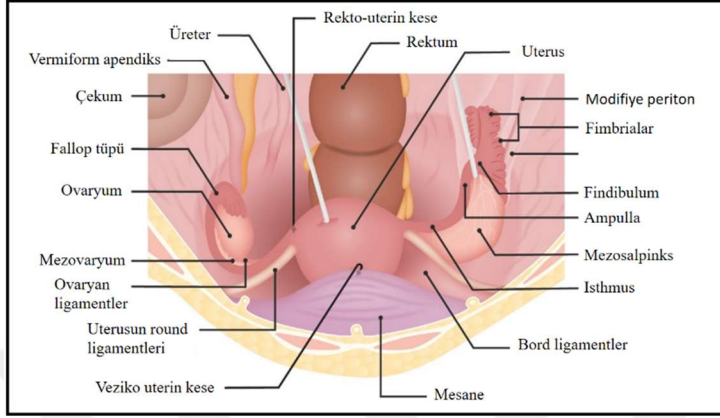
Ovaryumlar, uterusun her iki yanında yer alan, bord ligamentlere bağlı, pelvik duvara yakın konumlanmış, fossa adı verilen çöküntülerde yer alan dişi gonadlardır. Fossa, dış iliak damarlar ve üreter tarafından sınırlandırılmışlardır. Ovaryum geniş bir korteks, medulla ve hilum olarak tanımlanmış olan bölgelere sahiptir (Blaustein, 1982).

Her bir ovaryum, arka yüzeyine kısa bir periton kıvrımı (mezovarium), ovaryum bağı (utero-ovaryan) yoluyla ipsilateral uterin kornuya ve fundibulopelvik (asıcı) bağ yoluyla yan pelvik duvara bağlanır. Erişkinlerde, ovaryumun maksimum boyutu yaklaşık 3 ila 5 cm ve ağırlığı 5 ila 8 g'dır. Bu ölçümler yaş, gebelik ve fertilité durumuna bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir (Blaustein, 1982; O'Neill, ve ark., 2023).

Ovaryum, reproduktif yaşamının erken dönemlerinde pürüzsüz pembe-beyaz bir yüzeye sahiptir ve yaş ilerledikçe kıvrımlı ve giriform hale gelir. Ovaryumların ön kenarı ince, düzdür ve bord ligamentin arka yüzeyine mezovaryum olarak adlandırılan bir periton kıvrımı ile tutturulmuştur (Baggish, & Karram, 2016). Bord ligamentlere bağlanmasının yanı sıra ovaryumlar birbirleri ile de bağlantılıdır; uterusun yan köşesine bağlanan uteroovaryan bağ ve ovaryumların üst yuvarlak kutbundan duvara uzanan bir bağ vardır (Baggish, & Karram, 2016). Bu bağ fallop tüpü fimbrialarının hemen bitişinde yer alır. Uterus ile ovaryum arasındaki bağda çizgisiz kas lifleri bulunmaktadır. Asimetrik morfoloji yaygındır, sağ ovaryum genellikle soldan büyüktür (Blaustein, 1982; O'Neill ve ark., 2023).

Ovaryum, intraperitoneal olan tek pelvik yapıdır ve yüzey germinal epitelini çevreleyen visseral periton mezotelyumu ile kaplıdır. Germinal epitel, tunika albuginea tabakasının üzerinde bulunur. Tunika albuginea, kortikal ovaryum stroması ve gelişimin çeşitli aşamalarında yerleşik folikülleri barındıran sıkı bağ dokusu yapısındadır. Kortikal stroma; düz kas hücreleri, fibroblastlar ve kapiller ağlar olmak

üzere çeşitli hücre tiplerini içermekte olan matrikstir. Medullar stroma, vasküler ve lenfatik yapının yanı sıra sinirleri içeren düzensiz bağ dokusundan oluşmaktadır (Blaustein, 1982; O'Neill ve ark., 2023).



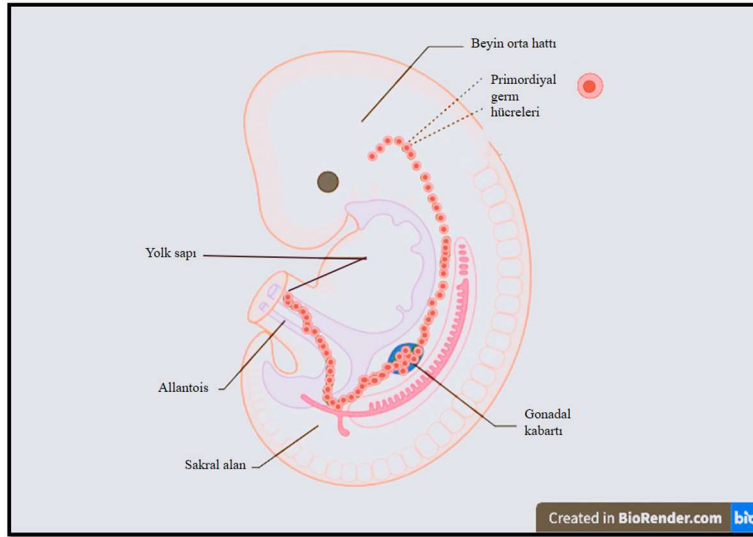
Şekil 1. Ovaryum anatomisi (Lecturio, Lisans: CC BY-NC-SA 4.0)

2.1.2. Ovaryum embriyolojisi

Embriyonun cinsiyeti fertilizasyon sırasında belirlenmesine karşın gonadların erkek veya dişi morfolojik özellikleri 7. haftada ortaya çıkmaktadır (Coucouvanis, Sherwood, Carswell-Crumpton, Spack, & Jones, 1993). Dişi gonadlar üç farklı kaynaktan köken alır: Posterior abdominal duvarın sölomik epiteli (mezotel), sölomik epitelin altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve primordial germ hücreleri (Sadler, & Langman, 2012).

Gestasyonel gelişimin 5. haftasının ortasında sölomik epitelin altındaki mezenşime doğru büyümesi ile primer seks kordonları (gonadal kordonlar) oluşur (Sadler, & Langman, 2012). Gestasyonel gelişimin 4. haftasında allantoisin vitellüs kesesine komşu duvarında beliren ve epiblast kaynaklı ekstraembriyonik mezoderm kökenli küresel hücreler olan primordial germ hücreleri, 5. haftada posterior vücut duvarında gelişen mezonefrozun medialindeki gonadal kabartıya göç ederler (Şekil 2) ve 6. haftada gonadal kabartıyı istila ederek primer seks kordonlarına dahil olurlar. Yaklaşık 1000 ila 2000 primordial germ hücresi genital kabartıyı istila ederler. Eğer primordial germ hücreleri göç etmezse, gonadlar oluşmaz (Sadler, & Langman, 2012).

Göçün tamamlanması ve yeni genlerin aktive olması ile gonadların farklılaşması sürecine girilir. Ovaryum gelişimi, testisten farklı olarak gestasyonel gelişimin 8. haftasında başlar; ancak 10. haftaya kadar histolojik olarak ayırtedilemez. Erken diferansiyasyon döneminde seks kordonları belirgin olmamakla beraber medullanın içlerine sokulurlar. Ardından bu kordonlar kaybolur ve yerini vasküler stroma alır (erken diferansiyasyonun 49. günü). Prolifere olmaya devam eden yüzey epiteli, 7. haftada ikinci farklılaşma ile kortikal kordonları oluşturur. Gestasyonel gelişimin 16. haftasında kortikal kordonların, germ hücresi içeren hücre gruplarını ayrılması ile primordiyal foliküller meydana gelir. Germ hücreleri oogonyumları, yüzey epitelinden köken alan oogonyum çevresindeki hücreler ise foliküler hücreleri oluşturur (Baker, & O, 1963).

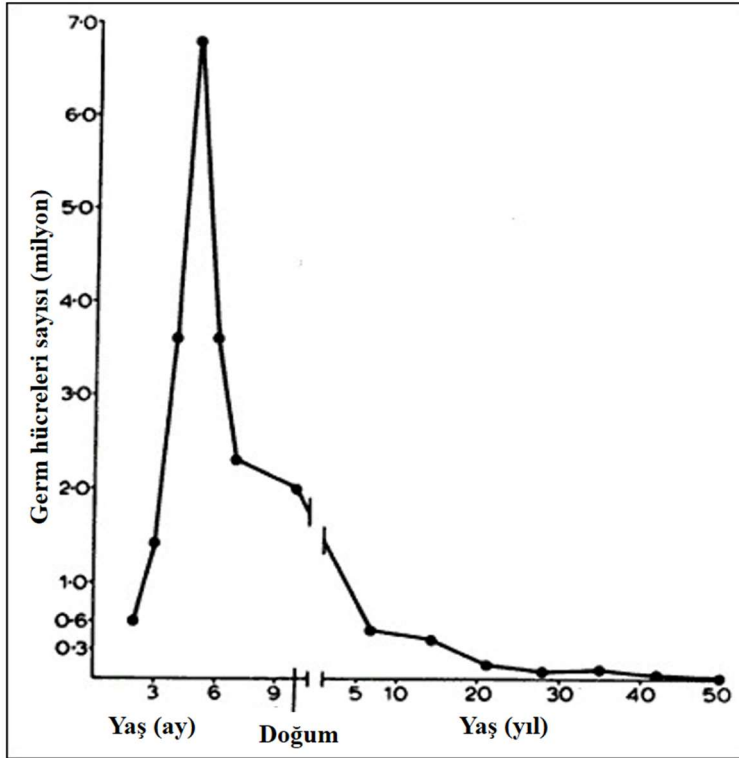


Şekil 2. Primordiyal germ hücrelerinin göçü. Görsel BioRender aracılığı ile oluşturulmuştur.

2.1.3. Ovaryum histolojisi

Dişi gametler olan oositler ile östrojen ve progesteron gibi steroid hormonları üreten ovaryum, dıştan içe doğru germinatif epitel, tunika albuginea, korteks ve medulladan meydana gelir. Germinatif epitel, ovaryumun dış yüzeyinde bulunmaktadır ve tek katlı, kübik epitel yapısındadır. Germinatif epitelin hemen altında yer alan tunika albuginea ise kollojen liflerden zengin bir bağ dokusu yapısıdır. Tunika albuginea pembe-beyaz renklidir. Korteks tabakası, bağ dokusu stroma içerisine gömülü foliküller ile karakterizedir.

Ovaryumda dişi gametler olan matür oositlerin geliştiği folikülogenez süreci olaylanır. Foliküller, ovaryumun korteks tabakasında fetal yaşamın dördüncü ayında gelişmeye başlar. İntrauterin yaşamın beşinci ayında yaklaşık 7 milyon germ hücresi içeren bir folikül havuzu mevcuttur (Baker, & O, 1963). Havuzdaki folikül sayısı giderek azalır ve doğumda ovaryumda 266.000 - 472.000 folikül içerir (Forabasco ve ark., 1991). Doğumdan önce başlayan bu azalma çocukluk boyunca devam eder; menarşda yaklaşık 500.000 primordiyal folikül kalır. Her folikül, birinci mayoz bölünmenin profazında bekleyen bir oosit içerir (Şekil 3). Matür oosit üretimi için primordiyal folikül havuzundaki foliküller aktive olur ve primer ve sekonder foliküller oluşur. Antral aşamaya erişen foliküllerin çoğu dejenerasyona uğrarken birkaçı büyümeye devam ederek ovülasyon öncesi aşamaya kadar ulaşır. Ovaryumdaki foliküller gelişim sürecinde sırası ile primordiyal foliküller, primer foliküller (unilaminar, multilaminar), sekonder foliküller, matür foliküller ve atretik foliküller oluşur.



Şekil 3. Artan yaşla birlikte insan yumurtalıklarındaki toplam germ hücresi popülasyonunda meydana gelen değişiklikler (Baker, & O, 1963).

Primordial foliküllerde, mayoz I'in profaz aşamasında bölünmesi duraklamış çapı yaklaşık 25 µm olan primer oosit bulunmaktadır. Ovulasyondan hemen önce mayoz I tamamlanır ve sonuçta sitoplazmanın çoğunluğunu alan sekonder oosit ile birinci kutup cismi ismini alan hücre oluşur. Mayoz II, fertilizasyon gerçekleştiğinde DNA replikasyonu başlamadan meydana gelir. Sonucunda ovum ile ikinci kutup cisimciği oluşur.(Bourdais, A., Dehapiot, B.,& Halet, G., 2018)

2.1.4. Gelişimin farklı basamaklarındaki foliküller

2.1.4.1. Primordiyal foliküller

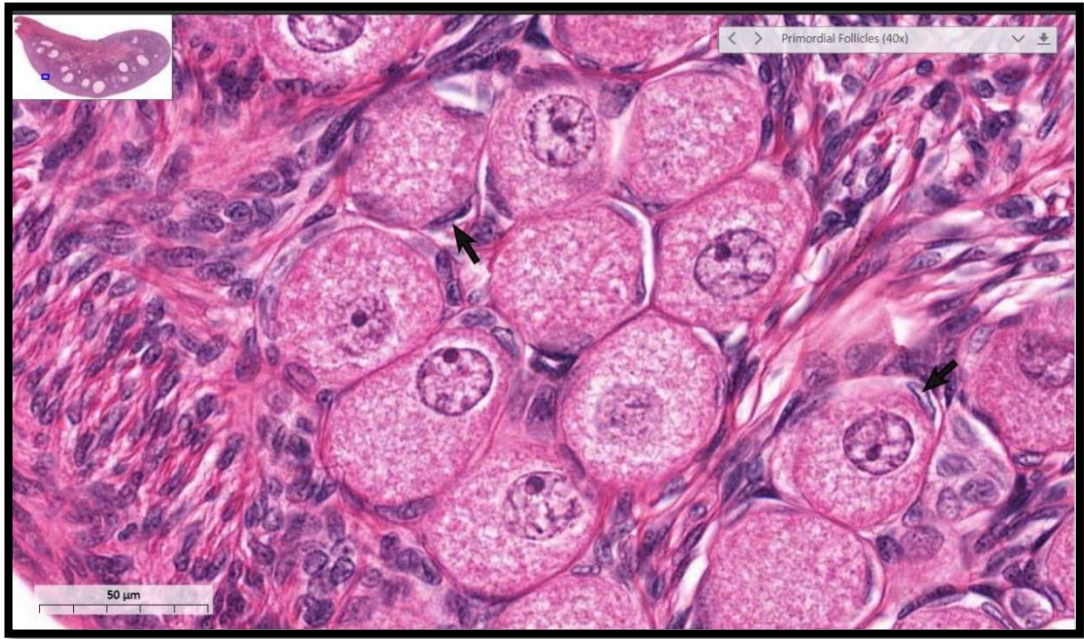
Primordiyal foliküller, foliküler gelişimin ilk basamağıdır. Her primordiyal folikülün dört olası kaderi vardır: (1) primordiyal folikül olarak kalmak, (2) dejenerasyona uğramak, (3), gelişmeye başlamak daha sonra atrezi uğramak veya (4) gelişmeye başlamak ve sonunda bir oosit salıvermek ardından da bir korpus luteum oluşturmak (Zeleznik ve ark., 2015).

İnsan primordiyal folikülünün çapı yaklaşık 40 mm'dir (Townson, & Combelles, 2012). Tek katlı yassı foliküler hücrelerin çevrelediği primer oositten oluşur (Şekil 4). Stromadan bazal lamina ile ayrılmaktadırlar. Primordiyal foliküller, ovaryumun tipik olarak periferik korteksinde yerleşiktir (Sforza, Vizzotto, Ferrario, & Forabosco, 2003). Primordiyal foliküller, germ hücrelerinin nükleusu ile ilişkili mitokondri ve golgi cisimcikleri dahil olmak üzere sitoplazmik organellerin birleşimi olan Balbiani cisimciği içerir (Pepling, Wilhelm, O'Hara, Geghardt, & Spradling, 2007).

Doğum sırasında ovaryumdaki primordiyal foliküllerin toplam sayısı, üreme sisteminin bir ömür boyunca yararlanacağı sınırlı bir havuz olarak kabul edilir. Bazı araştırmalar yetişkin insan yumurtalığında neogenez adı verilen bir süreç yoluyla yeni germ hücreleri oluşturabilen hücrelerin bulunduğunu öne sürülmüştür (Virant-Klun, 2015). Yetişkin ovaryum rezervini oluşturan primordiyal foliküllerdeki oosit, mayotik profaz I'de duraklar ve yıllar sonra gerçekleşecek olan ovülasyon ile etkinleşene kadar profaz I'de bekler (Pelosi, Simonsick, Forabosco, Garcia-Ortiz, & Schlessinger, 2015). Puberte ile yeniden uyanan foliküllerin çoğu, oositlerin ve olgun

granüloza hücrelerinin özel bir apoptoz şekli olan atreziye maruz kalır (Gleicher, Weghofer, & Barad, 2011).

Ovaryum hacmi ile primordiyal folikül sayısı arasında pozitif bir korelasyon vardır; yaklaşık 1000 primordiyal folikül, 3,01 cm³ ovaryum hacmine karşılık gelmektedir (Kelsey, & Wallace, 2012). Ovaryum rezervi, primordiyal folikül havuzundaki granüloza hücreleri tarafından salgılanan serum AMH düzeyleri aracılığıyla ölçülebilmektedir (Rooij ve ark., 2002). Primordiyal foliküllerin duraklama fazını terketmeleri primer foliküllerin oluşması ile sonuçlanır.



Şekil 4. Primordial foliküller. Ok: primordial folikülde oositi çevreleyen yassı folikül hücreleri. (Brelje, & Sorenson, 2024)

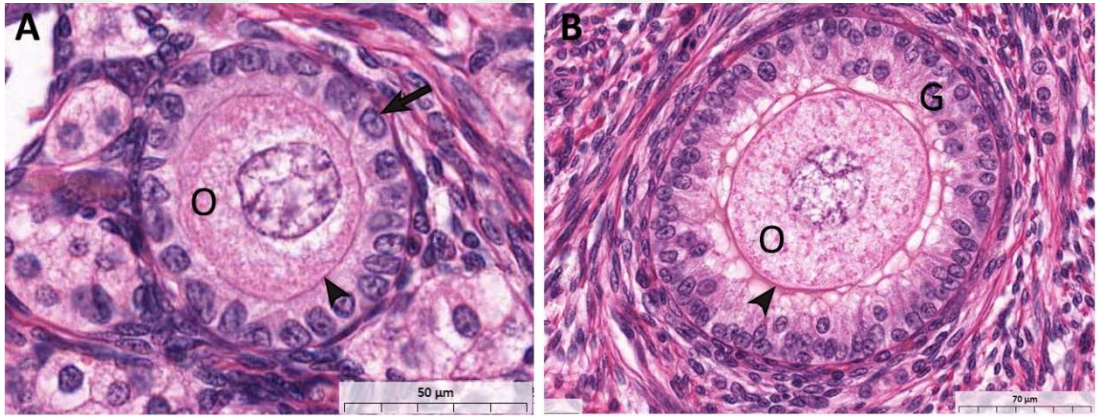
2.1.4.2. Primer foliküller

Folikül içindeki oositin boyutunun artması ve çevrede granüloza hücre katmanlarının oluşumu ile primer foliküller meydana gelir. Primer foliküller, granüloza hücre katmanlarının sayısına göre unilaminar ve multilaminar olmak üzere ikiye ayrılır.

Primer foliküllerde, foliküler büyüme FSH (folikül stimüle edici hormon) tarafından stimüle edilmektedir. Unilaminar primer foliküllerde, foliküler hücre tabakası tek katlı kübik hücrelerden, multilaminar primer foliküllerde ise çok katlı kübik folikül hücrelerinden yani granüloza hücrelerinden oluşmaktadır (Şekil 5).

Primer foliküller tıpkı primordiyal foliküller gibi stromadan bazal lamina ile ayrılırlar. Folikül hücreleri çok katlı aşamaya geçip multilaminer primer folikül meydana geldiğinde bazal lamina dışında stroma hücrelerinden teka folikülü şekillenmeye başlar.

Unilaminer primer foliküllerde oositin salınan glikoproteinler olan ZP1, ZP2, ZP3 içeren zona pellusida oluşumu başlar (Şekil 5). Multilaminer primer folikül aşamasına gelindiğinde zona pellusida kalınlaşır. Primer folikül aşamasında foliküler hücrelerin filopodları ve oosit mikrovillusları, zona pellusida içerisinde gap junctionlar aracılığı ile bağlantı kurmaktadır. Oosit çapı multilaminer primer folikül aşamasında artık 100-150 µm büyüklüğüne ulaşmıştır. Multilaminer primer folikülün gelişimine devam etmesi ile birlikte sekonder yani antral folikül meydana gelmektedir.

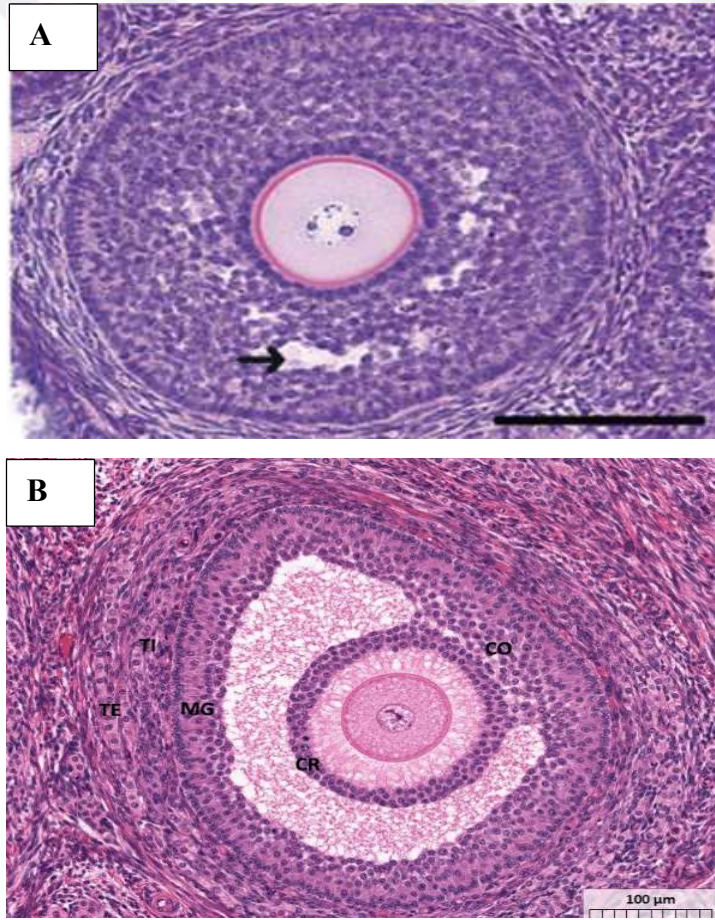


Şekil 5. Primer foliküller. (A) Unilaminer primer folikül, (B) Multilaminer primer folikül. O: Primer oosit, G: Granüloza hücreleri, Ok: Tek katlı folikül hücreleri, Ok başı: Zona .(Brelje, & Sorenson, 2024)

2.1.4.3. Sekonder (antral) foliküller

Granüloza hücreleri arasında antrumların gelişmesi ile karakterize foliküllerdir (Şekil 6). Antrumlar, içeriğini plazma eksüdası, steroid bağlayıcı proteinler, hormonlar ve glikoaminoglikanların oluşturduğu folikül sıvısı ile doludur. Granüloza hücreleri arasında yapısında hyoluronan ve proteoglikanlar bulunan Call-Exner olarak adlandırılan cisimcikler görülebilmektedirler. Call-Exner cisimcikleri granüloza hücrelerince salgılanır (Mcgee, & Hsueh, 2000; Myers, Britt, Wreford, Ebling, & Kerr, 2004).

Teka folikülü teka-interna ve teka eksterna olmak üzere iki farklı tabakaya farklılanır. Teka interna, steroid üretimi yapan hücrelerin bulunduğu ileri derecede vaskülarize bir tabakadır. Teka eksterna ise stromal hücrelerden oluşur ve teka internayı çevreler (Şekil 6B). Sekonder folikül aşamasında teka interna ile granüloza hücrelerini ayıran yapı bazal laminadır. Oosit ile ilişkili bölgede granüloza hücreleri kumulus ooforus adını almaktadırlar. Oosit ile temasta olan kumulus ooforus hücreleri ise korona radiata olarak adlandırılır (Şekil 6B). Korona radiata hücrelerinde zona pellusidaya penetre olan mikrovilluslar mevcuttur. Sekonder folikül aşamasında bu mikrovilluslar antral yüzeydeki serbest LH reseptörleri ile doğru orantılı olarak artmaktadır (Valdimarsson ve ark., 1993).



Şekil 6. Antral foliküller. (A) Erken antral folikül. Ok: Granüloza hücreleri arasında oluşmaya başlayan antrumlar. (B) Belirgin bir antrumu olan sekonder folikül. CO: kumulus ooforus, CR: korona radiata, ST: membrana granulosa (Myers ve ark., 2004).

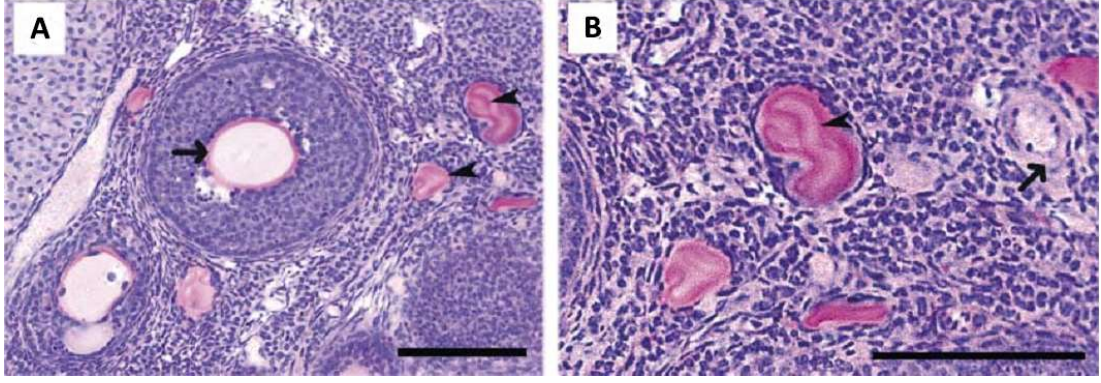
2.1.4.4. Matür (Graaf) foliküller

Matür (sekonder) oositi içeren bu folikül, oosit ile granüloza hücrelerinin arasının gevşemesi ile ovülasyona doğru yol almaktadır. Matür folikülün boyutu ~10 mm veya daha fazladır. Folikülogenezin bu aşamasında teka tabakaları belirginleşmiştir. Teka interna tabakasındaki hücrelerin sitoplazmasında lipit damlacıkları birikir (Gong ve ark., 1996).

İçten dışa incelendiğinde, oositi çevreleyen korona radiata, oosit ile folikül duvarı arasında yer alan kumulus ooforus ve son olarak folikül duvarında yer alan membrana granüloza tabakası belirginleşmiştir (Epic, 2001; Gougeon, 2010).

2.1.4.5. Atretik foliküller

Primordiyal foliküllerin olgunlaşma süreci ya matür folikül oluşumu ya da atrezi ile sonuçlanır. Olgunlaşmaya başlayan bir folikül, gelişimin farklı basamaklarında granüloza hücrelerinin apoptozunun aracılık ettiği atrezi ile atretik folikül haline gelir. Atrezi sürecinde oositte otoliz ve dejenerasyona bağlı yapısal değişiklikler meydana gelirken, dayanıklı bir yapısı olan zona pellusida bu değişikliklere direnir ve katlanıp kollebe olur (Şekil 7). Bağ dokudaki makrofajlar zona pellusida ve dejenere olan hücrelerin fagositasyonunu gerçekleştirir (Mcgee, & Hsueh, 2000; Myers ve ark., 2004). Teka interna ile granüloza hücreleri arasındaki bazal membran bağımsız hale gelip kalınlaşır, böylelikle hyalin bir yapı meydana gelir. Meydana gelen bu hyalin yapıya camsı membran da denilmektedir. Atretik folikülün teka interna tabakasından kaynaklanan intertisyel bezler sayesinde teka hücrelerinden az miktarda androjen salınımı devam eder.

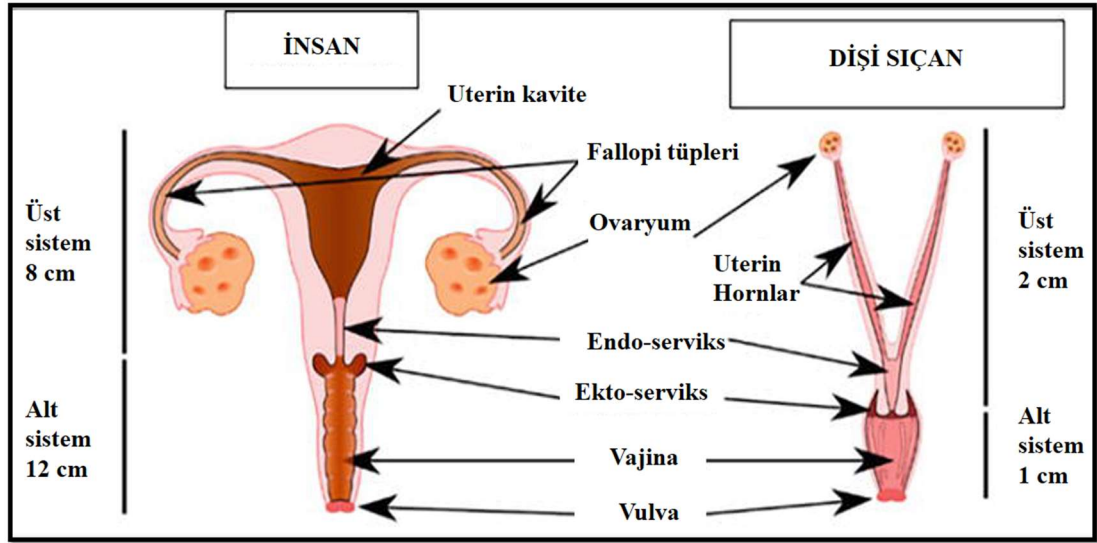


Şekil 7. Atretik foliküller. (A) Sağlıklı folikülde zona pellusida (ok) ve son aşama atretik foliküllerde (ok başı) zona pellusida kalıntılarının ışık mikroskopik görünümü. (B) Kan damarlarından (ok) kolaylıkla ayırt edilebilen zona pellusida kalıntıları (ok başı) (Myers ve ark., 2004).

2.2. Sıçan Dişi Üreme Sistemi

2.2.1. Sıçan ovaryum anatomisi

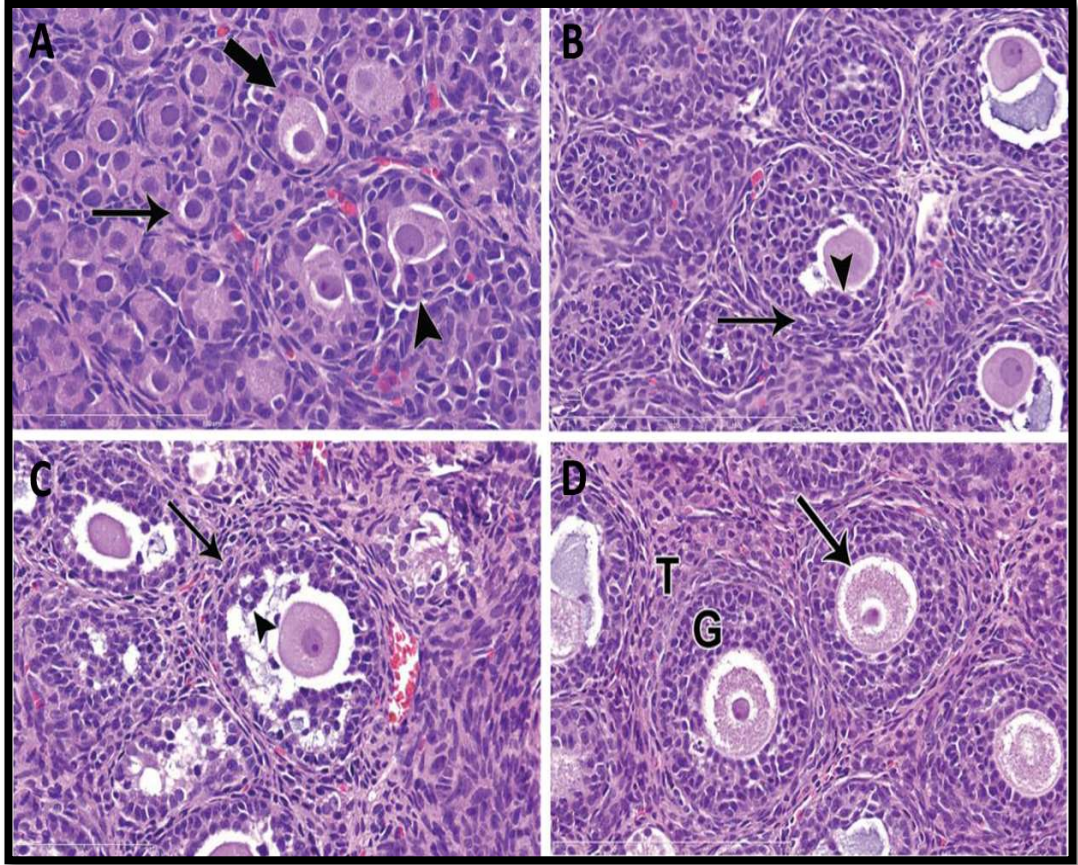
Sıçanlarda sağ ovaryum, sağ böbreğin kaudalinde ve omurganın L4-L5 hizasında iken sol ovaryum sol böbreğin kaudalinde L5-L6 hizasında yerleşiktir (Elvis-Offiah, Success-Isuman, Johnson, Ikeh, & Agbontaen, 2022). İnsan ovarumları periton boşluğuna açık iken sıçan ovaryumları bursadadır. İnsan ovaryumu ile sıçan ovaryumu arasındaki bir diğer farklılık ise şekil ve boyuttur. İnsan ovaryumları oval (badem benzeri) yapıda iken sıçan ovaryumları küreseldir (Elvis-Offiah, ve ark., 2022). Wistar Hannover ve Sprague Dawley cinsi sıçanlarda yapılan bir çalışmaya göre ortalama ovaryum boyutu ~15 mm olup estrus siklusuna göre değişmektedir (Elvis-Offiah ve ark., 2022; Sato, Hashimoto, Doi, Yamada, & Tsuchitani, 2014) (Şekil 8).



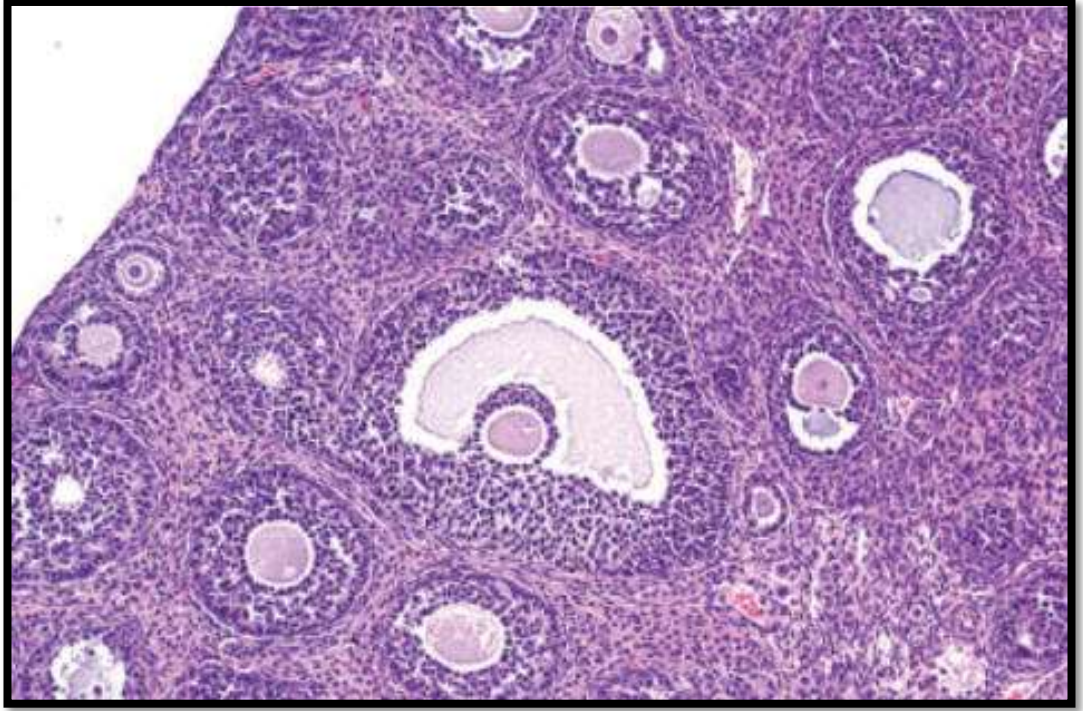
Şekil 8. İnsan ve dişi sıçanda genital sistemlerin anatomik özellikleri (Elvis-Offiah ve ark., 2022).

2.2.2. Sıçan ovaryum embriyolojisi ve foliküler gelişim

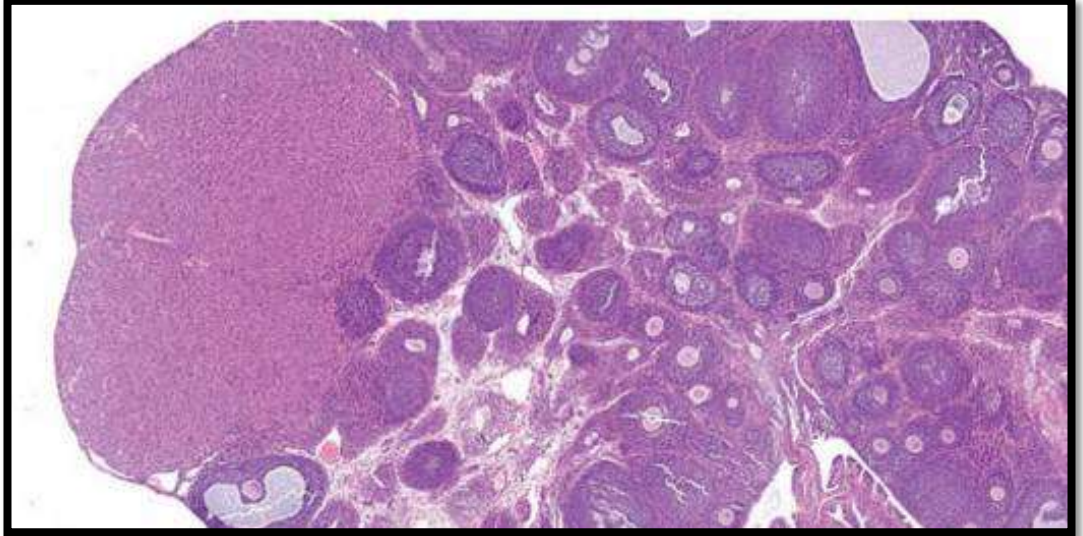
İnsanlarda olduğu gibi sıçanlarda da primordiyal germ hücrelerinin allantoisin vitellüs kesesine komşu duvarında belirmesi ile ovaryum gelişimi başlar ve devam eder. Sıçan ovaryumları doğum esnasında somatik hücreler ile çevrilmiş ve kordonlar halinde dizilmiş oositlerden oluşmaktadırlar. Sıçanlarda doğum sonrası 0-7 günlerde [PND 0-7] (yenidoğan dönemi), folikül gelişimi hipofizyal gonadotropinlerinden bağımsızdır ve foliküller preantral kalır (Şekil 9A). Doğumdan 3 gün sonra oositlerin granüloza hücreleri ile kaplanmalarının sonucu primordiyal foliküller oluşur. Primordiyal foliküllere dahil olmayan oositler 3 ila 4. günde kaybolur. Foliküllerde antrum gelişimi, overin hipofiz gonadotropinlerine duyarlı hale geldiği erken infantil dönemde (PND 8-14) meydana gelir (Şekil 9B). Geç infantil dönemde (PND 15-20) zona pellusida ortaya çıkar, hilus oluşur ve antral foliküller olgunlaşır (Şekil 9D, Şekil 10). Juvenil evre (PND 21-32), FSH düzeylerinde en düşük seviyeye karşılık gelen medüller folikül atrezisinin meydana geldiği aşamadır. Peripubertal dönemde (PND 33-37), FSH seviyeleri yükseldikçe atrezi azalır (Şekil 11) ve LH, ovulasyona yol açan iki modlu dalgalanma paternine başlar (McGee ve ark., 1997). İnsan postnatal gelişiminin ~13. yılında puberteye erişirken, sıçan için bu süre postnatal gelişiminin ~35. gününe denk gelmektedir (McGee ve ark., 1997).



Şekil 9. Sıçanlarda postnatal folikül gelişimi. (A) PND6 sıçan ovaryumu. İnce ok: primordiyal, kalın ok: unilaminar primer ve ok başı: multilaminar primer foliküller (B) PND 10 (erken infantil dönem). Granüloza hücreleri (ok başı) ile tekal hücreler (ok) arasında net bir sınır bulunmayan multilaminar primer foliküllerde zona pellusidanın yokluğu izlenmekte. (C) PND 13 (erken infantil dönem)). Erken antral foliküller, dolgun tekal hücreler (ok) ve granüloza hücreleri (ok başı). (D) PND 15 (geç infantil dönem). Zona pellusida oluşumu (ok) ve granüloza hücreleri (G) ile tekal hücreler (T) arasındaki belirgin ayırım (Picut ve ark., 2015).



Şekil 10. PND18 sıçan ovaryumunda varolan foliküller (Picut ve ark., 2015).



Şekil 11. PND35 sıçanda peripubertal ovaryum atretik folikül ve antral foliküllerin varlığı (Picut ve ark., 2015).

2.2.3. Sıçan östrus döngüsü

Östrus dişi sıçanlarda reproduktif döngüye verilen isimdir. Dişi sıçanlar östrus döngüsü dört evreden oluşur: Proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus (Cora, Kooistra, & Travlos, 2015). Dişi sıçanlar proöstrus, östrus dönemlerinde gebe kalabilirler. Eğer

östrus evresinde fertilizasyon gerçekleşmez ise endometriyumda gerileme (resorbtion) gerçekleşir. İnsanlarda ise fertilizasyonun gerçekleşmediği durumda endometriyumun döküldüğü menstürasyon dönemi başlar. Menstrüal siklus ile östrus siklusunun süreleri oldukça farklıdır; Menstrüal siklus 28 gün sürer ve 14. gün ovulasyon gerçekleşirken östrus siklusu 4 -6 gündür (Nelson, 2009).

Menstrüel ve östrus siklusları arasındaki en göze çarpan ortak nokta hipotalamus tarafından gonadotropin salgılayan hormonun (GnRH) pulsatil salınımıdır. Salgılanan GnRH adenohipofizdeki gonadotrop hücrelerden FSH ve LH hormonlarının üretimini ve salınımını tetikler. Bu hormonlar sistemik dolaşım ile ovaryumlara iletilir ve foliküllerin gelişimine ve sonucunda E2 (östrodiol) üretimine neden olur.

Östrus döngüsünün evreleri vajinal smear tekniği ile alınan vajinal sürüntü örneklerinin ışık mikroskopik değerlendirilmesi ile belirlenir (Tablo 1, Şekil 12). Bu teknik ilk olarak Stockard ve Papanicolaou tarafından kullanılmıştır.

Tablo 1. Östrus siklusu esnasında smear özellikleri.

Östrus Evreleri	Mikroskopik Özellikleri
Proöstrus	Çekirdekli ve çekirdeksiz epitel hücreler preperata hakimdir.
Östrus	% 75 kornifiye hücreler mevcut iken, %25 oranında çekirdekli ve çekirdeksiz epitel hücreler bulunmaktadır.
Meteostrus	Çekirdekli ve kronifiye hücrelerin yanısıra çok sayıda lökosit bulunur.
Diöstrus	Lökositlerin preperata hakim olduğu fazdır ve %85-100 oranında bulunurlar.

2.3. Prematür Ovaryan Yetmezlik (POI)

Prematür ovaryan yetmezlik (POI) ilk olarak 1942’de Fuller Albright tarafından tanımlanmış ve primer ovaryan yetmezlik olarak adlandırılmıştır. Daha sonrasında POI’yi yanımlamak için tablo 2’de gösterildiği gibi farklı terim kullanılmıştır (Webber ve ark., 2016) (Şekil 12).

	PUBMED yayın sayısı	PUBMED son beş yıla ait yayın sayısı
Primary Ovarian Insufficiency	1581	663
Premature Ovarian Failure	1601	573
Gonadal dysgenesis	3057	408
Premature menopause	1011	228
Early menopause	620	170
Hypergonadotropic hypogonadism	346	86
Premature Ovarian Insufficiency	79	70
Ovarian dysgenesis	204	26
Primary ovarian failure	145	20
Hypergonadotropic amenorrhea	52	9
Climacterium praecox	5	0
Menopause praecox	1	0

Şekil 12. PUBMED’de POİ için farklı terimlerin kullanıldığı toplam ve son 5 yıla ait makale sayısı. Eshre Gudline 2015’ten türkçeleştirilmiştir (Cooper ve ark., 2011; Webber ve ark., 2016).

Alan uzmanları, yetersizlik (insufficiency) ifadesinin, durumun değişken doğasını daha doğru bir şekilde tanımladığı ve eksiklik, kusur, bozukluk anlamına gelen “failure” kadar olumsuz bir çağrışıma neden olmadığı gerekçesiyle “insufficiency” yani yetmezlik kavramının kullanımını daha doğru bulmuşlardır. Benzer şekilde bu klinik tablo için kullanılan “primer” ya da “prematür” kavramlarının doğruluğu da tartışılmıştır. Primer terimi, Albright tarafından 1942’de öne sürülmüş ve o dönemde birçok kişi tarafından kullanılmıştır. Primer terimi, sendromun ana kusurunun, hipofiz tarafından gonadotropin salgılanmasındaki merkezi bir bozukluk sonucu oluşan sekonder ovaryum yetmezliğinden farklı olarak ovaryumdan kaynaklandığını vurgulanmaktadır. Bu yaklaşım Cooper ve meslektaşları tarafından tartışılmıştır ve bu terminoloji bir Amerikan konsensüs toplantısında benimsenmiştir (Cooper ve ark. 2011; Nelson, 2009) ve kadınlarda ovülasyonun gerçekleşmemesi ve östrojen hormonunun yeterince üretilmemesi durumunu aktarabilmek için “primer ovaryan yetmezliği” terimi kabul edilmiştir. Bununla birlikte, doğal menopozdaki kadınları hasta popülasyonundan hariç tutabilmek için bir yaş sınırı belirlenmesi gerekliliği nedeniyle tablonun “prematüre primer yumurtalık yetmezliği” veya PPOI olarak adlandırılması düşünülmüştür. (Cooper ve ark., 2011; Nelson, 2009). ESHRE (Üreme Endokrinolojisi için Özel İlgi Grubu, Utrecht, Aralık 2013) tarafından düzenlenen bir çalışmada menarşla ilişkili olarak amenoreyi sınıflandırmak için

yaygın olarak kullanılan "primer" ve "sekonder" terimlerinin karışıklığa yol açacağı kararına varılmıştır. Katılımcılarının net bir çoğunluğu “prematüre ovaryan yetmezliği” terminolojisinin doğru olduğu sonucuna varmışlardır. Sonuç olarak:

- POI, 40 yaşından önce ovaryum fonksiyonunun kaybına bağlı amenore olarak tanımlanır.
- Kadınlardaki hipergonadotropik hipogonadizm durumudur ve primer amenore ya da sekonder amenore şeklinde kendini gösterebilir.

POI kadın infertilitesinin başlıca nedenleri arasındadır. Luborsky ve arkadaşları, 40-55 yaş arası kadınlarda yapılan bir araştırmada POI prevalansının %1,1 olduğunu bildirmişlerdir (Luborsky, Meyer, Sowers, Gold, & Santoro, 2003). POI'nin etiolojisi geniş kapsamlıdır. Kromozomal kusurlar, frajil-X sendromu ve otozomal gen kusurları gibi sebepler başta olmak üzere kromozomal ve genetik kusurlar POI'ye neden olabilir. POI ayrıca otoimmün bozukluklar, enfeksiyonlar, ameliyat, radyoterapi veya kemoterapi dahil iatrojenik bir nedene sahip olabilir. POI'nin başlıca iki sebebi vardır (Tablo 2) (Woad, Watkins, Prendergast, & Shelling, 2006). POI genellikle idiyopatik veya spontan olarak sınıflandırılmaktadır.

Tablo 2. POI sebepleri.

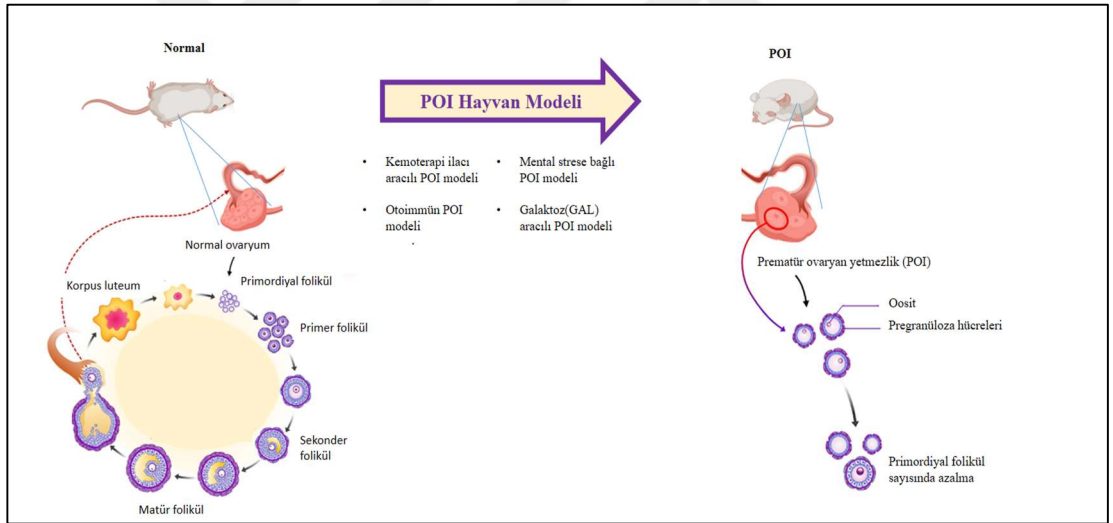
Az Folikül	Disfonksiyonel Foliküller
Bireyin az folikül sayısı ile dünyaya gelmesi	Gonadotropinlerin üretilmemesi
Foliküllerin hızlı dejenere olması	Gonadotropik hormonlara cevap vermemesi

POI'nin pek çok semptomu bulunmaktadır; bunlardan ilki ovülasyonun gerçekleşmemesinden kaynaklı, menstrüal siklusa düzensizlik ve infertilitedir. POI yalnızca fertilitiyi etkileyen bir durum değildir, aynı zamanda kemik sağlığını (osteoporosis), kardiyovasküler sağlığı ve nörolojik fonksiyonları da etkiler. Bu etkiler uzun vadeli sonuçlara yol açabilir, POI ve erken menopozun daha yüksek ölüm oranlarıyla ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Erken ölümün ana nedeninin kardiyovasküler hastalıklar olduğu bildirilmiştir. POI sonucu oluşabilecek bir diğer hastalıklar osteoporosis, bilişsel bozukluk, demans, parkinsonizm ve cinsel işlevde azalmadır (Shuster, Rhodes, Gostout, Grossardt, & Rocca, 2010).

2.4. 4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD)

POI'de yer alan genetik ve moleküler mekanizmaları tanımlamak ve yeni terapötiklerin gelişimi için deneysel çalışmalarda fare ve sıçan modelleri kullanılır. Bu modeller, ovaryum gelişimsel süreçleri ve işlevleri açısından insanlarla yüksek derecede benzerliğe sahiptirler. Ovulasyon süresi ve monoovulasyona karşı poliovülasyon dahil olmak üzere bazı varyasyonlar ve fiziksel farklılıklar dışında, POI'den sorumlu benzer bir genetik yol düzenlemesi sergiler (Na, & Kim, 2020).

Bu modeller, intraperitoneal (i.p.) veya kuyruk veni (intravenöz) yoluyla uygulanabilen siklofosamid (Nguyen ve ark., 2019), busulfan (Yang ve ark., 2016), cisplatin (Nguyen ve ark., 2019) ile kimyasal indüksiyonla ve bunların yanı sıra murin ZP3 330-342 peptidleri (Li ve ark., 2020) yardımı ile otoimmün olarak oluşturulabilmektedir (Şekil 13).



Şekil 13. POI hayvan modelleri.

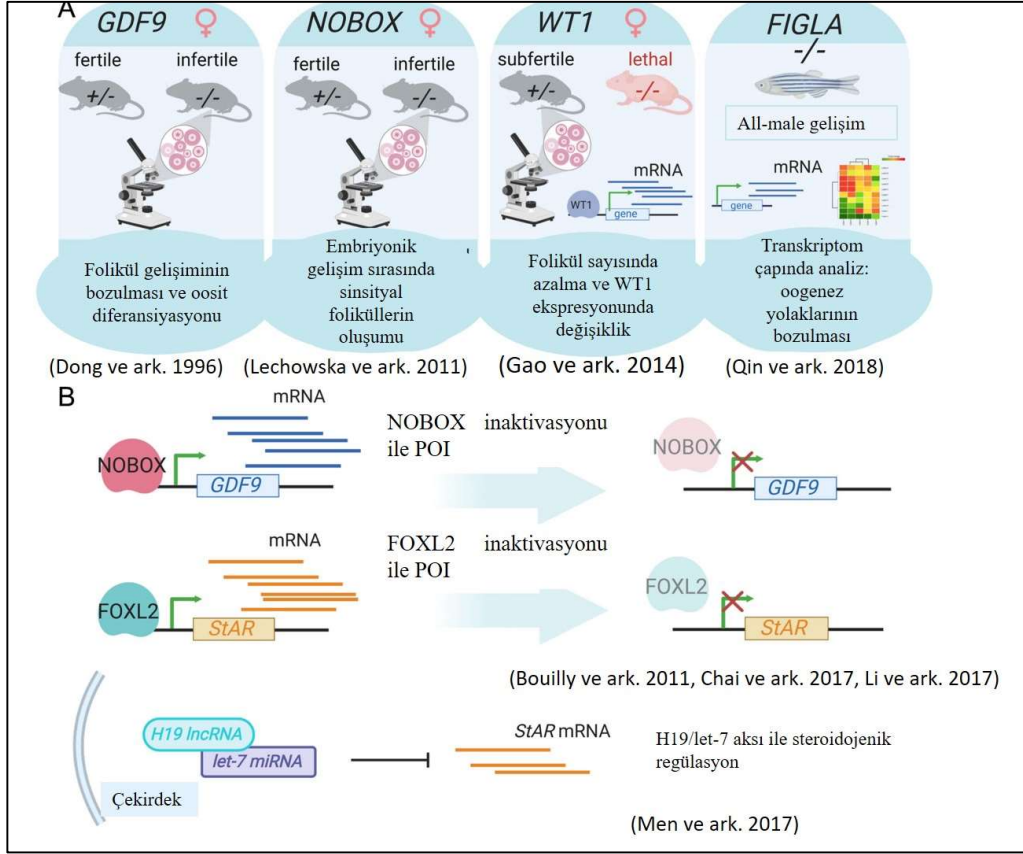
Kimyasal indüksiyon ile oluşturulan modellerde kullanılan ajanlardan bir diğeri 4-vinilsikloheksen diepoksit (VCD)'dir (Hoyer, Devine, Hu, Thompson, & Sipes, 2001; Hoyer, & Sipes, 2007). Alev geciktiriciler, böcek ilaçları, yapıştırıcılar, kokular ve sentetik kauçuk üretiminde kullanılan 4-vinilsikloheksenin kataboliti olan VCD'nin ovotoksik etkisi vardır (Hoyer ve ark. 2001). VCD'nin kemirgenlerde ve primatlarda primordial ve primer foliküllerin atretik dejenerasyonunu indüklediğini göstermiştir (Mayer ve ark. 2002). VCD'nin, apoptoz sürecini başlatarak selektif

olarak sıçan ve fare primordiyal ve primer foliküllerinin sayısını azaltması (Fernandez, ve ark., 2008; Hoyer, & Sipes, 2007), uygun perimenapozal hormonal değişikliklere sebep olması (Mayer, Devine, Dyer, & Hoyer, 2004), non-invaziv bir yöntem olması (Kempen, Milner, & Waters, 2011), çevresel dokuları etkilememesi (Muhammad ve ark., 2009), hem in vivo hem de in vitro test edilmiş olması (Mayer ve ark., 2002) ve ayrıca hayvanlarda genetik değişikliklere sebep olmaması (Kempen, Milner, & Waters, 2011) gibi avantajları vardır.

2.5. Primordiyal Folikül Aktivasyonunun Moleküler Mekanizmaları

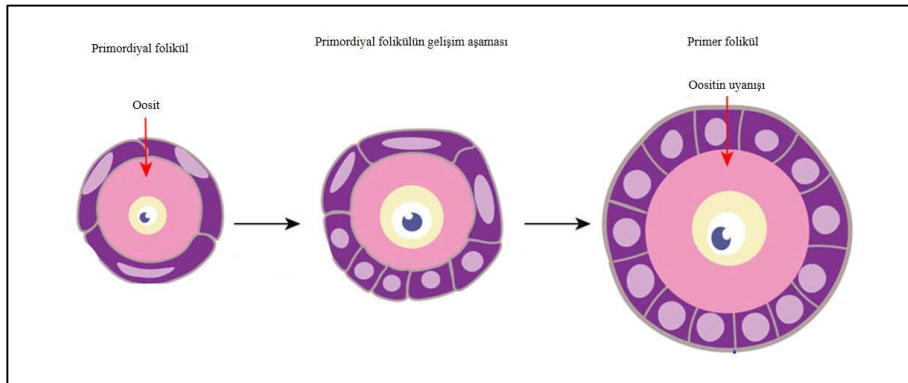
Primordiyal foliküller dişi üremesinin temel birimidir. Primordiyal foliküllerin aktivasyonu, primordiyal foliküllerin foliküler gelişim basamaklarına geçmiş olduğu durumdur. Primordiyal foliküllerin aktivasyonu gerçekleştiğinde bu durum geri döndürülemez (Shah ve ark., 2018). Aktivasyonun gerçekleşmesi ve bunun düzenli bir şekilde gerçekleşiyor olması folikül rezervini doğrudan etkiler ve dolayısıyla dişi üreme ömrünü belirler. Primordiyal folikül aktivasyonu, primordiyal foliküllerin hareketsiz veya aktif durumlarının korunmasının altında yatan moleküler mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır.

Primordial foliküller, oosit ve pre-granüloza hücreleri olmak üzere yalnızca iki tip hücreden oluşur. Primordiyal foliküllerin aktivasyonu bu iki tip hücrenin de katılımını gerektirmekte ve her ikitip hücre ile ilişkili yolların devreye girmesi ile gerçekleşmektedir (Zhang ve ark., 2014). Oosit ile ilişkili sinyal yolları PTEN-PI3K-AKT sinyali ve TSC1/TSC2-mTOR sinyali. Bu sinyal yollarına ek olarak LHX8, CDC42 transkripsiyon faktörleri ve E-kaderin molekülü oosit ile ilişkili primordiyal folikül aktivasyon araçlarıdır. Pre-granüloza hücrelerinde sinyal yolları ise TSC1/TSC2-mTOR sinyali, FOXL2, SMAD3, AMH, ESR2 ve Wnt ligand salgı aracıdır. Diğer önemli sinyal yolları ve moleküller ise HIPPO, HDAC6, SIRT1, TGF- β 1, NGF, EGF ve s.27 hücre siklusu baskılayıcısıdır (Şekil 14) (Shah ve ark., 2018).



Şekil 14. Primordiyal folikül aktivasyonunun moleküler mekanizmalarının bozulması ile POI modeli oluşturulması.

Primordiyal folikül aktivasyonu sırasında temel iki değişiklik meydana gelir: yassı granuloza hücrelerinin kübik şekle dönüşmesi ve folikül içerisindeki oosit çapı artması. (Şekil 15).



Şekil 15. Primordiyal folikül aktivasyonunda folikülde gözlenen değişiklikler. Bir folikül, ortasında tek bir oosit ve onu çevreleyen birkaç somatik hücreden oluşur. Primordiyal folikül aktivasyonundan sonra, folikül hücreleri yassı şekilden, kübik şekle dönüşür ve oosit çapı artar (Zhang ve ark., 2023).

2.6. ASPROSİN

Geçmişte sadece enerji depolama alanı olarak kabul edilen adipoz doku, eksprese ettiği adipokinler aracılığıyla endokrin, parakrin ve nöroendokrin sinyaller üreterek çok sayıda fizyolojik ve patolojik sürecin düzenlenmesinde rol oynar (Fasshauer, & Blüher, 2015). Adipoz doku tarafından eksprese edilen çok sayıdaki adipokin, çok işlevlidir ve pleiotropik etki gösterir (Fasshauer, & Blüher, 2015). Asprosin, 2016 yılında yağ dokusunda eksprese edilen yeni bir glukojenik ve oreksijenik protein hormon olarak bildirilmiştir (Romere ve ark. 2016). Asprosin, profibrillin-1'in, kalsiyum bağımlı bir endoproteaz olan furin tarafından kesilen, C-terminaline karşılık gelen bir peptittir (Romere ve ark. 2016). Sistemik dolaşıma salınan asprosin, karaciğerde cAMP-PKA sinyal yolağını aktive ederek hepatositlerden dolaşıma hızlı glukoz salınımını sağlar (Li ve ark., 2019, Romere ve ark., 2016). Asprosin bu etkisini OLFR734 reseptörü aracılığıyla gösterir (Li ve ark. 2019). Asprosinin kan beyin bariyerini geçtiği ve hipotalamusta arkuat çekirdekte lokalize oreksijenik AgRP (Agouti ile ilişkili peptit) nöronlarını direkt olarak aktive ederken, anoreksijenik POMC nöronlarını indirekt olarak inhibe ettiği, sonuç olarak farelerde iştahı uyardığı gösterilmiştir (Duerschmid ve ark. 2017; Romere ve ark. 2016).

Yakın zamanda yapılan araştırmalar adipokinlerin dişi ve/veya erkek bireylerde fertilité üzerinde olumlu veya olumsuz etkilerinin olduğunu göstermektedir (Kurowska ve ark. 2021; Maurya, & Singh, 2022). Obez bireylerde yapılan bir çalışmada asprosin ve OLFR etkileşiminin erkek fertilitésini etkilediği bildirilmiştir (Wei, Long, & Wang, 2019). OLFR734 geninin devre dışı bırakılmasının sperm canlılığını ve morfolojisini etkilemediği, ancak spermin, kadın genital sistemde ilerlemesi için önemli olan progressif motilitesinin önemli ölçüde azalttığı ve ek olarak OLFR734-/- erkeklerde fertilitenin azaldığı ve asprosin tedavisi ile progressif motilitesi önemli ölçüde iyileştiği gösterilmiştir (Wei, Long, & Wang, 2019). Asprosin uygulamasının ATP seviyesini arttırarak, yaşa bağılı sperm motilitesindeki azalmayı iyileştirdiği ve doğurganlıktaki yaşa bağılı düşüşü tersine çevirdiği (Wei, Long, & Wang, 2019) ve testosteron seviyelerini yükselterek testiküler fonksiyonları iyileştirdiği (Maurya, & Singh, 2022) bildirilmiştir.

Asprosin ve reseptörü olan OLF734'ün ovaryum fonksiyonu ve kadın doğurganlığı üzerindeki rolü ile ilgili literatürde az sayıda klinik ve deneysel çalışma vardır. Bu çalışmalar ovaryan foliküllerin işlevinin düzenlenmesinde asprosinin önemli bir rolü olabileceğini düşündürmektedir (Maylem ve ark., 2021). Maylem ve ark. (2021), büyük (6-13 mm) ve küçük (<6 mm) foliküllerden kültüre edilen granüloza ve teka hücrelerinde asprosin öncüsü FBN1 ve reseptörü olarak varsıyalan OR4M1'in (koku reseptörü ailesi 4 alt ailesi M üyesi 1) ekspresyonlarında farklılıklar olduğunu ve asprosin'in progesteron üretimini etkilemeden LH kaynaklı androstenedion üretimini arttırdığını göstermiştir. Bufalolarda intrafoliküler uygulanan asprosinin, folikül çapını enjeksiyondan sonraki ikinci günde kontrol grubuna göre anlamlı olarak arttırdığı ve ek olarak folikül sıvısında FBN1 mRNA miktarının küçük çaplı foliküllerde, büyük foliküllere göre 1.9 kat fazla olduğu ve bu farkın anlamlı olduğu bildirilmiştir (Maylem ve ark. 2022). Asprosinin dişi genital sistemle ilişkisinin araştırıldığı bir diğer çalışmada, menstrüal siklus sırasında asprosin seviyelerinin değiştiği ve kontrasepsiyon kullanımının asprosin seviyesinde bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (Leonard ve ark. 2021). Asprosinin folikül büyümesini indüklemesi (Maylem ve ark. 2021), menstrual siklus evrelerine göre asprosin seviyesinin değişmesi (Leonard, Shill, Thackray, Stensel, Bishop, ve ark. 2021), foliküler sıvıda FBN1 ve OR4M1 mRNA ekspresyonunun varlığı (Maylem, ve ark. 2021) ve hem sağlıklı hem de neoplastik over dokusunda asprosin ve OR4M1 protein ekspresyonunun olması (Kerslake ve ark. 2021) ovaryan foliküllerin gelişimine etkisinin olduğunu göstermektedir.

Günümüzde POI'li kadınlar için en etkili tedavi hormon tedavisidir. Bununla birlikte, hormon replasman tedavisi, yan etkilerinden (örneğin, yüksek kanser riski) dolayı birçok kadın için yarardan çok zarar verebilmektedir (Li ve ark. 2018). Bu nedenle birçok bilim insanı, kök hücre temelli stratejiler kullanarak alternatif terapötikler geliştirmeye çalışmaktadır (Byers ve ark., 2012; Cakiroglu ve ark., 2020; Wang, Wang, Yang, Li, & Yang, 2017).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamıza Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05.04.2022 tarih ve 22-05/08 karar no ile etik kurul onayı sonrasında başlandı. Çalışmada Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHYUAM)'nden 35 adet Sprague-Dawley sıçan kullanıldı. Hayvan modellemelerinde yaygın olarak kullanılıyor olması ve puberteden menapoza kadar devam eden siklik östrus döngülerinin olması nedeniyle denek olarak sıçanlar tercih edildi. Sıçanların 6-7. haftada puberteye girdikleri ve seksüel maturasyonlarını tamamladıkları bilindiğinden yaklaşık 60 günlük, 170-200 g ağırlığında dişi sıçanlar kullanıldı.

Denekler su ve besin kısıtlaması olmaksızın, 12 saatlik aydınlık/karanlık döngüsünde DEHYUAM'de standart kafeslerde her kafeste en fazla 5 denek olacak şekilde barındırıldı. Denekler üzerinde yapılan tüm işlemler DEHYUAM cerrahi girişim alanı ve Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

Deney grupları oluşturulmadan önce, deneklerin normal over rezervine sahip olup olmadıkları belirlendi. Bu amaçla deneyde kullanılacak sıçanların serum AMH düzeyleri ölçüldü ve homojen bir normal ovaryan rezerv grubu oluşturmak amacıyla AMH değerleri %25-%75'lik dilimler arasında tespit edilen denekler çalışmaya dahil edildi.

3.2. Deney Grupları

Hedef 1: Prematür ovaryan yetmezliği (POI) sıçan modelinin oluşturulması ve kontrol grubu ile kıyaslanarak doğrulanması: Bu hedef doğrultusunda iki grup oluşturuldu.

Grup 1: Normal over rezervi (NOR) grubu (n=5): Deneyin 1. günü kan örneğinin alınmasının ardından sakrifiye edilen deneklerden oluşan gruptur. Alınan kan örnekleri santrifüj edildi ve serumları, ELISA yöntemi ile anti müllerian hormon (AMH) ve estradiol (E2) düzeylerinin ölçümü için -80 °C'da saklandı.

Grup 2: POI grubu (n=5): Günde tek doz 4-vinilkloroheksen diepoksit (VCD) enjeksiyonu yapılarak POI sıçan modeli oluşturuldu. Çalışmada deneysel POI modeli oluşturmak için DMSO'da çözülen VCD kullanıldı. VCD enjeksiyonları başlamadan önce östrus takibi yapıldı. Östrusta olan deneklerden ELISA için kan alınıp serumları saklandı. Östrusta olduğunun tespit edilen deneklerde VCD enjeksiyonlarına başlandı. VCD, tek doz/gün ve her gün aynı saatte subkütan yolla 15 gün süreyle deneklere enjekte edildi (Frye, J. B. ve ark. 2012) . Enjeksiyonların tamamlanmasının ardından sevofluran inhalasyon anestezisi altındaki deneklerden retro-orbital kan alınıp serumları saklandı.

Hedef2: POI sıçan modeli oluşturulmuş deneklerde asprosinin ovaryan rezerve etkisinin belirlenmesi:

Bu hedef doğrultusunda iki farklı grup oluşturulmuştur.

Grup 3: Serum Fizyolojik (SF) (kontrol grubu) (n=5): Bu gruptaki deneklere asprosinin çözücüsü olan serum fizyolojik intraperitoneal (ip) yolla verildi.

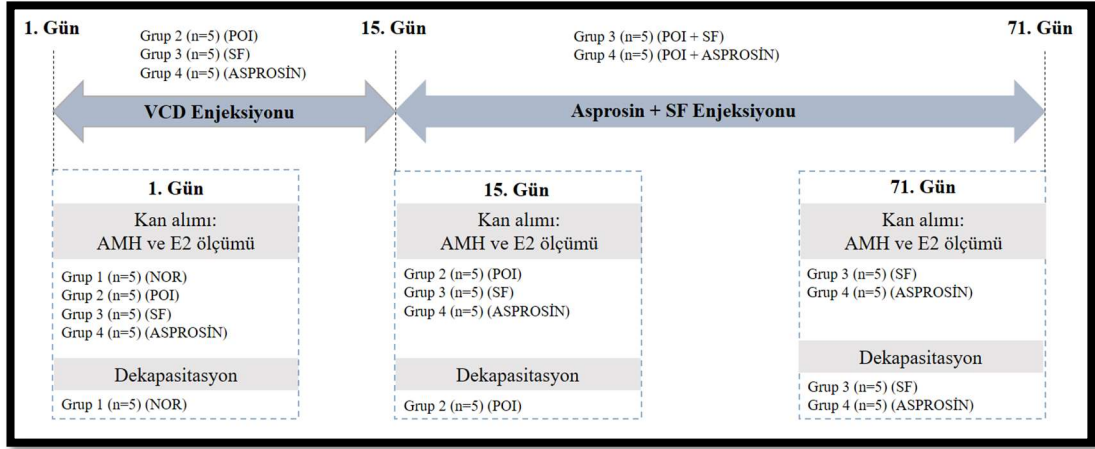
Grup 4 (Asp grubu) (n=10): Bu gruptaki deneklere 15 günlük VCD uygulamasının ardından 8 hafta boyunca günde tek doz asprosin 500 ng/kg dozda i.p. yolla (Oz, ve ark., 2023) verildi.

Tüm gruplar için VCD enjeksiyonuna, deneğin östrusta olduğunun tespiti ile başlandı. Östrus takibi sıçanlardan alınan smear örneklerinin Shorr yöntemi ile boyanması ve değerlendirilmesi ile yapıldı. Grup 2, grup 3 ve grup 4'deki deneklerden VCD öncesi, VCD sonrası ve dekapitasyon öncesi kan alındı ve serumları model doğrulanması amacıyla hormon seviyelerinin ELISA yöntemi ile tespiti için -80 °C'de saklandı.

Tüm gruplarda enjeksiyonların tamamlanmasının ardından, sevofluran anestezisi verilen denekler, kan örnekleri alınmasını takiben dekapite edildi. Sağ overleri histolojik değerlendirme için %10'luk formol ile fikse edilip, parafine gömüldü. Sol overleri ise western-blotting yöntemi için homejenat haline getirilip -80 °C'de muhafaza edildi.

Muhafaza edilen serumlarda ELISA tekniği ile AMH ve E2 düzeyleri belirlenirken, ovaryum dokuları hematoksilin-eosin (H&E) ve immünohistokimyasal yöntem (PCNA için) ile boyanarak primordiyal, primer ve antral folikül sayıları karşılaştırıldı.

Deney akışı şekil 16’da verilmiştir.



Şekil 16. Çalışma grupları ve deney akışı.

3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulama Yöntemi

Kullanılan biyolojik aktif maddeler, dozları, veriliş yolları ve süreleri tablo 3’te verilmiştir.

Tablo 3. Çalışma gruplarında uygulanan kimyasal maddeler, uygulama şekilleri ve uygulama süreleri.

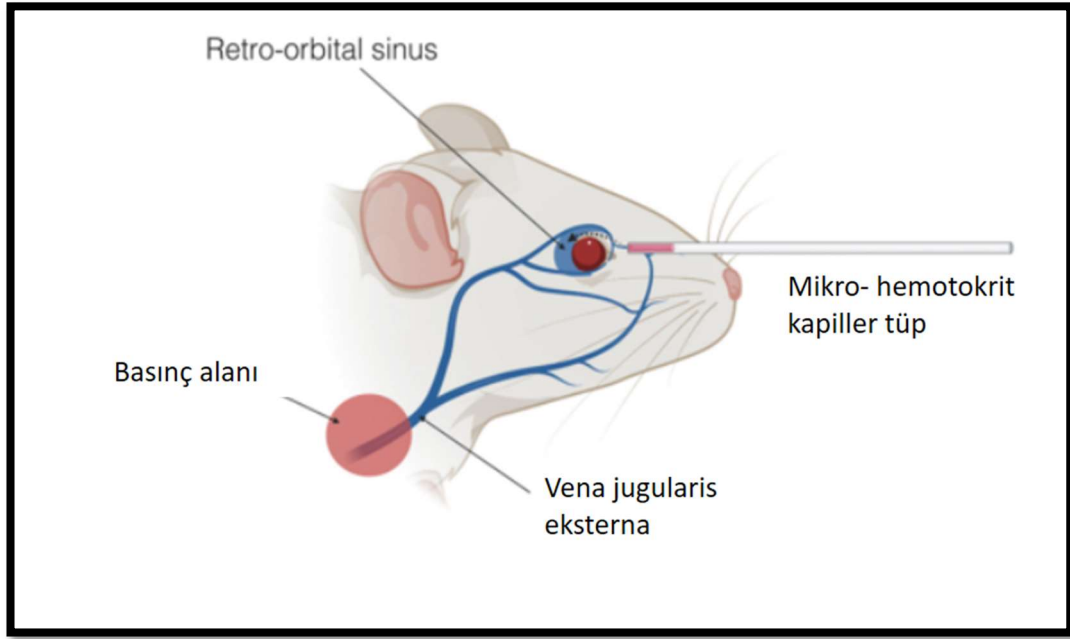
Etken madde	Doz	Süre	Uygulama yöntemi
4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD) / DMSO (1ml/kg) çözölmüş	160mg/kg/gün (Frye ve ark., 2012)	15 gün	Subkütan
Asprosin	500 ng/kg/gün (Oz ve ark., 2023)	8 hafta	İntraperitoneal
Serum fizyolojik	200 µl	8 hafta	İntraperitoneal

3.4. Kan Örneklerinin Alınması

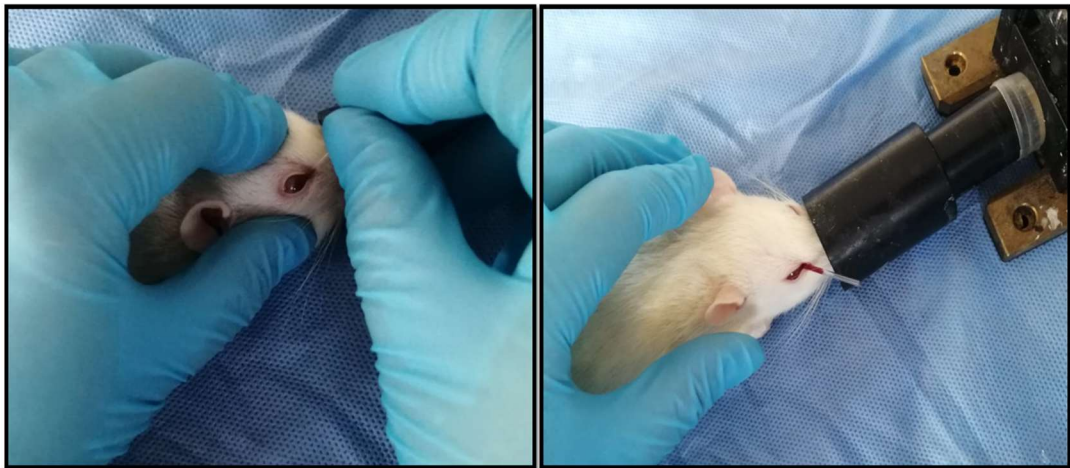
Retro-orbital kan örneği alımı, retro-orbital sinüse nüfuz edilerek hem farelerde hem de sıçanlarda kullanılabilir (Şekil 17). Yönteme orbital venöz, posterior-orbital ve pleksus periorbital kanaması da denir (Parasuraman, Raveendran, & Kesavan, 2010).

Kan alımı sevofluran inhalasyon anestezisi altında gerçekleştirildi. Denek baskın olmayan el yardımı ile tutuldu, göz kapağı gerdirildi ve hematokrit kılcal tüp aracılığı ile retroorbital kan alındı. Hematokrit kılcal tüp medial kantusa 45°lik açı ile

yerleştirildi. Dokuyu delip pleksus/sinüse geçmek için hafif bir baskı uygulandı. Pleksus/sinüs delindiğinde kılcal tüpten kan geldiği gözlemlendi ve kan santrifüj tüplerine alındı. Pleksustan gerekli miktarda kan alınca kılcal tüp yavaşça çıkarıldı. ve kanama alanı steril pamukla temizlendi. Hafif basınç uygulanarak kanama durduruldu. Kan alındıktan yarım saat sonra denek postoperatif ve periorbital lezyonlar açısından kontrol edildi (Şekil 18).



Şekil 17. Retroorbital kan alımının şematik gösterimi. (Bourdais, A., Dehapiot, B.,& Halet,G.,2018)

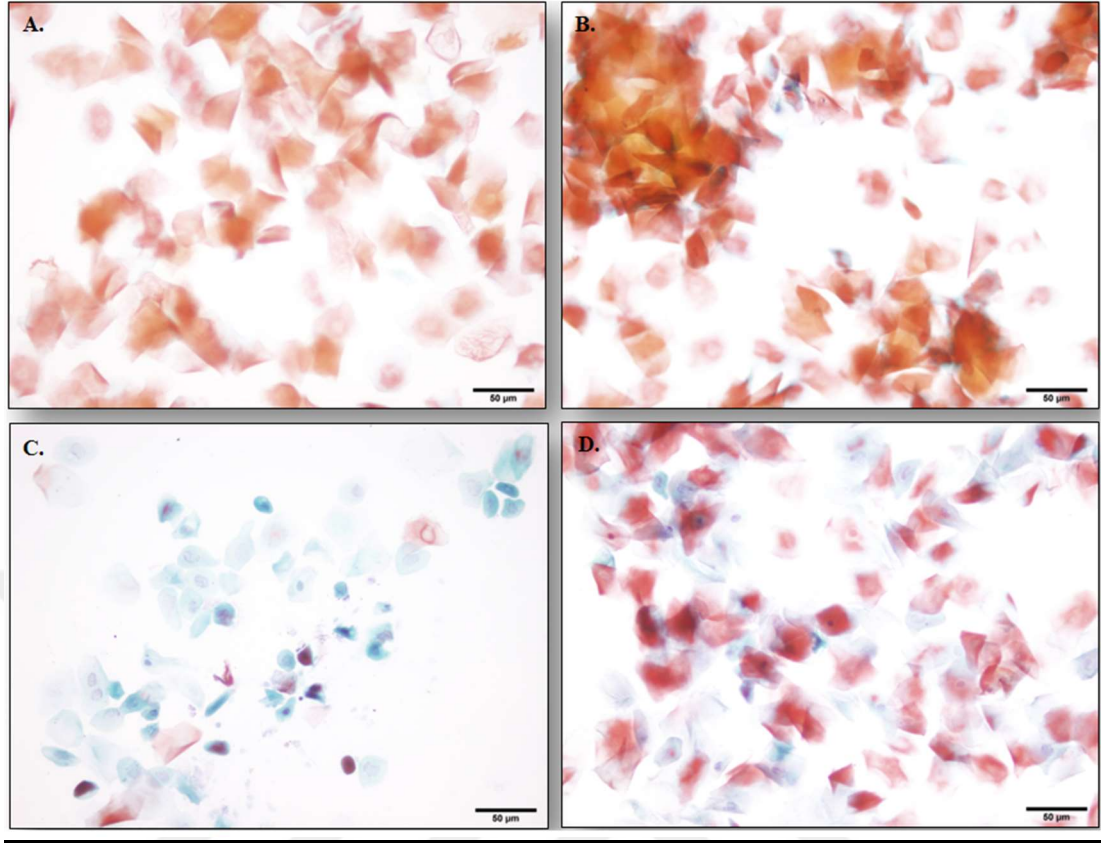


Şekil 18. Çalışma esnasında Sprague Dawley dişi sıçandan serum elde etmek amaçlı retroorbital kan alınması.

3.5. Vajinal Smear ile Östrus Döngüsünün Evrelerinin Tayini

Sıçanlar poliöstriktirler, yaşa ve türe göre değişen ardışık östrus döngüleri geçirirler. Bu döngüler ışık, mevsim ve yaşam koşullarına göre de değişiklik gösterebilmektedir. Bu çalışmada östrus döngüsünün evreleri Paccola ve arkadaşlarının tekniği kullanılarak tayin edilmiştir (Paccola, Resende, Stumpp, Miraglia, & Cipriano, 2013). Beklenen ağırlığa (~200 g) ulaşan deneklerden serum fizyolojik ile ıslatılmış pamuk uçlu çubuk yardımı ile aşırı servikal uyarım sonucu meydana gelebilecek sahte gebeliği önlemek amacı ile ~1 cm derinlikte vajinal smear alındı. (Goldman, Murr, & Cooper, 2007). Vajinal smearler 8 saat aralıklarla alındı. Vajinal smear örnekleri cam lamlara yayıldıktan sonra oda sıcaklığında (~24 °C) kurutuldu ve ardından Shorr tekniği ile boyandı (Shorr, 1941).

Vajinal smear testinde küçük veya büyük bazofilik hücreler, çekirdekli veya çekirdeksiz asidofilik, preasidofilik hücreler ve lökositler belirlenir. Bu hücreler, östrus siklusunun farklı aşamalarında farklı yoğunluklarda gözlenirler (Şekil 19) (Paccola ve ark., 2013).



Şekil 19. Östrus siklusunun her bir aşamasında alınan yaymaların Shorr metodu ile boyanması (Paccola ve ark., 2013). A. Östrus evresi: Asidofilik çekirdeksiz hücreler gözlenmektedir. B. Östrustan metaöstrusa geçiş esnasında kümeleşmiş çekirdeksiz asidofilik hücreler ve yer yer lökositlere rastlanmaktadır. C. Mavi ile boyanmış olan mukus ve erken diöstrus aşamasındaki artış göstermiş olan lökositler yer almaktadır. D. Proöstrus aşamasında yer alan asidofilik hücreler yer almaktadır.

3.6. Deneysel Prematür Ovaryan Yetmezliği (POI) Modeli Oluşturulması

POI'yi anlamak ve tedavi geliştirmek amacı ile sıçan ve fare modelleri kullanılmaktadır. Her iki denekte ovaryum gelişimleri ve işlevleri açısından insanla benzer özellikler taşımaktadır. Ovülasyon süresi ve poliye karşı mono ovülasyon dışında POI'de benzer genetik yol regülasyonları sergilerler (Na, & Kim, 2020).

Çalışmada kimyasal indüksiyon yani VCD aracılığı ile POI modeli oluşturuldu. Deneklerin östrus döngüleri smear ile takip edilmiştir. Döngünün östrus evresinde olduğu tespit edilen deneklerden retroorbital olarak kan alınarak serumları -80 °C'da muhafaza edildi. Ardından deneklere 14 gün süresince 160 mg/kg/gün (Frye ve ark., 2012) dozda VCD subkütan olarak hergün aynı saatte enjekte edildi. 14 günlük enjeksiyon sonrasında 15. gün deneklerden tekrar kan alınmış ve VCD öncesi alınan örnek ile kıyaslamak amacıyla serumları -80 °C'da muhafaza edilmiştir.

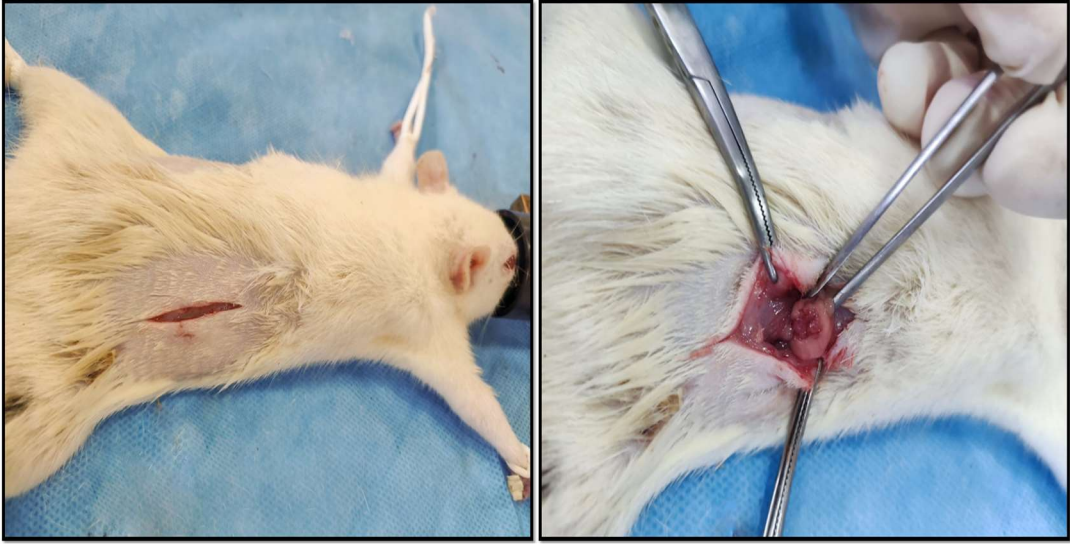
3.7. Asprosin Enjeksiyonu

Asprosin uygulanacak sıçanlar çalışmaya 60 günlük olduklarında dahil edildi. Ağırlıkları ve östrus siklusları aynı araştırmacı tarafından takip edildi. Östrus fazında sıçanlardan kan alımını takiben 14 gün boyunca 160 mg/kg/gün VCD (Frye ve ark., 2012) enjeksiyonu yardımı ile POI modeli oluşturuldu ve ardından (15. günde) tekrar retroorbital kan alındı. 16. gün itibariyle 500 ng/kg/gün (Oz ve ark., 2023) asprosin enjeksiyonu uygulanmaya başlandı. Asprosin enjeksiyonu 56 gün boyunca aynı araştırmacı tarafından aynı saatte intraperitoneal olarak gerçekleştirildi. Asprosin dozu için sıçanlar tartıldı ve doz hesaplaması Oz ve arkadaşlarının 2023 yılında yayınlanan çalışmasında belirtmiş oldukları doza göre gerçekleştirilmiştir (Oz ve ark., 2023). Araştırmada Biologend (katolog no: 762004), Rekombinant Fare Asprosinini kullanıldı. Asprosinin etkisinin kontrolü amacı ile SF grubuna asprosin solventi olan serum fizyolojik enjeksiyonu gerçekleştirildi.

3.8. Deneklerin Sakrifikasyonu

Neonatal kemirgenlerin anestezisine yönelik mevcut bilimsel protokollerde izofluran, sevofluran, hipotermi, ketamin, pentobarbital, fentanil-droperidol ve metoksifluran yöntemleri ve anestezi maddeleri yer almaktadır. Sevofluran yaygın olarak kullanılan inhalan anestezi maddeleridir. Düşük kan gazı çözünürlüğü, anestezinin hızlı indüksiyonu ve anestezi derinliğinin hassas kontrolü sebebi ile sevofluran anestezide tercih edilmiştir. Denekler sevofluran anestezisi altında dekapite edildi.

Deneklerin dorsalinden açılan 2cm'lik kesi ile ooforektomi uygulandı (Şekil 20). Sağ ovaryum histolojik incelemeler için %10 formalin ile fikse edilirken, sol ovaryum ileride yapılacak çalışmalar için PBS içinde homojenat haline getirilip -80 °C'da saklandı.



Şekil 20. Deneklerin dorsalinden açılan 2 cm'lik kesi ile ooforektominin uygulanması.

3.9. Doku Takibi

Tüm deneklerde sakrafikasyon esnasında ooforektomi ile alınan sağ ovaryumlar %10 formalin içerisinde fikse edilmiştir. Fiksasyon sonrası tablo 4'de yer alan çözeltilerde verilen sürelerce doku takibi işlemi gerçekleştirildi. Takip sonrası tüm dokular parafine gömüldü. Parafine gömülen dokulardan alınan kesitlerde histomorfolojik ve immünohistokimyasal incelemeler yapıldı.

Tablo 4. Çalışmada kullanılan doku takip protokolü.

DOKU TAKİP PROTOKOLÜ		
1	%50'lik alkol	2 saat
2	%70'lik alkol	2 saat
3	%90'lik alkol	2 saat
4	%96'lik alkol-I	2 saat
5	%96'lik alkol-II	Tüm gece
6	Ksilen-I	1.5 saat
7	Ksilen-II	1.5 saat
8	Parafin-I	1.5 saat
9	Parafin-II	1.5 saat
10	Parafin-III	1 saat

3.10. Kesit Alma

Parafin bloklara gömülmüş olan dokulardan mikrotom (Leica RM2245) ile 5 µm'lik sıralı kesitler alındı ve hematoksilin-eozin (H&E) boyaması gerçekleştirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler için primordiyal folikülün tespit edildiği kesit başlangıç kesiti olarak belirlendi alınan kesitlerde boyama gerçekleştirildi.

3.11. Hematoksilin – Eozin (H&E) Boyama

Mikrotom aracılığı ile parafin bloklardan alınan 5 µm'lik kesitler şarjlı lamlara (Leica RM2245) aktarıldı. Kesitler tüm gece inkübatörde bekletilen kesitler sonrasında 20'şer dakikalık iki ksilen solüsyonunda deparafinize edildi. Deparafinizasyon işleminin ardından sırası ile tablo 5'deki protokol uygulandı. Hematoksilin- eozin boyama protokolünün (Merck, Darmstadt, Almanya) ardından kesitler DPX (CellPath, Newtown, İngiltere) ile kapatıldı (Fischer ve ark., 2008).

Tablo 5. Çalışmada kullanılan H&E protokolü.

Hematoksilen & Eozin Boyama Protokolü		
1	%90'lik alkol	3 dk
2	%70'lik alkol	3 dk
3	%50'lik alkol	3 dk
4	Akan musluk suyu	3 dk
5	Harris'in Hematoksileni	6 dk
6	Akan musluk suyu	Kesit mavileşinceye kadar
7	Asit-Alkol	1 dips
8	Akan musluk suyu	Kesit mavileşinceye kadar
9	Amonyaklı su	8 dips
10	Akan musluk suyu	3 dk
11	Akan musluk suyu	5 dk
12	Asit-Alkol	Su berraklaşmaya kadar
13	Akan musluk suyu	3 dk
14	Amonyaklı su	3 dk
15	Akan musluk suyu	3 dk

3.12. İmmünohistokimyasal Boyama (IHC)

Şarjı lamalara alınmış 5 µm kalınlığındaki kesitler tüm gece etüvde bekletildi. Ertesi gün kesitler, her birinde 20 dk olacak şekilde iki farklı ksilen solüsyonunda deparafinizasyon gerçekleştirildi. Deparafinizasyon işleminin ardından sırası ile tablo 6 verilen protokol uygulandı. PCNA boyama protokolünü (Proteintech, kat. no: 10205-2-AP, Machester, İngiltere) takibi sonrası kesitlerin kuruması beklendi ardından sırası ile Ksilen-1 ve Ksilen-2'de 20'şer dk şeffaflama gerçekleştirildi ve DPX entellan (CellPath, Newtown, İngiltere) ile kapatıldı. İmmünohistokimyasal boyama üretici firmanın önerdiği prosedüre göre tavşan anti-PCNA poliklonal antikoru (Proteintech, Katalog no: 10205-2-AP) ile 1;200 dilüsyonda gerçekleştirildi. Sekonder olarak biyotin konjuge eşek anti-tavşan antikoru (JacksonImmunoResearch, Katalog no: 162263) 1:300 dilüsyonda kullanıldı. Kromejen diaminobenzidin (DAB) yardımı ile antikor ile işaretlenen granüloza hücreleri renklendirildi.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan immünohistokimya protokolü.

PCNA IHC PROTOKOL		
1	%90'lik alkol	3 dk
2	%70'lik alkol	3 dk
3	%50'lik alkol	3 dk
4	Akan musluk suyu	3 dk
5	Distile su	5dk ×2
6	AR (Na Sitrat)	98°C 10 dk
7	Soğut	30 dk
8	Distile su	5 dk
9	TBST	5 dk×2
10	Akan musluk suyu	3 dk
11	H ₂ O ₂	10 dk
12	Distile su	5 dk×2
13	Blocking (rt)	1 saat
14	Primer Antikor (PCNA)	ON
15	TBST	5 dk×2
16	Sekonder Antikor (o.s)	2 saat
17	TBST	5 dk×2
18	ABC (Vectastain Elite ABC kit)	1 saat
19	TBST	5 dk×3
20	DAB	10 dk
21	Distile su	5 dk×3

o.s.: Oda sıcaklığı

3.13. Ovaryan Folikül Sayımı

Ovaryan folikül sayımı ışık mikroskobu (Olympus BX50, Tokyo, Japonya) yardımıyla gerçekleştirildi. H&E boyama değerlendirmeleri için primordial folikülün tespit edildiği ilk kesit başlangıç kesiti olarak kabul edildi. Folikül sayımı her denek için elde edilen 5µm kalınlığındaki seri kesitlerden 10 µm atlanarak toplam 9 kesit üzerinde gerçekleştirildi.

Kesitler proliferasyon belirteci olan PCNA immünohistokimyasal boyaması için ilk primordiyal folikülün tespit edildiği kesit başlangıç kesiti olarak belirlendi ve 5 farklı seviyeden kesitte boyama gerçekleştirildi. Her kesitte ovaryan foliküller preantral (primordiyal foliküller, unilaminar ve multilaminar primer) ve antral (sekonder ve graaf) foliküller olmak üzere iki gruba ayrıldı. Her denek için 5 farklı

seviyeden elde edilen 5 µm'lik kesitlerde PCNA ile işaretlenen foliküllerin sayımı gerçekleştirildi. Folikül sayımı için folikül sınıflandırması tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. Folikül sınıflandırması.

Ovaryum Foliküller	Yapısal Özellikleri
Primordiyal	Tek katlı yassı pre-granuloza hücreleri ile çevrili tek primer oosit yapısındadır.
Unilaminar primer	Tek katlı kübik granuloza hücreleri ile çevrili tek primer oosit yapısındadır.
Multilaminar primer	Birden fazla katlı granuloza hücrelerinin çevrelediği tek primer oosit yapısındadır.
Sekonder	Birden fazla katlı granuloza hücrelerinin çevrelediği tek primer oosit ve oluşmaya başlayan antrum ile karakterizedir. Teka tabakası belirgindir.
Graaf	Genişlemekte olan tek antrum ve kumulus-oosit kompleksi ile karakterizedir.
Atretik	Camsı membran ile karakterize. Parçalanmış oosit ve incelmış granuloza tabakası ile karakterizedir.

3.14. ELISA

Serum AMH (katalog no: NE06C491003, NEPHENTHE ARAŞTIRMA TEKNOLOJİLERİ, Kocaeli, TÜRKİYE) ve E2 (katalog no: 201-11-0175 SunRed Biotechnology Company, Çin) seviyeleri “enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)” tekniği ile ticari kit kullanılarak tespit edildi. Standartlar, blank ve serumlar antikor ile kaplı olan ELISA plak kuyularına uygun volümlerde mikropipet ile yüklendi. İki kit içinde üretici tarafından önerilen prosedür takip edildi. AMH absorbans ölçümü için 450 ve 570 nm, E2 absorbans ölçümü 450 nm dalga boyunda gerçekleştirildi. Değerlendirme için GraphPad Prism 10 programı kullanıldı.

3.15. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel analiz SPSS v.26 (IBM) aracılığı ile gerçekleştirildi. Parametrik dağılım gösteren verilerde 2 grup arasındaki karşılaştırmada t test, 2'den fazla grup arasında karşılaştırmada ise One-Way ANOVA testi kullanıldı. Non-parametrik dağılım gösteren verilerde; 2 grup arasındaki karşılaştırmada Mann Whitney U testi, 2'den fazla grup arasındaki karşılaştırmada ise Kruskal Wallis Testi kullanıldı. Parametrik dağılım gösteren 2 bağımlı grup arasındaki karşılaştırmada Paired t testi kullanıldı. 2'den fazla bağımlı grup karşılaştırılmasında MANOVA testi kullanıldı. p değerinin 0,05'ten küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Denek Vücut ve Ovaryum Ağırlıkları Ölçümü

4.1.1. Vücut ağırlıkları ölçümü

Deney başlangıcında denek ağırlıklarının optimizasyonu sağlandı. Optimizasyonu sağlanan deneklerin ağırlıkları deney başlangıcında ölçüldü ve istatistiksel olarak değerlendirildi. Deneklerin enjeksiyonlar öncesi ortalama vücut ağırlıkları NOR, POI, SF ve ASP grupları için sırasıyla 184,60±8,08 g, 188,40±10,31 g, 189,40±9,28 g, 186±8,97 g olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi (p= 0,836) (Tablo 8) (Şekil 21).

Enjeksiyonlar sonlandığında deneklerin ağırlıkları tekrar ölçüldü. Deneklerin enjeksiyonlar sonrası ortalama vücut ağırlıkları POI, SF ve ASP grupları için sırasıyla 209,80±0,86 g, 207,80±3,32 g, 208±2,42 g olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi. (p= 0,817) (Tablo 8) (Şekil 21).

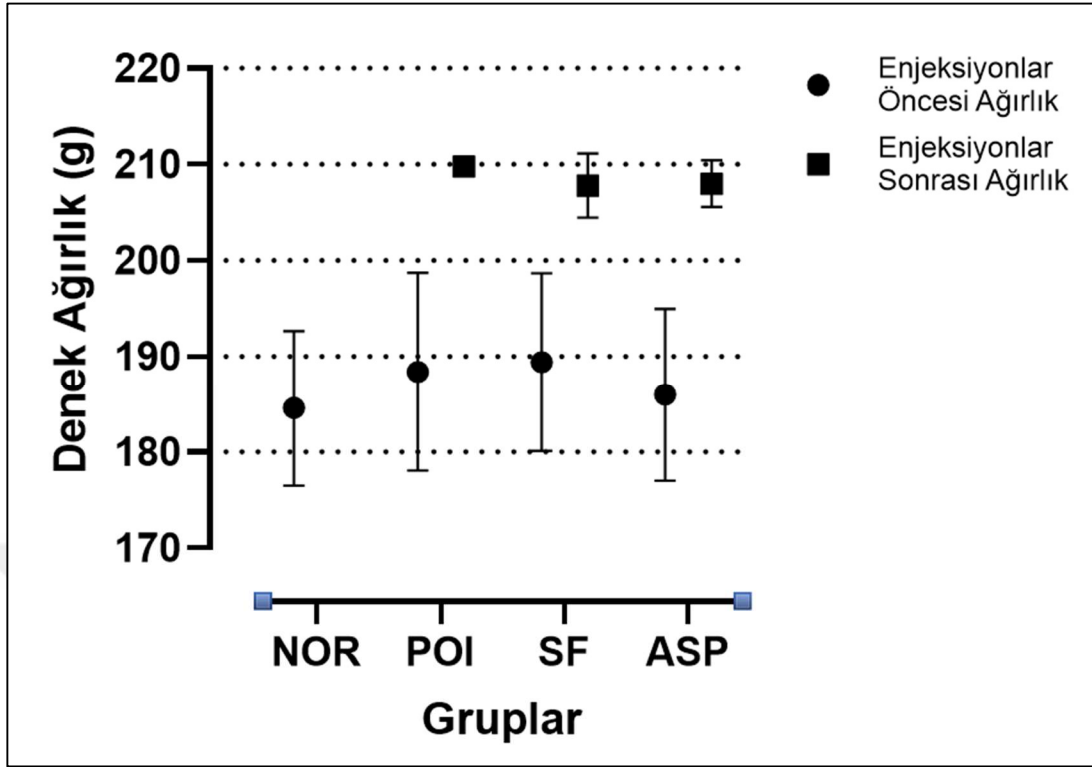
Tablo 8. Deney gruplarında denek ağırlıkları.

	NOR Grubu	POI Grubu	SF Grubu	ASP Grubu	p **,***
Enjeksiyonlar öncesi ağırlık (g)	184,60 ± 8,08	188,40 ± 10,31	189,40 ± 9,28	186 ± 8,97	p =0,836
Enjeksiyonlar sonrası ağırlık (g)	-	209,80 ± 0,86	207,80 ± 3,32	208 ± 2,42	p =0,817

Değerler grup ortalama ağırlık± SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 21. Enjeksiyonların öncesinde ve sonrasında tüm deneklerin vücut ağırlıklarının karşılaştırılması.

4.1.2. Ovaryum ağırlık ölçümleri

Sevofluran inhalasyon anestezi altındaki deneklere, dorsallerinde açılan 2 cm'lik kesiden ooforektomi uygulandı ve çıkarılan ovaryumların ağırlıkları ölçüldü. NOR, POI, SF ve ASP gruplarının ağırlıkları sırasıyla $0,134 \pm 0,002$ g, $0,133 \pm 0,003$ g, $0,133 \pm 0,004$ g, $0,133 \pm 0,002$ g olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi. ($p= 0,960$) (Tablo 9). VCD enjeksiyonlarının ovaryum ağırlığına etkisini değerlendirmek için NOR grubu ve POI grubu ovaryum ağırlıkları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak farklılık olmadığı sonucuna ulaşıldı ($p=0,783$). Asprosin enjeksiyonunun POI sıçan modelinde ovaryum ağırlığına etkisini değerlendirmek için SF grubu ve ASP grubu ovaryum ağırlıkları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak farklılık olmadığı görüldü ($p=0,751$).

Tablo 9. Deney gruplarında denek ovaryum ağırlıkları.

	NOR Grubu	POI Grubu	SF Grubu	ASP Grubu	p **,***
Ovaryum Ağırlık (g)	0,134 ± 0,002	0,133 ± 0,003	0,133 ± 0,004	0,133 ± 0,002	p =0,960

Değerler grup ortalama ağırlık± SD olarak verildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

*** İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 10. Deney gruplarında denek ovaryum ağırlıkları.

	NOR Grubu	POI Grubu	p *
Ovaryum Ağırlık (g)	0,134 ± 0,002	0,133 ± 0,003	p =0,783
	SF Grubu	ASP Grubu	p *
Ovaryum Ağırlık (g)	0,133 ± 0,004	0,133 ± 0,002	p =0,960

Değerler grup ortalama ağırlık± SD olarak verildi.

* Gruplar arası karşılaştırmalarda student t-testi kullanıldı, p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

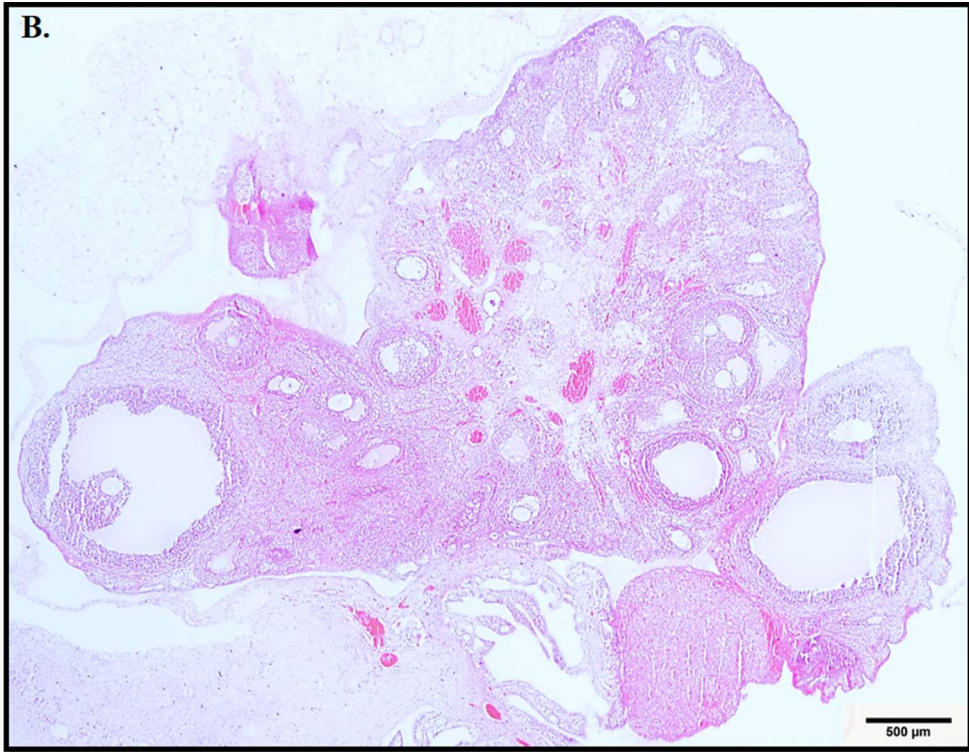
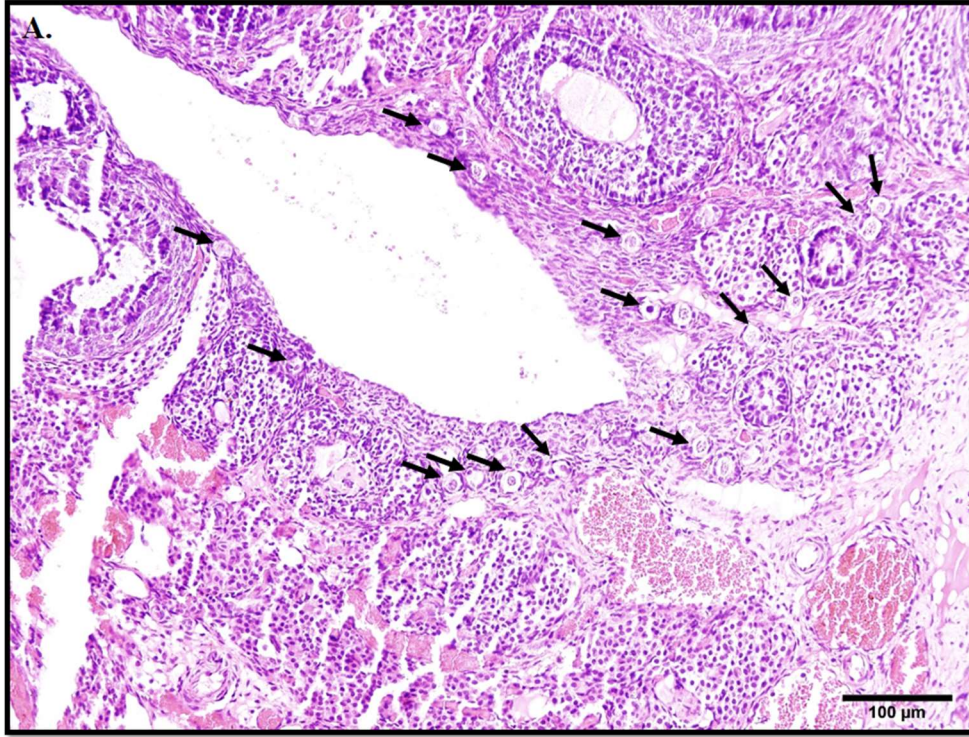
4.2.1. Histomorfolojik bulgular

Sevofluran inhalasyon anestezi verilen deneklerin dorsalinde açılan 2 cm'lik kesiden ooforektomi uygulandı. Ooforektomi sonucu deneklerden elde edilen ovaryumlar fikse edilip parafine gömüldü. Dokulardan 5 µm kalınlığında sıralı kesitler alındı. Doku kesitlerine H&E boyaması yapıldı ve histomorfolojik olarak değerlendirildi.

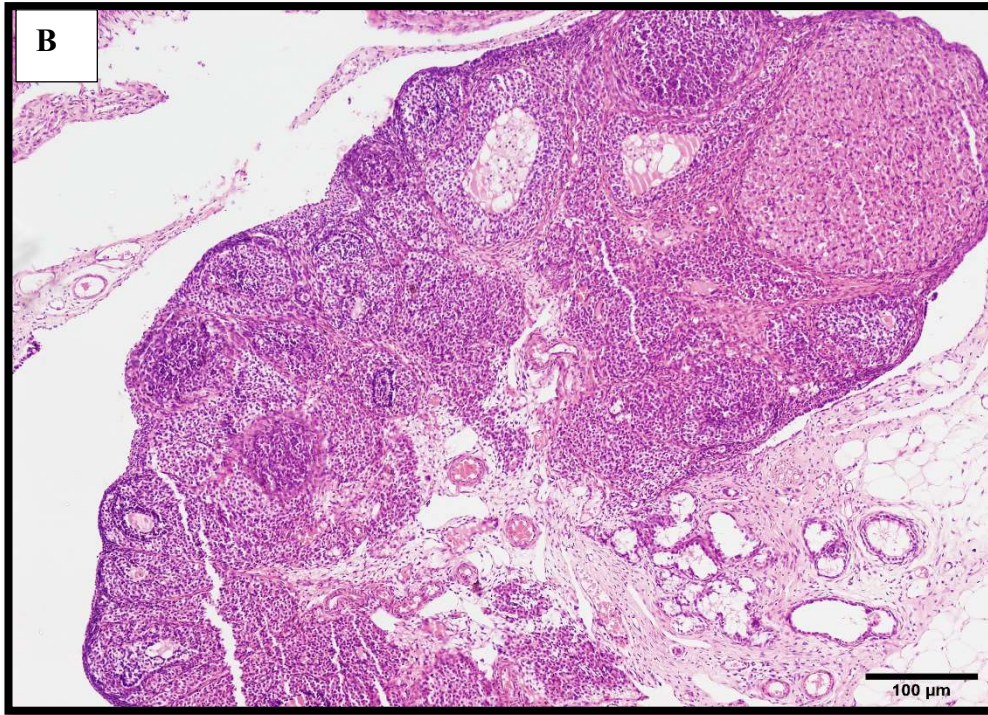
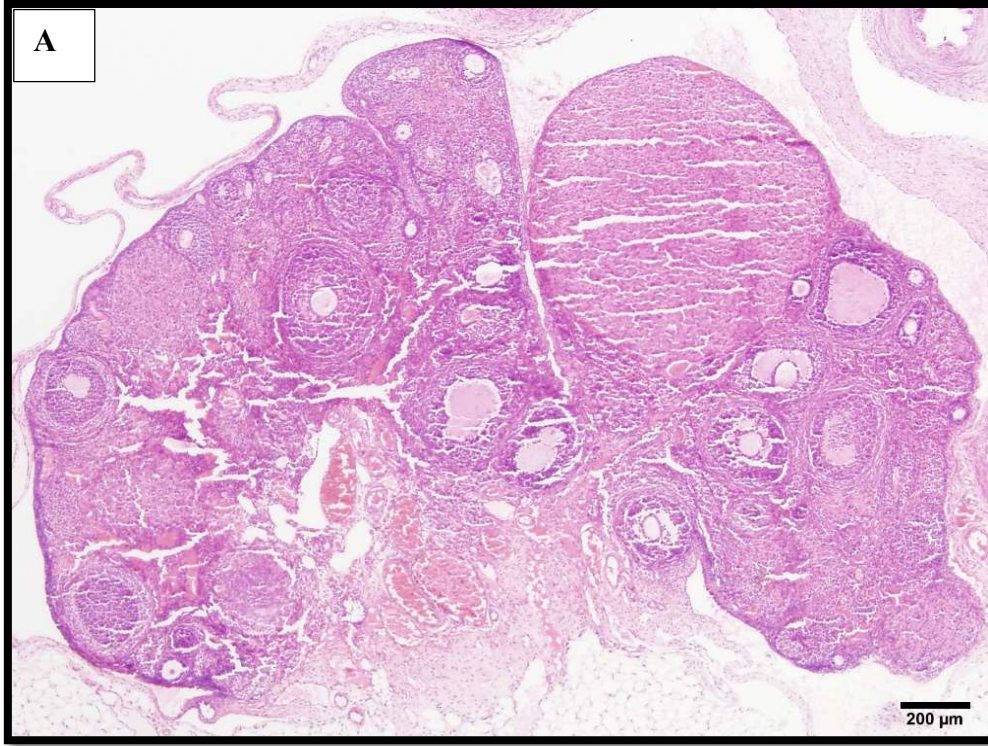
NOR grubu deneklerinden elde edilen ovaryum kesitleri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi. Tunika albuginea tabakasına yakın seviyede normal morfolojiye sahip primordiyal foliküller görüldü (Şekil 22A). Korteks tabakasında gelişimin farklı basamaklarında normal morfolojiye sahip foliküllerin bulunduğu, medulla tabakasında sinir liflerinin, lenf ve kan damarları yoğun bir şekilde yer aldığı gözlemlendi (Şekil 22B). Korteks stromasında normal morfolojide unilaminar primer foliküller ve multilaminar primer foliküller gözlemlendi. Kortekten medullaya doğru

normal morfolojili antrum yapısı gelişmekte olan sekonder foliküller tespit edildi. Graaf (matür) foliküllerin normal morfolojiye sahip oldukları gözlemlendi. Normal morfolojili foliküllerin yanı sıra camsı membran görünümlü, granüloza tabakası incelmış atretik foliküllere ve korteks stromasında birden fazla sayıda korpus luteum yapısına rastlandı.

POI grubu deneklerinin ovaryum kesitleri ışık mikroskopik değerlendirmesi sonucunda, NOR grubuna kıyasla kortekste gelişimin farklı basamaklarında foliküllerde sayıca azalma gözlenirken, atretik folikül sayısında artış belirlendi (Şekil 23). POI grubundan elde edilen kesitlerdeki primordiyal, unilaminar ve multilaminar primer folikül sayısında azalış meydana geldiği görüldü. POI ovaryum kesitlerinde atretik foliküllerin oosit ve granüloza hücre bağlantılarının bütünlüğünün bozulduğu, oositlerin asidofilik özelliklerinin arttığı gözlemlendi. POI grubuna ait ovaryum kesitlerinde bulunan foliküllerin morfolojilerinin NOR grubuna kıyasla anormalleştiği gözlemlendi.

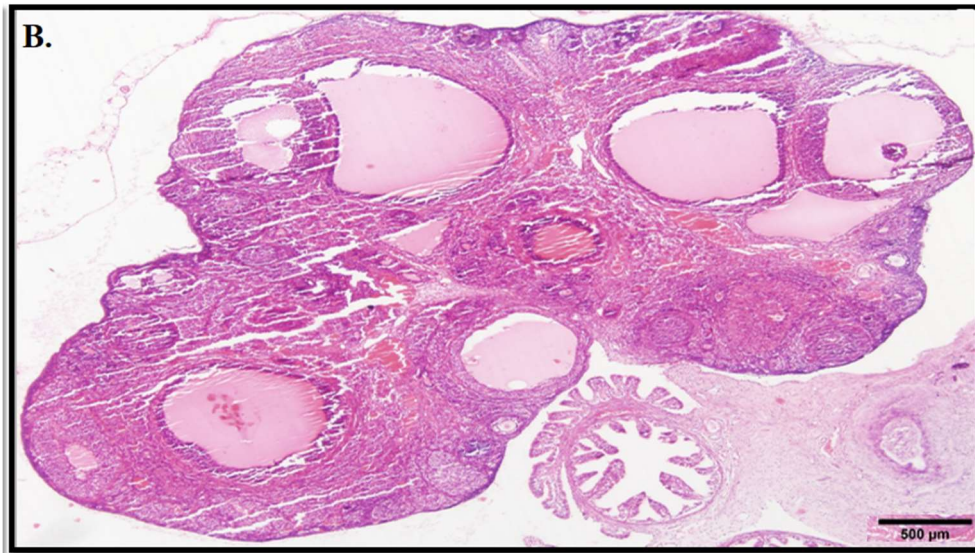
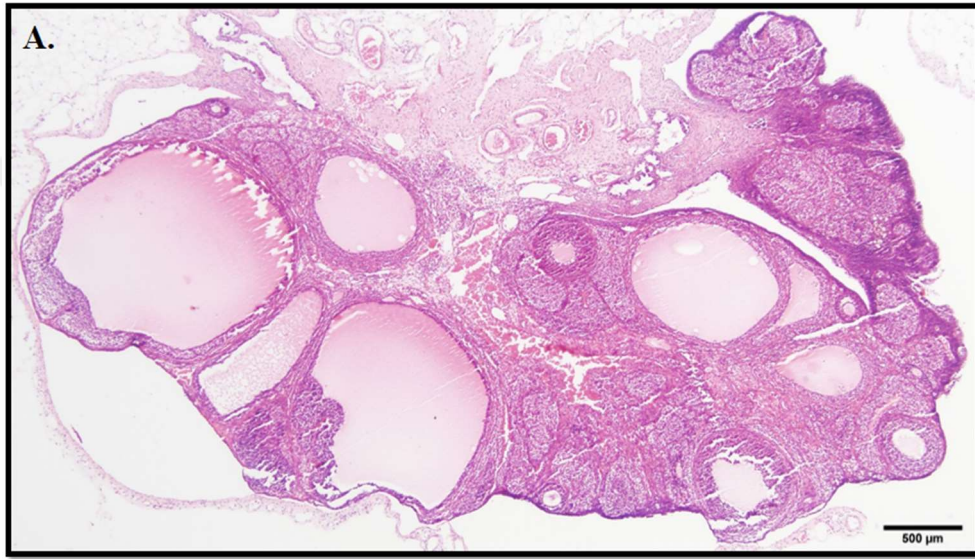


Şekil 22. H&E ile boyanmış NOR grubuna ait deneklerde gözlenen normal ovaryum morfolojisi. (A) tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrili primordiyal foliküller (ok ucunda) (B) NOR grubu ovaryum kesitinde yer alan gelişimin farklı basamaklarındaki foliküller, sinir lifleri, lenf ve kan damarlarını içeren H&E ile boyanmış sıçan ovaryum kesiti.



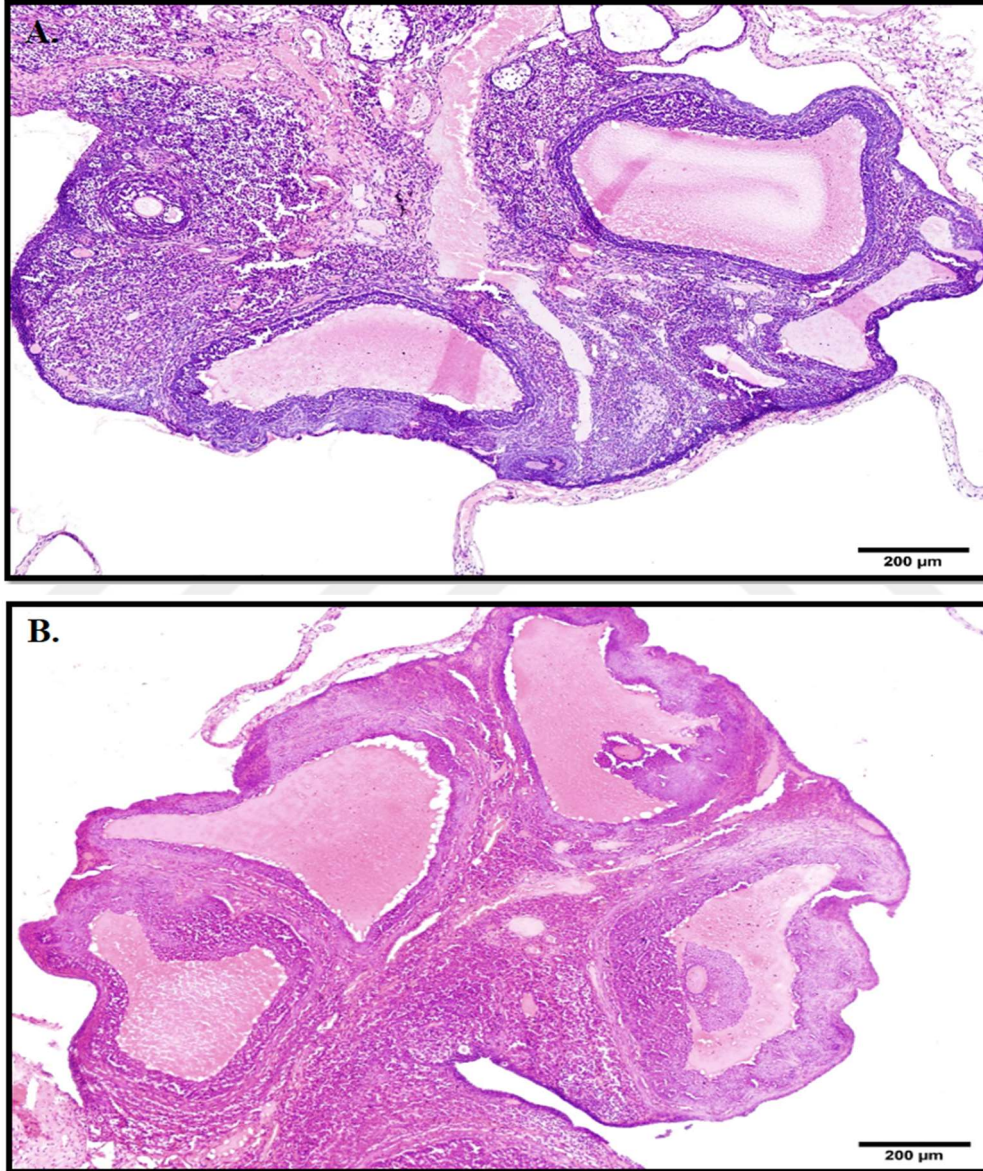
Şekil 23. A panelinde NOR grubuna ait ovaryum kesitinin H&E boyanması sonucu karakterize edilen gelişimin farklı basamaklarındaki foliküller. B panelinde POI grubuna ait ovaryum kesitinde NOR grubuna kıyasla sayıda artış görülen atretik foliküller yer almaktadır.

SF grubu deneklerden elde edilen kesitler incelendiğinde, ovaryum dokularının ışık mikroskopik görünümünün POI grubundaki ile benzer olduğu ve bir iyileşmenin olmadığı tespit edildi (Şekil 24). SF grubundaki ovaryumlarda NOR grubuna kıyasla primordiyal ve unilaminar primer foliküllerin azalmış olduğu atretik folikül sayısının arttığı bulgularına rastlandı. SF grubundaki deneklerin ovaryumundaki foliküllerin morfolojileri, POI grubundaki deneklerin ovaryumuna benzer şekilde anormal morfolojiye sahip olduğu bulgusuna rastlandı.

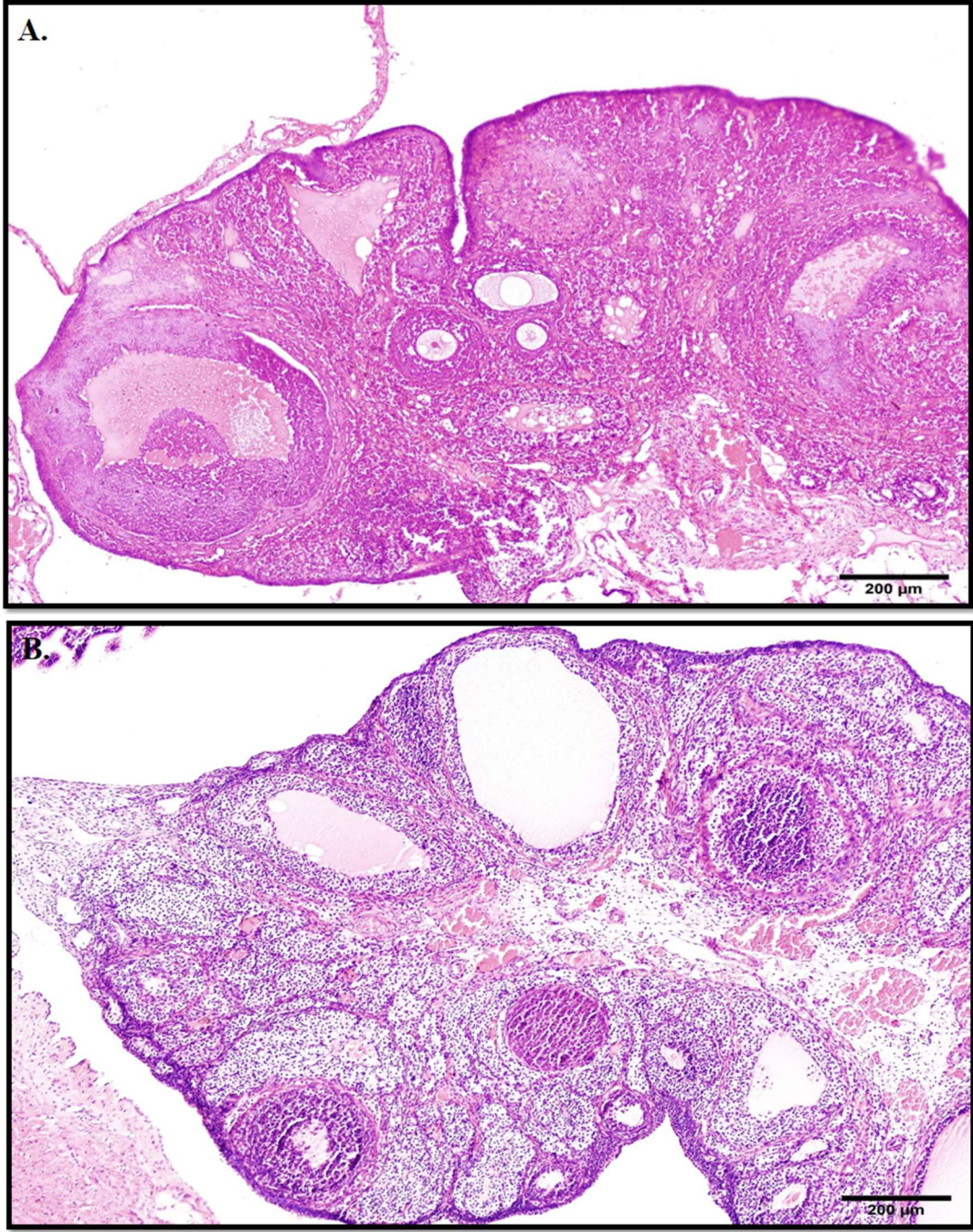


Şekil 24. A panelinde POI grubuna ait artmış atretik folikül sayısı ve bozulmuş folikül morfolojisi ile karakterize ovaryum kesiti, B panelinde SF grubuna ait POI grubuna benzer sayıda artış görülen atretik foliküllerin ve bozulmuş folikül morfolojileri ile karakterize ovaryum kesiti yer almaktadır.

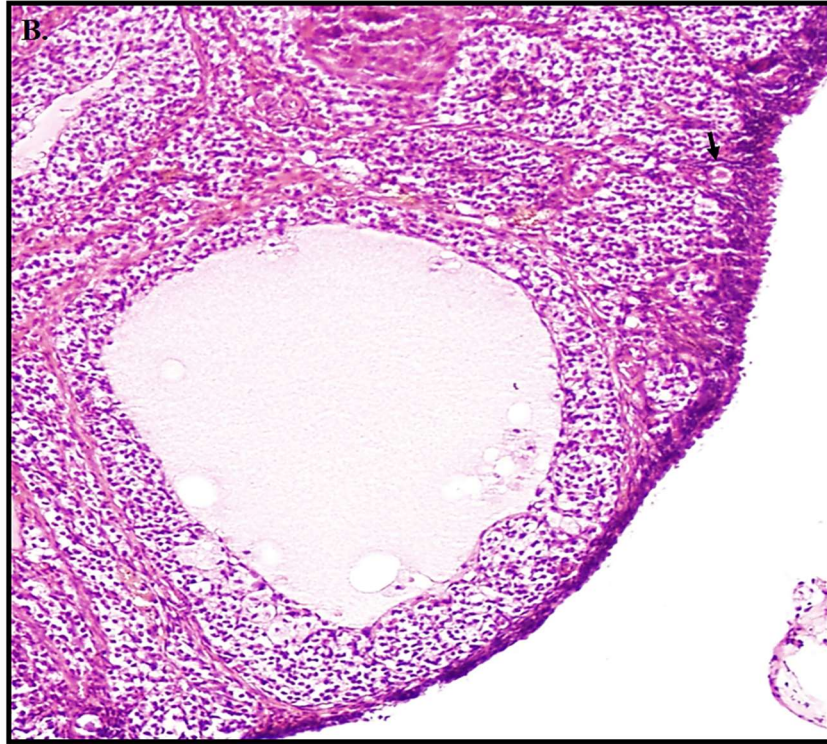
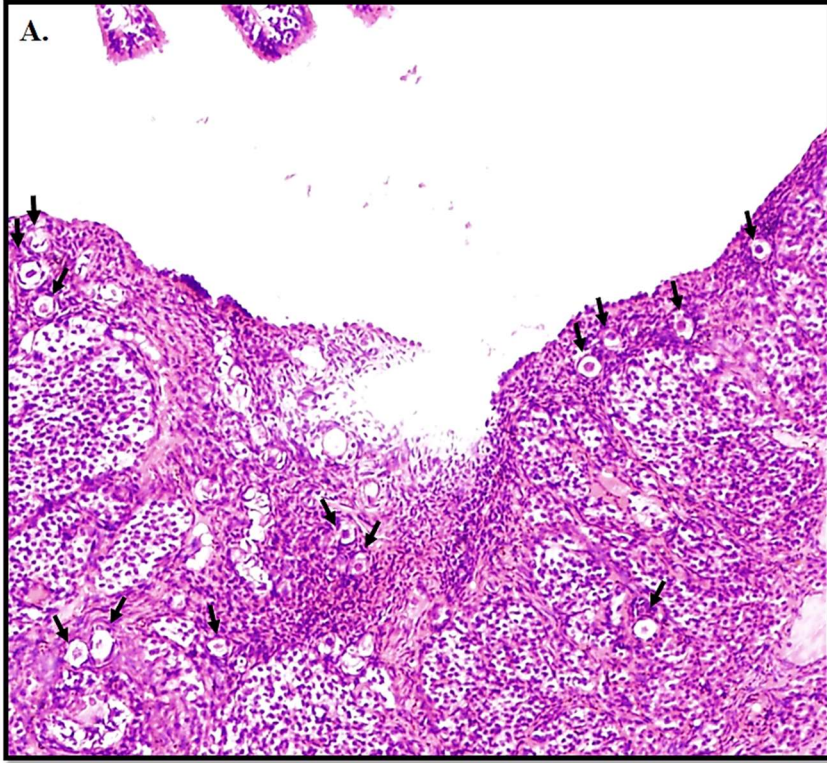
ASP grubu deneklerden elde edilen kesitler ışık mikroskobu altında incelendiğinde; VCD ve SF grubuna kıyasla primordiyal ve unilaminar primer foliküllerin artmış, atretik folikül sayısının ise azalmış olduğu gözlemlendi. ASP grubundaki deneklerin ovaryumundaki bazı foliküllerin morfolojilerinin, SF grubundaki deneklerin ovaryumuna benzer olduğu bulgusuna rastlandı (Şekil 25, Şekil 26).



Şekil 25. A panelinde SF grubuna ait ovaryum kesitinin H&E boyanması sonucu foliküllerin bozulmuş olan morfolojileri görülmektedir. B panelinde ASP grubuna ait ovaryum kesitinde SF grubu ile benzer özellikle anormal morfolojideki foliküller yer almaktadır.

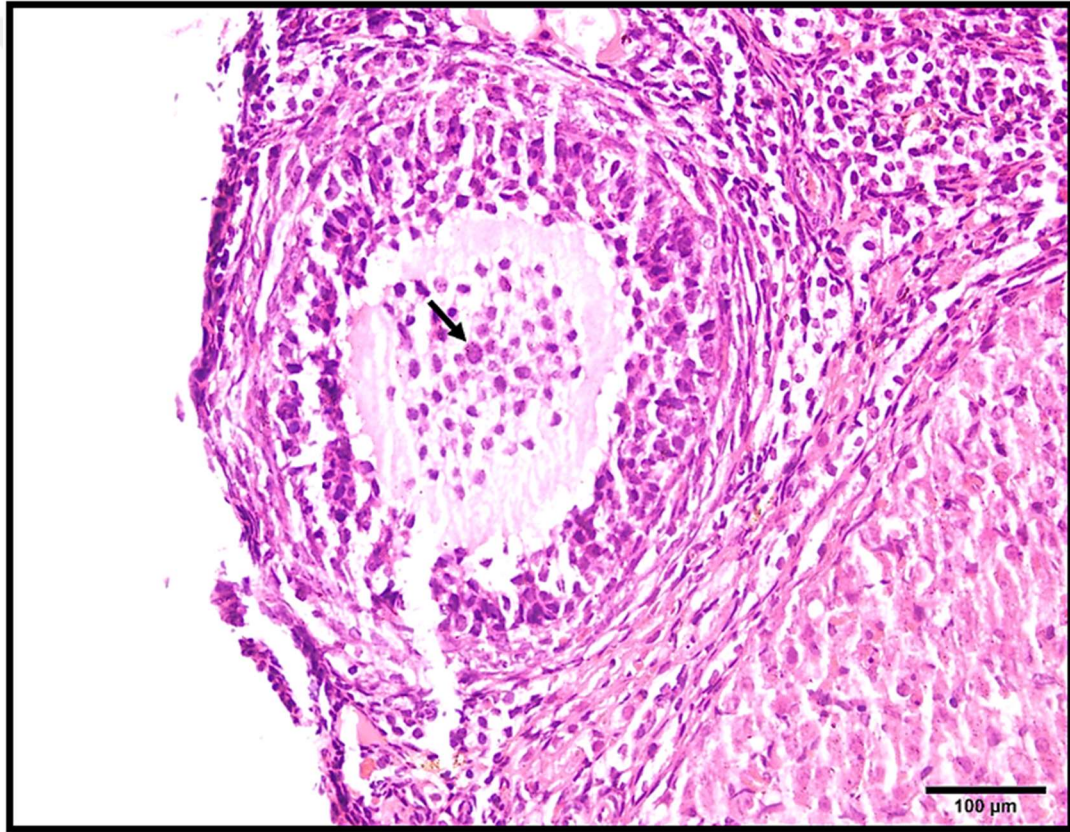


Şekil 26. A panelinde ASP grubuna ait ovaryum kesitinin H&E boyanması sonucu gelişimin farklı basamaklarındaki foliküllerin arttığı, B panelinde SF grubuna ait ovaryum kesitinde ASP grubu ovaryum kesitine kıyasla gelişmekte olan foliküllerin daha az sayıda olduğu bulgusu yer almaktadır.



Şekil 27. A panelinde ASP grubuna ait ovaryum kesitinin H&E boyanması sonucu primordiyal foliküllerin arttığı, B panelinde SF grubuna ait ovaryum kesitinde ASP grubu ovaryum kesitine kıyasla primordiyal foliküllerin az sayıda olduğu bulgusu yer almaktadır.

Histomorfolojik bulguların incelenmesi sonucunda elde edilen sonuçlara göre ASP grubundaki deneklerde, POI ve SF gruplarına göre atretik foliküllerin sayısında azalma gözlenirken NOR grubuna kıyasla atretik folikül sayısının daha fazla olduğu belirlendi. ASP grubu ovaryumlarına ait kesitlerde, gelişimin farklı basamaklarındaki folikül sayıları POI ve SF gruplarına kıyasla artmıştı (Şekil 24, 25, 26). POI grubuna ait kesitlerde; germinal epitel ile tunika albugineanın NOR grubuna benzer özellikte morfolojiye sahip olduğu görüldü. POI grubuna ait ovaryum doku kesitinde piknotik nükleusa sahip granüloza hücreleri belirlenirken granüloza hücreleri arasındaki bağlantıların da zayıfladığı gözlemlendi (Şekil 28).



Şekil 28. POI grubuna ait kesitte piknotik nükleusa sahip granüloza hücreleri ve granüloza hücreleri arasındaki zayıflayan bağlantı yer almaktadır.

4.2.2. Morfometrik Bulgular

NOR, POI, SF ve ASP grupları arasında H&E ile boyanan ovaryum kesitlerinde gerçekleştirilen sayımlardan elde edilen folikül sayılarının ortalamaları tablo 10’da verilmiştir. NOR ile POI ve SF ile ASP grupları arasında primordiyal folikül sayıları bakımından istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. ($p<0,001$).

NOR ve POI grupları gelişmekte olan foliküller açısından da karşılaştırıldı. Hormon parametrelerine ek olarak, spesifik olarak primordiyal foliküllerin yanı sıra gelişimin farklı basamaklarındaki diğer tüm foliküllerin sayılarındaki azalışların istatistiksel anlamlılık taşıdığı belirlendi ($p<0,001$). Böylece POI modelinin başarı ile oluşturulduğu da ispatlanmış oldu. NOR ve POI gruplarında gelişimin farklı evrelerindeki foliküllerin sayıları ve istatistiksel olarak karşılaştırmaları tablo 11 ve şekil 28’de verilmiştir. SF ve ASP grupları da tüm foliküller açısından karşılaştırıldı; POI sıçan modelinde ASP uygulamasının ovaryumda folikül sayılarını arttırdığı ve bu artışın istatistiksel anlamlılık taşıdığı belirlendi ($p<0,05$) (Tablo 11) (Şekil 28).

Tablo 11. Deney gruplarında H&E folikül sayımı.

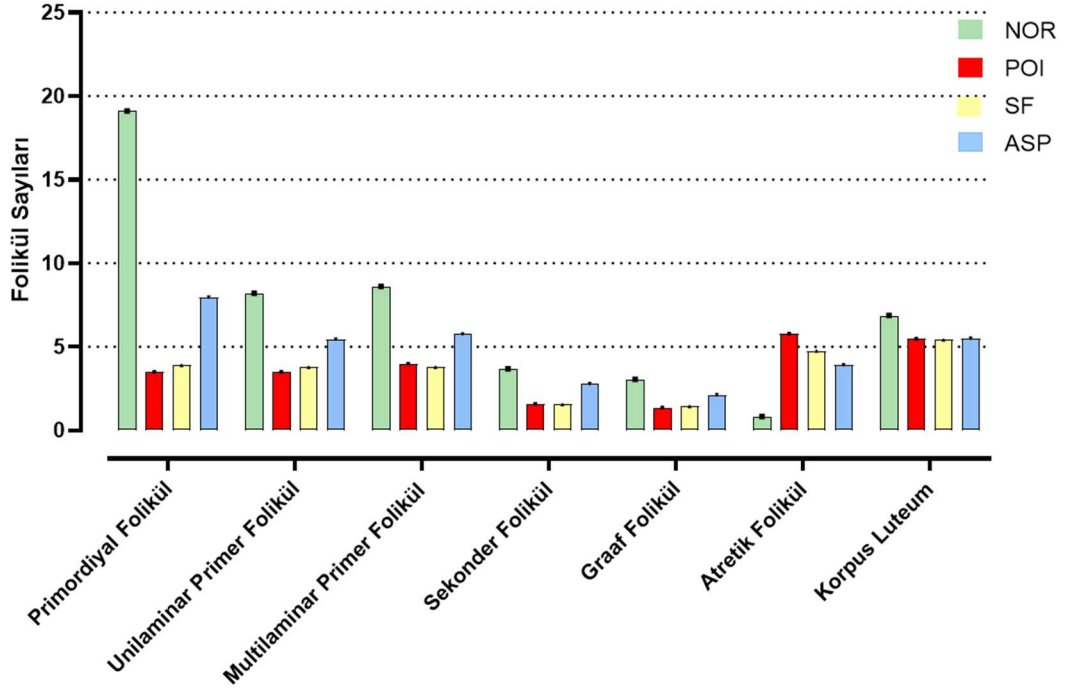
Folikül Tipi	Primordiyal Folikül	Unilaminar Primer Folikül	Multilaminar Primer Folikül	Sekonder Folikül	Graaf Folikül	Atretik Folikül	Korpus Luteum
NOR	19,11 ± 0,28 ^{ac}	8,21 ± 1,28 ^{ac}	8,62 ± 0,82 ^{ac}	3,68 ± 0,29 ^{ac}	3,06 ± 0,12 ^{ac}	0,84 ± 0,14 ^{ac}	6,88 ± 0,41 ^{ac}
POI	3,51 ± 0,17 ^b	3,51 ± 0,24 ^b	3,99 ± 0,47 ^b	1,60 ± 0,49 ^b	1,37 ± 0,17 ^b	5,79 ± 0,50 ^b	5,48 ± 0,26
p*	p*$<0,001$	p*$=0,001$	p*$<0,001$	p*$<0,001$	p*$<0,001$	p*$<0,001$	p*$<0,001$
SF	3,90 ± 0,11 ^a	3,78 ± 0,24 ^a	3,79 ± 0,25 ^a	1,55 ± 0,51 ^a	1,44 ± 0,08 ^a	4,75 ± 0,70 ^a	5,42 ± 0,59 ^a
ASP	7,97 ± 0,25 ^{bc}	5,46 ± 0,66 ^{bc}	5,77 ± 0,50 ^{bc}	2,79 ± 0,26 ^{bc}	2,13 ± 0,16 ^{bc}	3,93 ± 0,54 ^{bc}	5,51 ± 0,40 ^c
p*	p*$<0,001$	p*$=0,03$	p*$<0,001$	p*$=0,003$	p*$<0,001$	p*$=0,074$	p*$=0,798$
p**,***	p**$<0,001$	p***$<0,001$	p**$<0,001$	p**$<0,001$	p**$<0,001$	p**$<0,001$	p**$<0,001$

Veriler ortama ağırlık± SD olarak verildi.

* İkili grup karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı, $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

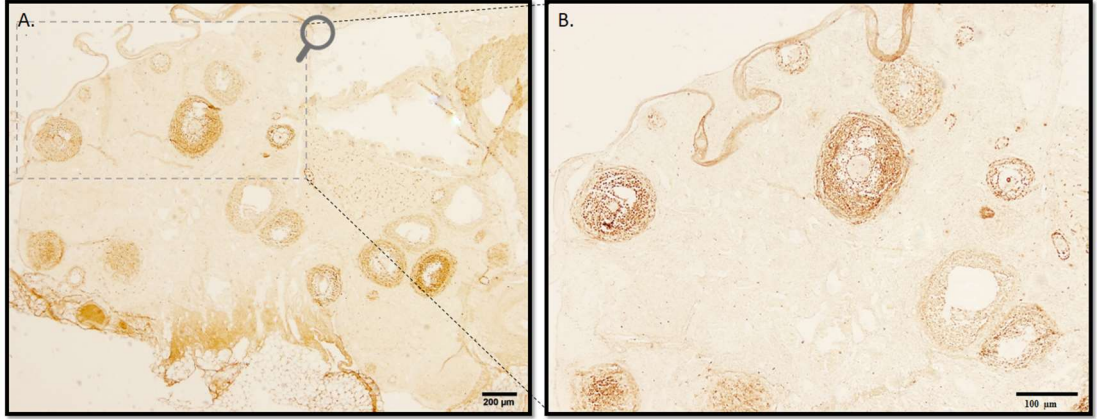
*** Gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi kullanıldı, $p<0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.



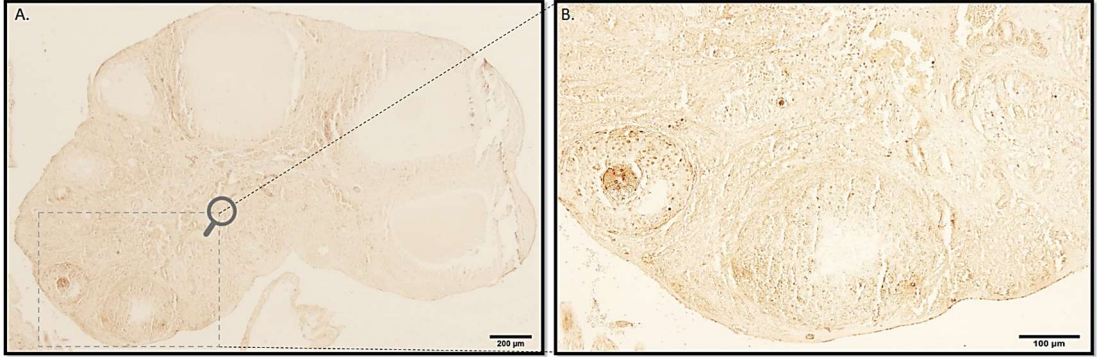
Şekil 28. NOR, POI, SF ve ASP grupları için folikül sayıları.

4.2.3. İmmünohistokimyasal bulgular

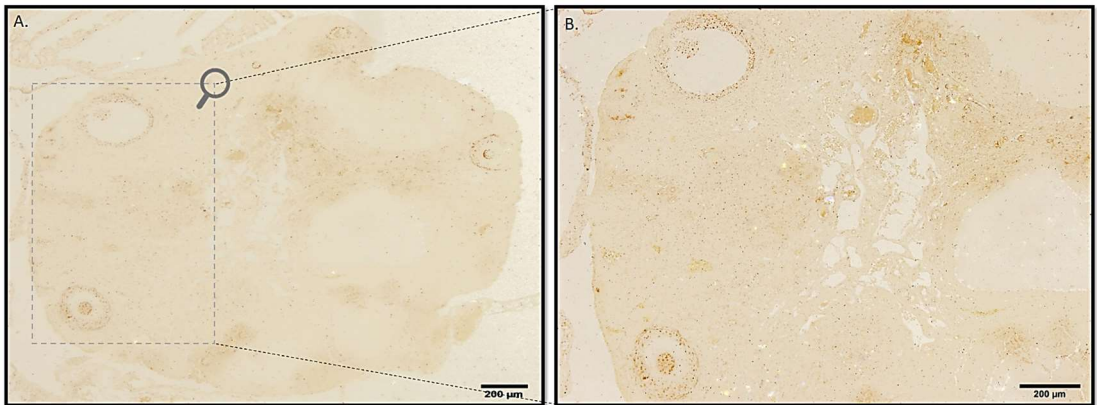
Çalışmaya dahil edilen NOR, POI, SF ve ASP grupları PCNA ile işaretlenmiş preantral ve antral foliküller bakımından kıyaslandığında NOR grubuna kıyasla POI ve SF gruplarında işaretlenen folikül sayısında azalma olduğu belirlendi (Şekil 29, Şekil 30, Şekil 31). SF grubunda, VCD sonrası enjekte edilen serum fizyolojinin ovaryum folikülleri üzerine bir etkisi olmadığı sonucuna ulaşıldı. ASP grubundaki deneklerin preparatları diğer gruplarla kıyaslandığında antral folikül sayısında artış olduğu gözlemlenmekle birlikte (Şekil 32), bu artış NOR grubu deneklerde (Şekil 29) sayılan işaretlenmiş folikül sayısı kadar fazla sayıda değildi.



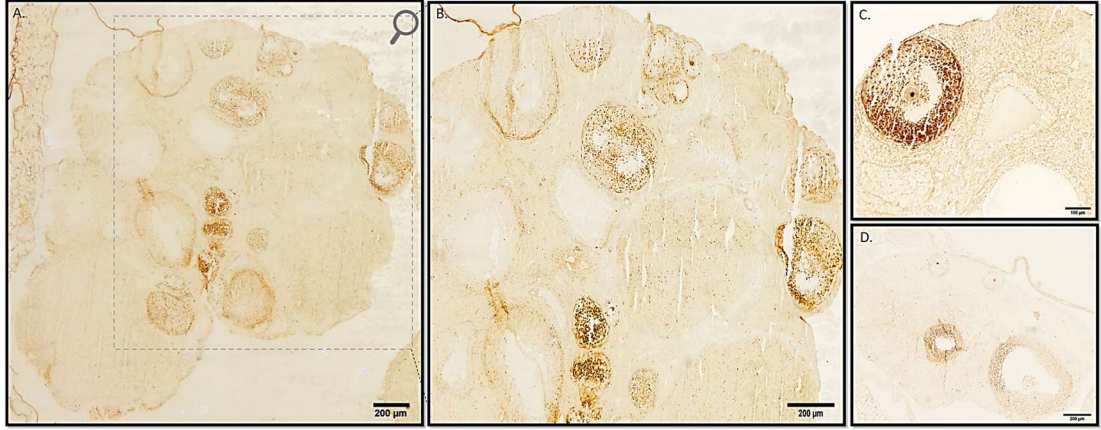
Şekil 29. A panelinde NOR grubu deneklere sahip ovaryum preperatından elde edilmiş PCNA ile işaretlenmiş preantral ve antral foliküller yer almaktadır. B panelinde PCNA tarafından granuloza hücreleri işaretlenmiş olan foliküllerin sıralı kesitlerinde yakınlaştırılmış hali yer almaktadır.



Şekil 30. A panelinde POI grubu deneklere sahip ovaryum preperatından elde edilmiş PCNA ile işaretlenmiş preantral ve antral foliküller yer almaktadır. B panelinde PCNA tarafından granuloza hücreleri işaretlenmiş olan foliküllerin yakınlaştırılmış hali yer almaktadır.



Şekil 31. A panelinde SF grubu deneklere sahip ovaryum preperatından elde edilmiş PCNA ile işaretlenmiş preantral ve antral foliküller yer almaktadır. B panelinde PCNA tarafından granuloza hücreleri işaretlenmiş olan foliküllerin yakınlaştırılmış hali yer almaktadır.



Şekil 32. A panelinde ASP grubu deneklere sahip ovaryum preparatından elde edilmiş PCNA ile işaretlenmiş preantral ve antral foliküller yer almaktadır. B panelinde PCNA tarafından granüloza hücreleri işaretlenmiş olan foliküllerin yakınlaştırılmış hali yer almaktadır. C panelinde granüloza hücreleri PCNA tarafında tarafından işaretlenen ASP grubuna ait bir sekonder folikül yer almaktadır. D panelinde ASP grubuna ait denekten elde edilen kesitte yer alan gelişimin farklı basamaklarındaki PCNA ile işaretli foliküller yer almaktadır.

PCNA ile işaretlenen NOR ve POI gruplarına ait kesitler karşılaştırıldığında preantral ve antral folikül bakımından anlamlı farklılık olduğu tespit edildi ($p < 0,001$) (Tablo 12) (Şekil 33). SF ve ASP grupları karşılaştırıldığında ASP grubu deneklerin ovaryumlarında gözlenen preantral ve antral foliküllerin SF grubuna göre sayıca arttığı ve bu artışın istatistiksel anlamlılık taşıdığı belirlendi (sırasıyla $p = 0,001$ ve $p < 0,05$) (Tablo 12) (Şekil 33). Ek olarak tüm gruplar preantral ve antral folikül sayıları açısından birbiri ile karşılaştırıldı ve anlamlı farklılık bulundu. Folikül sayıları ve p^{**} değerleri tablo 12’de verilmiştir (Şekil 33)

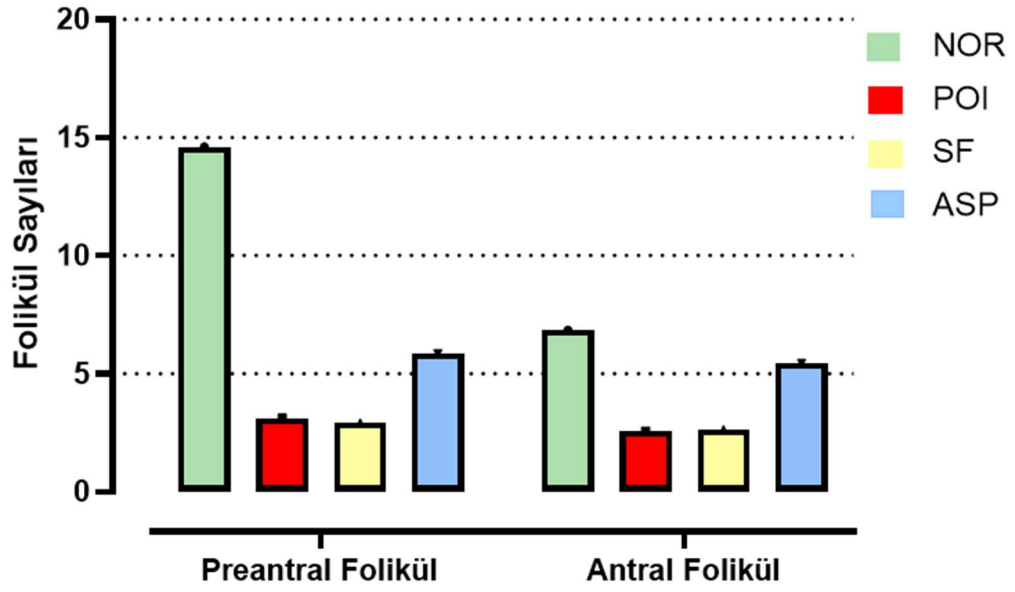
Tablo 12. Preantral ve antral folikül sayıları.

	Preantral Folikül	Antral Folikül
NOR	14,60 ± 1,10	6,84 ± 0,60
POI	3,12 ± 0,52	2,56 ± 0,26
p*	p<0,001	p<0,001
SF	2,92 ± 0,30	2,64 ± 0,38
ASP	5,84 ± 0,93	5,44 ± 0,55
p*	p=0,001	P=0,001
p**	p<0,001	p<0,001

Veriler ortama ağırlık±SD olarak verildi.

* İkili grup karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.



Şekil 33. NOR, POI, SF ve ASP gruplarının preantral ve antral foliküller için karşılaştırılması.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

NOR, POI, SF ve ASP gruplarına ait deneklerin serumlarında anti-Müllerian hormon konsantrasyonu ve östradiol konsantrasyonu “enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)” yöntemi ile ölçüldü.

Normal ovaryan rezerve sahip NOR grubu deneklerden çalışmanın 1. günü, prematür ovaryan yetmezliği (POI grubu) grubuna ait deneklerden çalışmanın 1. ve 15. günü, ve 15 günlük VCD enjeksiyonundan sonra SF ya da ASP verilen deneklerden ise çalışmanın 1, 15 ve 71. günü elde edilen serum örneklerinde ovaryan rezerv belirteci olan AMH konsantrasyonlarının ölçümü gerçekleştirildi. Ardından gruplar arası ve grup içi sıralı örneklemeler karşılaştırıldı.

Çalışmanın birinci günü, deneklerden alınan kandan elde edilen serum örneklerinde AMH seviyeleri bakımından gruplar arasında anlamlı fark olmadığı sonucuna ulaşıldı ($p=0,69$) (Tablo 13). POI modeli oluşturulan deneklerin 1. gün (VCD enjeksiyonu öncesi) ve 15. günde (VCD enjeksiyonu sonrası) toplanan serumlarında ölçülen AMH konsantrasyonları karşılaştırıldığında AMH seviyelerindeki azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi. Ortalama ölçümler ve $p^{**},^{***}$ değerleri tablo 13'te verilmiştir.

POI, SF ve ASP gruplarında VCD enjeksiyonlarının tamamlanması sonrası (15. gün) ölçülen serum AMH düzeylerinde gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı ($p=0,54$) (Tablo 13). VCD enjeksiyonu sonrası SF ve ASP verilen deneklerden 71. gün alınan kan örnekleri karşılaştırıldığında ASP'nin serum AMH seviyesi arttığı ve bu artışın SF grubuna göre istatistiksel anlamlılık taşıdığı belirlendi ($p= 0,01$) (Tablo 13).

POI, SF ve ASP gruplarının AMH seviyeleri kendi aralarında karşılaştırıldı. SF ve ASP gruplarında grup içi AMH konsantrasyonlarının karşılaştırması 1., 15., ve 71. günler için yapıldı ve anlamlı fark bulundu ve değerler tablo 13'te $p^{**},^{***}$ değerleri ile verilmiştir.

Tablo 13. NOR, POI ve SF grupları arasında 1. Gün, 15. Gün ve 71. Gün serum AMH konsantrasyonunun istatistiksel değerlendirilmesi.

AMH (ng/mL)	NOR Grubu	POI Grubu	SF Grubu	ASP Grubu	p*, #değeri
1. GÜN	0,759±0,008	0,756±0,007	0,762±0,009	0,763±0,011	p*=0,696
15. GÜN	-	0,698±0,003	0,698±0,005	0,704±0,004	p*=0,054
71. GÜN	-	-	0,693±0,008	0,709±0,006	p# =0,013
p**,*** değeri	-	p **<0,001	p*** <0,001	p ***<0,001	

Veriler ortama ağırlık±SD olarak verildi.

* Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

Bağımsız ikili grup karşılaştırmalarında t-testi kullanıldı, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

** İkili grup karşılaştırmalarında Paired Sample t testi kullanıldı, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

*** Gruplar arası karşılaştırmalarda MANOVA testi kullanıldı, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

Çalışmanın birinci günü deneklerden alınan kandan elde edilen serum örnekleri incelendiğinde gruplar arasında E2 serum seviyeleri bakımından anlamlı fark olmadığı sonucuna ulaşıldı (p=0,98) (Tablo 14). POI, SF ve ASP gruplarında VCD enjeksiyonu sonrasında toplanan (15. gün) serum örneklerinde ölçülen E2 seviyesi bakımından gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmadı. (p= 0,41) (Tablo 14). 71. gün SF ve ASP gruplarında toplanan serum örneklerinde yapılan E2 ölçümleri, asprosinin serum E2 düzeyini arttırdığını gösterdi. İstatistiksel karşılaştırmada bu artışın SF grubuna göre anlamlı olduğu belirlendi (p #= 0,030) (Tablo 14).

POI, SF ve ASP grupları kendi aralarında karşılaştırıldı. POI (1 ve 15. Gün) denekleri VCD enjeksiyonu öncesi ve sonrasında elde edilen serum örneklerindeki E2 konsantrasyonları bakımından karşılaştırıldığında anlamlı fark bulundu, değerler tablo 13'te p**,*** değerleri ile verildi. SF ve ASP gruplarında E2 konsantrasyonları kendi içlerinde karşılaştırma 1. 15. ve 71. günler için yapıldı ve anlamlı fark bulundu ve değerler tablo 13'te p**,*** değerleri ile verildi.

Tablo 14. NOR, POI ve SF grupları arasında 1. gün, 15. gün ve 71. gün serum E2 konsantrasyonları ve istatistiksel değerlendirmesi.

E2 (ng/mL)	NOR Grubu	POI Grubu	SF Grubu	ASP Grubu	p*değeri
1. GÜN	162,80±6,97	163,28±7,93	162,12 ±9,81	160,96±17,05	p*=0,989
15. GÜN	-	180,60± 15,93	170,3 ±15,59	169,41± 10,41	p*=0,41
71. GÜN	-	-	177,5± 6,48	211,30± 25,39	p#=0,030
p**,***değeri	-	p**<0,001	p***<0,001	p***<0,001	

Veriler ortama ağırlık± SD olarak verildi.

* Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

Bağımsız ikili grup karşılaştırmalarında t-testi kullanıldı, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

** İkili grup karşılaştırmalarında Paired Sample testi kullanıldı, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

*** Gruplar arası karşılaştırmalarda MANOVA testi kullanıldı, p<0,05 anlamlı olarak kabul edildi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

“Asprosin peptidi, dişi fertilitasını etkileyen patolojilerden biri olan prematür ovaryan yetmezliğinde azalmış ovaryan rezervini, ovaryum foliküllerinin gelişimi uyararak artırır” hipotezinin test edilebilmesi için önerilen bu tez çalışmasında, asprosinin POI’de azalan ovaryum rezervini ve bozulan ovaryan folikül gelişimini etkileyip etkilemediğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda prematür ovaryan yetmezliği (POI) sıçan modeli oluşturulmuş ve bu deneklerde asprosinin ovaryan rezervine etkisi, histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir. Çalışmamız bir adipokin olan asprosinin, deneysel olarak oluşturulan prematür ovaryan yetmezliği (POI) modelinde, azalmış ovaryum folikül rezervinde iyileştirici etkilerini gösteren ilk çalışmadır. Asprosin uygulaması ovaryumda başta primordial foliküller olmak üzere gelişmekte olan foliküllerin sayısında olumlu bir etki göstermiştir.

5.1. VCD Yardımı ile POI Modelinin Oluşturulması

1994’te yapılan bir çalışmada VCD’nin erişkin sıçanların ovaryumundaki oositlerin yok olmasına neden olabileceğini bildirmiştir; iki yıl sonra ise preantral foliküllerin VCD ovotoksitesine karşı daha duyarlı olduğunu ve granüloza hücrelerinin sağkalımını etkileyerek folikül canlılığını azaltabileceğini gösterilmiştir (Flaws, Doerr, Sipes, & Hoyer, 1994; Springer ve ark., 1996). Cao ve arkadaşları VCD’nin granüloza hücrelerinin apoptozunu etkileyerek foliküler atreziye neden olduğunu bulmuştur (Cao ve ark., 2020). Bu çalışmalar, VCD’nin POI modellerini oluşturmak için ideal kemoteröpatik ajan olduğunu göstermektedir.

POI patolojisinde, primordial foliküllerden antral foliküllere kadar olan gelişimsel süreçte bozulma söz konusudur. Folikülün gelişimi esas olarak granüloza hücrelerinin ve oositlerin normal fonksiyonuna bağlıdır. Bu nedenle, foliküllerin aşırı tükenmesinin nasıl önleneceği, normal gelişimlerinin nasıl teşvik edileceği kadın infertilitesi açısından büyük bir öneme sahiptir. Granüloza hücreleri foliküllerin gelişimi için gereklidir ve anormal fonksiyonları folikül atrezisine yol açmaktadır (Liu ve ark., 2024).

Yukarıda özetlenen literatür bilgisi dikkate alınarak çalışmada POI sıçan modeli oluşturmak için primordiyal ve primer foliküllerde apoptotik süreci başlatan ve sayılarını azaltan VCD (subkütan, 160 mg/kg/gün, 15 gün) tercih edilmiştir. VCD'nin tercih edilmesindeki diğer sebepler ise cerrahi müdahale gerektirmemesi, genetik değişikliğe ihtiyaç duyulmaması ve etkinliğinin in vivo ve in vitro çalışmalarla kanıtlanmış olmasıdır.

5.2. POI Modeli ve Asprosin Uygulaması

POI tedavisine yönelik pek çok ilaca karşın, mevcut ana yöntem HRT (Hormon Replasman Tedavisi)'dir. Ancak bu yöntem, uzun süreli uygulamayla ilişkili birçok yan etkiye de sahiptir. Meme kanseri, endometriyal kanser ve diğer hastalıkların riski kontrol edilemez, bu da POI tedavisinin zorluğunu bir dereceye kadar artırır (Ishizuka, 2021). HRT, POI'nin sistemik semptomlarını belirli bir dereceye kadar iyileştirebilir ancak foliküllerin normal gelişimini destekleyemez; bu aynı zamanda HRT'nin POI tedavisi için temel tedavi olamamasının da nedenidir (Ishizuka, 2021).

Asprosin, *fibrillin-1 (FBN1)* geni tarafından kodlanan FBN1'in, furin enzimi tarafından bölünmesiyle üretilen ve insanlarda insülin direnci ile polikistik over sendromu ile ilişkili olan ve açlıkla indüklenen yeni bir proteindir (Fasshauer ve Blüher, 2015).

Yakın zamanda yapılan araştırmalar asprosinin dişi üreme sistemi üzerinde olumlu veya olumsuz etkilerinin olduğunu göstermektedir (Kurowska ve ark. 2021; Maylem ve ark., 2021; Batalha ve ark., 2023). Maylem ve arkadaşlarının 2021'de yayınlanan çalışmasında teka hücreleri ve progesteron üretimi ile asprosin ilişkisi araştırılmış ve asprosinin, luteinizan hormonla indüklenen teka hücrelerinde androstenedion üretimini arttırken, IGF1 ile indüklenen teka hücre proliferasyonunu azalttığı, ayrıca progesteron üretimi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı gösterilmiştir. (Maylem ve ark., 2021). *FBN1*'in gelişimsel düzenlenmesi ve asprosinin teka hücrelerinin üzerindeki doğrudan etkileri, asprosinin ovaryum foliküler fonksiyonunun yeni bir düzenleyicisi olabileceğini düşündürmektedir. Asprosinin ovaryumlarda yer alan diğer bir hücre grubu olan granüloza hücrelerine etkisi de araştırılmıştır (Batalha ve ark., 2023). Sığır granüloza hücrelerinin kullandığı bu

çalışmada, asprosinin hücre çoğalması ve östradiol ile progesteron salınımı ile olan ilişkisi değerlendirilmiş ve asprosinin granüloza hücre fonksiyonlarını doza bağlı bir şekilde etkilediği gösterilmiştir. Asprosinin FSH varlığında hem östradiol üretimini artırdığı hem de doza bağlı bir şekilde FSHR (FSH reseptörü) ve CYP19A1'in mRNA ekspresyonunda bir artışı uyardığı, buna karşın IGF1 varlığında, estradiol üretimini azaltırken progesteron üretimini artırdığı gösterilmiştir. Ek olarak, asprosin IGF1 ile birlikte doz bağımlı olarak PKA protein ekspresyonu ile p-ERK1/2/total ERK1/2 protein ekspresyon oranını artırma eğiliminde olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışma, asprosinin, in vitro koşullarda sığır granüloza hücrelerinde steroidojenik enzimlerin mRNA düzeyleri ile hücre döngüsü ve apoptoz düzenleyicilerini kodlayan genlerin mRNA miktarını değiştirerek ve östradiol, progesteron üretimi ile steroid sentezini düzenleyen moleküllerin protein ekspresyonlarını etkileyerek granüloza hücre fonksiyonlarının düzenleyicisi olduğunu ve etkilerinin doza ve hücre kültürü koşullarına bağlı olduğunu göstermektedir (Batalha ve ark., 2023).

Asprosinin dişi genital sistem ve diğer organlar üzerindeki etkinliğini araştıran araştırmaların çoğu in vitro koşullarda yapılmıştır (Batalha ve ark., 2023; Jung ve ark., 2019). Asprosinin sistemik kullanımı ile ilgili literatürde az sayıda deneysel çalışma bulunmaktadır (Oz ve ark., 2023; Özcan ve ark., 2022). Farklı yöntemlerle oluşturulan deneysel nöropatik ağrı modellerinde i.p. uygulanan 10 µg /kg asprosinin ağrı eşiğini arttırdığı ve analjezik bir etki sergilediğini gösterilmiştir (Özcan ve ark., 2022). Kronik asprosin uygulamasının koku duyusu ve cinsel davranış üzerine etkilerinin araştırıldığı diğer bir çalışmada, 21 günlük dişi sıçanlara 8 hafta boyunca intraperitoneal uygulanan 500 ng/kg/gün asprosinin serum oksitosin ve estradiol seviyelerini artırdığı sonucuna varılmıştır (Oz ve ark., 2023). Kronik asprosin uygulaması ile serum E2 seviyesinin artması, asprosinin granüloza hücrelerinin aktivitesini arttırabileceğini düşündürmüştür. Dolayısıyla bu literatür bilgisi doğrultusunda çalışmamızda, oluşturulan POI modelinde primordial foliküllerin uyarılması ve granüloza hücrelerinin aktivasyonu ile proliferasyonunun artırılması için 8 hafta süreyle intraperitoneal yolla 500 ng/kg/gün asprosin uygulaması yaptık.

5.3. POI Modelinin ve Asprosin Uygulamasının Vücut Ağırlığına Etkisi

Çalışmada NOR, POI, SF ve ASP gruplarının enjeksiyonlardan önce ve sonra ölçülen vücut ağırlıkları grup içinde ve gruplar arasında karşılaştırıldı (Tablo 8). Her bir grup için 1., 15. gün ve 72. günde vücut ağırlıklarının karşılaştırmasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,54$). Benzer şekilde 1., 15. gün ve 72. günlerde ölçülen vücut ağırlıklarının gruplar arası karşılaştırmasında da benzer sonuç elde edildi ($p>0,05$).

VCD ile vücut ağırlığı arasındaki ilişki ile ilgili değişik sonuçlar veren çalışmalar bulunmaktadır (Cakir ve ark., 2024; Muhammad ve ark., 2009; Zhou ve ark., 2021). Muhammad ve arkadaşlarının 2009'da yayınlanan bir çalışmasında Sprague-Dawley sıçanlara 30 gün boyunca farklı dozlarda (40, 80, 160 mg/kg/gün) intraperitoneal ve intramusküler yolla uygulanan VCD'nin vücut ağırlığı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. 9. günde, i.p. uygulanan 160 mg/kg/gün dozundaki VCD'nin önemli ölçüde kilo kaybına neden olduğu belirlenmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında deneklerin 9. ve 10-13. günlerde sırasıyla başlangıç ağırlığının yaklaşık %11'i ve %16'sını kaybettikleri gösterilmiştir (Muhammad ve ark., 2009). Çin tıbbının geleneksel bir bitki karışımı olan "Liu Zi Tang" bileşiğinin primer ovaryan yetmezliğinin tedavisindeki etkinliğini araştırmak için i.p. tek doz siklofosamid ile POI oluşturulan deneklerin vücut ağırlıklarında kontrol grubuna kıyasla %5 ila %10 oranında azalma olduğu tespit edilmiştir (Zhou ve ark., 2021). Çakır ve arkadaşları tarafından yapılan "Dehidroepiandrosteron, sıçanlarda 4-vinilsikloheksen diepoksitin neden olduğu erken yumurtalık yetmezliğini hafifletmek için PTEN/PI3K/AKT sinyal yolunu modüle eder" başlıklı çalışmada Sprague Dawley cinsi sıçanlarda 15 gün subkütan VCD (160 mg/kg/gün) uygulanmış sonucunda VCD uygulamasının deneklerde ağırlıklar kıyaslanmış istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ve ağırlık düşüşüne sebep olmadığı belirlenmiştir (Cakir ve ark., 2024).

Farklı kimyasal ajanların kullanılması ve POI oluşturmak için kullanılan VCD'nin uygulama süresi, dozu ya da uygulama yöntemlerinin (i.p., i.m. ve subkutan) farklı olması VCD-vücut ağırlığı ilişkisinde farklı sonuçların elde edilmesine neden olabilir. Çalışmamızda, subkütan 15 gün 160 mg/kg/doz'un verilmiş olduğu araştırma (Cakir ve ark., 2024) ile uyumlu sonuçlar elde edilmiştir.

5.4. POI Modelinin ve Asprosin Uygulamasının Ovaryum Ağırlığına Etkisi

Çalışmamızda, ooforektomi ile çıkarılan ovaryumların ağırlıkları ölçüldü ve karşılaştırıldı (Tablo 9). Ovaryum ağırlıkları bakımından NOR, POI, SF ve ASP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı belirlendi ($p=0,960$). Literatürde, VCD uygulaması sonrası ovaryum ağırlıklarının değişmediğini gösteren çalışmaların yanı sıra (Cakır ve ark., 2024; Flaws ve ark., 1994;), ovaryum ağırlıklarının azaldığını bildiren yayınlar bulunmaktadır (Hoyer, & Sipes, 2007a; Mayer ve ark., 2002; Nozaki ve ark., 2009). Çakır ve arkadaşları, 15 gün subkutan VCD (160 mg/kg/gün) uyguladıkları sıçanların ovaryum ağırlıklarında kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir (Cakır ve ark., 2024). Bir diğer çalışmada 30 gün süreyle uygulanan VCD'nin erişkin (58 günlük) ve immatür (28 günlük) sıçanlarda ovaryum ağırlığına etkisi olmadığı gösterilmiştir (Flaws ve ark., 1994). Farklı doz ve sürelerde uygulanan sisplatinin ovotoksitesinin değerlendirildiği bir çalışmada, i.p. olarak iki hafta süreyle uygulanan 1 mg/kg ve 2 mg/kg dozlarında sisplatinin ovaryum ağırlığında azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Nozaki ve ark., 2009). 30 gün VCD uygulanan ve uzun dönem takibi (360 gün) yapılan deneklerin ovaryum ağırlıklarının değerlendirildiği bir çalışmada ovaryum ağırlığında azalma olduğu sonucuna ulaşılmıştır (Mayer, ve ark., 2002). Ovaryum ağırlığındaki azalmanın sebebinin ovaryan folikül sayısındaki azalma ve ovaryum doku atrofisindeki artış olduğu kanısına varılmıştır (Hoyer, & Sipes, 2007; Mayer, ve ark., 2002). Uyguladığımız süre ve dozdaki VCD'nin dişi sıçanların ovaryum ağırlıklarını değiştirmediğini gösteren bulgumuz literatürle uyumlu olup VCD'nin overlerin genel morfolojisini bozmadığı öncelikle primordial folikülleri etkilediğini yönündeki literatür bilgisini desteklemektedir.

Çalışmamızda, 56 gün boyunca 500 ng/kg/gün uyguladığımız asprosinin ovaryum ağırlıkları üzerindeki etkisi, solventi olan serum fizyolojik uygulanan deneklerin ovaryum ağırlıklarının karşılaştırılması ile değerlendirilmiş ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı sonucuna ulaşılmıştır ($p=0,960$). Literatürde, normal over rezervine sahip denekler ile POI modeli oluşturulmuş deneklerde asprosin uygulamasının ovaryum ağırlıklarına etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanmamıştır.

5.6. POI Modelinin ve Asprosin Uygulamasının Ovaryum Foliküllerine Etkisi

Ovaryumlarda, primordial folikül, primer folikül, (unilaminer, multilaminer), sekonder folikül, Graaf folikülü ve atretik folikül olarak adlandırılan birçok farklı aşamada folikül mevcuttur. Foliküllerin oranına bakıldığında en büyük orana sahip olan foliküllerin statik durumdaki primordiyal foliküller olduğu görülmektedir (Monget, McNatty, & Monniaux, 2021; Hsueh, Kawamura, Cheng, & Fauser, 2015; Pedersen, 1970). Çalışmamızda POI sıçan modeli oluşturmak için kullanılan VCD'nin ovotoksik etkisinden en çok etkilenen folikül grubu primordial foliküllerdir. Çalışmamızda ovaryan foliküller, H&E ve proliferasyon belirteci PCNA için uygulanan immünohistokimyasal yöntem ile boyanan preparatlarda değerlendirildi. Normal ovaryan rezerve sahip olan NOR grubu ve POI grubu deneklere ait ovaryum primordiyal folikül sayılarının azaldığı ve bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bulundu. Bu sonucumuz literatür verilerini desteklemektedir. Ek olarak, POI modeli oluşturulan deneklerde NOR grubuna göre atretik folikül sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir artış vardır ki bu da ovaryan rezervin atreziye uğradığını göstermektedir.

Primordial foliküllerin ilk aktivasyonu, gonadotropinler tarafından düzenlendiği kabul edilen siklik aktivasyonundan farklıdır (Kallen ve ark., 2018). İlk aktivasyon gonadotropinlerden bağımsız olup, pregranüloza hücreleri, oosite ait sinyaller, primordiyal folikülün mikro çevresindeki büyüme faktörleri ve stres gibi farklı mekanizmalar ile düzenlenmektedir (Bian ve ark., 2021). Çalışmamızda POI modeli oluşturulmuş deneklere uygulanan asprosin, primordial foliküllerin yanı sıra gelişimin farklı evrelerindeki foliküllerin (unilaminer primer folikül, multilaminer primer folikül ve sekonder folikül ve Graaf folikülleri) sayılarını da istatistiksel anlamlılık taşıyacak düzeyde arttırmıştır. Bu bulgu, sistemik uygulanan asprosinin ovaryum folikülleri üzerindeki etkisini gösteren literatürdeki ilk veri olup, öncelikle asprosinin, primordiyal foliküllerin siklik aktivasyonuna ve/veya ilk aktivasyonunda rol oynayan mekanizmalara etki ederek primordial folikül sayısını artırdığını düşündürmüştür. Ayrıca, gelişimin farklı evrelerindeki foliküllerin sayısında gözlenen artışın, sadece primordial foliküllerin aktivasyonu ile değil aynı zamanda folikül

gelişimini düzenleyen diğer mekanizmalar üzerine de asprosinin etkisi olabileceği fikrini akla getirmiştir.

5.7. POI Modelinin ve Asprosin Uygulamasının E2 ve AMH Seviyelerine Etkisi

Çalışmamızda tüm gruplardaki deneklerden 1., 15. ve 71. günlerde alınan kanlardan elde edilen serumlarda ELISA tekniği ile AMH ve E2 düzeyleri ölçüldü. NOR ve POI gruplarının AMH düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde 1. ve 15. günler arasında anlamlı bir düşüş olduğu belirlendi. VCD enjeksiyonlarının POI modelini oluşturduğu doğrulandı ($p<0,001$). Literatürdeki farklı denek ve VCD dozlarının uygulandığı çalışmalarda da serum AMH düzeylerinde düşüş gözlemlenmiştir (Cakır ve ark., 2024). AMH düzeyindeki düşüş deneklerden elde edilen ovaryum kesitlerinde gerçekleştirilen folikül sayımlarından elde edilen istatistiksel analizlerle benzer özellikler göstermektedir. Asprosin enjeksiyonlarının AMH düzeyini ve folikül sayılarını artırması, asprosinin oluşturulan POI modelinde ovaryum rezervindeki olumsuz etkileri iyileştirebileceğini düşündürmüştür.

E2, kadınlar için fertilitiyi, özellikle folikülogenezi kontrol eden önemli bir hormondur. Ovaryum foliküllerindeki granüloza hücreleri tarafından lokal olarak üretilen bir steroiddir; dominant preovulatuvar foliküllerin gelişimini ve seçimini kontrol eder. Oz ve arkadaşlarının 2023'te yayınlanan çalışmalarına göre normal ovaryan rezerve sahip deneklere 500 ng/kg dozda 56 gün süreyle i.p. verilen asprosin, dişi sıçanlarda serum E2 değerlerini anlamlı düzeyde ($p<0,001$) artırmaktadır (Oz ve ark., 2023). Çalışmamızda 1., 15. ve 71. günlerde ölçülen serum E2 düzeylerinde anlamlı bir artış tespit edilmiştir. Granüloza hücreleri tarafından üretilen E2 serum düzeyindeki bu artışın granüloza hücrelerinde gözlenen artmış proliferasyon ile ilişkili olabileceği sonucuna varılmıştır. Şöyle ki, çalışmamızda granüloza hücrelerindeki olası proliferasyonu değerlendirmek amacıyla immünohistokimyasal yöntemle yapılan PCNA boyaması sonucunda, hem PCNA eksprese eden preantral folikül ($p<0,001$) hem de antral foliküllerin sayısında anlamlı artış ($p<0,001$) belirlendi. Elde etmiş olduğumuz bu sonuçlar, E2 düzeylerindeki artışın, asprosinin primordiyal foliküllerin aktivasyonu ve diğer foliküllerin siklik aktivasyonu üzerindeki etkisi ile ilişkili olabileceğini düşündürmüştür.

Sonuç olarak çalışmamız, asprosinin, primordial foliküllerin aktivasyonuna neden olarak over rezervini ve folikül gelişimini olumlu yönde etkilediğini göstermektedir. Ayrıca asprosinin POI modelinde etkinliğini gösteren literatürdeki ilk veriler olması açısından değerlidir. Ek olarak asprosinin, primordial foliküllerin ilk aktivasyonunu düzenleyen pregranüloza hücreleri, oositteki sinyaller, primordiyal folikülün mikro çevresindeki büyüme faktörleri ve stres gibi farklı mekanizmaların üzerindeki etkilerinin araştırılacağı yeni çalışmalara öncülük edeceğini düşünmekteyiz.



6. KAYNAKLAR

- Baggish, M. S., & Karram, M. M. (2016). Atlas of Pelvic Anatomy and Gynecologic Surgery (5). Philadelphia: Elseiver.
- Baker, T. G. (1963). A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings Of The Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rspb.1963.0055>
- Baker, T. G., & O, W. S. (1976). Development of the ovary and oogenesis. *Clinics in Obstetrics And Gynaecology*, 3-26. [https://doi.org/10.1016/S0306-3356\(21\)00330-7](https://doi.org/10.1016/S0306-3356(21)00330-7)
- Batalha, İ. M., Maylem, E. R. S., Spicer, L. J., Bello, C. A. P., Archilia, E. C., & Schütz, L. F. (2023). Effects of asprosin on estradiol and progesterone secretion and proliferation of bovine granulosa cells. *Molecular And Cellular Endocrinology*, 565. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2023.111890>
- Bian, X., Xie, Q., Zhou, Y., Wu, H., Cui, J., Jia, L., & Suo, L. (2021). Transcriptional Changes Of Mouse Ovary During Follicle İnitial Or Cyclic Recruitment Mediated By Extra Hormone Treatment. *Life sciences*, 261. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118654>
- Blaustein, A. (1982). Anatomy and Histology of the Human Ovary. Pathology of the Female Genital Tract (s. 416–441). içinde New York: Springer. doi:https://doi.org/10.1007/978-1-4757-1767-9_16
- Brelje, T. C., & Sorenson, R. L. (2024). <http://www.histologyguide.com/slideview/mhs-259-ovary/18-slide-1.html?x=30490&y=13569&z=29.1>]. Histology Guide. <https://histologyguide.com/>
- Bourdais, A., Dehapiot, B., & Halet, G. (2018). Polar Body Formation After Ovulation and Fertilization, *Encyclopedia of Reproduction*, 208-211. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.64455-0>
- Byers, S. L., Wiles, M. V., Dunn, S. L., Taft, R. A. Shannon L. Byers, M. V. (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images. *PLoS One*. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035538>
- Çakır, C., Kuspınar, G., Aslan, K., Bozyıgıt, C., Kasapoglu, I., Dırıcan, M., Uncu, G., & Avcı, B. (2024). Dehydroepiandrosterone modulates the pten/p13k/akt signaling pathway to alleviate 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced premature ovarian insufficiency in rats. *Experimental Animals*. <https://doi.org/10.1538/expanim.23-0179>
- Çakiroglu, Y., Saltık, A., Yuceturk, A., Karaosmanoglu, O., Kopuk, S. Y., Scott, R. T., Tiras, B., & Seli, E. (2020). Effects of intraovarian injection of autologous platelet rich plasma on ovarian reserve and IVF outcome parameters in women with primary ovarian insufficiency. *Aging (Albany NY)*, 12(11), 10211–10222. doi:<https://doi.org/10.18632/aging.103403>
- Cao, J., Huo, P., Cui, K., Wei, H., Cao, J., Wang, J., Liu, Q., Lei, X., & S. Z. (2022). Follicular fluid-derived exosomal mir-143-3p/mir-155-5p regulate follicular dysplasia by modulating glycolysis in granulosa cells in polycystic ovary syndrome. *Cell Commun Signal*, 20(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s12964-022-00876-6>

- Cao, L. B., Leung, C. K., Law, P. W., Lv, Y., Ng, C., Liu, H. B., , G. L., Ma, J. L., & W. Y. C. (2020). Systemic changes in a mouse model of vcd-induced premature ovarian failure. *Life Sciences*, 262, Bölüm:118543. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118543>
- Carolino, R. O. G., Barros, P. T., Kalil, B., & Anselmo-Franci, J. (2019). Endocrine profile of the vcd-induced perimenopausal model rat. *Plos One*, 14(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226874>
- Chauvin, S., Cohen-Tannoudji, J., & C. J. G. (2022). Estradiol signaling at the heart of folliculogenesis: its potential deregulation in human ovarian pathologies. *Int J Mol Sci.*, 23(1). 10.3390/ijms23010512
- Cooper, A. R., Baker, V. L., Sterling, E. W., Ryan, M. E., Woodruff, T. K., & Nelson, L. M. (2011). The time is now for a new approach to primary ovarian insufficiency. *Fertility And Sterility*, 95(6), 1890-1897. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.01.016>
- 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>
- Coucovanis, E. C., Sherwood, S. W., Carswell-Crumpton, C., Spack, E. G., & Jones, P. (1993). Evidence that the mechanism of prenatal germ cell death in the mouse is apoptosis. *Exp. Cell. Res*, 238-247. doi:<https://doi.org/10.1006/excr.1993.1307>
- Duerrschmid, C., He, Y., Wang, C., Li, C., Bournat, J. C., Romere, C., Saha, P. K., Lee, M. E., Phillips, K. J., Jain, M., Jia, P., Zhao, Z., Farias, M., Wu, Q., Milewicz, D. M., Sutton, V. R., Moore, D. D., Butte, N. F., Krashes, M. J., & Chopra, A. R. (2017). Asprosin is a centrally acting orexigenic hormone. *Nature Medicine*, 23, 1444–1453. <https://doi.org/10.1038/nm.4432>
- Elvis-Offiah, U. B., Isuman, S., Johnson, M. O., Ikeh, V. G., & Agbontaen, S. (2022). Our clear-cut improvement to the impact of mouse and rat models in the research involving female reproduction. M. Karapehlivan, V. Gelen, & A. Kükürt (Ed.), *Animal models and experimental research in medicine*, 167-169. <https://doi.org/10.5772/intechopen.106858>
- Elvis-Offiah, U. B., Success Isuman, Johnson, M. O., Ikeh, V. G., & Agbontaen, S. (2022). Our Clear-Cut Improvement to the Impact of Mouse and Rat Models in the Research Involving Female Reproduction. *Animal Models and Experimental Research in Medicine*. içinde IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.106858
- Epic, J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), 829–838. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220829>
- Fasshauer, M., & Blüher, M. (2015). Adipokines in health and disease. *Trends Pharmacol Sci*, 36(7), 461-470. doi:10.1016/j.tips.2015.04.014
- Fernandez, S. M., Keating, A. F., Christian, P. J., Sen, N., Hoying, J. B., Brooks, H. L., & Hoyer, P. B. (2008). Involvement of the kit/kitl signaling pathway in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in rats. *Biology Of Reproduction*, 79(2), 318–327. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.067744>

- Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2008). Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *Csh Protoc.*, <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>
- Flaws, J. A., Doerr, J. K., Sipes, I. G., & Hoyer, P. B. (1994). Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology*, 8(6), 509-514. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0890-6238(94)90033-7)
- Forabosco, A., Sforza, C., Pol, A. D., Vizzotto, L., Marzona, L., & Ferrario, V. F. (1991). Morphometric study of the human neonatal ovary. *The Anatomical Record*. <https://doi.org/10.1002/ar.1092310208>
- Frye, J. B., Lukefahr, A. L., Wright, L. E., Marion, S. L., Hoyer, P. B., & Funk, J. L. (2012). Modeling perimenopause in sprague–dawley rats by chemical manipulation of the transition to ovarian failure. *Comparative Medicine*, 62(3), 193–202.
- Gleicher, N., Weghofer, A. & Barad, D.H. (2011) Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. *Reproductive Biology And Endocrinology*,9, 23. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-23>
- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Developmental And Reproductive Toxicology*, 80(2), 84-97. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
- Gong, J. G., Campbell, B. K., Bramley, T. A., Gutierrez, C. G., Peters, A. R., & R. W. (1996). Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biology Of Reproduction*, 55(1), 68-74. <https://doi.org/10.1095/biolreprod55.1.68>
- Gougeon, A. (2010). Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. *Annales D'Endocrinologie*, 71(3), 132-143. <https://doi.org/10.1016/j.ando.2010.02.021>
- Granados-Aparici, S., Hardy, K., Franks, S., Sharum, I. B., Waite, S. L., & Fenwick, M. A. (2019). Smad3 directly regulates cell cycle genes to maintain arrest in granulosa cells of mouse primordial follicles. *Scientific Reports*, 9.
- Grimbizis, G. F., Gordts, S., Sardo, A. D. S., Brucker, S., Angelis, C. D., Gergolet, M., Li, T., Tanos, V., Brölmann, H., Gianaroli, L., & Campo, R. (2013). The eshre/esge consensus on the classification of female genital tract congenital anomalies. *Human Reproduction*, (28), 2032–2044., <https://doi.org/10.1093/humrep/det098>
- Guidelines for survival bleeding of mice and rats. *Nih-Arac* (2005, 12 January) Guidelines. <http://oacu.od.nih.gov/ARAC/Bleeding.pdf> [Revize 14.12.2024]
- Gutierrez-Barbosa, H., Medina-Moreno, S., Davis, H., Bryant, J., Chua, J. V., & Zapata, J. C. (2021). Humanized mice for the study of dengue disease pathogenesis: biological assays. R. Mohana-Borges (Ed.), *Dengue virus methods and protocols* book içinde (s. 271–289). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1879-0_19.
- Hagen-Lillevik, S. J., Rushing, J., Cari, E. L., Lersten, I., Polotsky, A. J., Lai, K., & Johnson, J. (2022). Evidence of fluctuating integrated stress response activity in murine primordial ovarian follicles. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1682172/v1>

- Hoyer P. B., Devine, P. J., Hu, X., Thompson, K. E., & Sipes, I. G. (2001). Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene diepoxide: a mechanistic model. *Toxicologic Pathology*, 29(1), 91 - 99. <https://doi.org/10.1080/019262301301418892>
- Hoyer, P. B., & Sipes I. G. (2007). Development of an animal model for ovotoxicity using 4-vinylcyclohexene: a case study. *Birth Defects Research Part B: Developmental And Reproductive Toxicology*, 80(2). <https://doi.org/10.1002/bdrb.20103>
- Hsueh, A. J. W., Kawamura, K., Cheng, Y., & Fauser, B. C. J. M. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, 36(1), 1-24. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1020>
- Ishizuka, B. (2021). Current understanding of the etiology, symptomatology, and treatment options in premature ovarian insufficiency (poi). *Frontiers In Endocrinology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.626924>
- Ishizuka, B. (2021). Current Understanding of the Etiology, Symptomatology, and Treatment Options in Premature Ovarian Insufficiency (POI). *Front. Endocrinol.*, 12. doi:<https://doi.org/10.3389/fendo.2021.626924>
- Jaffe, L. A., & Egbert, J. R. (2017). Regulation of mammalian oocyte meiosis by intercellular communication within the ovarian follicle. *Annual Review Of Physiology*, 79, 237-260. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-022516-034102>
- Jiao, X., Zhang, H., Ke, H., Zhang, J., Cheng, L., Liu, Y., Qin, Y., & Chen, Z., C. (2017). Premature ovarian insufficiency: phenotypic characterization within different etiologies . *The Journal Of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 102(7), 2281-2290. <https://doi.org/10.1210/jc.2016-3960>
- Kallen, A., Polotsky, A.J., Johnson, J. (2018). Untapped Reserves: Controlling Primordial Follicle Growth Activation. *Trends in Molecular Medicine*, 24(3), 319-331. doi:<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.01.008>
- Kelsey, T. W., & Wallace, W. H. B.(2011) Ovarian volume correlates strongly with the number of nongrowing follicles in the human ovary. *Obstetrics And Gynecology International*, 2012. 17(12), 3065–3071<https://doi.org/10.1155/2012/305025>
- Kempen, T. A. V., Milner, T. A., & Waters, E. M. (2011). Accelerated ovarian failure: a novel, chemically induced animal model of menopause. *Brain Research*, 1379, 176-187. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.064>
- Kerslake, R., Sisuu, C., Panfilov, S., Hall, M., Khan, N., Jeyaneethi, J. (2022). Differential Regulation of Genes by the Glucogenic Hormone Asprosin in Ovarian Cancer. *J. Clin. Med*, 11(19). doi:<https://doi.org/10.3390/jcm11195942>
- Kurowska P, Mlyczyńska E, Dawid M, Sierpowski M, Estienne A, Dupont J, Rak A (2021) Adipokines change the balance of proliferation/apoptosis in the ovarian cells of human and domestic animals: *A comparative review. Anim Reprod Sci* 228:106737.
- Leonard, A. N., Shill, A.L., Thackray, A. E., Stensel, A. J., Bishop, N. C. (2021). Fasted plasma asprosin concentrations are associated with menstrual cycle phase, oral contraceptive use and training status in healthy women. *European Journal of Applied Physiology*, 121, 793–801. doi:10.1007/s00421-020-04570-8

- Li, E., Shan, H., Chen L., Long A., Zhang Y., Liu Y., Jia L., Wei, F., Han J., Li T., Liu X., Deng H., & Wang, Y. (2019). Olfr734 mediates glucose metabolism as a receptor of asprosin. *Cell Metabolism*, 30(2), 319-328. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.022>
- Li, E., Shan, H., Chen, L., Long, A., Zhang, Y., Liu, Y., Jia, L., ..., Wang, Y. OLFR734 Mediates Glucose Metabolism as a Receptor of Asprosin. *Cell Metabolism*, 30(2), 319-328. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.05.022>
- Li, S., & Davis, B. (2007). Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies., 80(3), 246-252. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20120>
- Li, X., Xie, J., Wang, Q., Cai, H., Xie, C., & Fu, X. (2020). Mir-21 and pellino-1 expression profiling in autoimmune premature ovarian insufficiency. *Journal Of Immunology Research*.<https://doi.org/10.1155/2020/3582648>
- Lintern-Moore, S., & Moore, G. P. M. (1979). The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary . *Biology Of Reproduction*, 20(4), 773–778. <https://doi.org/10.1095/biolreprod20.4.773>
- Liu, C., Zhang, Y., Han, X., Tan, G., Cao, C., Lao, Y., & Y. H. (2024). Research on liposomal hydrogels loaded with "liu zi tang" compound chinese medicine for the treatment of primary ovarian insufficiency. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine* , 10. <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2023.100337>
- Liu, S., Jia, Y., Meng, S., Luo, Y., Yang, Q., & Pan, Z. (2023). Mechanisms of and potential medications for oxidative stress in ovarian granulosa cells: a review. *Int J Mol Sci* , 24(22). <https://doi.org/10.3390/ijms24119205>
- Long, G. G., Cohen, I. R., Gries, C. L., Young, J. K., Francis, P. C., & Capen, C. C. (2001). Proliferative lesions of ovarian granulosa cells and reversible hormonal changes induced in rats by a selective estrogen receptor modulator. *Toxicologic Pathology*. 10.1080/01926230152500004
- Long, J. A., Evans, A., & Evans, H. M. (1922). The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. . *Memoirs Univ Calif* , 6, 1–148.
- Lönnqvist L., Reinhardt, D., Sakai, L., & Peltonen, L. (1998). Evidence for furin-type activity-mediated c-terminal processing of profibrillin-1 and interference in the processing by certain mutations. *Human Molecular Genetics*, 7(13), 2039–2044. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.13.2039>
- Luborsky J., Meyer, P., Sowers, M., Gold, E., & Santoro, N. (2003). Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Human Reproduction*, 18(1), 199–206. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg005>
- Madalinska, J. B., Beurden, M. V., Bleiker, E. M. A., & Valdimarsdottir, H. B. (2006). The Impact of Hormone Replacement Therapy. *Journal Of Clinical Oncology*, 24(22), 3576, 3582. doi: <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.1896>
- Mark-Kappeler, C. J., Sen, N., Keating, A. F., Sipes, I. G., & Hoyer, P. B. (2010). Distribution and responsiveness of rat anti-müllerian hormone during ovarian development and vcd-induced ovotoxicity. *Toxicology And Applied Pharmacology*, 249(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.08.024>
- Maurya S, Singh A (2022) Asprosin modulates testicular functions during ageing in mice. *Gen Comp Endocrinol* 323–324:114036.
- Mayer, L. P., Devine, P. J., Dyer, C. A. , & Hoyer, P. B. (2004). The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biology Of Reproduction*, 71(1), 130–138. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016113>

- Mayer, L. P., Pearsall, N. A., Christian, P. J., Devine, P. J., Payne, C. M., Mccuskey, M. K., Marion, S. L., Sipes, I., & Hoyer, P. B. (2002). Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology*, 16(6), 775-781. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00048-5)
- Maylem E. R. S., Spicer, L. J., Atabay, E. P., Atabay, E. C., Batalha, I., & Schutz, L. F. (2022). A potential role of fibrillin-1 (fbn1) mrna and asprosin in follicular development in water buffalo. *Theriogenology*, 178,67-72. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.004>
- Maylem, E. R. S., Spicer, L. J., Batalha, S., & Schutz, L. F. (2021). Discovery of a possible role of asprosin in ovarian follicular function. *In Journal Of Molecular Endocrinology*, 66(1), 35–44. <https://doi.org/10.1530/JME-20-0218>
- Maylem, E. R. S., Spicer,L.J. Batalha,I., & Schutz, L.F.(2021). Discovery of a possible role of asprosin in ovarian follicular function. *Journal Of Molecular Endocrinology*, 66(1), 35–44. <https://doi.org/10.1530/JME-20-0218>
- Mcgee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200-214. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
- Mcgee, E., Spears, N., Minami, S., Hsu, S., Chun, S., Billig, H., & Hsueh, A. J. W. (1997). Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrine Society*,18(6), 2417–2424. <https://doi.org/10.1210/endo.138.6.5164>
- Mohamed-Ali, V., Pinkney, J. H. & Coppack, S. W. (1998). Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *International Journal of Obesity*, 22, 1145–1158. doi:<https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0800770>
- Monget, P., Mcnatty, K., & Monniaux, D. (2021). The crazy ovary. *Genes*, 12(6), 928. <https://doi.org/10.3390/genes12060928>
- Muhammad, F. S., Goode, A. K., Kock, N. D., Arifin, E. A., Cline, J. M., Adams, M. R., Hoyer, P. B., Christian, P. J., Isom, S., Kaplan, J. R., & Appt, S. E. (2009). Effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on peripubertal and adult sprague–dawley rats: ovarian, clinical, and pathologic outcomes. *Comparative Medicine*, 59(1), 46-59.
- Myers, M., Britt, K. L., Wreford, N. G. M., Ebling, F. J. P., & Kerr, A. J. B. (2004), Methods for quantifying follicular numbers within the mouse ovary. *Reproduction*, 127(5), 569-580. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00095>
- Na, J., & Kim, G. J. (2020). Recent trends in stem cell therapy for premature ovarian insufficiency and its therapeutic potential: a review. *Journal Of Ovarian Research*, 13, 74. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00671-2>
- Nelson, L. M. (2009). Clinical practice. primary ovarian insufficiency. *The New England Journal Of Medicine*, 360(6), 606-614. <https://doi.org/10.1056/NEJMcp0808697>
- Nguyen Q. N., Zerafa, N., Liew, S. H., Findlay, J. K., Hickey, M. , & Hutt, K. J. (2019). Cisplatin- and cyclophosphamide-induced primordial follicle depletion is caused by direct damage to oocytes. *Molecular Human Reproduction*, 25(8), 433-444. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz020>

- Nozaki, Y., Furubo, E., Matsuno, T., Fukui, R., Kizawa, K., Kozaki, T., & Sanzen, T. (2009). Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity 6) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats.
- Jung, T., Kim, H., Kim, H., Taekwang, P., Jinwoo, P., Uiseok, K., Ji Hoon, J. (2019). Asprosin attenuates insulin signaling pathway through PKC δ -activated ER stress and inflammation in skeletal muscle. *Journal of Cellular Physiology* 234(11), 20888-20899. <https://doi.org/10.1002/jcp.28694>
- Journal of Toxicological Sciences*. 34(1), 91-99. <https://doi.org/10.2131/jts.34.s91>.
- O'Neill, E. K., Maher, J. Y., Laronda, M. M., Duncan, F. E., LeDuc R. D., Lujan, M. E., ...Gomez-Lobo, V. (2023). Anatomic nomenclature and 3-dimensional regional model of the human ovary: call for a new paradigm. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 228(3), 270-275. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2022.09.040>
- Ozcan, S., Kelestemur, M. M., Hekim, M. G., Bulmus, O., Bulut, F., Bilgin, B., Canpolat, S., Ozcan, M. (2022). Asprosin, a novel therapeutic candidate for painful neuropathy: an experimental study in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 395(3), 325-335. <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02197-w>.
- Oz, Z. D., Kacar, E., Serhatlioglu, İ., Ozdede, M. R., Atila, B., Horoz, M. A., Avcu, G. G., Ozbeg, G., Ozgen, A., Tan, F., Zorlu, G., Yasar, A., Yilmaz, B., & Kelestimur, H. (2023). The effects of chronic asprosin administration on sense of smell and sexual behavior in female rats. *Neuroendocrinology*, 113(8), 822–833. <https://doi.org/10.1159/000530274>
- Paccola C., Resende, C., Stumpp, T., Miraglia, S., & Cipriano, İ. (2013). The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim Reprod.*, 10(4), 677-683.
- Parasuraman, S., Raveendran, R., & Kesavan, R. (2010). Blood Sample Collection In Small Laboratory Animals, *J. Pharmacol. pharmacother.* 1(2), 87–93. 10.4103/0976-500X.72350
- Pedersen, T. (1970). Determination of follicle growth rate in the ovary of the immature mouse. *In Reproduction*, 21(1), 81-93. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0210081>
- Pelosi, E., Simonsick, E., Forabosco, A., Garcia-Ortiz, J. E., & Schlesinger, D. (2015). Dynamics of the ovarian reserve and impact of genetic and epidemiological factors on age of menopause. *Biology Of Reproduction*, 92(5), 1 9. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.127381>
- Peluso, J. J. (1992). Pathobiology of the aging rat. Morphologic and physiologic features of the ovary içinde (s. 337–349). *İlsi Press*, Washington, Dc.
- Pepling, M. E., Wilhelm, J. E., O'Hara, A. L., & Spradling, A. C.(2007). Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a balbiani body. *Pnas Biological Sciences*, 104 (1), 187-192. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609923104>
- Pepling, M. E., Wilhelm, J. E., O'Hara, A. L., Geghardt, G. W., & Spradling, A. C. (2007). Mouse oocytes within germ cell cysts and primordial follicles contain a Balbiani body. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(1), 187-192. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609923104>

- Picut, C. A., Dixon, D., Simons, M. L., Stump, D. G., Parker, G. A., & Remick, A. K. (2014). Postnatal ovary development in the rat: morphologic study and correlation of morphology to neuroendocrine parameters. *Toxicologic Pathology*, 43(3). <https://doi.org/10.1177/0192623314544380>
- Picut, C. A., Dixon, D., Simons, M. L., Stump, D. G., Parker, G. A., & Remick, A. K., (2015). Postnatal Ovary Development in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. *Society of toxicologic pathology* 43(3), 343–353. <https://doi.org/10.1177/0192623314544380>
- Reddy, P., Zheng, W., & Liu, K. (2010). Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends In Endocrinology & Metabolism*, 21(2), 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2009.10.001>
- Romere, C., Duerschmid, C., Bournat, J., Constable, P., Jain, M., Xia, F. ..., Chopra, A. R. (2016). Asprosin, a Fasting-Induced Glucogenic Protein Hormone. *165(3)*, 566-579. doi:10.1016/j.cell.2016.02.063
- Rooij, I. V., Broekmans, F., Velde, E. T., Fauser, B., Bancsi, L., Jong, F., & Themmen, A. (2002). Serum anti-müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Human Reproduction*, 17(12), 3065–3071. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.12.3065>
- Rudnicka E., Kruszewska, J., Klicka, K., Kowalczyk, J., Grymowicz, M., Skórska, J., Pięta, W., & Smolarczyk, R. (2018). Premature ovarian insufficiency – aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Menopause Review*, 17(3), 105-108. <https://doi.org/10.5114/pm.2018.78550>
- Sadler, T., & Langman, J. (2012). langman's medical embryology. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, ©2012.
- Sahambi, S. K., Visser, J. A., Themmen, A. P., Mayer, L. P., & Devine, P. J. (2008). Correlation of serum anti-müllerian hormone with accelerated follicle loss following 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced follicle loss in mice. *Reproductive Toxicology*, 26(2), 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.07.005>
- Sato J., Hashimoto S., Doi T., Yamada N., & Tsuchitani M. (2014). Histological characteristics of the regression of corpora lutea in wistar hannover rats: the comparisons with sprague-dawley rats. *Journal Of Toxicologic Pathology*, 27(2), 107-113. <https://doi.org/10.1293/tox.2013-0054>
- Sforza, C., Vizzotto, L., Ferrario, V. F., & Forabosco, A. (2003). Position of follicles in normal human ovary during definitive histogenesis. *Early Human Development*, 27-35. [https://doi.org/10.1016/S0378-3782\(03\)00081-1](https://doi.org/10.1016/S0378-3782(03)00081-1)
- Shah, J. S., Sabouni, R., Vaught, K. C. C., Owen, C. M., Albertini, D. F., & Segars, J. H. (2018). Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. *Journal Of Assisted Reproduction And Genetics* , 35, 1135–1148. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1180-y>
- Shorr, E. (1941). A new technic for staining vaginal smears: iii, a single differential stain. *Science*, 94(2449), 546-545. 10.1126/science.94.2449.545-a
- Shuster, L. T., Rhodes, D. J., Gostout, B. S., Grossardt, B. R., & Rocca, W. A. (2010). Premature menopause or early menopause: long-term health consequences. *Maturitas*, 65(2),161-166. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2009.08.003>

- Springer, L. N., Flaws, J. A., Sipes, I. G., & Hoyer, P. B. (1996). Follicular mechanisms associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Reproductive Toxicology*, 10(2), 137-143. 10.1016/0890-6238(95)02056-x
- Steele, M. S. & Bennett, R. A. (2011). Clinical technique: dorsal ovariectomy in rodents. *Journal Of Exotic Pet Medicine*, 20(3), 222-226. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2011.04.008>
- Townson, D. H., & Combelles, M. H. C. (2012). Ovarian Follicular Atresia. A. Darwish (Dü.) içinde, *Basic Gynecology - Some Related Issues*. InTech. doi:<https://doi.org/10.5772/32465>
- Valdimarsson, G., Sousa, P. A. D., & Kidder, D. G. M. (1993). Coexpression of gap junction proteins in the cumulus-oocyte complex. *Molecular Reproduction And Development*, 36(1), 7-15. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080360103>
- Virant-Klun, I. (2015). Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. *Stem Cells And Cloning: Advances And Applications*, 8, 49-60. <https://doi.org/10.2147/SCCAA.S32650>
- Wang, Z., Wang, Y., Yang, T., Li, J., Yang, X. (2017). Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res. Ther.*, 8(1), 11. doi:<https://doi.org/10.1186/s13287-016-0458-1>
- Webber, L., Davies, M., Anderson, R., Bartlett, J., Braat, D., Cartwright, B., ..., Vermeulen, N. (2016). Eshre guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, 31(5), 926-937. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew027>
- Wei, F., Long, A., & Wang, Y. (2019). The Asprosin-OLFR734 hormonal signaling axis. *Cell Discovery*. doi:<https://doi.org/10.1038/s41421-019-0122-x>
- Woad K. J., Watkins, W. J., Prendergast, D., & Shelling, A. N. (2006). The genetic basis of premature ovarian failure. *Anzjog*, 46(3), 242-244. <https://doi.org/10.1111/j.1479-828X.2006.00585.x>
- Yuan, Y., & R. G. C. (1985). Structure, cyclic change, and function, vagina and vulva, rat. T. C. Jones, U. Mohr, R. D. Hunt ve (Ed.), *Genital system* içinde (s. 161-168). Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Zeleznik, A. J., Albertini, D., Goodman, R., McCarthy, M. M., Muglia, L., & Richards, J. (2015). Follicular development: mouse, sheep, and human models. T. M. Plant ve A. J. Zeleznik (Ed.), *Knobil and neill's physiology of reproduction* içinde (s. 947-995). <https://doi.org/10.1016/C2011-1-07288-0>
- Zhang H., Panula, S., Petropoulos, S., Edsgård, D., Busayavalasa, K., Liu, L., ..., Sheikhi, M., Damdimopoulou, P., Sandberg, R., Douagi, I., & Liu, K. (2015). Adult human and mouse ovaries lack ddx4-expressing functional oogonial stem cells. *Nature Medicine*, 21, 1116-1118. DOI: 10.1038/nm.3775
- Zhang, H., Risal, S., Gorre, N., Busayavalasa, K., Li, X., Shen, Y., Bosbach, B., Brañnnstro'm, M., & Liu, K. (2014). Somatic cells initiate primordial follicle activation and govern the development of dormant oocytes in mice. *Current Biology*, 24(31), 2501-2508. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.09.023>
- Zhang, T., He, M., Zhang, J., Tong, Y., Chen, T., Wang, C., Pan, W., & Xiao, Z. (2023). Mechanisms of primordial follicle activation and new pregnancy opportunity for premature ovarian failure patients. *Front. Physiol.*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1113684>

- Zhang, T., Yan, D., Yang, Y., Ma, A., Li, L., Wang, Z., Pan, Q., & Sun., Z. (2016). The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers. *Regulatory Toxicology And Pharmacology*, 81, 223-232. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.09.002>
- Zhao, F., Lian, Y., & Wang, W. (2017). Short-term effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on ovarian follicular depletion and fertility in sprague-dawley rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 10(11), 15775-15781.
- Zhou, F., Song, Y., Liu, X. Zhang, C., Li, F., Hu, R., ... Zhang, M. (2021). Si-Wu-Tang facilitates ovarian function through improving ovarian microenvironment and angiogenesis in a mouse model of premature ovarian failure. *Journal of Ethnopharmacology*. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114431>



7. EKLER

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
Görükle Yerleşkesi, 16059 Nilüfer/ BURSA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	<i>Prematür ovaryan yetmezliği modelinde asprosinin folikül gelişimine etkisinin araştırılması</i>
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. F. Zehra MINBAY BUÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Yüksek Lisans Öğr. Bahar POMAK ADALI
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Bahar POMAK ADALI'nın Yüksek Lisans Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01 Mart 2023 – 01 Mart 2024
	KULLANILACAK HAYVAN TÜRÜ VE SAYISI	37 Adet Dişi Sıçan

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU	21.02.2023

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2023 - 04 / 05	Tarih: 28.02.2023
	<p>Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi. 	

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	İlişki (*)	İmza		Düşünceler
				Kabul	Ret	
Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY Başkan	Tıp- Farmakoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Dr.Öğr. Üyesi Sezer ERER KAFA Üye	Tıp - Tıp Tarihi ve Etik	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Dr.Öğr. Üyesi Diğdem YÖYEN ERMIŞ Üye	Tıp- Immunoloji	Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Veli Yılgör ÇIRAK Üye	Veteriner-Parazitoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Özgür ÖZYİĞİT Üye	Veteriner-Patoloji	Veteriner Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Doç. Dr. Arda SÖZCÜ Üye	Ziraat- Zootečni	Ziraat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Prof. Dr. Nilüfer ÇİNKILIÇ Üye	Fen Edebiyat - Biyoloji	Fen Edebiyat Fakültesi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Asiye İşil SEZER Üye	Sivil Toplum Kuruluş Üyesi	Diş Hekimi	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Filiz TORUN Üye	Sivil Üye	Emekli	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			
Faruk KÜÇÜKYILDIZ Üye	Veteriner Hekim	BUÜ- DEHYUAM	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H			

8. SİMGELER VE KISALTMALAR

AMH	:	Anti-Müllerian hormon
ATP	:	Adenosin trifosfat
DAB	:	Diaminobenzidin
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
E2	:	Östrojen hormonu
E2	:	Östrojen hormonu
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ELISA	:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FOXO3a	:	Forkhead box O3
FSH	:	Folikül stimüle edici hormon
FSH	:	Folikül stimüle edici hormon
GGH	:	Büyüme hormonu
GnRH	:	Gonadotropin salgılayan hormon
H&E	:	Hematoksilen-Eozin
H&E	:	Hematoksilen-Eozin
IP	:	İntraperitoneal
Ip	:	İntraperitoneal
mTORC1	:	Memeli rapamycin complex 1
o.s	:	Oda sıcaklığı
ON	:	Tüm gece
pAKT	:	Fosforile AKT
pAKT	:	Fosforile AKT
PCNA	:	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCNA	:	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PGC	:	Primordiyal germ hücreleri
PGC	:	Primordiyal germ hücreleri
PI3K	:	Fosfotidilinositol-3-kinaz
PI3K	:	Fosfotidilinositol-3-kinaz
POI	:	Prematür ovaryan yetmezliği
POI	:	Prematür ovaryan yetmezliği
PTEN	:	Fosfataz ve tensin homolog
PTEN	:	Fosfataz ve tensin homolog
Sc	:	Subkütan
SF	:	Serum Fizyolojik
VCD	:	4-vinilsikloheksen diepoksit

9. TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimi aldığım süre boyunca bilgisi, tecrübesi ve desteğiyle her zaman yanımda olan, bana yol gösteren değerli danışmanım Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. F. Zehra MİNBAY'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimi aldığım süre boyunca mesleki tecrübeler kazanmama destek olan, bilgisini esirgemeyen Üreme Biyolojisi ve Klinik Embriyoloji Yüksek Lisans Programı yürütücüsü Prof. Dr. Berrin AVCI'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Desteğini hep hissettiğim, bilgi, görgü ve tecrübesine başvurduğum değerli hocam Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Semiha ERSOY'a; eğitimim sürecinde büyük emekleri olan bilgileriyle beni aydınlatan Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR, Doç. Dr. Sema SERTER KOÇOĞLU, Dr. Öğretim Üyesi Duygu GÖK YURTSEVEN'e teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm asistan arkadaşlarıma, çalışanlarına ve laboratuvar çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Bio. Ayşe AKTAŞ'a ve özellikle, tezimde büyük emekleri olan, ihtiyacım olduğunda her zaman destek olan bilgilerini benden esirgemeyen Emb. Dr. Cihan ÇAKIR, Dr. Senem YAVAŞ ve yüksek lisans öğrencisi Nergis COŞKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkez Sorumlusu Prof. Dr. Gürkan UNCU başta olmak üzere tüm çalışanlarına eğitimim boyunca verdikleri emeklerden ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Son olarak, beni bugünlere getiren her an yanımda olan, desteklerini esirgemeyen sevgili annem Cemile POMAK ve babam Selçuk POMAK'a; hayatımı anlamlı kılan sabrı ve sevgisiyle her zaman yanımda olan, beni destekleyen, motive eden eşim Gökay ADALI'ya; bu süreçte bana destek veren herkese teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

İş Deneyimleri

09.2020- 07.2024 Klinik embriyoloji asistanı
Bursa Uludağ Üniversitesi Hastanesi, Tüp Bebek Merkezi

- Spermogram
- İn vitro fertilizasyon için sperm hazırlama
- Foliküler sıvılardan oositleri tanımlanması (OPU)
- Testis biyopsi materyalinden spermi tanımlama izolasyonu
- Embriyo kültürü
- Gamet ve embriyoların kriyoprezervasyonunu gerçekleştirme
- Laboratuvarın kalite kontrol sistemine katılmak

09.2020- 07.2024 Histoloji ve Embriyoloji Asistanı
Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AbD

- Projeler için doku tespiti ve hazırlıkları
- İmmünohistokimyasal boyama
- Deneysel hayvan çalışmaları

04.2021-10.2021

Moleküler Biyolog ve Genetikçi

Bursa Şehir Hastanesi Genetik Tanı Merkezi

- Örneklerden DNA ve RNA izolasyonu,
- PCR,
- RT-PCRSequencing (Parça Analizi için ABI 3500 Genetik Analiz Cihazı)
- Next Generation Sequencing (NGS)

07.2018-08.2018

- Observer

Eğitim

Moleküler Biyolog ve Genetikçi (Stajyer)

10.2020- Devam ediyor Üreme Biyolojisi ve Klinik Embriyoloji

Yüksek Lisans Programı

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji AbD

Tez

- Effect of Asprosin on Follicle Development in a Model of Premature Ovarian Insufficiency

• Projem Bursa Uludağ Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi (BAP) tarafından desteklenmektedir.

- Proje ID:1498

• 07.2016- 07.2020 Moleküler Biyoloji ve Genetik

Bursa Uludağ Üniversitesi