



**NİKOTİNAMİD MONONÜKLEOTİD (NMN) VE
NİKOTİNAMİD RİBOZİD (NR) İLE
MİTOKONDİRİYAL STRES İNHİBİSYONUNUN
ORTA YAŞLI SIÇANLARDA ANOVULASYON
ÜZERİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Nazlı Pınar ARSLAN

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı

Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ

Doktora Tezi-2022

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

**NİKOTİNAMİD MONONÜKLEOTİD (NMN) VE
NİKOTİNAMİD RİBOZİD (NR) İLE MİTOKONDRIYAL
STRES İNHİBİSYONUNUN ORTA YAŞLI SIÇANLARDA
ANOVULASYON ÜZERİNE ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Nazlı Pınar ARSLAN

**Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ**

**Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi'nin 14/06/2021 tarih ve TDK-2021-9146 proje nolu kararı ile
desteklenmiştir.**

**ERZURUM
2022**

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	I
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET	V
ABSTRACT.....	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ovaryumların Embriyolojisi, Anatomisi ve Histolojisi	3
2.1.1. Ovaryumların Embriyolojisi	3
2.1.3. Ovaryumların Histolojisi	4
2.2. Foliküler Gelişim	5
2.3. Kadınlarda İnfertilite.....	7
2.4. Ovaryum Yaşlanması ve Kadın İnfertilitesi	9
2.5. Oksidatif Stres ve Ovaryum yaşlanması	12
2.6. Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Dinamikler	14
2.7. Ovaryum Yaşlanması ve Mitokondriyal Dinamikler.....	18
2.8. Nikotinamid Mononükleotid (NMN) ve Nikotinamid Ribozid (NR)' in Biyolojik Rolleri	19
3. MATERYAL VE METOT.....	22
3.1. Hayvan Etik Kurul Onayı	22
3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı	22
3.3. Deney Grupları ve İlaç Uygulama Prosedürü	22

3.4. Kan Örneklerinin Alınması ve Ovaryumların Çıkarılması.....	23
3.5. Ovaryumlarda Histopatolojik İnceleme ve Folikül Sayımı	23
3.6. Serum Hormon Seviyelerinin Ölçülmesi	25
3.7. Gen Ekspresyon Seviyesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi	26
3.7.1. RNA İzolasyonu	26
3.7.2. Total RNA'nın Spektroskopik Olarak Konsantrasyonunun Ölçülmesi ve Saflığının Kontrolü	26
3.7.3. cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması	26
3.7.4. Kantitatif Gen Ekspresyonu (qReal-Time PCR)	27
3.8. Western-Blot Analizi	28
3.9. İstatistiksel Analizler	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. Vücut ve Ovaryum Ağırlıkları	30
4.2. Histopatolojik İnceleme ve Folikül Sayıları	32
4.3. Serum FSH, LH ve AMH Değişimleri	35
4.4. RT-PCR ile Gen Ekspresyon Seviyesinin Analizi.....	37
4.4.1. Mitokondriyal Füzyon ile İlişkili Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri	37
4.4.2. Mitokondriyal Fızyon ile İlişkili Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri	39
4.5. Fızyon proteinlerinin Western-Blot ile Analizi	41
5. TARTIŞMA.....	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR	55
EKLER	77
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	77
EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU	78



TEŞEKKÜR

Doktora tezi olarak sunduğum bu çalışmayı, değerli bilgi ve katkıları ile yöneten, tezimin her aşamasında yardımlarını ve sabrını esirgemeyen değerli hocam Sayın Doç. Dr. Osman Nuri KELEŞ'e en derin saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmadaki histo-patolojik incelemelerde emeği olan Dr. Öğr. Üyesi Özlem DEMİR'e, RT-PCR ve Western Blot analizlerindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Mesut TAŞKIN'a ve bu çalışmayı proje ile destekleyen Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün değerli yönetici ve personeline teşekkür ederim.

Son olarak, gösterdiği özveri ve manevi desteklerden dolayı büyükbabam Nazım ARSLAN, babaannem Şükriye ARSLAN, babam Birol ARSLAN, annem Hamiyet ARSLAN ve kardeşim Arda ARSLAN'a sonsuz teşekkür ederim.

Nazlı Pınar ARSLAN

ÖZET

Nikotinamid Mononükleotid (NMN) ve Nikotinamid Ribozid (NR) ile Mitokondriyal Stres İnhibisyonunun Orta Yaşlı Sıçanlarda Anovulasyon Üzerine Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Bu çalışmada, Nikotinamid Mononükleotid (NMN) ve Nikotinamid Ribozid (NR)' in orta yaşlı sıçanlarda ovulasyon problemlerini azaltma ve mitokondriyal dinamiklerdeki (mitokondriyal fisyon ve füzyon mekanizmaları) bozulmaları iyileştirme potansiyelleri araştırıldı.

Materyal ve Metot: Genç (Normal), orta-yaşlı (kontrol), orta yaşlı+NMN ve orta yaşlı+NR olmak üzere Wistar albino cinsi dişi sıçanlardan oluşan 4 farklı grup oluşturuldu. Her grupta 6 sıçan yer aldı. NMN 500 mg/kg konsantrasyonda intraperitoneal fakat NR 200 mg/kg konsantrasyonda gavaj ile uygulandı (17 gün süreyle toplam 17 doz). Serum örneklerindeki folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH) ve anti-müllerian hormon (AMH) seviyeleri ELISA ile analiz edildi. Hematoksilen-eozin boyama kesitleri histopatolojik incelenme ve folikül sayımı için kullanıldı. Mitokondriyal fisyon (Drp1, Mff ve Fis1) ve füzyon (Mfn1, Mfn2, Opa1, Fam73a ve Fam73b) genlerinin yanı sıra Sirt1 geninin ekspresyon seviyeleri RT-PCR ile analiz edildi. Fisyon proteinlerinin ve SIRT1' in ekspresyon seviyeleri ayrıca Western Blot ile analiz edildi.

Bulgular: Kontrole oranla, NMN ve NR grupları için daha yüksek ovaryum indeksi, daha fazla korpus luteum ve antral folikül sayısı tespit edildi. NMN veya NR uygulamasının LH/FSH oranındaki dengesizliği düzelttiği belirlendi. RT-PCR ve Western Blot analizlerine göre, genç gruba oranla kontrol grubunun ovaryumlarında mitokondriyal füzyonda azalma fakat mitokondriyal fisyonda artış olduğu tespit edildi. Tam tersine, kontrol grubuna oranla NMN ve NR gruplarında mitokondriyal füzyonda artış fakat mitokondriyal fisyonda azalma belirlendi. Kontrole oranla NMN ve NR gruplarında Sirt1 için daha yüksek gen ve protein ekspresyon seviyeleri ölçüldü.

Sonuç: Hem NMN hemde NR' nin orta-yaşlı sıçan ovaryumlarında mitokondriyal dinamiği yeniden dengeye getirebileceği ve bu şekilde yaşlanma kaynaklı ovaryum defektlerini ve ovulasyon anormalliklerini düzeltebileceği belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: mitokondriyal dinamik, NMN, NR, ovaryum yaşlanması

ABSTRACT

Investigation of Effects of Mitochondrial Stress Inhibition by Nicotinamide Mononucleotide (NMN) and Nicotinamide Riboside (NR) on Anovulation in Middle-Aged Rats

Aim: In this study, the potentials of Nicotinamide Mononucleotide (NMN) and Nicotinamide Riboside (NR) to reduce ovulation problems and ameliorate the disruptions in mitochondrial dynamics (fission and fusion mechanisms) in middle-aged rats were investigated.

Material and method: Four different groups of Wistar albino female rats were formed: young (normal), middle-aged (control), middle-aged+NMN and middle-aged+NR. There were 6 rats in each group. NMN was administered at a concentration of 500 mg/kg intraperitoneally, but NR at a concentration of 200 mg/kg by gavage (a total of 17 doses for 17 days). Follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH) and anti-mullerian hormone (AMH) levels in serum samples were analyzed using ELISA. Hematoxylin-Eosin staining sections were used for histopathological examination and follicles-counting. Expression levels of mitochondrial fission (Drp1, Mff and Fis1) and fusion (Mfn1, Mfn2, Opa1, Fam73a and Fam73b) genes as well as Sirt1 gene were analyzed by RT-PCR. Expression levels of fission proteins and SIRT1 were also analyzed by Western Blot.

Results: Compared to the control, higher ovarian index, more corpus luteum and antral follicles were detected in NMN and NR groups. NMN or NR application was found to correct the imbalance in LH/FSH ratio. RT-PCR and Western Blot analyzes showed that there was a decrease in mitochondrial fusion but an increase in mitochondrial fission in the ovaries of the control group compared to the young group. On the contrary, there was an increase in mitochondrial fusion but a decrease in mitochondrial fission in NMN and NR groups compared to the control. Higher gene and protein expression levels for Sirt1 were measured in the NMN and NR groups compared to the control.

Conclusion: It was determined that both NMN and NR could rebalance mitochondrial dynamics in middle-aged rat ovaries, thus correcting aging-induced ovarian defects and ovulation abnormalities.

Key Words: mitochondrial dynamics, NMN, NR, ovarian aging

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	:	Adenozin trifosfat
AMH	:	Anti Mullerian Hormon
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
E2	:	Östradiol
Drp1	:	Dynamine ilişkili protein 1
Fis1	:	Mitokondriyal fisyon protein 1
FSH	:	Folikül uyarıcı hormon
GnRH	:	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GTP	:	Guanozin tri fosfat
GTPaz	:	Guanozin tri fosfataz
IGFBP-1	:	IGF-1 inhibe edici insülin benzeri bağlacı protein 1
LH	:	Lüteinleştirici hormon
Mff	:	Mitokondriyal fisyon faktörü
Mfn1	:	Mitofusin 1
Mfn2	:	Mitofusin 2
mtDNA	:	Mitokondriyal DNA
NAD⁺	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit
NADH	:	Nikotinamid Adenin Dinükleotit Hidrit
NAMPT	:	Nikotinamid fosforibosiltransferaz
NMN	:	Nikotinamid Mononükleotit
NO	:	Nitrik oksit
NR	:	Nikotinamid Ribozid
OPA1	:	Optik Atrofi 1
SIRT1	:	Sirtuin 1, Silent Information Regulator 1

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No

Sayfa No

Şekil 2.1. Yaşlanmaya bağlı olarak ovaryumlardaki folikül sayısı ve fertilizasyondaki değişim.	11
Şekil 2.2. Mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmaları	15
Şekil 4.1. Gruplarda vücut ve ovaryum ağırlıklarının değişimi	31
Şekil 4.2. Genç grubuna ait Hematoksilen-Eozin Boyama kesitleri	32
Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait Hematoksilen-Eozin Boyama kesitleri	33
Şekil 4.4. NMN grubuna ait Hematoksilen-Eozin Boyama kesitleri	33
Şekil 4.5. NR grubuna ait Hematoksilen-Eozin Boyama kesitleri	34
Şekil 4.6. Gruplarda folikül ve korpus luteum sayılarının değişimi.....	35
Şekil 4.7. Deney gruplarında FSH, LH ve LH/FSH oranlarının değişimi.....	36
Şekil 4.8. Deney gruplarında AMH değişimi	37
Şekil 4.9. β -aktin kontrol genine göre Mfn1 (A) ve Mfn2 (B) genlerinde ekspresyon değişimlerini	38
Şekil 4.10. β -aktin kontrol genine göre Fam73a (A) ve Fam73b (B) genlerinde ekspresyon değişimlerini.	38
Şekil 4.11. β -aktin kontrol genine göre opa geninin ekspresyon değişimi.....	39
Şekil 4.12. β -aktin kontrol genine göre Mff (A) ve Fis1 (B) genlerinde ekspresyon değişimleri.....	40
Şekil 4.13. β -aktin kontrol genine göre Drp1 (A) ve Sirt1 (B) genlerinde ekspresyon değişimleri.....	41
Şekil 4.14. Gruplarda fisyon ile ilişkili proteinlerin Western Blot analizleri. Gruplara Unpaired t test uygulandı	42

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No

Sayfa No

Tablo 3.1. Over foliküllerinin sınıflandırılması 25

Tablo 3.2. Genlerin ileri ve geri primer sekansları 27



1. GİRİŞ

Hücrede üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) yaşlanma sürecinin en önemli etkeni olarak kabul edilmektedir. Yaşlanma süreci boyunca ROS seviyesi sürekli artmakta ve aşırı ROS birikimi de hücrede mutasyonlara ve mitokondriyal oksidatif strese neden olmaktadır. Ortaya çıkan mitokondriyal stres ise mitokondriyal yapının ve fonksiyonlarının bozulmasına ve ATP üretiminin azalmasına sebebiyet vermektedir.

ROS kaynaklı fizyolojik yaşlanma tüm vücut organlarını etkilese de pankreas ve uterus gibi diğer organlara oranla ovaryumlar daha hızlı yaşlanmaktadır. Yaşlanmaya bağlı mitokondriyal stres ovaryumlarda oosit kalitesini ve sayısını azaltmakta, granüloza hücre apoptozunu indüklemekte, korpus luteumun dejenerasyonunu hızlandırmakta ve fertilizasyon başarısını düşürmektedir. Bu yüzden, ovaryum yaşlanması dişi infertilitesinin en önemli sebeplerinden birisi olarak kabul edilmektedir.

Mitokondriyal dinamikler olarakta bilinen mitokondriyal fisyon (mitokondrilerin bölünmesi, fragmentasyon) ve füzyon (iki mitokondrinin birleşmesi) mekanizmaları hücrelerde mitokondriyal morfolojiyi ve aktiviteyi etkilemektedir. Hücrede ortaya çıkan ROS kaynaklı oksidatif stres ise füzyon ve fisyon mekanizmalarını bozarak ovaryumlar dahil çeşitli organlarda mitokondriyal fonksiyonları azaltmaktadır. Yaşlı ovaryumlarda ise mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmalarındaki dengenin bozulduğu bilinmektedir.

Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+); organik moleküllerden ATP üretimi sırasında koenzimler olarak görev yapmaktadır. NAD^+ hücrede düşük seviyede bulunduğunda hücrede enerji üretimi azalmaktadır. Hücrede artan NAD^+ seviyesinin memeli hücrelerinde mitokondriyal fonksiyonu iyileştirdiği, mitokondriyal stresi azalttığı ve yaşlanma karşıtı özellik taşıdığı gösterilmiştir.

Hücrelerde NAD^{+} 'nın sentezinde öncü (precursor) olarak kullanılan önemli moleküller Nikotinamid mononükleotit (NMN) ve Nicotinamide riboside (NR) dir. Yapılan çalışmalarda, NAD^{+} öncüsü olan bu moleküllerin tıpkı NAD^{+} gibi mitokondriyal fonksiyonları düzenleyerek mitokondriyal stresi azalttığı ve bu sayede de yaşlanma karşıtı özellik taşıdığı gösterilmiştir. Bu molekülün mitokondriyal fonksiyonları düzeltmesi sayesinde yaşlanmayla ortaya çıkan birçok hastalığa karşı koruyucu etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir. Hatta, eksojen olarak verilen NMN' nin NAD^{+} seviyesini artırarak ileri yaşlı farelerde oosit kalitesini ve ovulasyon oranını artırdığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte, NMN' nin ovaryumlardaki mitokondriyal fisyon ve füzyon mekanizmaları ilişkisi henüz literatürde test edilmemiştir. NR' nin ise sadece mitokondriyal dinamikler değil aynı zamanda oosit kalitesi ve ovulasyon parametreleri üzerindeki etkisi de henüz bir çalışmada test edilmemiştir.

Bu tez çalışmasında, orta-yaşlı sıçanlarda NR ve NMN uygulaması ile ovaryum fonksiyonlarının düzeltilmesi ve ovulasyon veriminin artırılması ve bu moleküllerin mitokondriyal dinamikleri (füzyon ve fisyon mekanizmaları) etkileyip etkilemediğinin ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryumların Embriyolojisi, Anatomisi ve Histolojisi

2.1.1. Ovaryumların Embriyolojisi

Embriyonun genetik ve kromozal cinsiyet tayini fertilizasyon sırasında belirlenmektedir. Gonadlar yedinci hafta tamamlanana kadar erkek ya da dişi morfolojik özelliğe sahip olmazlar. Y kromozomu üzerinde bulunan SRY geni (Y kromozomu üzerinde cinsiyet belirleyen bölge) canlıda gelişecek olan gonad türünün belirlenmesinde genetik kontrolü sağlamaktadır. SRY geni varsa Gonad, erkek, yoksa dişi olarak belirlenir. Y kromozomu olmayan XX cinsiyet kromozomlarına sahip dişi embriyolarda primitif cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılır.¹⁻³ Primitif cinsiyet kordonları belli bir hücre kümelerine ayrılarak yerini stromaya ve medulla içeren ovaryuma bırakır. Primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaştıktan sonra farklılaşarak oogonyumları oluştururlar.⁴

Primordiyal germ hücreleri ilk olarak intrauterin 3. haftanın sonunda yolk kesesi duvarının Allantoise yakın olan kısmında görülür. 3. haftanın sonu, 4. haftanın başında primordiyal germ hücreleri ameboid hareketlerle gelişmekte olan barsak dorsal mezenterinden geçerek gelişmekte olan ilkel gonadlara göç eder. Primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaşamaz ise dejenere olarak yok olurlar. Aynı şekilde gonadların da ileri gelişimi için primordiyal germ hücrelerinin gonadlara ulaşmış olması gerekmektedir. Primordiyal germ hücreleri gelişmekte olan gonadlara ulaşır ulaşmaz oogoniumlara farklılanır. Bu arada mitoz ile hızla çoğalarak oogoniumların sayıları artar.⁵ Yirminci haftanın sonunda oogonyumların sayısı yedi milyon kadardır. Doğumdan sonra, oogonyum oluşmaz. Mayoz bölünme geçiren oogonyumlar primer oositleri oluşturur. Oositlerin etrafını tek katlı yassı şeklinde hücreler çevreler ve primordiyal folliküllerin sayısı artar. Gestasyonun yirminci haftasında gonadlar en yüksek kapasitesine ulaşır.⁶⁻⁸

2.1.2. Ovaryumların Anatomisi

Ovaryumlar eliptik şekilli 3 x1,5 x1 cm boyutlarında pembemsi renkli yapılardır. Ovaryumlar uterusun her iki yanında, pelvis boşlukta intraabdominal olarak yerleşmiş, rektumun önünde, fossa ovarica içerisinde sağlı sollu bulunan bir çift organdır. Ovaryumlar mezovaryum ile peritoneal katlantı tarafından broad ligamentin posterioruna bağlıdır. Tubal taraftaki kutbu ise suspensor ligament tarafından pelvis duvarına bağlanır.^{9,10}

Over iki adet arter dalı tarafından beslenir. Bunlardan biri ovaryan arter overe lateralinden yapışıp, peritondan geçip, suspensör ligament içerisinde geçer. Diğer arter ise kardinal ligament içerisindeki uterusun ovaryan dalıdır. Uterusun lateral kenarlarında bu iki arter anastomoz yapar.¹¹ Arterlere intraovaryan venler drene olur. Overin içindeki venler hilustaki ağa eşlik eder ve infundibulopelvik ligament boyunca yol alır. Overin venleri, uterin venlerin kolları ile ağ yapar. Sağ ovaryan ven ise vena kava inferiora, sol ovaryan ven sol renal vene drene olur.¹²

Ovaryumların, ekstremitas uterina ovarii ve ekstremitas tubaria ovarii isimli iki ucu, facies lateralis ve facies medialis isimli iki yüzü, margo mesovaricus ovarii ve margo liber isimli iki kenarı bulunmaktadır.¹³

2.1.3. Ovaryumların Histolojisi

Over; dışta korteks ve içte medulla olmak üzere iki histolojik kısımdan oluşmaktadır. Ayrıca overin mezoovaryuma tutunma yeri olan hilus bulunur (Liu 2016). Memelilerde ovaryumların yüzeyi tek katlı kübik veya tek katlı yassı epitelden oluşan germinal epitel adı verilen hücre tabakasıyla örtülüdür. Over yüzey epitelinin hemen altında tüm overi bir kapsül gibi saran tunika albuginea denilen bağ dokusu ile çevrilmiştir.^{14,15}

Ovaryumun merkezinde bulunan medulla gevşek bağ dokusu, kan damarları, lenfatikler ve poligonal interstisyel hücre grupları ve sinir içermektedir. Medulla, peritonun mezoteli ve ovaryumun germinal epiteli ile kaplanmış mezovaryumla devam eder.¹⁶ Kortekste zengin, selüler bağ dokusu içerisinde gelişen foliküller, korpus luteum, destekleyici stroma ve kan damarları bulunur.¹⁷

2.2. Foliküler Gelişim

Gebeliğin beşinci haftasında, dişi bir fetüsün ovaryumu yaklaşık 500 ila 1300 ilkel germ hücresi içerir. Primordiyal germ hücreleri mitoz geçirir ve gebeliğin yirminci haftasında dişi fetüs yaklaşık 6 ila 7 milyon germ hücresine sahiptir. Mitoz tamamlandığında, germ hücreleri mayoz bölünmeye girer ve mayoz profaz I'de durur ve germ hücre kistlerini oluşturur. Her bir germ hücre kisti bir oosit ve tek bir besleyici granüloza hücresi tabakası içeren ilkel bir primordial folikül oluşturmak üzere geriler. Bu süreç sırasında birçok germ hücresi kaybolur ve dişi 1-2 milyon primordial folikül ile doğar. Ergenliğe ulaştığında ise, yaklaşık 400.000-500.000 primordial folikül kalır.¹⁸

Fetal gelişimin üçüncü ayında, ilk kez ovaryumlarda primordial foliküller ortaya çıkar. Primordiyal foliküller, olgun ovaryumda tunika albuginea'nın hemen altında korteksin stromasında bulunur. Oosit, tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrilidir. Bir bazal lamina, folikül hücrelerinin dış yüzeyini çevreler. Oosit ve çevresindeki folikül hücreleri bu noktada birbirine yakın halde bulunur. Foliküldeki oosit, büyük ve eksantrik bir nükleusa sahiptir ve çapı yaklaşık 30 µm'dir. Ayrıca primordiyal foliküllerin merkezinde bulunan primer oosit sitoplazmasında endoplazmik retikulum, lizozomlar, golgi aygıtı ve de çok sayıda mitokondriyonlar bulundurmaktadır.^{10,19}

Ovaryumların iki temel işlevi vardır. Bunlardan ilki, dişi üreme sistemini harekete geçiren hormonları üretmek, ikincisi ise folikülogenez olarak bilinen süreç ile oosit gelişimini, seçimini ve salınımını kontrol etmektir.²⁰

Folikülogenez, doğum öncesi dönemde gelişen ve ergenliğe kadar pasif durumda kalan primordial foliküllerin primer ve antral fazları geçerek sekonder oositleri içeren olgunlaşmış graaf folikülü haline dönüştüğü ve olgunlaşmış oositin döngünün ortasında döllenmek veya atrezi ile ortadan kalkmak üzere ovidukta atıldığı süreçtir. Sürecin kontrol edilmesinde FSH ve LH görev almaktadır.¹⁸ Gelişim aşamalarına göre primordiyal folikül, gelişmekte olan folikül, olgun (Matür) foliküller (Graaf folikül) olmak üzere üç tip folikül bulunur. Gelişmekte olan foliküller primer (birincil) ve sekonder (ikincil veya antral) foliküller olarak ikiye ayrılır. Ayrıca primer foliküller unilaminar (tek tabakalı) ve multilaminar (çok tabakalı) primer foliküller olarak ikiye ayrılır.^{21,22}

Primer folikül gelişirken primer oositin çevresindeki yassı folikül hücreleri kübik bir şekil alır. Primer foliküller, folikül hücrelerinin oosit çevresinde oluşturduğu katman sayısına göre unilaminar primer folikül ve multilaminar primer folikül olmak üzere iki kısımda incelenmektedir.¹⁹ Multilaminar (çok tabakalı) primer folikülde, folikül hücreleri oosit çevresinde çok sayıda sıra oluştururken, unilaminar (tek tabakalı) primer folikülde ise oosit çevresinde tek sıralı foliküler hücreler yer almaktadır.²³ Çoğalan folikül epitel hücreleri de granüloza hücreleri adını alır. Çoğalan granüloza hücreleri, aralarındaki oluklu bağlantılar (gap junctionlar) aracılığıyla birbirleriyle temas kurarlar. Primer oositin çekirdeği bu evrede yaklaşık 100-150 µm çapındadır.²⁴ Granüloza hücreleri büyüdükçe, folikülü doğrudan çevreleyen stromal hücreler, bağ dokusu hücrelerinin bir kılıfı olan teka follikülünü üretir. Teka folikülleri teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki katmana ayrılır: Teka interna, yüksek oranda vaskülarize tabakasıdır ve kollajen demetleri ve fibroblastlar içerir. Teka interna hücrelerinde önemli sayıda lüteinize edici hormon (LH) reseptörü bulunur.²⁵ Teka eksternada ise kollajen liflerin yanı sıra düz kas

hücreleri yer almaktadır. Teka interna tabakasındaki teka hücrelerinde LH'nın indüktif etkisi ile östrojen öncülü olan androjenler (androstenedion) sentezlenir.⁴

Sekonder folikül evresi, primer oositin yaklaşık 200-250 µm çapta olduğu, stratum granulozumun 6-12 katmanlı hal aldığı foliküler gelişim evresidir.²⁶ Granüloza hücreleri arasında sıvı dolu boşluklar oluşur. Likör folikülleri adı verilen hyaluronan açısından zengin sıvı granüloza hücreleri içinde biriktiğinde boşluklar birleşmeye başlar ve sonunda antrum adı verilen hilal şeklinde tek bir boşluk oluşturmaktadır ve antral folikül olarak da bilinen sekonder bir folikül artık tamamlanmıştır.²⁵

2.3. Kadınlarda İnfertilite

Çiftler arasında korunma yöntemi olmamasına ve düzenli bir cinsel yaşamın sürdürülmesine rağmen 12 ay ve üzerindeki sürelerde gebelik oluşmaması durumu insan infertilitesi olarak tanımlanmaktadır. İnfertilitenin %37' sinde tek başına kadın, %35' inde hem erkek hem de kadın, %8' inde ise tek başına erkek faktörleri etkilidir.²⁷⁻²⁹

Doğuştan gelen bozukluklar, hormonal anormallikler, yaşam tarzı, polikistik over sendromu, çevresel faktörler, psikolojik faktörlerin yanı sıra enfeksiyonlar da önemli infertilite sebeplerindendir. Bu faktörler genital organların işlevlerinde bozulmalara, sperm ve oosit kalitesinde düşüşe, spermilerin oosite taşınması ve implantasyon aşamalarında sorunlar oluşturmaktadır.²⁸

Kadınlarda yaşın ilerlemesi, kilo, hormonal dengesizlik, polikistik over sendromu, tiroid hastalığı, hyperprolactinemia, enfeksiyonlar, kemoterapik ajanlar ve kimyasal maddeler, ovulasyon bozuklukları, endometriozis, pelvik yapışıklıklar, tüp tıkanıklığı, diğer tubal/uterin anormallikler ve hiperprolaktinemi gibi istenmeyen durumlara sebebiyet vererek kadınlarda infertilitenin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.²⁹⁻³¹ Örneğin, toksik kimyasal madde özelliğindeki uçucu organik çözücüler, klorlu hidrokarbonlar, pestisitler ve ağır metallerin yanı sıra sigara ve alkol tüketimi kadın

infertilisinde etkili olmaktadır.^{30,32,33} Sigara içmek östrojen sentezini, embriyo naklini, endometriyal alımı, endometriyal anjiyogenezi, uterus kan akışını ve uterus miyometriyumunu olumsuz etkilemektedir. Sigara içmeyenlere oranla sigara içenlerde infertilite %60 daha yüksektir. Alkol alımı ise östrojen seviyesini artırarak FSH sekresyonunu azaltmaktadır. Azalan FSH ise kadınlarda folikülogenezi baskılamakta ve anovülasyona neden olmaktadır.³⁰

Dünya Sağlık Örgütü'ne (WHO) göre vücut kitle indeksinin 25 kg/m^2 'ye eşit veya daha büyük olması aşırı kiloyu, 30 kg/m^2 'ye eşit veya daha yüksek olması ise obezite olarak kabul edilmektedir.³⁴ Aşırı kilo kaybı, obesite veya fazla kilolu olma ise hormonal dengeyi ve menstrual döngüyü bozarak infertiliteye neden olmaktadır.³⁵ İnfertilite nedeni olan enfeksiyonlar bakteri, mantar, protozoon veya virüs kaynaklı olup, bu enfeksiyonlar tek bir mikroorganizma veya farklı mikroorganizma türlerinin karışık kültürü ile oluşturulmaktadır. Enfeksiyonlar, kadınlarda serviks ve endometriumun kronik inflamasyonuna, üreme sistemi salgılarındaki değişikliklere, gamet veya embriyo yapısında değişikliklere ve intrauterin yapışması gibi yapısal bozukluklara sebebiyet vererek infertilite oluşturmaktadır.^{31,36,37}

Prolaktin ön hipofiz bezi tarafından üretilen ve esas olarak hamilelik sırasında meme gelişimi ve doğum sonrasında ise süt üretiminden sorumlu olan bir hormondur. Hiperprolaktinemi ise kanda normalin üzerinde prolaktin bulunmasıdır. Hiperprolaktinemi esas olarak hamilelik, emzirme, zihinsel stres, hipotiroidizm veya uyku sırasındaki normal fizyolojik değişikliklerin bir sonucu olarak ortaya çıkabilir. Hipotalamus ve hipofiz bezini etkileyen hastalıkların yanısıra karaciğer, böbrek, ovaryum ve tiroid gibi diğer organlarda ortaya çıkan hastalıklarda hiperprolaktinemiye neden olabilmektedir. Kadınlarda gebelik ve lohusalık dönemindeki prolaktin artışları normal

olarak kabul edilsede bu dönemler dışındaki aşırı prolaktin artışları anovulasyon ve adet düzensizliği problemlerine neden olarak infertiliteye sebebiyet vermektedir.^{38,39}

Kadın infertilitesinin diğer önemli sebeplerinden biriside polikistik over sendromu (PKOS) dur. Polikistik over durumu kadının ultrasonografik ovaryum incelemesinde, 2-8 mm çapında çok sayıda küçük folikül kistinin olmasıdır. Polikistik over sendromu ise androjenlerin seviyelerinde artışa, ovulasyonda bozukluğa ve ovaryumlarda kistik yapıların ortaya çıkmasına sebebiyet vermektedir. PKOS üreme çağındaki kadınların %4-8'ini etkileyen en yaygın endokrin bozuklukdur. PKOS' lu kadınların %40'ı ovulasyon bozukluğuna bağlı olarak infertilidir.^{40,41}

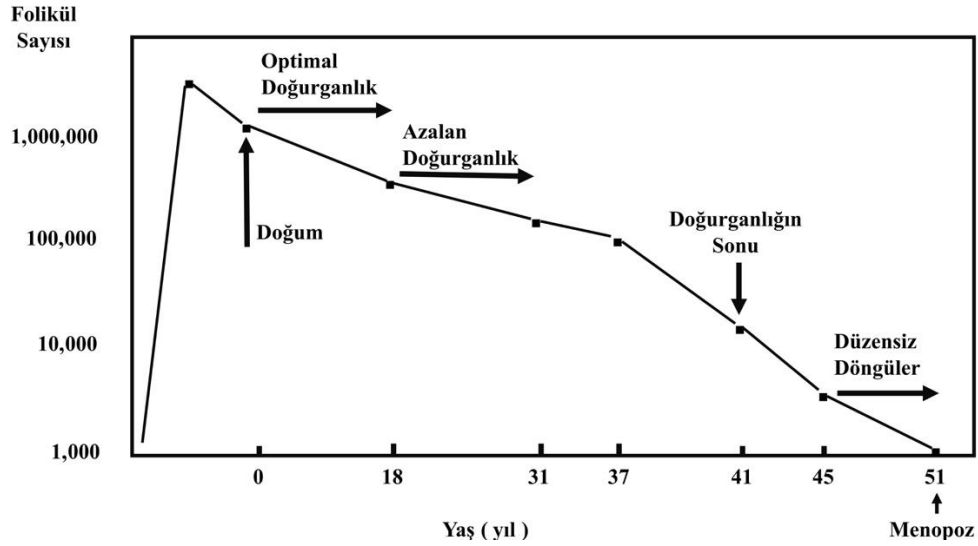
2.4. Ovaryum Yaşlanması ve Kadın İnfertilitesi

Erkeklerde fertilizasyon başarısı 20-30 yaş aralığında en yüksek seviyelerde iken, 40 yaşından sonra azalmaktadır. Kadınlarda fertilizasyon başarısı 20-30 yaşlarında en yüksek iken, 30-40' lı yaşlar arasında düşmekte (özellikle 35 yaşından sonra) ve 40 yaşından sonra ise her üç kadından birinde infertilite durumu gözlenmektedir.²⁵⁻²⁷ Örneğin, 20-24 yaşındaki kadınlara kıyasla, 35-39 yaşındaki kadınlarda doğurganlık %31 oranında azalmaktadır.⁴²

Kadınlarda ovülasyon eksikliği veya ovulasyon olmaması anovülasyon olarak isimlendirilmektedir. Ovulasyon bozuklukları, kısırlık sorunu yaşayan yani infertil kadınların % 40'ında ortaya çıkmaktadır. Yaşlanmaya diğer organlarda olduğu gibi ovaryumları da etkilemektedir. Hatta, ovaryumlar, uterus, hipofiz bezi veya pankreas gibi diğer dokulardan daha hızlı yaşlanmaktadır. Yaşlanma süreci boyunca, ovaryumlardaki oositlerin hem sayısı hem de kalitesi azalır. 50' li yaşlarda ortaya çıkan menopoz ovaryum yaşlanması olarak bilinen sürecin en son adımıdır.⁴³

Kadınlarda bir primordial folikülün büyümesi ve ovulasyon aşamasına gelmesi yaklaşık 1 yıl sürmektedir. Folikülogenez sırasında büyüme, hücre proliferasyonu ve foliküler sıvı oluşumu ile sağlanırken, gelişme foliküldeki tüm hücre ve dokuların sitofarklılaşmasını gerektirir. İnsan ovaryumlarında sadece birkaç folikül, farklılaşma sürecini tamamlamayıp hayatta kalırken ve %99,9'u foliküler atrezi sürecinde apoptoz adı verilen programlanmış bir hücre ölümü mekanizması ile ölmektedir.^{44,45}

Folikülogenezde ovaryal yaşlanmaya bağlı olarak primordial foliküller yani rezerv foliküllerin sayısında sürekli bir düşüş meydana gelmektedir. Örneğin, puberte döneminde sayıları 400.000 civarında olan primordial folikül sayısı ovaryal yaşlanmaya bağlı olarak menopoz döneminde 1000'e kadar düşmektedir (Şekil 2.1)⁴⁶⁻⁴⁸. Rezerv folikül sayısının azalmasına bağlı olarak da, adet düzensizliği başlamakta ve ilerleyen süreçte menopoz durumu gelişmektedir. Adet döngüsünün kısalması, azalmış ovaryum rezervinin ilk işareti olarak kabul edilmektedir. Ovaryal yaşlanmada primordial folikül havuzunda ve oosit sayısında azalmanın yanı sıra oosit kalitesinde de düşüş meydana gelmektedir. Oositlerde görülen dağılmış kromatin yapıları, kromozomların yoğunlaşması ve iç ipliklerindeki anormallikler ise oosit kalitesindeki düşüşü işaret eder.^{49,50} Ayrıca, over yaşlanmasına bağlı olarak oosit kalitesi azaldığı için gelişen embriyo sayısı da düşmektedir.⁵⁰⁻⁵³ Diğer taraftan, yaşla birlikte, overin endokrin fonksiyonu azaldığı için uterin damar sisteminde anormallikler ortaya çıkmakta bu durumda implantasyonunu ve büyümesini de engellemektedir. Diğer bir ifade ile, ovaryum yaşlanması implantasyon başarısını da azaltmaktadır.^{49,54} Ovaryum yaşlanması kaynaklı tüm bu olumsuzluklar ise dişilerde infertiliteye sebebiyet vermektedir.



Sekil 2.1. Yaşlanmaya bağlı olarak ovaryumlardaki folikül sayısı ve fertilizasyondaki değişim.

Folikülogenez, doğum öncesinden menopoza kadar devam eder. Menopoz sözcüğü Yunanca' da mens (ay) ve pause (durmak) sözcüklerinden türetilmiştir. Menopoz; Dünya Sağlık Örgütü tarafından, ovaryumların aktivitelerini kaybetmeleri sonucu adet döngüsünün kalıcı olarak kesilmesi olarak tanımlanmaktadır. Dünya genelinde ortalama menopoz yaşı 51 olarak açıklanmaktadır. Menopoz döneminde ovaryumlardaki folikül miktarı düşmekte ve buna bağlı olarakda östrojen üretimi azalmaktadır. İlerleyen süreçte östrojen üretimi kesilmekte ve ovaryumlar küçülmekte, adet döngüsü durmakta ve üreme yeteneği kaybolmaktadır.^{55,56} Menopoz öncesi süreç ise premenopoz olarak adlandırılmaktadır. Genellikle kadınlarda 40'lı yaşlarda başlamaktadır. Bu dönemde adet görmede düzensizlikler ve folikül gelişim aktivitesinde azalma söz konusudur. Bu dönem birkaç ay ya da yıl sürse de bazı kadınlarda 10 yıl kadar devam etmektedir. Perimenopoz, ardışık 12 ay adet görülmediğinde sona ermekte ve bu durumda menopozun başladığını işaret etmektedir. Postmenopoz dönem ise menopoz sonrası süreyi kapsamaktadır.⁵⁷⁻⁶¹

2.5. Oksidatif Stres ve Ovaryum yaşlanması

Mitokondriler, oksidatif fosforilasyon (ATP üretimi), termojenez, demir-kükürt kümesi biyojenezi, hem biyosentezi, bazı lipidlerin ve amino asitlerin sentezi ve apoptozun düzenlenmesi dahil olmak üzere bir dizi temel hücrel rolü yerine getiren çift zarlı kapalı organellerdir.^{62,63}

Mitokondri, enerji metabolizması sırasında iç zarda bulunan solunum zinciri kompleksindeki redoks reaksiyonunu kullanarak ATP üretir. Aynı zamanda hücrelerde oksidatif hasara neden olan reaktif oksijen türleri (ROS)'ninde en fazla üretildiği organeldir.^{64,65} Süperoksit radikalleri ($O_2^{\bullet-}$), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalleri ($\bullet OH$) ve tekli oksijen (1O_2) ökaryotik hücrelerde ortak metabolik süreçlerde yan ürünler olarak sürekli olarak üretilen en önemli ROS'lardır.⁶⁶ Düşük seviyelerde ROS, hücre sinyal iletimine geniş ölçüde katılır ve hücrenin hayatta kalmasını, çoğalmasını ve farklılaşmasını destekler. ROS ayrıca ovaryumlarda foliküllerin gelişiminde ve canlılıklarını korumada önemli bir rol oynar.⁶⁷⁻⁷³ Bununla birlikte, aşırı yüksek ROS seviyeleri, başta mitokondriler olmak üzere bütün hücrel yapılarda oksidatif hasar oluşturarak mitokondri fonksiyonlarının bozulmasına diğer bir ifadeyle enerji üretiminin sekteye uğramasına (özellikle solunum sistemi enzimlerini inhibe etmektedir), mitokondriyal DNA (mtDNA)'da mutasyonların meydana gelmesine, telomer kısalmasına ve mitokondri dinamiğinin bozulmasına sebebiyet vermektedir.^{74,75} Nihayetinde de, oksidatif stresin neden olduğu ve mitokondrilerde ortaya çıkan bu anormallikler ise Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıkların yanı sıra infertilite, kardiyometabolik bozukluklar, enflamatuar barsak hastalığı, kanser ve diyabet gibi diğer patolojik durumların ortaya çıkmasında etkili olmaktadır.⁷⁶⁻⁸⁰

Yaşlanma, doku ve organ fonksiyonlarında ilerleyici azalma ile karakterize edilen ve hastalık ve ölüm riskinde artışa yol açan doğal bir olgudur. Yaşlanmaya katkı yapan

etkenler içerisinde, ROS kaynaklı oksidatif strese bağlı mitokondriyal fonksiyonun bozulması en önemli etkenlerden birisi olarak kabul edilmektedir.⁶³ İlk olarak Harman⁸¹ tarafından çok uzun yıllar önce ileri sürülen teoride yaşlanmanın serbest radikallerin neden olduğu zararlı etkilerin birikmesinden kaynaklandığını belirtilmektedir. Bu teoriyle uyumlu olarak da, ilerki yıllarda yapılan çalışmalarda da artan ROS üretimi ve ROS kaynaklı mtDNA'da artan 7,8-dihidro-8-okso-deoksiguanozin (8-okso-dG)'in mutasyonunun yaşlı dokularda çok fazla rastlanıldığı rapor edilmiştir. Diğer bir ifadeyle, özellikle mitokondri kaynaklı ROS ve oksidatif hasar birikiminin ve bunlara karşı antioksidan mekanizmanın yeterince çalışmaması sadece patolojik hastalıkların değil aynı zamanda doğal fizyolojik yaşlanmanında ortaya çıkmasına sebebiyet vermektedir.^{66,82}

İlerleyen yaşla birlikte reaktif oksijen türlerinin (ROS) neden olduğu mutasyonların birikmesi ve oksidatif hasar nedeniyle mitokondriyal DNA hacmi, bütünlüğü ve işlevselliği azalır. Yaşlı deneklerde mitokondrilerde, düşük oksidatif kapasite, düşük oksidatif fosforilasyon, azalmış ATP üretimi, ROS üretiminde önemli artış ve azalmış antioksidan savunma ve mitokondri dinamiğinin bozulması gibi işlev bozuklukları görülür.⁸³

Fizyolojik yaşlanma tüm vücut organlarını etkilese de ovaryumlardaki yaşlanma süreci diğer organlara oranla daha hızlı gerçekleşmektedir.^{45,84,85} Hatta, fizyolojik yaşlanmaya bağlı aşırı ROS birikimi ile ortaya çıkan oksidatif stres, ovaryum yaşlanmasının da en önemli etkeni olarak kabul edilmektedir.⁶⁵ Literatürde, ovaryumlarda yaşlanmaya bağlı ROS birikimi ile ortaya çıkan oksidatif stresin oosit kalitesini bozduğunu, granüloza hücre apoptozunu indüklediğini ve korpus luteumun dejenerasyonunu hızlandırdığını, oositler ve granüloza hücreleri arasındaki iletişimi azaltarak ovulasyon öncesi oosit olgunlaşmasını etkilediği rapor edilmektedir.^{65,86,87}

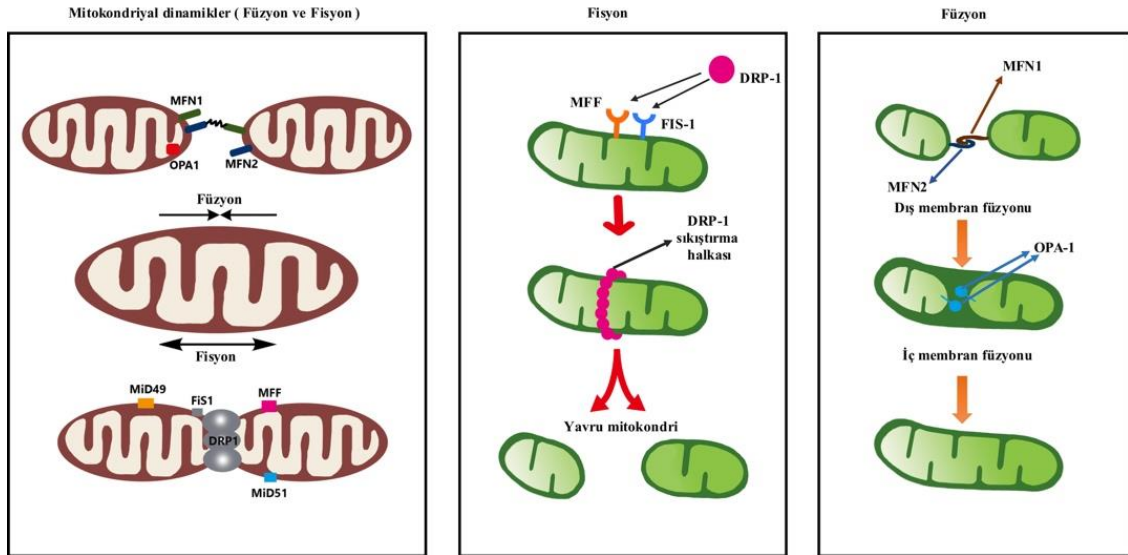
Kısacası, ovaryumlardaki yaşlanma kaynaklı oksidatif hasar folikülojenezi, mayoz bölünme ve ovulasyonu negatif olarak etkilemektedir. Bu durumda, kadın fertilitésinin azalmasına neden olmaktadır.^{45,87}

2.6. Oksidatif Stres ve Mitokondriyal Dinamikler

Hücrelerde mitokondriyal morfoloji (uzunluk, şekil, hacim), mitokondri dağılımı, hareketi, sayısı ve aktivitesi; fisyon (mitokondrilerin bölünmesi, fragmentasyon) ve füzyon (iki mitokondrinin birleşmesi) mekanizmaları ile kontrol edilmektedir. Bu iki olay ise mitokondri dinamikleri olarak ifade edilmektedir.^{88,89}

İnsan hücrelerinde mitokondriyal füzyonda görev alan en önemli proteinler mitofusin-1 ve 2 (MFN1 ve MFN2) ve optik atrofi 1 (OPA1) dir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda *Drosophila*' da mitokondri dış zarında bulunan ve Mitoguardin-1/2 (MİGA1 ve MİGA2) olarak bilinen proteinlerin de mitokondriyal füzyonda görev aldıkları rapor edilmiştir. Bu proteinlerin kodlanmasından sorumlu olan genlerin insanlar dahil omurgalılarda karşılıkları ise sırasıyla Fam73a ve Fam73b dir. MFN 1, MFN2, FAM73A ve FAM 73B dış zar füzyonuna aracılık ederken, OPA1 iç zarın füzyonunda görev almaktadır.⁹⁰⁻⁹³

İnsanlar dahil memelilerde mitokondri fisyonunda görev alan temel proteinlerin dış zarda (MFF, FİS1, MİD49 VE MİD51) ve stoplazmada (Dynamin-ilişkili protein, DRP1) bulunduğu belirtilmiştir. Fisyon sırasında bu reseptörler DRP-1' in mitokondri dış zarına bağlanmasını sağlamaktadır. Özellikle de MFF VE FİS1 mitokondriyal fisyonda Drp1' in aktivitesi için en önemli reseptörler olarak görev yapmaktadır.^{91, 94-98} DRP1, fisyon sırasında reseptöre bağlanarak dış mitokondriyal membrana tutunur. Mitokondriye bağlanan aktif DRP1 oligomerleri, oluşturduğu halka benzeri yapılar sayesinde mitokondri sıkıştırarak mitokondrinin bölünmesini ve yavru mitokondrilerin oluşmasını sağlar (Şekil 2.2).^{99,100}



Şekil 2.2. Mitokondriyal füzyon ve fisyon mekanizmaları

Sirtuinler insanda yaşlanma ve obezite dahil hücre döngüsü, büyüme ve farklılaşma, iltihaplanma, apoptoz ve stres cevabı gibi çok çeşitli hücresel süreçleri etkileyen NAD^+ bağımlı protein deasetilaz ailesine bağlı olan proteinlerdir. Memelilerde sirtuin ailesine bağlı 7 farklı sirtuin grubu (SIRT1-7) protein bulunmaktadır.¹⁰¹ Bu proteinlerin mitokondriyal strese karşı koruyucu olduğu ve yaşam süresinin uzamasında çok önemli rol oynadığı diğer bir ifadeyle yaşlanma karşıtı özellik gösterdiği belirtilmektedir.^{101,102} Yaşlanmaya bağlı olarak hücrelerde NAD^+ sentezi azaldığı için, sirtuinlerin aktivitesinde azalmaktadır. Sirtuinlerin aktivitesinin azalmasına bağlı olarak yaşlanmaya bağlı hastalıklar daha da ilerlemektedir. NAD^+ öncüsü maddelerin takviyesi ise sirtuinlerin tekrar aktive edilmesine ve böylece oksidatif stresin azaltılmasına ve yaşlanmanın geciktirilmesine katkı sağlamaktadır.^{103,104}

Sirtuinler, örneğin Sirt 1 proteininin, dolaylı olarak mitokondri fisyonunda diğer bir ifadeyle mitokondriyal dinamik üzerinde etkili olduğu belirtilmektedir. Sirt1'in etki mekanizmasının ise fisyon proteini olan DRP1'in aşırı aktivitesini (mitokondriyal fisyonu, bölünmeyi) azaltarak mitokondriyal dinamiği korumak ve böylece mitokondriyal stresi azaltmak şeklinde olduğu belirtilmiştir.¹⁰⁵

Mitokondriyal dinamikler mitokondri bölünmesi, morfolojisi ve sayısını kontrol etmek suretiyle hücrede lipid homeostazı, kalsiyum homeostazı ve ATP üretimi gibi mitokondri-bağımlı biyolojik süreçlerde görev almaktadır.¹⁰⁶ Örneğin, mitokondriyal şeklin kontrolünün ötesinde, füzyon, mitokondrinin biyoenerjetik işlevi için de önemlidir. Füzyonu olmayan hücrelerde mitokondriyal fonksiyon büyük ölçüde azalır ve oksijen tüketimi ve ATP üretimi tehlikeye girer. Bu nedenle, mitokondriyal füzyonu olmayan hücreler çok daha yavaş büyür.¹⁰⁷

Füzyona benzer şekilde, mitokondriyal fisyon da hücre yaşamında ve ölümünde önemli bir rol oynar. Mitokondriyal fisyon, hasarlı mitokondrinin mitofaji yoluyla uzaklaştırılmasına yardımcı olur ve hücrel stres koşullarında apoptozu kolaylaştırır.¹⁰⁸ Ayrıca mitokondriyal fisyon, nöronlarda sinaps oluşumu gibi hücrel süreçlerde ve embriyonik gelişimde kritik öneme sahiptir.¹⁰⁹ Kısacası, fisyon ve füzyon mekanizmaları arasındaki hassas denge vasıtasıyla mitokondri ve hücre fonksiyonları doğru bir şekilde yerine getirilmektedir. Bununla birlikte bu dengenin bozulması özellikle füzyondaki aşırı düşüş ve fisyondaki aşırı artışlar mitokondri fonksiyonlarının bozulmasına ve patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.¹¹⁰⁻¹¹² Aşırı fisyon durumunda mitokondri fonksiyonlarının bozulduğu ve buna bağlı olarak mitokondriyal membran potansiyelinin kaybolduğu, solunum ve oksidatif fosforilasyonun azaldığı rapor edilmektedir. Dahası, aşırı fisyona bağlı mitokondriyal parçalanma apoptotik süreçleride tetiklemektedir. Orta dereceli stres durumunda fisyon mekanizması ile parçalanan mitokondriler ortadan kaldırılıp hücrelerin hayatta kalması sağlanırken, aşırı stres durumunda fisyon seviyesi çok fazla artmakta ve bu durumda hücrelerin apoptozuna yani ölümüne neden olmaktadır.¹¹³ Örneğin, mitokondri dinamiğinin korunmasında Drp1' in çok önemli bir rol üstlendiği belirtilse de, bu genin aşırı ekspresyonun sağlıklı hücrelerde mitokondriyal yapıda ve fonksiyonlarda anormallikler oluşturarak ATP üretimini inhibe

ettiği ve pro-apoptotik sinyallerin aktivasyonuna neden olduğu da açıklanmaktadır.¹¹⁴ Başka bir çalışmada, karaciğer hücrelerinde ortaya çıkan toksisitenin Drp1' in ekspresyonunu artırdığı ve mitokondri dinamiğini bozduğu belirtilmiştir.¹¹⁵

Literatürde lazer ışınları, hidrojen peroksit (H_2O_2), 6-hydroxydopamine (6-OHDA), rifamisin, izoniazid, nanopartikül, ksenoöstrojen, bisfenol A (BPA), kemoterapikler ve antibiyotikler gibi kimyasal veya fiziksel ajanların oksidatif strese neden olarak somatik hücrelerde mitokondriyal dinamikleri bozabileceği gösterilmiştir.¹¹⁶⁻¹²¹ Örneğin, Iqbal and Hood ¹¹⁷ yaptıkları çalışmada eksojen olarak uygulanan hidrojen peroksit (H_2O_2)'in iskelet kası miyoblastlarında oksidatif stres oluşturarak mitokondriyal fisyonu ve Drp-1' in ekspresyonunu artırdığı ve mitokondri fragmentasyonunda %41 artışa neden olarak mitokondri dinamiğinin bozduğunu ortaya çıkarmıştır. Başka bir çalışmada, memeli osteosarkom ve kardiyomiyoblast hücre hatları üzerinde H_2O_2 uygulamasının mitokondriyal fisyonla ilişkili DRP-1 proteini üzerinde herhangi bir etki yapmasa da mitokondriyal füzyonla ilgili Opa-1 proteininin ekspresyon seviyesini düşürerek mitokondriyal dinamiği bozduğu gösterilmiştir.¹²² Liu ve ekibi ¹²³ yaptıkları çalışmada 6-OHDA isimli bir kimyasal maddenin parkinson PC12 hücre hatları üzerinde mitokondriyal dinamikler üzerindeki etkisini incelemiş ve çalışmanın sonucunda bu maddenin mitokondriyal fisyonla ilişkili FİS1 VE DRP1 proteinlerinin ekspresyon seviyelerinde artışa fakat füzyonla ilişkili Opa-1 proteinin seviyesinde azalışa sebebiyet verdiğini ve böylece mitokondriyal dinamiği bozarak mitokondriyal fonksiyonları azalttığını ortaya çıkarmıştır. Başka bir çalışmada¹²¹, TiO_2 -nanopartiküllerinin fare testis dokusunda aşırı Drp-1 ve mitokondriyal fisyon artışına neden olarak mitokondri dinamiğini bozduğu ve sperm kalitesinin azalmasına sebebiyet verdiği gösterilmiştir. Agarwal et al.¹¹⁹ yaptıkları çalışmada plastik endüstrisinde kullanılan bisfenol A (BPA) isimli kimyasal'ın hipokampal nöral hücrelerde oksidatif

hasar oluşturduğunu, Drp-1 ekspresyonunu ve mitokondriyal fragmentasyonu artırdığını, mitokondriyal dinamikleri ve fonksiyonları bozduğunu ortaya çıkarmıştır. Kısacası fiziksel veya kimyasal faktörler mitokondrilerde oksidatif hasar oluşturarak mitokondriyal dinamikleri ve dolayısıyla da mitokondriyal fonksiyonları bozmaktadır.

Bu faktörlerin yanısıra, bazı çalışmalarda ROS kaynaklı doğal fizyolojik yaşlanmanın da mitokondriyal dinamiği ve mitokondriyal fonksiyonları olumsuz olarak etkilediği belirtilmiştir.^{98,124} Örneğin, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklarda özellikle Drp1'in ekspresyonunda aşırı artışın gözlemlendiği ve bu artışında mitokondri dinamiğinin bozduğu ve nöral hücre ölümünün sebep olduğu rapor edilmiştir.^{111,125,126}

2.7. Ovaryum Yaşlanması ve Mitokondriyal Dinamikler

Fisyon ve füzyon mekanizmaları sadece somatik hücrelerde değil aynı zamanda üreme hücreleri ve bunlarla ilişkili organlarda da son derece hassas görevler üstlenmişlerdir. Yapılan bazı çalışmalarda, mitokondriyal fisyon ve fisyon proteinlerinin memelilerde oogeneze, embriyogeneze ve implantasyon süreçlerinde de etkili olduğu rapor edilmiştir.^{92,127-130} Örneğin, Udagava et al¹²⁷ folikül oluşumunda ve ovulasyonda mitokondriyal fisyon mekanizmasının özellikle Drp1 proteininin etkisini göstermiştir. Liu et al⁹² mitokondriyal füzyonla ilişkili-mitokondri dış zar proteinlerinden olan MIGA1/2 (FAM73A VE FAM73B)'in ovulasyon ve ovulasyon steroidogenezinde önemli rol oynadığını ortaya çıkarmıştır. Zhang et al¹²⁹ mitofusin 2 (Mfn2)'nin, oosit ve folikül gelişiminde rol oynadığını ve ovaryum foliküler rezervinin korunması için gerekli olduğunu belirtmiştir. Bununla birlikte, literatürde oksidatif strese bağlı ovaryum yaşlanmasında fisyon ve füzyon mekanizmalarında anormallikler ortaya çıktığı ve özellikle mitokondriyal fisyonda artışın meydana geldiği belirtilmektedir.^{54,93} Bununla

birlikte, ovaryum yaşlanmasında mitokondriyal dinamiklerde ortaya çıkan değişimler hakkında literatürde sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır.

Yaşlanma karşıtı özellik gösteren sirtuinler, özellikle Sirt1 ovaryum yaşlanmasına karşı da koruyucu rol üstlenmektedir. Yaşlı ovaryumlarda ise bu proteinlerin seviyelerinde önemli düşüşler gözlenmektedir. Sirtuin seviyesindeki azalmalara paralel olarak primordial folikül sayısı da azalmaktadır. Seviyeleri azaldığı içinde mitokondriyal dinamiği koruyacak şekilde Drp1 seviyelerindeki artışları engelleyememektedir.¹³¹

2.8. Nikotinamid Mononükleotid (NMN) ve Nikotinamid Ribozid (NR)' in Biyolojik Roller

Glikoz ve yağ asitleri gibi organik moleküllerden hücresel enerji üretiminde gerekli olan elektronların ve hidrojen atomlarının taşınmasında Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) bir koenzim olarak görev yapmaktadır. Düşük NAD^+ seviyelerinde ise hücrede daha az enerji üretimi gerçekleşmektedir.^{132,133} Literatürde, strese maruz kalmış olan memeli hücrelerinde, NAD^+ seviyesindeki artışın mitokondriyal fonksiyonu iyileştirdiği ve mitokondriyal stresi azalttığı, nihayetinde de besinsel veya artan yaşa bağlı olarak ortaya çıkan metabolik bozukluklara karşı koruyucu etkisinin olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, NAD^+ ın yaşlanma karşıtı özellik taşıdığı bildirilmektedir.¹³²⁻¹³⁷ Yakın zamanda yapılan bir çalışmada artan NAD^+ seviyesinin mitokondriyal fonksiyonları düzelttiği ve ovaryum yaşlanmasını tersine çevirdiği belirtilmiştir.¹³⁸

Hücrelerde NAD^+ 'ın sentezinde öncü olarak kullanılan önemli moleküller tryptophan (Trp), nikotinik asit (NA), nikotinamid (NAM), nikotinamid mononükleotit (NMN) ve nikotinamid ribozid (NR) dir. Yapılan çalışmalarda bu öncü moleküllerin insanlarda ne gibi değişiklikler yaptığıda test edilmiştir. NAM ve NA' nın birçok hastalığa karşı koruyucu olduğu belirtildi insan hücrelerinde toksisite gösterebileceği

ifade edilmiştir. Bu yüzden, insan kullanımı için NR ve NMN' nin daha güvenli olduğu açıklanmıştır.^{139,140}

Yapılan çalışmalarda, NAD⁺ öncüsü olan NMN' nin tıpkı NAD⁺ gibi mitokondriyal fonksiyonları düzenleyerek mitokondriyal stresi azalttığı ve bu sayede de yaşlanma karşıtı özellik taşıdığı gösterilmiştir. Bu molekülün mitokondriyal fonksiyonları düzeltmesi sayesinde yaşlanmayla ortaya çıkan fizyolojik güçsüzlüğü, tip 2 diyabeti, sinir hücrelerindeki azalmayıda engellediği ve alzheimer ve parkinsona karşı koruyucu özellik gösterdiği rapor edilmiştir.^{136, 141-145}

NMN' nin memeli fertilitesi üzerindeki etkisinde çok yakın zamanda gerçekleştirilen bir çalışmada test edilmiş ve araştırma ekibi eksojen olarak verilen NMN' nin NAD⁺ seviyesini artırarak ileri yaşlı farelerde oosit kalitesini ve ovulasyon oranını artırdığı rapor edilmiştir.¹⁴⁶ Dolayısıyla, araştırma ekibi NMN' nin anovulasyon sıkıntısı yaşayan bireylerde ilaç olarak kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir. Bazı araştırmacılar NMN'nin Sirt1 aktivitesini artırdığını rapor etmişlerdir.^{147,148} Örneğin, kalpte iskemi-reperfüzyon hasarının giderilmesinde NMN uygulamasının sirt1 proteininin aktivitesini artırmak suretiyle oksidatif stresi azalttığı gösterilmiştir.¹⁴⁸ Yine başka bir çalışmada, NMN uygulamasının sirt1 proteininin aktivitesini artırarak yaşlanma karşıtı özellik gösterdiği rapor edilmiştir.¹⁴⁷ Diğer taraftan, yapılan bir çalışmada NMN uygulamasının beyin hücrelerinde sirt1 aktivitesini artırmak suretiyle Drp1 ekspresyonunu azalttığı, mitokondriyal dinamiği koruduğu, mitokondriyal hasarı önlediği ve yaşlanma karşıtı özellik gösterdiğide rapor edilmiştir.¹⁴⁹ Kısacası, yapılan çalışmalarda sirt 1 proteininde mitokondriyal stress ve mitokondriyal dinamikle (fisyon mekanizması) ilişkili olduğu ve NMN uygulaması aracılığıyla Sirt 1 ve Drp1 seviyelerinin kontrol edilebileceği gösterilmiştir. Bununla

birlikte, NMN uygulamasının ovulasyon süreçlerinde Sirt1 üzerinde nasıl bir etki yaptığına yönelik literatürde bir çalışma yer almamaktadır.

NR, son zamanlarda keşfedilen B3 vitamininin alternatif formu olup sütte bulunmaktadır. Tıpkı, NMN' de olduğu gibi NAD^+ öncüsü olarak işlev görmektedir. Bu molekülün, mitokondriyal biyogenezi indüklediği, NAD^+ üretimini artırdığı, mitokondriyal stresi azalttığı ve sirtuinleri aktive ettiği belirtilmektedir. Bu özellikleri sayesinde de birçok hastalığın yanısıra yaşlılıkla veya yağlı beslenme ile indüklenen obeziteye karşı koruyucu özellik gösterdiği belirtilmiştir.^{140,150} Bununla birlikte, NMN' nin aksine NR' nin anovulasyon durumunda kullanılabilirliği henüz bir çalışmada test edilmemiştir. Dahası, anovulasyonun düzeltilmesinde NMN' nin olumlu rolü ortaya çıkartılsa da, NMN ve NR' nin ovaryumlarda mitokondriyal dinamik (füzyon ve fisyon proteinleri) üzerinde nasıl bir etki yaptığı konusunda literatürde herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

Bu yüzden mevcut çalışmada, orta-yaşlı sıçanlarda NR ve NMN uygulaması ile ovulasyon veriminin artırılmasının yanısıra bu moleküllerin olası mitokondriyal stres, mitokondriyal dinamikler (füzyon ve fisyon proteinleri) ve sirtuinler (Sirt1) üzerinde nasıl bir etki yaptığının ortaya çıkartılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Hayvan Etik Kurul Onayı

“Nikotinamid mononükleotid (NMN) ve nikotiamid ribozidin (NR) ile mitokondriyal stres inhibisyonunun orta yaşlı sıçanlarda anovulasyon üzerine etkilerinin araştırılması” adlı bu çalışmanın, etik kurallara uygunluğu, Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu’nun 12.04.2021 tarihli 3. toplantısının 91 nolu kararı ile belirlendi.

3.2. Deney Hayvanlarının Temini ve Bakımı

Çalışmada kullanılan Wistar albino cinsi dişi sıçanlar; Elazığ Veteriner Kontrol Enstitüsü' den (Elazığ) ve Atatürk Üniversitesi Deneysel Araştırma ve Uygulama Merkezinden (Erzurum) temin edildi. Sıçanlar, yiyecek ve suya (musluk suyu) serbest erişimi olan standart kafeslerde 20 -24°C' de 12 saat/12h saat ışık-karanlık periyodunda tutuldu. Yatak malzemesi içeren atık tepsileri (Tip 3/4 tozsuz gömme) kafeslerin altına sabitlendi.¹⁵¹

3.3. Deney Grupları ve İlaç Uygulama Prosedürü

Mevcut çalışmada; genç (Normal), orta-yaşlı (kontrol), orta yaşlı+NMN ve orta yaşlı+NR olmak üzere 4 farklı grup oluşturuldu ve her grupta 6 sıçan yer aldı. Orta yaşlı bireylerin yer aldığı gruplar için 12 aylık (300-350 gr), genç bireylerin (normal) olduğu gruplar içinse 5 aylık (200-220 gr) Wistar albino cinsi dişi sıçanlar seçildi. Madde uygulamasından önce, sıçanların 1 hafta süreyle laboratuvar koşullarına adaptasyonu sağlandı. PBS içerisinde hazırlanan NMN 500 mg/kg konsantrasyonda intraperitoneal, NR ise 200 mg/kg konsantrasyonda gavaj tekniği ile oral olarak 17 gün boyunca (toplam 17 doz) uygulandı.

3.4. Kan Örneklerinin Alınması ve Ovaryumların Çıkarılması

18. günde sıçanlara izofluran anestezisi uygulandı. Anestezi altındaki sıçanlardan 1mL' lik şırınga ile alınan kan örnekleri hemen santrifüj işlemine (13,000 rpm' de 15 dk boyunca) tabi tutuldu ve elde edilen serum kısımları daha sonraki analizler için -80°C' de saklandı. Kan örnekleri alındıktan sonra, anestezi altındaki sıçanların ovaryumları çıkarıldı, ovaryumların fazla yağ ve bursal keseleri uzaklaştırıldı ve ovaryumlar PBS ile yıkandı. Ardından ovaryumların bazıları histopatolojik inceleme için %10'lük formaldehit içerisine alındı. Benzer şekilde, her grup için ovaryumların bazılarında RT-PCR ve Western-Blot analizleri için -80°C' de saklandı.

3.5. Ovaryumlarda Histopatolojik İnceleme ve Folikül Sayımı

Doku takibi ve kesit alma işlemi: Tüm gruptaki sıçanlardan alınan over dokuları fiksasyon işlemi için %10'luk formaldehit içinde 48 saat boyunca bekletildi. Doku takip kasetine alınan over doku örnekleri üç saat boyunca akan su altında yıkandı. Daha sonra doku takip işlemi otomatik Leica TP 1050 cihazında aşağıdaki gibi gerçekleştirildi:

1. Distile suda 2 saat yıkama.
2. Dehidratasyon
 - a) %50 alkolde 2 saat bekletme.
 - b) %70 alkolde 1 saat bekletme.
 - c) % 80 alkolde 1 saat bekletme.
 - d) % 96 alkolde 1 saat bekletme
 - e) İki farklı %100 alkolde 1'er saat bekletme
3. Şeffaflaştırma
 - a) Üç farklı ksilölde 5'er dakika bekletme.
4. İnfiltrasyon işlemi

a) Parafin I (46-48 °C; 1 saat)

b) Parafin II (56- 58 °C; 1 saat) işleminden sonra, doku örnekleri metal bloklama kalıbı içinde uygun olarak sabitlendi. Metal kalıplar eriyik parafin ile doldurularak donduruldu ve bloklama işlemi tamamlandı. LeicaRM 2145 mikrotom cihazı ile her bir bloktan 4 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Lam üzerine alınan over doku örnekleri parafinin uzaklaştırılması ve dokunun lam üzerine sabitlenmesi amacıyla 20 dakika boyunca 60°C'deki etüvde tutuldu.

Hematoksilen-Eozin Boyama İşlemi: Aşağıda belirtilen adımlar sırasıyla uygulanarak gerçekleştirilmiştir.

- 1.Üç farklı ksilende 5 'er dak. bekletme
2. %100'lük Alkolde 5 dak. bekletme
3. %96'lık Alkolde 5 dak. bekletme
4. %80'lik Alkolde 5 dak. bekletme
5. %70'lik Alkolde 5 dak. bekletme
6. Akar suda 1 dak. yıkama
7. Hemotoksilen boyasında 3 dak. bekletme
9. Eozin solüsyonunda 2 dak. bekletme
10. %96'lık Alkolde 5 dak. bekletme
11. İki farklı %100'lük Alkolde 5'er dak. bekletme
12. Üç farklı ksilen serisinde 5'er dak. bekletme

Entellan balzamu ile lam ve lamelle kapatma işlemi gerçekleştirilen kesitler kurumaya bırakıldı. Over kesitleri, Nikon Eclipse i50 (Nikon, Tokyo, Japan) marka ışık mikroskopunda incelendi ve fotoğrafları çekildi.

Folikül sayımı: Her ovaryumun her kesiti folikül sayımı için kullanıldı. Kısmi veya tam bir skuamöz granüloza hücresi tabakası ile çevrili bir oosit folikül olarak

sınıflandırıldı. Foliküller, primordial folikül (bir tabaka yassı granüloza hücreleri ile çevrili bir oosit), primer folikül (bir veya çok tabaka küboidal granüloza hücreleri ile çevrili bir oosit) ve antral folikül (bir veya daha fazla bağımsız antral boşluk içeren dörtten fazla granüloza hücresi katmanı veya bir kümülüs granulosa hücre katmanı) olarak gruplandırıldı.¹⁵² Granüloza hücre tabakasında apoptotik cisimlerin, düzensiz granüloza hücrelerini ve dejenere bir oositi içeren veya oosit çekirdeğinin parçalanmış olan foliküller atretik folikül olarak kabul edildi.^{153,154}

Tablo 3.1. Over foliküllerinin sınıflandırılması

Folikül çeşidi	Oosit tipi	Oositi çevreleyen hücreler
Primordial folikül	Primer oosit	Tek tabaka yassı pregranuloza hücreleri ve en fazla bir tane kübik granuloza hücresi
Primer folikül	Primer oosit	Tek veya daha fazla tabaka küboidal granüloza hücreleri ile çevrili bir oosit
Antral folikül	Primer oosit	Bir veya daha fazla bağımsız antral boşluk içeren dörtten fazla granüloza hücresi katmanı

3.6. Serum Hormon Seviyelerinin Ölçülmesi

Folikül uyarıcı hormon (FSH), luteinleştirici hormon (LH) ve anti-müllerian hormon (AMH) ölçümü sıçanlara özel ELISA kitleri (Elabscience, 96 kuyu, FSH kit Cat. No: E-EL-R0391, LH kit Cat. No: E-EL-R0026 ve E-EL-R3022) protokolüne göre yapıldı. Her bir sıçana ait 100 µL serum örneği ve standart, kitin içerisinde bulunan 96-kuyucuklu hazır plaka içerisinde bulunan bir adet kuyucuğa konuldu ve 37°C'de 90 dakika inkübe edildi. Kuyucuklara konulan serumlar kit protokolüne göre işleme tabi tutuldu. Buna göre her kuyuya 100 µL Biotinylated Detection Ab çalışma solüsyonu eklendi. 37°C'de 60 dakika inkübe edildi. Plaka aspire edildi ve 3 kez yıkandı. 100µL HRP konjugat çalışma solüsyonu eklendi. 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Plaka aspire edilip ve 5 kez yıkandı. 90 µL substrat reaktifi eklendi. 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.

50 µL durdurma solüsyonu eklendi. Sonra her bir kuyucuğun absorbansı 450 nm'de ölçüldü. Kit protokolüne göre standart grafik hazırlanarak her bir serum örneğinde bulunan FSH konsantrasyonu ng/ml olarak hesaplandı ve daha sonrada "uIU/ml FSH=0.167ng/ml FSH" faktörü göz önüne alınarak değerler mIU/ml' ye çevrildi. Yine kit protokolüne göre LH konsantrasyonu mIU/ml, AMH konsantrasyonu ise pg/ml cinsiden hesaplandı.

3.7. Gen Ekspresyon Seviyesinin Real-Time PCR ile Belirlenmesi

3.7.1. RNA İzolasyonu

cDNA kütüphanesi hazırlamak için ilk olarak sıçan ovaryum dokusundan mRNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzolasyonlar firmanın protokolüne göre total RNA İzolasyon Kiti (Roche, Germany) ile yapıldı. Doku örnekleri yeterli miktarda 1.5 ml ependorf tüplere alındıktan sonra her bir tüpe kit içerisinde bulunan parçalama çözeltisi eklendi. Çözelti içerisinde dokular homojenizatör ile buz içerisinde homojenize edildikten sonra kit protokolüne göre total RNA izolasyonu yapıldı. İzolasyon süresi boyunca işlemler buzda yapıldı. RNA'lar cDNA izolasyonuna kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.7.2. Total RNA'nın Spektroskopik Olarak Konsantrasyonunun Ölçülmesi ve Saflığının Kontrolü

RNA'nın miktarı ve saflığını belirlemek amacıyla Thermo Cihazı (Thermo NanoDrop™ 2000/2000c) kullanıldı, cihaz tarafından verilen 260/280 oranları (saflık) ve konsantrasyon değerleri dikkate alınarak cDNA sentezine geçildi.

3.7.3. cDNA Kütüphanesinin Hazırlanması

Komplementer DNA sentezi cDNA Sentez Kiti (Applied Biosystems, USA) protokolüne göre yapıldı. RNA örneklerinden 10'ar µl PCR tüplerine alındı. Kit protokolüne göre her bir RNA örneği için reaksiyon kuruldu. Tüm işlemler buzda yapıldı. Termal döngülü PCR cihazında RNA örnekleri komplementer DNA'ya çevrildi.

3.7.4. Kantitatif Gen Ekspresyonu (qReal-Time PCR)

Genlerin ekspresyon düzeyleri her bir genin Taqman Prob kiti (Applied Biosystem, USA) protokolüne göre ölçüldü. Kit protokolüne göre PCR tüplerinde her bir örneğin dört gen için reaksiyonları üç tekrarlı olarak hazırlandı. Bir tüpe kontaminasyon olup olmadığını anlamak için komplementer DNA haricinde sadece diğer reaksiyon bileşenleri konularak negatif kontrol grubu oluşturuldu. Tüm işlemler buzda yapıldı. RT-QPCR cihazında (Biorad, USA) her bir örnek için belirtilen genlerin komplementer DNA halleri çoğaltıldı. Genlerin ekspresyon düzeyleri literatürde belirtildiği gibi β -aktin ekspresyonu baz alınarak hesaplandı.

Tablo 3.2. Genlerin ileri ve geri primer sekansları

Tablo: Rat Genlerin İleri ve Geri Primer Dizileri		
Drp1	İleri Primer	5'-CGTAGTGGGAACCTCAGAGCA-3'
	Geri Primer	5'-TGGACCAGCTGCAGAATAAG-3'
Mfn1	İleri Primer	5'-CCTTGTACATCGATTCCTGGGTTC-3'
	Geri Primer	5'-CCTGGGCTGCATTATCTGGTG-3'
Mfn2	İleri Primer	5'-GATGTCACCACGGAGCTGGA-3'
	Geri Primer	5'-AGAGACGCTCACTCACTTTG-3'
Fam73a	İleri Primer	5'-ATGTGCATGCCTTGGTCTGTGG-3'
	Geri Primer	5'-AGACCGTTGCCCCAGCTATG-3'
Fam73b	İleri Primer	5'-CACGTTAGCCCTGTCCTAGC-3'
	Geri Primer	5'-TCGAACATGTCGGTCAGGTA-3'
Mff	İleri Primer	5'-AGGTGACTCAATCTGGCACA-3'
	Geri Primer	5'-GCCCCACTCACCAAATGAGA-3'
Opa1	İleri Primer	5'-CAGCTGGCAGAAGATCTCAAG-3'
	Geri Primer	5'-CATGAGCAGGATTTTGACACC-3'
Sirt1	İleri Primer	5'-TGAAGCTGTTTCGTGGAGATATTTT-3'
	Geri Primer	5'-CATGATGGCAAGTGGCTCAT-3'
Fis1	İleri Primer	5'-AAATGATGCTACGCAGGCTT-3'
	Geri Primer	5'-CCTGGACCATGACCAAGTTT-3'
β -aktin	İleri Primer	5'-CCTCTATGCCAACACAGTGC-3'
	Geri Primer	5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3'

3.8. Western-Blot Analizi

Over doku örnekleri, 5 katı hacminde RIPA Lysis tamponu içerisinde homojenize edildi ve homojenatlar daha sonra +4°C’de ve 13,000 g’de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatantlar alındı ve küçük miktarlara bölünerek -20°C’ muhafaza edildi ve örneklerin total protein miktarı Bradford yöntemiyle belirlendi. Bunun içinde, BSA-protein standart eğrisi kullanılarak her bir örneğe ait total protein miktarı hesaplandı. Bu işlemlerden sonra, SDS-PAGE jelleri hazırlandı, yükleme tankındaki cam tabakalar arasına ayırma jeli (%10'luk) ve sonrasında da paketleyici jel (%5 lik) döküldü. Hazırlanan jelin üst yüzeyinin düz olması için izopropil alkol kullanıldı ve izopropil alkolün fazlası bir kurutma kâğıdı aracılığıyla uzaklaştırıldı. Hazırlanan jelin üzerine 10 adet kuyucuk barındıran tarak koyuldu ve polimerleşmenin ardından tarak çıkarılarak kuyucuklar hazırlandı.

Elde edilen jel, elektroforez tankına yerleştirildi ve tankın içerisine 1x yürütme tamponu ilave edildi. Her bir deney grubu için 20 µg protein barındıran 20 µl süpernatant kuyucuklara aktarıldı. Yapılan yükleme işlemi sonrasında, örnekler 30 dakika süre ile 50volt’da, yürütülerek proteinlerin ayırma jeline geçmesi sağlandı. Numune, ayırma jeline geçmeye başladığında voltaj 120 Volta yükseltilerek 90dk daha yürütüldü. Sonraki aşamada ise blotlama kasetleri arasına Wattman kağıtları, bunların üzerine jel ve nitroselüloz membran yerleştirildi ve son olarakda membranın üzerine Wattman kağıtları yerleştirildi. Nitroselüloz membrana proteinleri transfer etmek için kasetler kapatılmış ve blotlama tankına transferi amaçlanmıştır. Transfer işlemi 1 saat süre ile 100 V ve 350 mA akım uygulanarak gerçekleştirildi. 1 saat oda sıcaklığında bloklama çözeltisi (%5 Süt tozu) ile muamele edildi. Bloklama işleminden sonra membran, 5'er dakika süreyle 3 kez %0,1 oranında Tween-20 barındıran TBS solüsyonu ile yıkandı. Membran, %5 oranında süt tozu barındıran TBST solüsyonu içerisinde 1:1500 oranında dilüe edilen primer

antikorlar (anti- sirt1, Fis1, mff, Drp1) içerisinde bir gece boyunca ve bir çalkalayıcı üzerinde +4 °C’de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra membran 5'er dakika 3 kez TBST solüsyonu ile yıkama işlemine tabi tutuldu, yıkama işleminden sonra membran TBST solüsyonu (%5 oranında süt tozu içeren) içerisinde 1:2500 oranında dilüe edilen HRP ile işaretli bir sekonder antikor ile oda sıcaklığında bir saat inkübe edildi.

Sonrasında membran steril bir kaba alınmış, karanlık bir ortamda membranlar, Enhanced Chemiluminescence solüsyonu ile 1-2 dakika muamele edildi. Antikor ile reaksiyon veren bantlar görüntüleme cihazında görüntülendi ve fotoğrafları çekildi. Kantitatif analiz için Gapdh housekeeping proteini 1/1000 oranında kullanıldı.

Elde edilen ve beklenen bandlarda maksimum bant yoğunluğu, analiz programında hem primer antikorlar, hem de endojen kontrol olarak kullanılan GADPH proteinleri için ayrı ayrı hesaplandı. Hesaplanan primer antikorlar için hesaplanan I_{max} değeri, aynı membranda hesaplanan GADPH, I_{max} değerine bölünerek normalizasyon işlemi gerçekleştirildi.

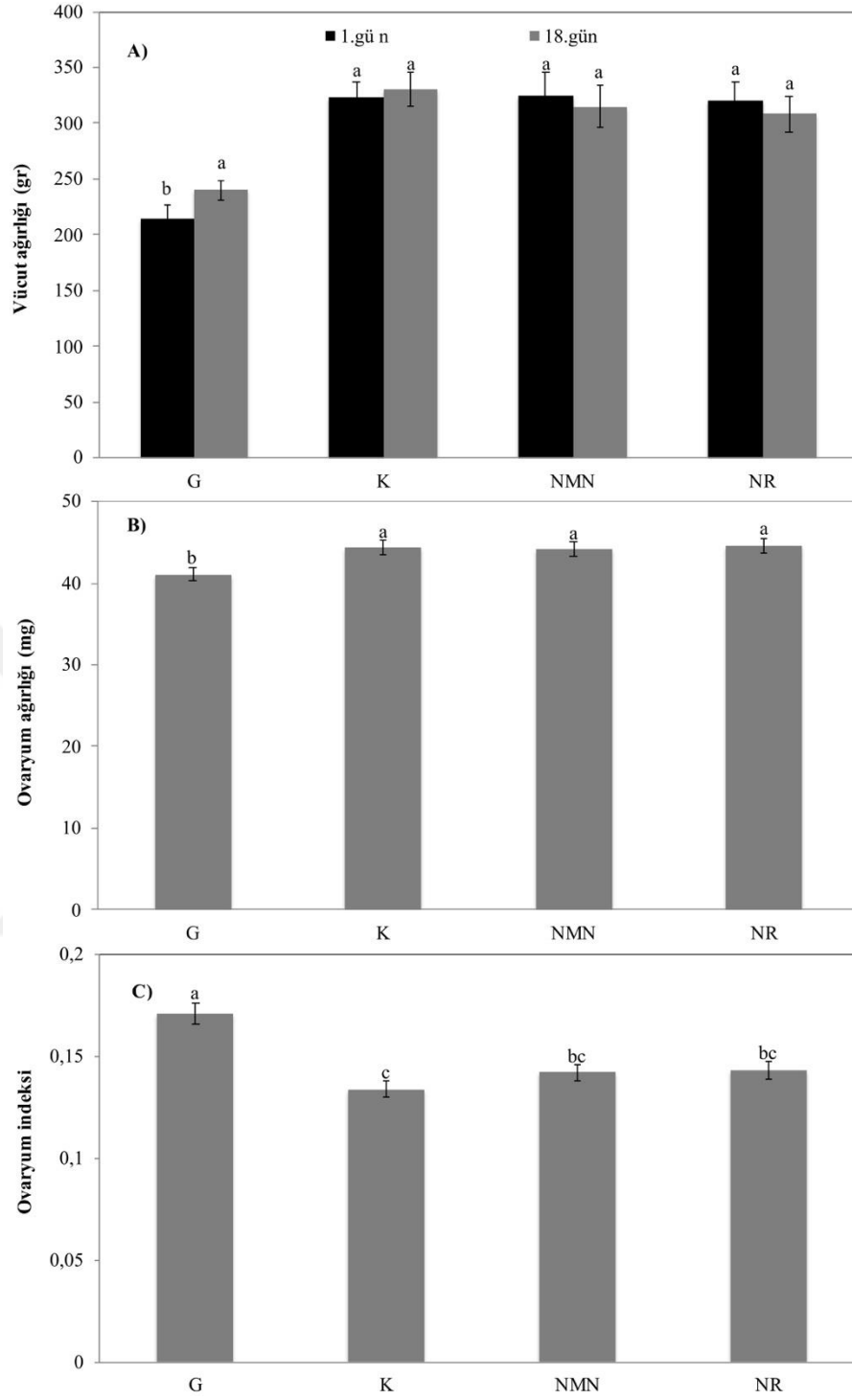
3.9. İstatistiksel Analizler

Deneyler, 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı, veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi ve istatistiksel anlamlılıklar Student's t test kullanılarak değerlendirildi. 0,05' ten küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi. qRT-PCR analizlerinde sonuçlar $2^{-(\Delta\Delta CT)}$ yöntemine göre hesaplandı ve 0,0001' den küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi. Western Blot analizlerinde ise gruplara Unpaired t testi uygulandı, 0,05, 0,01 ve 0,001' den küçük p değerleri anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut ve Ovaryum Ağırlıkları

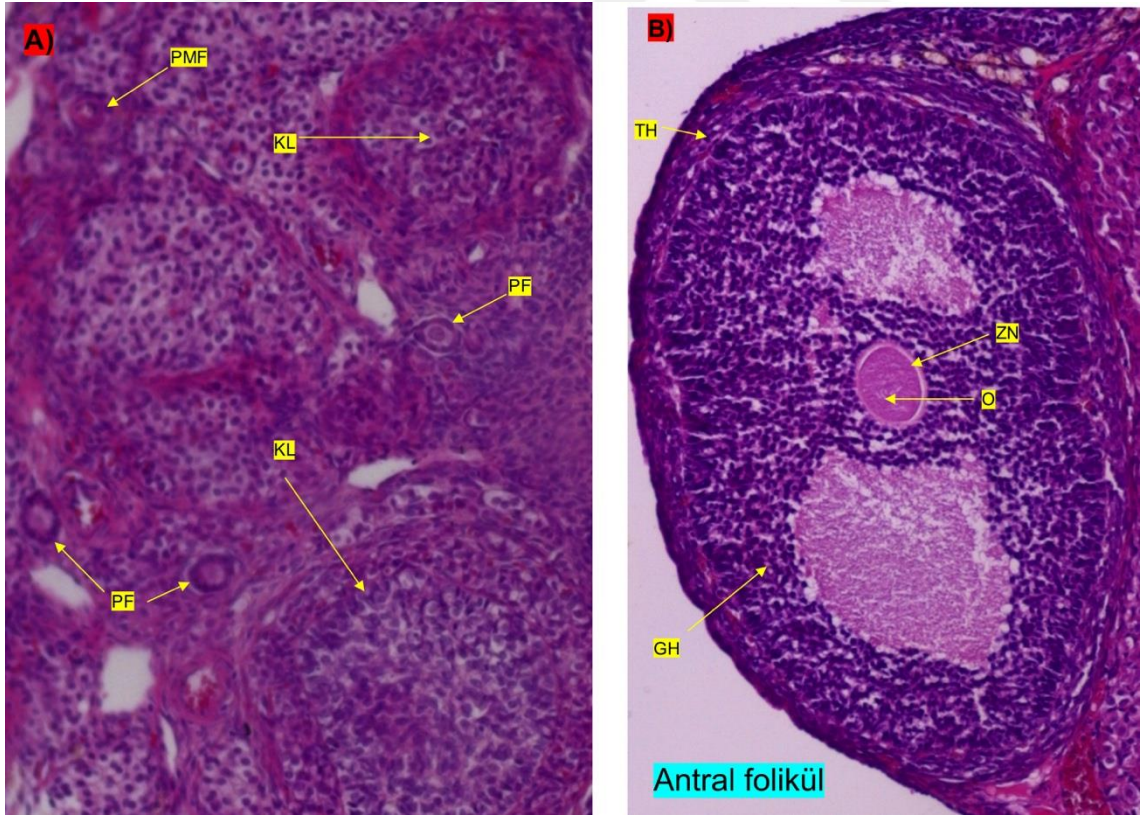
Mevcut çalışmada, orta-yaşlı bireylerin yer aldığı gruplarda 12 aylık (300-350 gr), genç bireylerin (normal) olduğu gruplarda ise 5 aylık (200-220 gr) Wistar albino cinsi dişi sıçanlar kullanıldı. Her grup için 6 adet sıçan seçildi. Deneylerin başlangıcında (madde uygulamasının 1.günü) genç grubun ortalama ağırlığı 215 gr, orta-yaşlı kontrol grubunun 323 gr, NMN grubunun 320 gr ve NR grubunun ise 325 gr olarak belirlendi. Ortalama vücut ağırlığı; 17 günlük deney süresinin sonunda (18.günde ölçümler yapıldı) ise genç bireylerde 240 gr, kontrol grubunda 330 gr, NMN grubunda 308 gr ve NR grubunda 315 gr olarak tespit edildi. Bu sonuçlardan da görülebileceği gibi, 18. günde orta-yaşlı sıçanların bulunduğu kontrol grubunun vücut ağırlığında çok az bir artış, NMN ve NR gruplarının vücut ağırlıklarında ise bir miktar azalma meydana gelmiş ancak bu farklılıklar istatistiki olarak anlamlı bulunmadı ($p \geq 0.05$). Orta-yaşlı NR ve NMN gruplarının aksine, genç gruptaki sıçanların ortalama vücut ağırlığının 215 gr' dan 240 gr' a çıktığı belirlenmiş ve bu değişim istatistiki olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Ortalama ovaryum ağırlığı, 18. günde genç grup için 41.1 mg, orta-yaşlı kontrol grubu için 44.3 mg, orta-yaşlı NMN grubu için 44.1 ve orta-yaşlı NR grubu için 44.6 mg olarak ölçüldü. Ovaryum indeksi (ovaryum ağırlığı/vücut ağırlığı) ise genç, kontrol, NMN ve NR grupları için 0.171, 0.134, 0.143 ve 0.142 olarak hesaplandı.



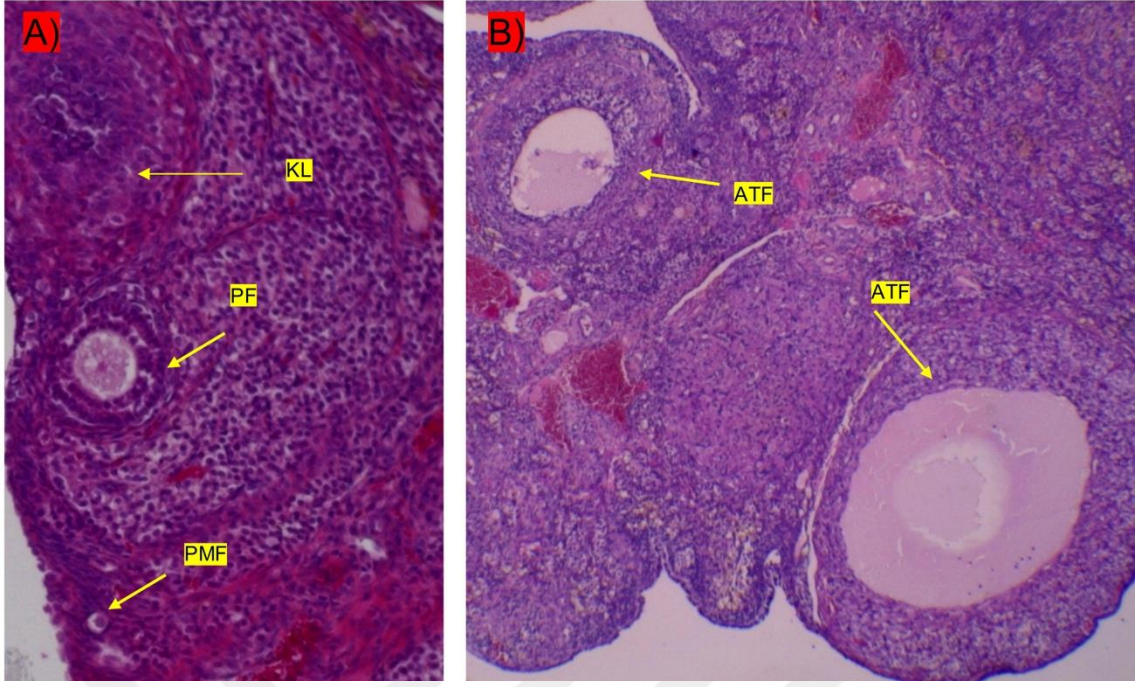
Şekil 4.1. Gruplarda vücut ve ovaryum ağırlıklarının değişimi. *Aynı harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli değildir ($p \leq 0,05$). Şekil A'da 1. ve 18. günler kendi aralarında değerlendirildi. G, genç grubu; K, kontrol grubu; NMN, nikotinamid mononükleotid (NMN) uygulanmış grup; NR, nikotinamid ribozidinin (NR) uygulanmış grup.

4.2. Histopatolojik İnceleme ve Folikül Sayıları

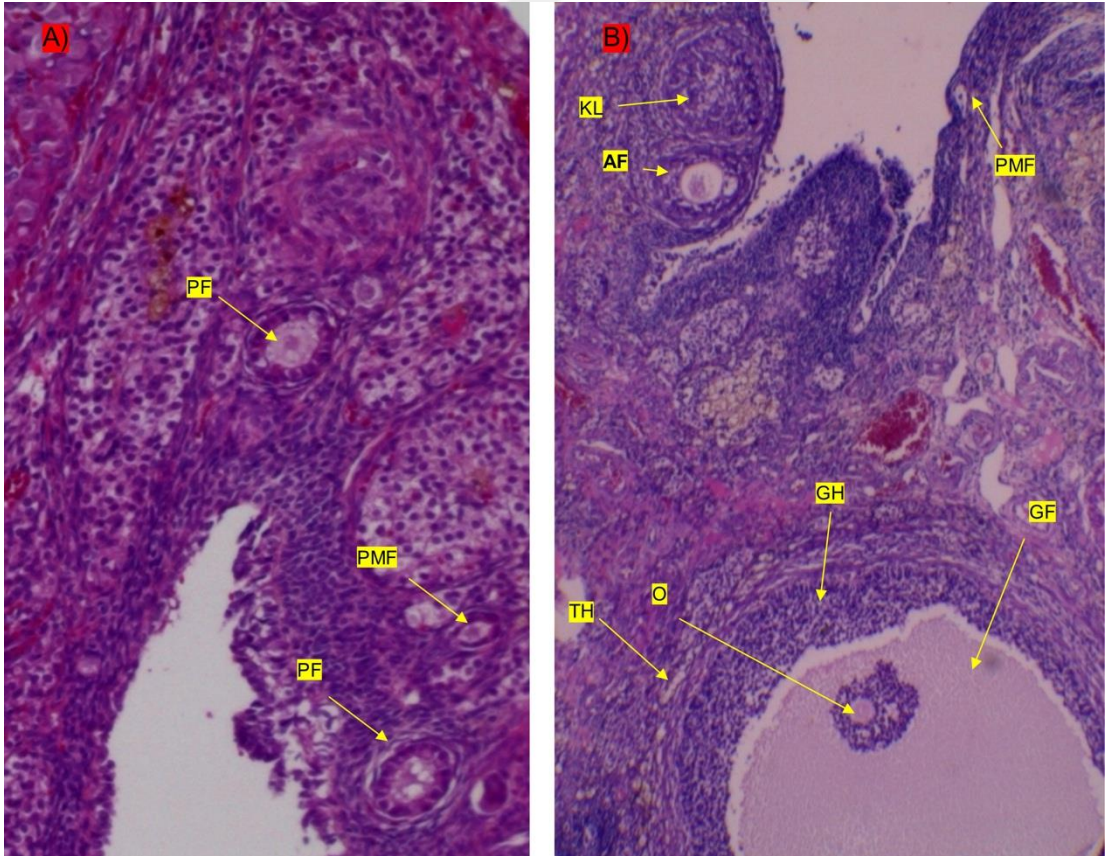
Hematoksilen-Eozin boyama işlemi uygulanmış ovaryum dokuları ışık mikroskopunda incelendiğinde, genel olarak bütün grupların over dokularının normal görünümde olduğu belirlendi. Ovaryumların en dışında bulunan germinal epitel tabakasının bütün gruplarda benzer olduğu ve tespit edilebilen bir farklılık olmadığı görüldü. Germinal epitel' in altında yer alan tunika albuginea tabakasının ise orta-yaşlı kontrol grubunda kalın, NR ve NMN gruplarında ince ve genç grubunda ise en ince olduğu belirlendi. Orta-yaşlı NMN (Şekil 4.4) ve NR (Şekil 4.5) gruplarında, orta-yaşlı kontrol grubuna (Şekil 4.3) oranla korpus luteum sayısının daha fazla, fakat genç gruba (Şekil 4.2) oranla daha az olduğu belirlendi ve farklılıklar istatistiki olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Korpus luteum sayıları genç, kontrol, NMN ve NR grupları için sırasıyla 14, 5, 9 ve 7 olarak belirlendi (Şekil 4.6).



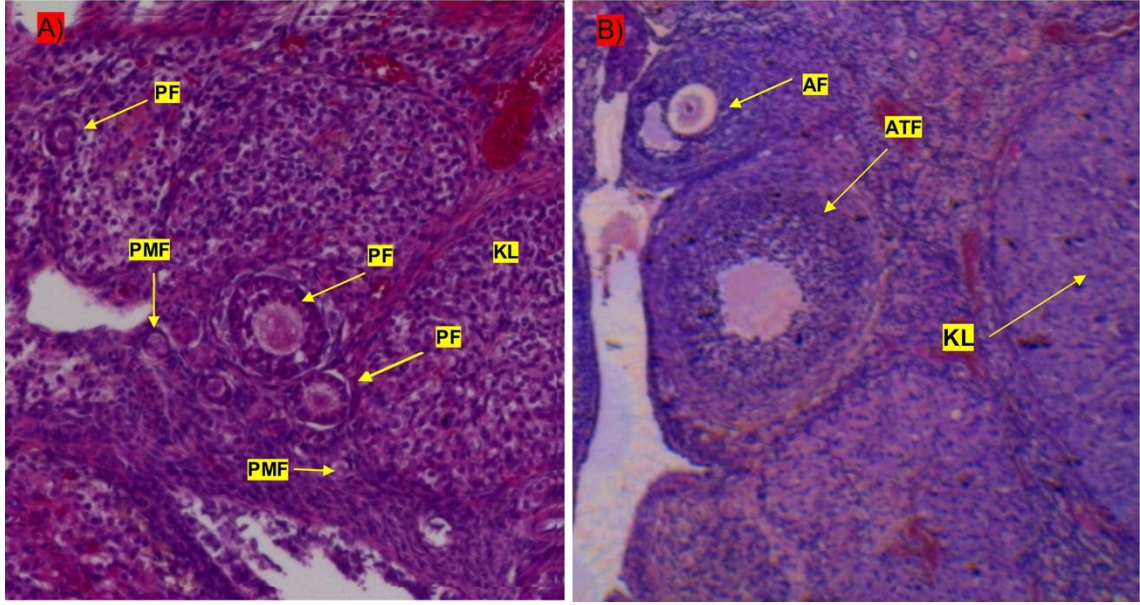
Şekil 4.2. Genç grubuna ait Hematoksilen-Eozin Boyama kesitleri. A) x10 B) Antral folikül (x 40). PF, primer folikül; PMF, primordial folikül; AF, antral folikül; KL, korpus Luteum; GH, granulosa hücreleri; TH, teka hücreleri; O, oosit ve ZN, zona pellusida.



Şekil 4.3. Kontrol grubuna ait Hematoksilen-Eozin Boyama kesitleri. A) x10, B) x 10. PF, primer folikül; PMF, primordial folikül; ATF, atrezik folikül; KL, korpus luteum.

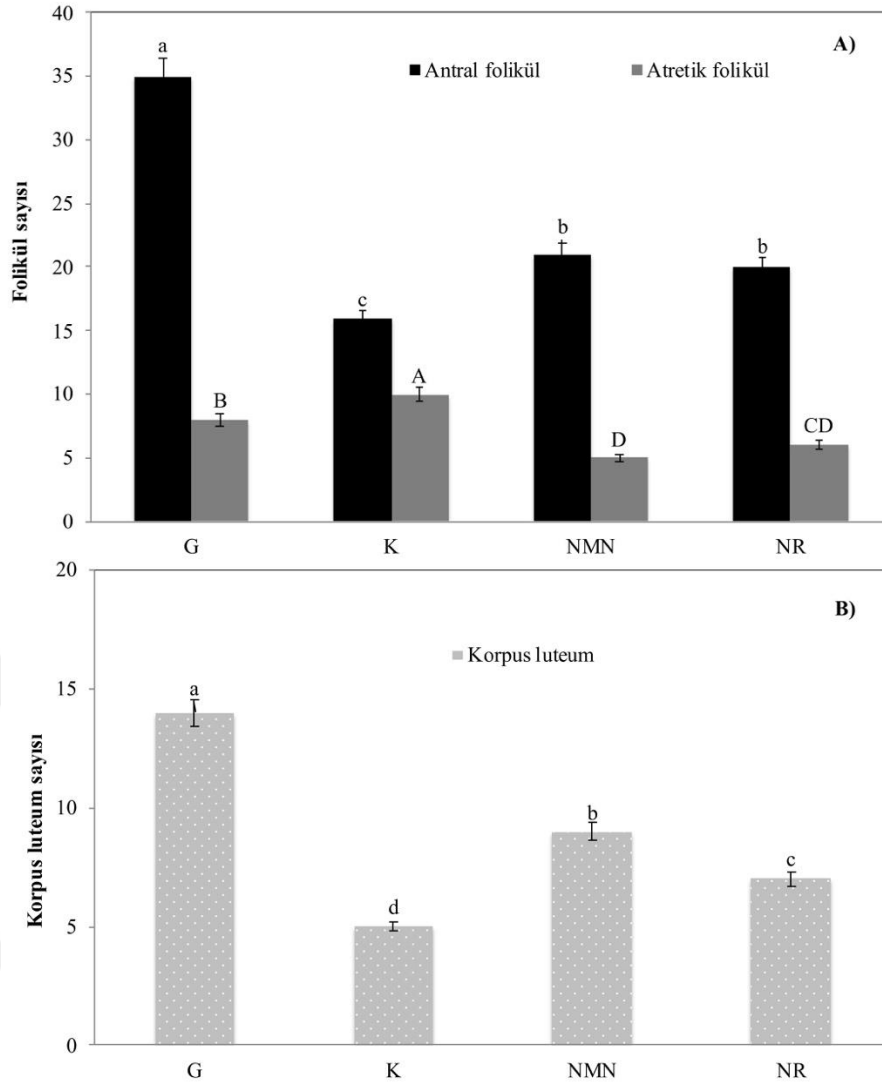


Şekil 4.4. NMN grubuna ait Hematoksilen-Eozin Boyama kesitleri. A) x10, B) x 10. PF, primer folikül; PMF, primordial folikül; ATF, atrezik folikül; AF, antral folikül; KL, korpus luteum; TH, teka hücreleri; GH, granulosa hücreleri; GF, graaf folikülü ve O, oosit.



Şekil 4.5. NR grubuna ait Hematoksilen-Eozin Boyama kesitleri. A) x10, B) x 10. PF, primer folikül; PMF, primordial folikül; ATF, atrezik folikül; AF, antral folikül; KL, korpus luteum.

Orta-yaşlı gruplara (kontrol, NMN ve NR dahil) oranla, genç grubun ovaryumlarında primordiyal, primer ve antral foliküllerin daha fazla sayıda olduğu gözlemlendi. Kontrol grubu (Şekil 4.3) ile karşılaştırıldığında hem NMN (Şekil 4.4) hemde NR (Şekil 4.5) grubunda daha fazla antral folikülün mevcut olduğu tespit edildi ($p<0.05$). Genç, kontrol, NMN ve NR gruplarındaki antral folikül sayısı sırasıyla 35, 16, 21 ve 20 olarak belirlendi (Şekil 4.6A). Ancak NMN ve NR grupları arasındaki antral folikül sayıları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p\geq 0.05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında NMN ve NR gruplarındaki atretik folikül sayıları daha az olmakla birlikte farklılıklar istatistiki olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Genç, kontrol, NMN ve NR gruplarındaki ortalama atretik folikül sayısı sırasıyla 8, 10, 5 ve 6 olarak tespit edildi (Şekil 4.6A). Antral folikül/Atretik folikül oranı genç, kontrol, NMN ve NR grupları için sırasıyla 4.3, 1.6, 4.2 ve 3.3 olarak hesaplandı.

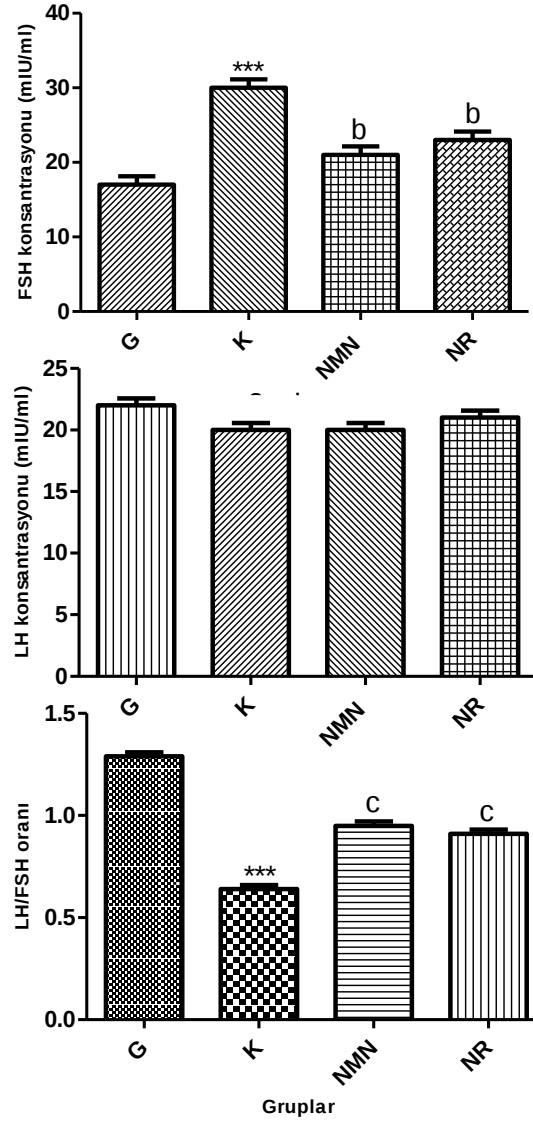


Şekil 4.6. Gruplarda folikül ve korpus luteum sayılarının değişimi. *Aynı harfler ile gösterilen değerler arasındaki fark, istatistiksel olarak önemli değildir ($p \leq 0,05$). Şekil A'da küçük harfler antral folikülü; büyük harfler atretik folikülü ifade etmektedir. G, genç grubu; K, kontrol grubu; NMN, nikotinamid mononükleotid (NMN) uygulanmış grup; NR, nikotiamid ribozidin (NR) uygulanmış grup.

4.3. Serum FSH, LH ve AMH Değişimleri

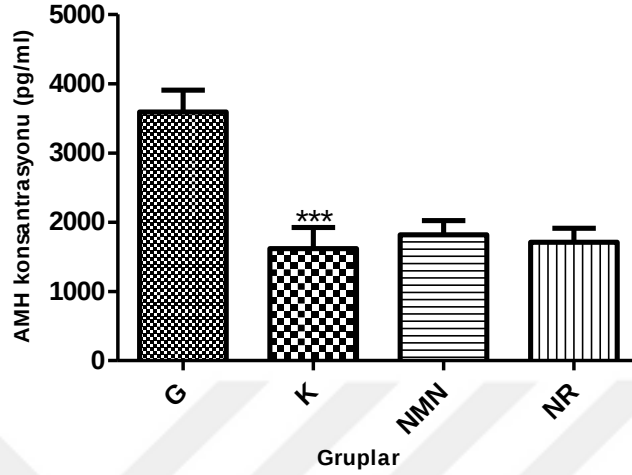
Kan örneklerinde Eliza ile Folikül uyarıcı hormon (FSH), Luteinleştirici hormon (LH) ve Anti Müllarian Hormon (AMH) analizleri gerçekleştirildi (Şekil 4.7). Genç gruba oranla orta-yaşlı (kontrol, K) grubunda, FSH' ın istatistiksel olarak önemli artış gösterdiği tespit edildi ($p < 0.05$). Kontrol grubuna oranla, NMN ve NR gruplarında FSH seviyesinde istatistiksel bir düşüş tespit edildi ve bu iki gruptaki FSH seviyelerinin genç gruptaki FSH seviyesine yaklaştığı görüldü ($p \geq 0.05$). FSH' ın aksine LH değerlerinin genç, kontrol,

NMN ve NR gruplarında çok fazla değişiklik göstermediği tespit edildi ($p \geq 0.05$). LH ve FSH değerleri, genç grupta 22 ve 17 mIU/ml, kontrol grubunda 20 ve 30 mIU/ml, NMN grubunda 20 ve 21 mIU/ml ve NR grubunda 21 ve 23 mIU/ml olarak ölçüldü. LH/FSH oranı ise genç, kontrol, NMN ve NR gruplarında sırasıyla 1.29, 0.66, 0.95 ve 0.91 olarak hesaplandı.



Şekil 4.7. Deney gruplarında FSH, LH ve LH/FSH oranlarının değişimi. (Veriler ortalama±standart sapma olarak hesaplanmıştır. *** $p < 0.001$ vs G, b $p < 0.01$ vs K ve c $p < 0.001$ vs K (a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.001$ ve $n=3$)). G, genç grubu; K, kontrol grubu; NMN, nikotinamid mononükleotid (NMN) uygulanmış grup; NR, nikotiamid ribozidin (NR) uygulanmış grup.

AMH seviyesi genç bireylerde 3590 pg/mL, orta-yaşlı kontrol bireylerinde 1620 pg/mL, orta-yaşlı NMN bireylerinde 1820 pg/mL ve orta-yaşlı NR bireylerinde 1710 pg/mL olarak ölçüldü. Kontrol, NMN ve NR gruplarının AMH değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim tespit edilmedi ($p \geq 0.05$) (Şekil 4.8).

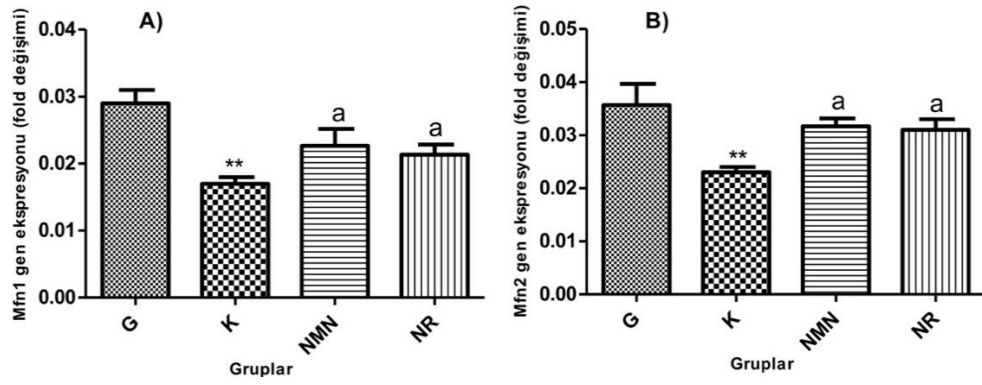


Şekil 4.8. Deney gruplarında AMH değişimi. Veriler ortalama±standart sapma olarak hesaplanmıştır. *** $p < 0.001$ vs G (a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.001$ ve $n=3$). G, genç grubu; K, kontrol grubu; NMN, nikotinamid mononükleotid (NMN) uygulanmış grup; NR, nikotiamid ribozidin (NR) uygulanmış grup.

4.4. RT-PCR ile Gen Ekspresyon Seviyesinin Analizi

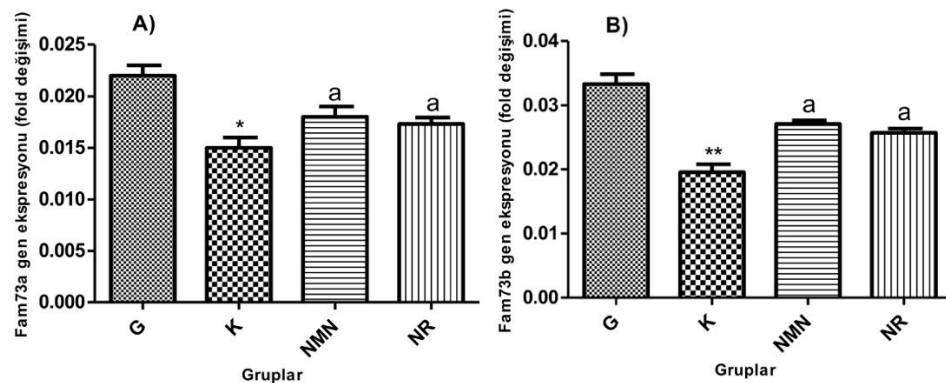
4.4.1. Mitokondriyal Füzyon ile İlişkili Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri

Mfn1, Mfn2, Fam73a (Miga1), Fam 73b (Miga 2) ve OPA mitokondriyal füzyonla ilişkili genlerdir. Genç (G) sıçanlarla karşılaştırıldığında orta-yaşlı sıçanlarda yani kontrol gruplarında (K) Mfn1' de istatistiksel ($p < 0.01$) bir azalma görülürken, NMN ve NR uygulamasının Mfn1 seviyesini artırdığı ($p < 0.05$) ve normal genç bireylerdeki ekspresyon seviyesine yaklaştırdığı belirlendi (Şekil 4.9A). Normal genç (G) sıçanlarla karşılaştırıldığında orta-yaşlı sıçanlarda yani kontrol gruplarında (K) Mfn2' de istatistiksel ($p < 0.01$) anlamda önemli bir azalma görülürken, NMN veya NR uygulamasının Mfn2 seviyesini artırdığı ($p < 0.05$) ve normal genç sıçanlardaki ekspresyon seviyesine yaklaştırdığı tespit edildi (Şekil 4.9B). Gerek Mfn1 gerekse Mfn2 için, NMN ve NR grupları arasında ise istatistiksel anlamda bir farkın olmadığı görüldü ($p \geq 0.05$).



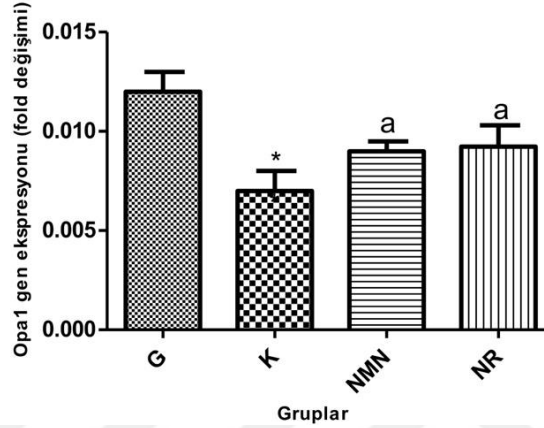
Şekil 4.9. β -aktin kontrol genine göre Mfn1 (A) ve Mfn2 (B) genlerinde ekspresyon değişimlerini. [G: Genç grup, K: orta-yaşlı kontrol grubu, NMN: nikotinamid mononükleotid (NMN) uygulanmış orta-yaşlı grup, NR: nikotiamid ribozid (NR) uygulanmış orta-yaşlı grup]. Veriler ortalama±standart sapma olarak hesaplanmıştır. ** p<0.01 vs G ve a p<0.05 vs K (a p<0.05, b p<0.01, c p<0.001 ve n=3)

Hem mitokondriyal füzyon hemde ovulasyon ve ovulasyon steroidogenezinde önemli rol oynadığını bilinen Fam73a (Miga1) ve Fam73b (Miga 2) genlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edildiğinde ise genç bireylere oranla orta yaşlı bireylerin Fam73a (Şekil 4.10A) ve Fam73b (Şekil 4.10B) seviyelerinde istatistiksel olarak önemli düşüşler belirlendi (sırasıyla p<0.05, p<0.01). NMN veya NR uygulamasının orta yaşlı kontrol grubuna oranla Fam 73a ve Fam 73b seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğu tespit edildi (p<0.05). NMN ve NR grupları arasında ise istatistiksel anlamda önemli bir fark tespit edilmedi (p≥0.05).



Şekil 4.10. β -aktin kontrol genine göre Fam73a (A) ve Fam73b (B) genlerinde ekspresyon değişimlerini. [G: Genç grup, K: orta-yaşlı kontrol grubu, NMN: nikotinamid mononükleotid (NMN) uygulanmış orta-yaşlı grup, NR: nikotiamid ribozid (NR) uygulanmış orta-yaşlı grup]. (Veriler ortalama±standart sapma olarak hesaplanmıştır. ** p<0.01 vs G, * p<0.05 vs G ve a p<0.05 vs K (a p<0.05, b p<0.01, c p<0.001 ve n=3).

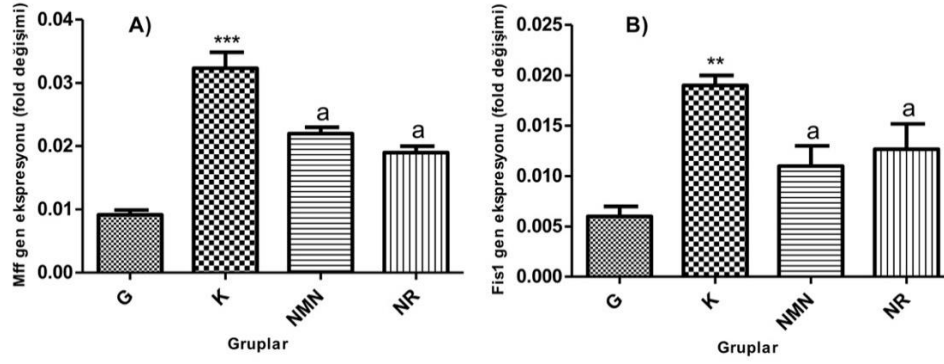
Bir diğer füzyon proteini olan Opa1' in ekspresyon seviyesinde ise genç bireylere oranla kontrol grubunda istatistiksel anlamda bir azalma tespit edildi ($p<0.05$). NMN veya NR uygulanmış gruplarda ise kontrole oranla Opa1 seviyelerinde istatistiksel anlamda artışlar belirlendi ($p<0.05$). Bununla birlikte, NMN veya NR uygulaması Opa1 seviyesini artırsada genç bireylerdeki Opa1 seviyesine tam olarak ulaşamadığı tespit edildi. NMN ve NR gruplarının Opa1 seviyeleri arasında ise anlamlı bir fark belirlenmedi ($p\geq 0.05$) (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. β -aktin kontrol genine göre opa geninin ekspresyon değişimi [G: Genç grup, K: orta-yaşlı kontrol grubu, NMN: nikotinamid mononükleotid (NMN) uygulanmış orta-yaşlı grup, NR: nikotiamid ribozid (NR) uygulanmış orta-yaşlı grup]. (Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak hesaplanmıştır. * $p<0.05$ vs G (a $p<0.05$, b $p<0.01$, c $p<0.001$ ve $n=3$).

4.4.2. Mitokondriyal Fisyon ile İlişkili Genlerinin Ekspresyon Seviyeleri

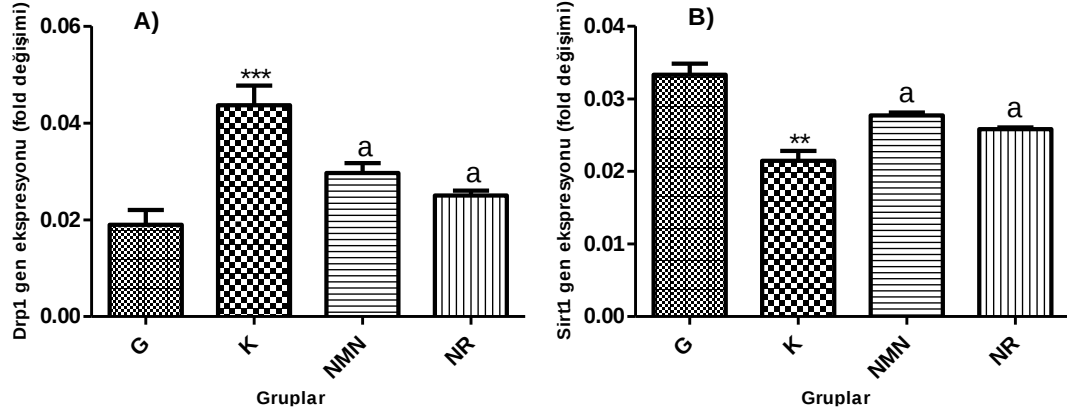
Normal-genç (G) bireylere oranla orta-yaşlı sıçanlarda (K) Mff (Şekil 4.12A) ve Fis1 (Şekil 4.12B) seviyelerinde istatistiki olarak önemli ($p<0.001$, $p<0.01$) artışlar tespit edildi. Mff seviyelerindeki artışın Fis1' e oranla daha fazla olduğu görüldü. NMN veya NR uygulanmış gruplarda, kontrole (K) oranla Fis1 ve Mff seviyelerinde azalma görüldü ve bu azalışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0.05$). NMN ve NR grupları arasında ise Fis1 ve Mff seviyeleri açısından istatistiksel bir fark tespit edilmedi ($p\geq 0.05$). Bununla birlikte, Mff seviyelerini üzerinde NMN' nin, Fis1 seviyeleri üzerinde ise NR' nin biraz daha etkili olduğu görüldü.



Şekil 4.12. β -aktin kontrol genine göre Mff (A) ve Fis1 (B) genlerinde ekspresyon değişimleri [G: Genç grup, K: orta-yaşlı kontrol grubu, NMN: nikotinamid mononükleotid (NMN) uygulanmış orta-yaşlı grup, NR: nikotiamid ribozid (NR) uygulanmış orta-yaşlı grup]. (Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak hesaplanmıştır. *** $p < 0.001$ vs G, ** $p < 0.01$ vs G ve a $p < 0.05$ vs K (a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.001$ ve n=3).

Normal-genç bireylere (G) oranla, orta-yaşlı (K) grup da bir stres göstergesi olarak kabul edilen Drp1' in ekspresyon seviyesinde istatistiksel olarak çok fazla bir artış tespit edildi ($p < 0.001$). NMN veya NR uygulamasının kontrole oranla Drp1 seviyesini istatistiksel ($p < 0.05$) olarak azalttığı ve genç bireylerdeki ekspresyon seviyelerine yaklaştırdığı görüldü. Genç, NMN ve NR gruplarının Drp1 ekspresyon seviyeleri birbirine yakın olsada, ekspresyon seviyeleri arasında istatistiksel anlamda fark tespit edildi ($p < 0.05$) (Şekil 4.13A).

Sirt1 seviyesi analiz edildiğinde ise, genç bireylerdeki Sirt1 seviyesinin en yüksek olduğu ve genç gruba oranla orta-yaşlı kontrol grubundaki Sirt1 seviyesinin istatistiksel anlamda çok fazla azaldığı görüldü ($p < 0.01$). NMN ve NR grubunda ise kontrole oranla Sirt1 seviyesinde anlamlı artışlar tespit edildi ($p < 0.05$). Kısacası, NMN veya NR uygulamaları orta-yaşlı sıçanlarda Sirt1 seviyelerini artırdığı ve genç bireylerdeki Sirt1 seviyelerine yaklaştırdığı görüldü. Bununla birlikte, NMN veya NR grubunun ekspresyon seviyesi ile genç grubun ekspresyon seviyesi arasında istatistiksel anlamda bir farkın olduğu belirlendi ($p < 0.05$) (Şekil 4.13B).

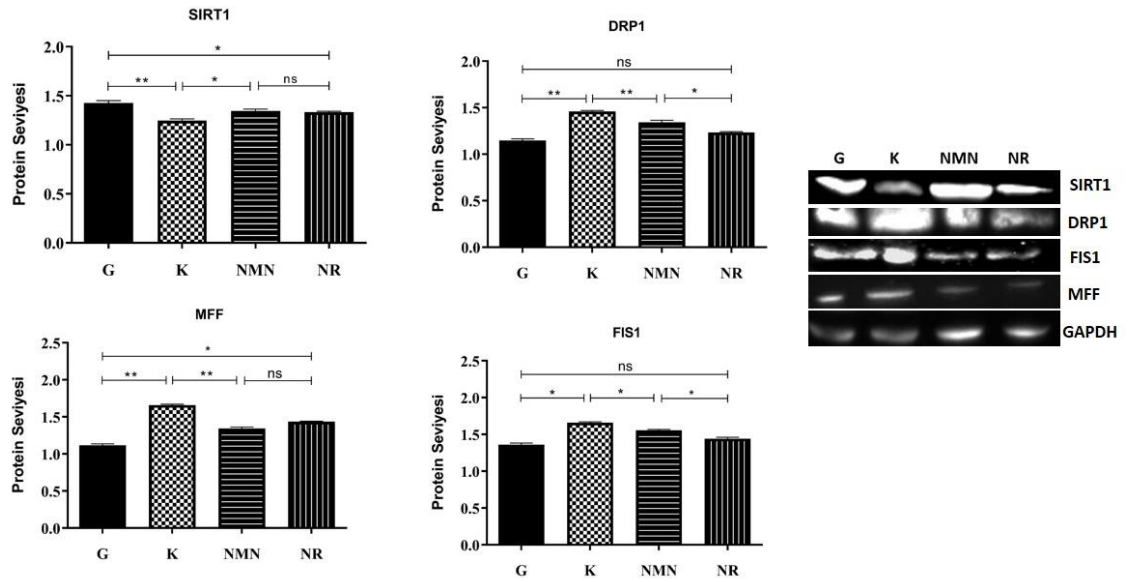


Şekil 4.13. β -aktin kontrol genine göre Drp1 (A) ve Sirt1 (B) genlerinde ekspresyon değişimleri. [G: Genç grup, K: orta-yaşlı kontrol grubu, NMN: nikotinamid mononükleotid (NMN) uygulanmış orta-yaşlı grup, NR: nikotiamid ribozid (NR) uygulanmış orta-yaşlı grup]. (Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak hesaplanmıştır. *** $p < 0.001$ vs G, ** $p < 0.01$ vs G ve a $p < 0.05$ vs K (a $p < 0.05$, b $p < 0.01$, c $p < 0.001$ ve n=3).

4.5. Fisyon proteinlerinin Western-Blot ile Analizi

Western-Blot çalışmalarında fisyon ile doğrudan ilişkili üç proteinin (MFF, FIS1 ve DRP1) yanısıra fisyon ile dolaylı ilişkili olan SIRT1 proteininin ekspresyon seviyeleri analiz edildi (Şekil 4.14). Genç gruba oranla orta yaşlı bireylerin bulunduğu kontrol grubunda DRP1 seviyesinde anlamlı artışın olduğu tespit edildi ($p < 0.05$). Kontrol grubuna oranla, NMN veya NR gruplarında ise DRP1 seviyelerinde anlamlı düşüşler belirlendi ($p < 0.001$, $p < 0.05$). NMN veya NR grupları ile genç gruptaki DRP1 seviyeleri arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p \geq 0.05$). Kısacası, DRP1' için en düşük ekspresyon seviyesi genç grubu, bunu ardından da sırasıyla NMN ve NR grupları için tespit edildi. DRP1 için NMN ve NR grupları arasındaki fark yine istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0.05$). DRP1' de olduğu gibi genç grubuna oranla, kontrol grubunda MFF ($p < 0.001$) ve FIS1 ($p < 0.01$) seviyelerinde (özellikle MFF seviyesinde) artış tespit edildi ve bu artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. NMN veya NR uygulamaları ise kontrole oranla MFF ve FIS1 seviyelerini azalttı. Bununla birlikte, MFF'in NMN ve NR gruplarındaki seviyeleri genç gruptaki seviyelerinden istatistiksel anlamda daha yüksek bulundu ($p < 0.05$).

SIRT1 proteininin kontrol grubundaki ekspresyon seviyesinin genç gruptaki ekspresyon seviyesinden istatistiksel anlamda daha düşük olduğu bulundu ($p<0.001$). NMN veya NR uygulaması ise SIRT1' in ekspresyon seviyesini kontrole oranla artırdığı ve bu artışların istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlendi ($p<0.05$). NMN ve NR gruplarındaki SIRT1 seviyelerinin kontrol grubunun SIRT1 seviyesinden daha yüksek fakat genç grubunun SIRT1 seviyesinden daha düşük olduğu belirlendi ($p<0.05$). Kısacası, SIRT1 için en yüksek ekspresyon seviyesi genç grup, bunun ardından da sırasıyla NMN ve NR grupları için ölçüldü. NMN ve NR grupları arasında ise SIRT1 seviyeleri bakımından anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p<0.05$).



Şekil 4.14. Gruplarda fisyon ile ilişkili proteinlerin Western Blot analizleri. Gruplara Unpaired t test uygulandı. [G: Genç grup, K: orta-yaşlı kontrol grubu, NMN: nikotinamid mononükleotid (NMN) uygulanmış orta-yaşlı grup, NR: nikotiamid ribozid (NR) uygulanmış orta-yaşlı grup]. $p>0,05$ =ns (not significant) önemsiz, $p<0,05$ = * önemli, $p<0,01$ = * çok önemli, $p<0,001$ = ** yüksek derecede önemli

5. TARTIŞMA

Yaşlanma, diğer organlarda olduğu gibi ovaryumları da olumsuz olarak etkilemektedir. Ovaryum yaşlanması hem ovaryum yapısında anormallikler oluşturmakta hem de ovaryumlardaki foliküllerin sayısını ve kalitesini azalmaktadır.^{43,155}

Hücrede, özellikle de hücre mitokondrisinde üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) yaşlanma sürecinin en önemli etkeni olarak kabul edilmektedir.⁶³ ROS birikimin neden olduğu mutasyonlar ve oksidatif hasar; mitokondriyal DNA hacminin, bütünlüğünün ve işlevselliğinin ve ATP üretimin azalmasına neden olmaktadır.⁸³ Fizyolojik yaşlanma tüm vücut organlarını etkilese de ovaryumlar pankreas ve uterus gibi diğer organlara oranla daha hızlı yaşlanmaktadır.^{43,84,85,156} Hatta, ROS birikimine bağlı fizyolojik yaşlanma ovaryum yaşlanmasının en önemli etkeni olarak kabul edilmektedir.⁶⁵ Yapılan çalışmalarda, ROS kaynaklı oksidatif stresin ve yaşlanma sürecinin ovaryumlarda oosit sayısını ve kalitesini azalttığı, korpus luteumun dejenerasyonunu hızlandırdığını ve oosit olgunlaşmasını negatif olarak etkilediği bildirilmektedir.^{65,86,87} Bu durumda, kadın fertilitésinin azalmasına neden olmaktadır.^{43,87}

Mitokondri dinamikleri olarak bilinen fisyon ve füzyon mekanizmaları, hücrelerde mitokondriyal morfoloji, mitokondri dağılımı, hareketi, sayısı, aktivitesinin yanı sıra enerji üretimini etkilemektedir. Hücrelerde ortaya çıkan ROS kaynaklı stres mitokondri dinamiklerini diğer bir ifadeyle mitokondriyal fisyon ve füzyon mekanizmalarında bozmaktadır. Özellikle, fisyondaki aşırı artışlar mitokondri fonksiyonlarının bozulmasına ve patolojik durumların ortaya çıkmasına neden olmaktadır.^{117,119,121} Yapılan çalışmalarda, mitokondriyal dinamiğin yani fisyon ve füzyon dengesinin ovaryum stresinde ve ovaryum yaşlanmasında da bozulduğu gösterilmiştir.^{54,92,93,127-129} Mevcut çalışmada, orta-yaşlı sıçanlarda azalan ovaryum kalitesi ile mitokondriyal dinamikler arasındaki ilişki ve mitokondriyal dinamik üzerinde NAD⁺ kaynağı olarak kullanılan

nikotinamid mononükleotit (NMN) ve nikotinamid ribozid (NR) moleküllerinin olası olumlu etkileri araştırıldı.

Başarılı üremede, sağlıklı ovaryum ve foliküler rezervinin yeterli olması önemli kriterdir. Hasarlı foliküller ve folikül rezerv havuzundaki azalma gibi çeşitli nedenlerle 30 yaşını aşmış kadınlarda doğurganlık hızı azalmaktadır. Bu nedenle subfertil dönem olarak da bilinen menopoza hemen önceki bu dönem önemlidir. Bu dönemde doğurganlığı artırmak için foliküler havuzu ve foliküllerin sağlığını düzeltmeye yönelik adımlar atılmalıdır.¹⁵⁵ Dişi sıçanların beklenen ömrü 2-3 yıldır. Ancak, dişi sıçanlar orta yaşlarda (8-12 ay) artan düzensiz bir üreme döngüsü sıklığı gösterirler.¹⁵⁷ Mevcut çalışmada, kadınlarda da doğurganlık oranının azaldığı 30-35 yaş arasına denk gelecek şekilde 12 aylık orta-yaşlı dişi sıçanlar tercih edildi.

Elde edilen sonuçlar, 17 günlük uygulama süresinin sonunda orta-yaşlı sıçanların bulunduğu kontrol grubunda çok az bir kilo kazanımı olduğu tespit edildi. Aksine aynı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, orta-yaşlı NMN ve NR gruplarının vücut ağırlıklarında bir miktar düşüş gözlemlendi. Bu bulgu, NAD⁺ öncüsü NMN ve NR'nin kilo kaybını sağladığı ve obeziteyi engellediği gerçeği ile uyumaktadır.^{143,158} Orta-yaşlı NMN ve NR gruplarının aksine, 17 günlük sürenin sonunda genç gruptaki sıçanların ortalama vücut ağırlığının 215 gr' dan 240 gr' a çıktığı belirlendi. Bu durum ise, genç gruptaki sıçanların büyüme aşamasında olmasıyla açıklandı.

Genç bireylerle karşılaştırıldığında orta-yaşlı sıçanlardaki (kontrol, NM) ovaryum ağırlıklarının daha fazla olduğu tespit edildi. Bu durum, literatürde belirtildiği gibi belli bir döneme kadar özellikle orta yaşlı döneme kadar ovaryum hacminin ve ağırlığının artabileceği gerçeği ile uyumaktadır.¹⁵⁷ Kontrolle karşılaştırıldığında ise NMN veya NR uygulanmış grubun ovaryum ağırlıklarında çok fazla bir farklılık olmadığı belirlendi. Ovaryum ağırlığının aksine, ovaryum indeksinin (ovaryum ağırlığı/vücut ağırlığı)

kontrole oranla NMN ve NR gruplarında azda olsa arttığı görüldü. Yüksek ovaryum indeksi ovaryum kalitesinin bir göstergesi kabul edildiği için¹⁵⁶, NMN ve NR' nin ovaryum indeksi üzerindeki olumlu etki göstermesi kadın fertilitesi açısından önemlidir.

Tunika albuginea, ovaryum yüzeyinin altında yer alan, esas olarak yapısal kollajenler ve diğer hücre dışı proteinlerden (kollajen tip I, decorin, versican) oluşan vaskülarize olmayan kalın lifli zengin bir tabakadır.¹⁵⁹ Mevcut çalışmada, genç bireylere oranla NR ve NMN gruplarında tunika albuginea' nın nispeten daha kalın olduğu görüldü. Bu durum, ovaryumlarda tunika albuginea'nın kalınlığının yaşlılıkla birlikte arttığı gerçeğiyle uyumaktadır.^{160,161} NR ve NMN gruplarının tunika albuginea tabakalarının genç grubunkinden kalın fakat kontrol grubunkinden nispeten biraz daha ince olduğu gözlemlendi. Bu sonuç, NMN ve NR uygulamasının yaşlılıkla ilişkili ovaryumlardaki tunika albuginea kalınlaşmasını geriye dönük bir şekilde azalttığını işaret etmektedir. Literatürde, korpus luteum sayısının yaşlılıkla birlikte azaldığı hatta yaşları 12 ayın üzerinde olan sıçanlarda korpus luteum'un tamamen ortadan kalktığı bildirilmektedir.^{155,162} Mevcut çalışmada, genç bireylere oranla orta-yaşlı bireylerin yani kontrol grubunun ovaryumlardaki korpus luteum sayısının daha az olduğu, NMN veya NR uygulamasının ise kontrole oranla korpus luteum sayısını artırdığı tespit edildi.

Dişi gonadlar olgun oositlerin oluşumu, salınması ve sekonder cinsel özelliklerin gelişimi için gerekli olan steroidlerin üretilmesini sağlar.¹⁶³ Puberteden sonraki dönemde, her menstrual döngüde primordiyal foliküller ilk olarak primer foliküllere, primer foliküllerde antral foliküllere dönüşmektedir. Ovaryum foliküllerin en gelişmiş halide graaf folikülü olarak adlandırılmaktadır. ^{44,164,165} Ovaryum foliküllerinin %99'undan fazlası ovulasyondan önce atrezi adı verilen bir süreçle dejenere olmaktadır. Foliküler atrezide yani dejenerasyonda apoptoz ve otofaji gibi hücre ölümü biçimleri etkili

olmaktadır. Foliküler atrezi, foliküler gelişimin tüm aşamalarını etkilese de, en yüksek foliküler dejenerasyon insidansı, erken antral folikül aşamasında gözlenmektedir.¹⁶³ Yenidoğanın over korteksinde 700.000-2.000.000 civarında primordiyal folikül bulunur. Devam eden atreziler sebebiyle primordial foliküllerin sayısı puberteye kadar 400.000'e kadar düşer. Puberte ile birlikte hipofizden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle her menstrual siklus başında 5-15 follikül gelişmeye başlar ancak nadiren birden fazlası ovulasyon aşamasına yani graaf folikülü haline kadar ilerleyebilir. Dominant follikül dışındaki gelişmeye başlayan diğer folliküller atreziye uğrar. Bu şekilde folikül sayısı menapoza kadar gittikçe azalır. Over korteksinde hiç folikül kalmadığı zaman menapoz gerçekleşir. Puberteden menapoza kadar ancak 400-500 follikül ovule olabilecek şansa sahip olur.¹⁶⁶ Atrezi ilerledikçe, granüloza hücreleri tamamen kaybolur ve oosit dejenere olur, geriye zona pellusida kalıntıları ve hipertrofik teka hücreleri kalır.¹⁶⁷⁻¹⁶⁹

Mevcut çalışmada, ovaryumlarda folikül sayımı yapıldığında genç sıçanlara oranla orta-yaşlı kontrol grubundaki sıçanların ovaryumlarında folikül sayılarının (primordial, primer, antral folikül) daha düşük olduğu görüldü. Günümüzde, ovaryum yaşlanmasının değerlendirmesinde ultrasonografik yöntemler, antral folikül sayımı, ovaryum hacmi ve ovaryum kan akımı ölçümünü gibi yaklaşımlar uygulanmaktadır. Bununla birlikte, klinik olarak en yaygın kullanılan test antral folikül sayımıdır, çünkü bu test kolay, ucuz ve güvenilirdir.¹⁷⁰ Bu yüzden, mevcut çalışmada esas olarak deney gruplarının ovaryumlarındaki antral folikül sayıları araştırıldı. Çalışmada, genç bireylere oranla orta-yaşlı bireylerde atretik folikül sayısında artış fakat antral folikül sayısında azalış görüldü ($p<0.05$). NMN veya NR uygulanmış gruplarda ise kontrole oranla antral folikül sayısında artış ve atretik folikül sayısında azalış tespit edildi ($p<0.05$). Bu sonuçta, NMN ve NR' nin atreziiyi azaltarak folikül kalitesini artırdığını işaret etmektedir.

Deneyler sonucunda, orta-yaşlı sıçanlarda (kontrol) genç bireylere oranla FSH seviyesinin istatistiksel olarak arttığı ($p<0.05$) ancak LH seviyesinin çok fazla değişmediği ($p\geq 0.05$) görüldü. Bu bulgu, ovaryum yaşlanmasına bağlı olarak FSH'nın çok fazla artabileceği ancak LH seviyelerinin çok fazla etkilenmeyeceği veya LH'da küçük azalmalar görülebileceği gerçeği ile uyumludur.¹⁷¹⁻¹⁷⁴ Sağlıklı kişilerde LH/FSH oranının 1-2 arasında olduğu belirtilmektedir.¹⁷⁵ Bu bilgi göz önüne alındığında, LH/FS oranı 1.29 olan genç bireylerin ovulasyon verimlerinin iyi, LH/FSH oranı 0.66 olan orta-yaşlı kontrol bireylerinin ovulasyon verimlerinin düşük, LH/FSH oranları sırasıyla 0.95 ve 0.91 olan NMN ve NR gruplarında ise ovulasyon verimlerinin normale yakın olduğunu söylemek mümkündür.

AMH kadınlarda follikülogenezisin düzenlenmesinde görev alan ve folikül rezervi hakkında bilgi veren bir hormondur.¹⁷⁶⁻¹⁷⁸ AMH, bireyin doğumdan sonra kadınlarda ovaryumlarda primer ve antral foliküllerin granüloza hücreleri tarafından salgılanmaya başlamakta ve seviyesi doğurganlık döneminde artmaktadır. Yaşlanmaya bağlı olarak AMH seviyesi azalmakta ve menapoz döneminde tespit edilemeyecek kadar düşük seviyelere inmektedir. Bu yüzden, ovaryum rezervinin AMH ile analiz edilmesi fertilitenin değerlendirilmesinde kullanılan önemli bir yöntemdir.^{84,174,179} Mevcut çalışmada da, genç bireylere oranla orta-yaşlı gruptaki bireylerin (kontrol, NMN ve NR dahil) AMH seviyelerinin düşük ($p<0.05$) olduğu belirlendi. Düşük AMH seviyesi ise orta-yaşlı bireylerdeki folikül rezervlerinin daha düşük olduğunun bir göstergesi olarak kabul edildi. Kontrol, NMN ve NR grupları arasında ise AMH seviyeleri açısından istatistiksel bir fark gözlenmedi ($p\geq 0.05$).

Yapılan çalışmalarda, mitokondriyal fisyon ve füzyon proteinlerinin memelilerde oogeneze, embriyogeneze ve implantasyon süreçlerinde etkili olduğu ortaya çıkarılmıştır.^{91,92} Mfn1, Mfn2 ve Opa1 genleri memeli mitokondrilerinin füzyonunda

görev aldığı uzun zamandır bilinmektedir.¹²¹ Mevcut çalışmanın RT-PCR sonuçları, genç bireylerle karşılaştırıldığında orta-yaşlı kontrol bireylerinde Mfn1, Mfn2 ve Opa1 genlerinin ekspresyon seviyelerinde bir azalma meydana geldiğini gösterdi ($p<0.001$). NMN ve NR uygulamaları ise bahsedilen genlerin ekspresyon seviyelerini kontrole oranla artırdı ($p<0.001$). Kısacası, ovaryum yaşlanması mitokondriyal füzyonu azaltırken, NMN veya NR uygulaması mitokondriyal füzyonu artırarak normal seviyelere yaklaştırmıştır. Mitokondriyal füzyon genleri üzerinde NMN ve NR uygulamalarının düzeltici etki yapması önemli bir sonuç olarak kabul edilebilir. Çünkü, Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada¹²⁹ bu genlerden birisi olan Mfn2'nin oosit ve folikül gelişiminde rol oynadığı ve ovaryum foliküler rezervinin korunması için gerekli olduğu belirtilmiştir.

Yakın zamanda yapılan bazı çalışmalarda^{91,92,180}, Mitoguardin-1/2' (Miga1 ve Miga2) olarak bilinen genlerinde ovaryumlarda mitokondriyal füzyonunda görev aldığı ortaya çıkarılmıştır. Bu proteinlerin kodlanmasından sorumlu olan genlerin insanlar dahil omurgalılarda karşılıkları Fam73a ve Fam73b'dir. Nukleer genom tarafından kodlanan bu iki protein ise mitokondri dış zarına yerleşmiş olup mitokondriyal füzyonda görev almaktadır.^{91,92,181} Yapılan çalışmalarda^{91,92} Fam73a ve Fam73b proteinlerinin mitokondriyal dinamiğinin korunmasının yanı sıra fare ovaryumlarında oositlerin mayozunda, üretiminde ve olgunlaşmasında görev aldığı bildirilmiştir. Bu proteinlerin kodlanmasından sorumlu olan genler susturulduğunda ise mitokondriyal fragmentasyonun (yani fisyonun) arttığı, ovaryum hacminin azaldığı, folikül atrezisinin gerçekleştiği ve ovulasyon veriminin düştüğü bildirilmektedir. Örneğin, yapılan bir çalışmada⁹¹, Miga1 ve 2-knockout farelere vitamin C ve ATP takviyesi yapılmış ve daha sonrada oosit yapıları incelenmiştir. Deneyler sonucunda araştırma ekibi vitamin C ve ATP uygulamasının ROS seviyesini azalttığı, oosit mitokondrilerindeki defektleri

düzeltiltiği gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında, RT-PCR analizlerine göre genç sıçanlara oranla, orta-yaşlı sıçanların ovaryumlarında Fam73a ve Fam73b (Migal ve Miga2) seviyelerinin azaldığı belirlendi ($p<000.1$). Ancak, orta-yaşlı sıçanlara oranla (kontrol), NMN veya NR uygulanmış orta-yaşlı sıçanlarda Fam73a ve Fam73b' in ekspresyon seviyelerinin yükseldiği ve hatta genç bireylerdeki ekspresyon seviyelerine yaklaştığı tespit edildi ($p<000.1$). Mitokondriyal füzyon ATP bağımlı bir süreçtir.¹⁸¹ Bu yüzden, NMN ve NR' de hücreye NAD^+ (ATP öncüsü) sağlayarak Fam73a ve Fam73b' in ekspresyon seviyelerini artırarak mitokondri dinamiğini ve fonksiyonlarını düzeltmiş olabilir.

Memelilerde mitokondriyal fisyonla doğrudan ilişkili proteinler MFF, FİS1, MİD49, MİD51 ve DRP1 dir. Bunlardan MFF, FİS1, MİD49 ve MİD51 mitokondri dış zarında yer almakta olup DRP1 için reseptör olarak görev yapmaktadır. Dynamin-ilişkili protein olarak da bilinen DRP1 ise stoplazmada yer almaktadır. Mitokondri fisyonu yani mitokondri fragmentasyonu sırasında, DRP1 proteini reseptör olarak görev yapan MFF, FİS1, MİD49 ve MİD51 proteinlerine bağlanmaktadır.^{97,114,182} Mevcut çalışmada da mitokondriyal fisyonla ilişkili üç genin (Drp1, Mff ve Fis1) ekspresyon analizi yapılmıştır. RT-PCR sonuçları, genç bireylere oranla orta-yaşlı kontrol bireylerinin ovaryumlarında Drp1, Fis1 ve Mff genlerinin seviyelerinde çok fazla artış olduğunu ortaya çıkardı ($p<000.1$). Bu sonuçlar, fizyolojik yaşlanmanın ovaryumlar dahil çeşitli organlarda mitokondriyal fisyonu artırarak mitokondriyal dinamiği bozduğu gerçeği ile uyusmaktadır.^{54,93} RT-PCR ile gerçekleştirilen gen ekspresyon analizleri, Fis1' e oranla Mff' in seviyelerinde daha fazla artış olduğunu ortaya çıkarmıştır ($p<000.1$). Bu sonuçta, önceki literatürlerde belirtildiği gibi fisyon sırasında Drp1'in Fis1'e oranla Mff' ye daha fazla bağlanma eğiliminde olduğu gerçeği ile uyusmaktadır.^{95,96,97,183} Diğer taraftan, mevcut RT-PCR analizleri orta-yaşlı kontrol grubuna göre NMN veya NR uygulanmış

orta-yaşlı sıçanların ovaryumlarında Drp1, Mff ve Fis1 seviyelerinde istatistiksel olarak önemli düşüşler olduğunu gösterdi ($p < 0.001$). Bu verilerin ışığında, hem NMN'nin hemde NR'nin mitokondriyal fisyonu azalttığı sonucu çıkarılmıştır.

Sirtuinler, NAD^+ bağımlı protein deasetilaz aktivitesi gösteren proteinlerdir. Memelilerde sirtuinler gen ekspresyonu, hücre metabolizması, apoptoz, DNA onarımı, hücre döngüsü, gelişim, bağışıklık tepkisi, nöro-koruma ve yaşlanma karşıtı gibi birçok süreci düzenlemektedir.^{101,184} Literatürde, sirtuinlerin ömür uzunluğunu arttırdığı ve yaşlılıkla ilişkili hastalıklara (Alzheimer ve Parkinson) karşı koruyucu özellik gösterdiği bildirilmektedir.^{185,186} Memelilerde sirtuin ailesine bağlı 7 farklı protein (SIRT1-7) bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, SIRT1, SIRT3 ve SIRT6 proteinlerinin memelilerde ovaryum yaşlanmasının geciktirilmesinde koruyucu rolünün olduğu gösterilmiştir.^{131,187-191} Çalışmalarda ayrıca, bu proteinlerin memelilerde folikülogenez sürecinde görev aldığı ve özellikle SIRT1' in sıçanlarda folikülogenez sürecinde çok etkili olduğu rapor edilmiştir.^{187-189, 192} Bu yüzden, mevcut çalışmada Sirt1 geni içinde RT-PCR analizi yapılmıştır.

Yaşlanma sürecinde NAD^+ seviyeleri düşmekte ve bu düşüşte nükleer ve mitokondriyal fonksiyonlarda kusurlara ve nihayetinde yaşlanmaya bağlı birçok patolojiye neden olmaktadır. NAD^+ öncüsü maddeleri takviye ederek NAD^+ seviyelerini eski haline getirmek ise yaşa bağlı bu fonksiyonel kusurları önemli ölçüde iyileştirebilmektedir. NAD^+ sirtuinler de dahil olmak üzere NAD^+ -bağımlı enzimlerin fonksiyonların düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Sirtuinler yaşlanma karşıtı enzimler olarak görev yaptıkları içinde, NAD^+ eksikliği sirtuinlerin aktivitesini azalmakta ve sirtuin aktivitesinin azalmasına bağlı olarak da yaşlanmaya bağlı hastalıklar daha da kötüleşebilmektedir. Bu nedenle, NAD^+ öncüsü maddelerin takviyesiyle sirtuinlerin aktive edilmesi yaşlanma karşıtı bir tedavi yaklaşımı olarak kabul edilmektedir.^{104,193,194}

Örneğin yapılan bir çalışmada¹⁹⁵, NAD⁺ öncüsü maddelerin yanısıra resveratrol ve SRT2104' in farelerde sirtuinleri aktive ederek hücre ve organ fonksiyonlarını düzelttiği, yaşlanmayı yavaşlattığı ve yaşam süresini uzattığı rapor edilmiştir. Hatta, yapılan bir çalışmada¹⁴⁶, NAD⁺ öncüsü olarak uygulanan NMN' nin yaşlı sıçanlarda ovaryum fertilizasyonu düzelttiği ve oosit kalitesini artırdığı gösterilmiştir.

Sirtuinlerin mitokondriyal stresi azaltmada ve mitokondriyal dinamiği korumadaki etkinliği ise onun mitokondriyal fisyonla ilişkili DRP1 proteininin aktivitesini azaltması ile açıklanmaktadır.¹⁰⁵ Mevcut çalışmadaki RT-PCR sonuçlarında genç bireylere oranla orta-yaşlı bireylerde Sirt1 aktivitesinin azaldığını ortaya çıkardı ($p < 0.0001$). Bu durum, yaşlanmaya bağlı olarak orta-yaşlı sıçanların ovaryumlardaki NAD⁺ seviyesinin düşmesiyle açıklanabilir. Ancak, NAD⁺ öncüsü moleküller (NMN veya NR) uygulanmış orta-yaşlı gruplarda Sirt1 aktivitesinin tekrar arttığı ve bu gruplardaki Sirt1 aktivitelerinin genç gruptaki Sirt1 aktivitesine yakın olduğu görüldü ($p \geq 0.001$). Kısacası, elde edilen sonuçlar NMN ve NR'nin Sirt1'i aktive ettiğini ortaya çıkardı. Tüm bu veriler göz önüne alındığında, NAM veya NR uygulaması ile Sirt1 aktivitesine bağlı olarak mevcut çalışmada şu çıkarımlar yapılmıştır. NAM veya NR' den açığa çıkan NAD⁺ sirtuinleri aktive etmiş, aktive edilen sirtuinler DRP1'in yüksek aktivitesini ve mitokondriyal fisyonun meydana gelme sıklığını azaltmış, mitokondriyal fisyonun azalmasına bağlı olarak orta-yaşlı sıçanlarda ovaryum stresi yatıştırılmış ve folikülogenez deki olası bozukluklar düzeltilmiştir.

Mevcut çalışmada, mitokondriyal fizyonla doğrudan (DRP1, MFF, FIS1) veya dolaylı (SIRT1) ilişkili proteinleri için Western Blot analizleride gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar genç bireylere oranla orta-yaşlı kontrol bireylerinde fizyondan sorumlu üç proteininin (DRP1, MFF ve FIS1) ekspresyon seviyesinin arttığını gösterdi ($p < 0.05$). NMN veya NR uygulamasının ise bu üç proteinin seviyelerinde düşüşe neden olduğu

görüldü ($p<0.05$). Western-Blot sonuçları DRP1 proteinin inhibitörü olan SIRT1'in kontrol bireylerine oranla diğer tüm gruplarda (genç, NMN ve NR grupları) daha yüksek seviyelere sahip olduğunu ortaya çıkardı ($p<0.05$). Kısacası, RT-PCR sonuçlarında olduğu gibi Western-Blot sonuçları da orta yaşlı sıçanların ovaryumlarında mitokondriyal fizyonun arttığını, NMN veya uygulamasının ise artan fizyon seviyelerini tekrar azalttığını gösterdi ($p<0.05$).

Literatürde, ovaryumlarda yaşlanmaya bağlı ROS birikimi ile ortaya çıkan oksidatif stresin oosit kalitesini bozduğunu, granüloza hücre apoptozunu indüklediğini ve korpus luteumun dejenerasyonunu hızlandırdığını, oositler ve GC'ler arasındaki iletişimi azaltarak ovulasyon öncesi oosit olgunlaşmasını etkilediği rapor edilmektedir.^{65,86,87} Kısacası, ovaryumlardaki yaşlanma kaynaklı oksidatif hasar folikülogenezi, mayoz bölünme ve ovulasyonu negatif olarak etkilemektedir. Bu durumda, kadın fertilitésinin azalmasına neden olmaktadır.^{45,87} Yapılan çalışmalarda, mitokondri fonksiyonlarının normal bir şekilde devam etmesi için mitokondriyal fisyon ve füzyon olaylarının meydana gelme sıklığının belirli bir dengede olması gerektiği ve aşırı füzyon ya da fisyonun hücrede mitokondri dinamiğini ve fonksiyonlarını bozduğu rapor edilmektedir. Özellikle, fisyondaki aşırı artışın mitokondri yapısında ve fonksiyonlarında çok fazla anormallikler oluşturduğu bildirilmektedir.^{113,114,126} Mevcut deneyler, ovaryumlarda yaşlanmaya bağlı olarak mitokondriyal fisyonda artışın fakat mitokondriyal füzyonda azalışın olduğunu ortaya çıkardı. NMN veya NR uygulamasının ise orta-yaşlı sıçanlarda mitokondriyal fisyonu azalttığı fakat füzyonu artırdığı tespit edildi. Bu sonuçlarda bize, bu iki molekülün fisyon ve füzyon dengesini sağlamak suretiyle ovaryumlardaki yaşlanma kaynaklı bazı anormallikleri düzelttiklerini işaret etmektedirler. Örneğin, orta-yaşlı ovaryumlarla karşılaştırıldığında, NMN veya NR uygulanmış gruplarda atretik

folikül sayısının azaldığı ($p<0.05$) ve daha fazla antral folikül ve korpus luteum gelişiminin başarıldığı tespit edildi.

Literatürde, mitokondriyal füzyon ve fisyon genlerinin ovulasyon ve folikülogenez süreçlerinde rol aldıkları bildirilmektedir.^{54,91,92,129} Bu bilgi ve mevcut çalışmada elde edilen sonuçlar göz önüne alınarak, NMN ve NR' nin mitokondriyal fisyon ve füzyon proteinlerinin aktivitesini etkilediği ve böylece sıçan ovaryumlarında yaşlanma kaynaklı ovaryum hasarlarını ve folikülogenez problemlerini düzeltebildiği sonucuna varılabilir. Özellikle, NMN ve NR' nin fisyonla ilişkili DRP1 proteinin seviyesini azaltarak mitokondrilerin mitofaji ve apoptoza uğrama sıklığını düşürerek granüloza hücrelerinde, korpus luteum'da ve folikülogenez sürecine giren foliküllerde dejenerasyonu azalttığı çıkarımı yapılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaşlanmaya bağlı mitokondriyal stres ovaryumlarda oosit kalitesini ve sayısını azaltmakta, **granüloza hücre apoptozunu indüklemekte ve korpus luteumun dejenerasyonunu hızlandırmaktadır. Bu yüzden, ovaryum yaşlanması dışı infertilitesinin en önemli sebeplerinden birisi olarak kabul edilmektedir.**

Bu tez çalışmasında; mitokondriyal stresin mitokondriyal füzyonu azaltma ve mitokondriyal fisyonu ise artırma şeklinde bir etki göstererek ovaryumlarda korpus luteum ve antral folikül sayısının yanısıra ovaryum kalitesini azalttığı, NAD⁺ kaynağı olarak kullanılan nikotinamid mononükleotit (NMN) ve nikotinamid ribozid (NR) moleküllerinin ise tam tersine mitokondriyal füzyonu artırma ve mitokondriyal fisyonu azaltma şeklinde etki yaparak ovaryumlarda antral folikül ve korpus luteum sayısının yanısıra ovaryum kalitesini artırdığı belirlendi. Ayrıca, bu moleküllerin ovaryum yaşlanmasına bağlı olarak ortaya çıkan LH-FSH dengesizliğini düzelterek normal seviyelere yaklaştırdığı tespit edildi. Kısacası, NMN ve NR' nin mitokondriyal fisyon-füzyon dengesini sağlayarak mitokondriyal stresi azaltabileceği ve bu sayede ovaryum yaşlanmasına karşı yaşlanma karşıtı moleküller olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı. NMN antral folikül gelişiminde, LH/FSH dengesinin yeniden sağlanmasında ve mitokondriyal fisyon sıklığının azaltılmasında NR'ye oranla biraz daha yüksek etkinlik gösterse de genel olarak bu iki molekülün bahsedilen parametreler üzerindeki etkinliklerinin birbirine yakın olduğu tespit edildi.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, ovaryum yaşlanmasına bağlı olarak ortaya çıkan kadın infertilitesinin tedavisinde NMN ve NR moleküllerinin ilaç olarak kullanılabilme potansiyellerinin yüksek olduğunu işaret etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sadler TW, *Langman's medical embryology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2018.
2. Makiyan Z, Studies of gonadal sex differentiation. *Organogenesis*, 2016, 12: 42-51.
3. Nagahama Y, Chakraborty T, Paul-Prasanth B, Ohta K, Nakamura, M. Sex determination, gonadal sex differentiation, and plasticity in vertebrate species. *Physiological reviews*, 2021, 101: 1237-1308.
4. Eşrefoğlu M. *Özel Histoloji 2*. Baskı. İstanbul, İstanbul Tıp Kitapevi, 2016.
5. Delilbaşı L. *A'dan Z'ye: tüp bebek: laboratuvar*, Veri Medikal Yayıncılık, 2008.
6. Moore KL, Persaud TVN, Yıldırım M, Okar İ, Dalçık H. *Klinik yönleri ile insan embriyolojisi*, Nobel Tıp Kitabevleri, 2002.
7. Krohmer R. *The Reproductive System: The Human Body, How It Works*, New York, Infobase Publishing, 2010.
8. Wallace WHB, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PloS one*, 2010, 5: e8772.
9. Lentz GM, Lobo RA, Gershenson DM, Katz VL. *Comprehensive gynecology e-book*. Elsevier Health Sciences, 2010.
10. Ross MH, Pawlina W. Çeviri: Mete GA. *Dişi Üreme Sistemi*, Ankara: Palme Yayınları, 2013: 830-870.
11. Ngo AV, Otjen JP, Parisi MT, Ferguson MR, Otto RK, Stanescu AL. Pediatric ovarian torsion: a pictorial review. *Pediatric radiology*, 2015, 45: 1845-1855.
12. Yener N, Tuncel M. Kadın Genital Sistem Anatomisi. *Temel Anatomi (Cumhur M.)*, Ankara, Metu Pres, 2001: 281-284.
13. Aydın S. *İnsan anatomisi ve fizyolojisi 5*. Baskı. Eskişehir Anadolu Üniversitesi, 2000: 60-66.

14. Eroschenko VP, Di Fiore MS. *DiFiore's atlas of histology with functional correlations*. Lippincott Williams & Wilkins, 2013.
15. Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Schwartz J, Rodgers RJ. *Development of the mammalian ovary and follicles*. In *The ovary*, Academic Press, 2019: 71-82.
16. Suttie AW, Leininger JR, Bradley AE, *Boorman's Pathology of the Rat*. San Diego: Academic Press, 2017.
17. Junqueira LCU, Carneiro J, Aytekin Y, Solakoğlu S. *Temel histoloji: text & atlas*. Nobel Tıp Kitabevleri, 2009.
18. Cox E, Takov V. *Embryology, ovarian follicle development*. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing, 2021.
19. Ross MH, Pawlina W. *Histology*. Lippincott Williams & Wilkins. 2006.
20. Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction Update*, 2006, 12: 537-555.
21. Kayali H, Satiroglu G, Tasyürekli M. *İnsan Embriyolojisi* 7. Baskı. İstanbul, Alfa Basım Yayım Dağıtım, 1992.
22. Delilbaşı L. *In Vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri (Yeni uygulamalar ve güncel yaklaşımlar)*. Ankara, Güneş Kitabevleri, 61-83.
23. Arıcı A, Attar E, Balaban E, Buyru F, Çolgar U. *Reprodüktif Endokrinoloji ve İnfertilite*. İstanbul, İstanbul Medikal Yayıncılık, 2006: 249-259.
24. Miyano T. In vitro growth of mammalian oocytes. *Journal of Reproduction and Development*, 2005, 51: 169-176.
25. Pawlina W, Ross MH. *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology*. Lippincott Williams & Wilkins, 2018.

26. Gartner LP, Hiatt JL. *Color textbook of histology e-book*. Elsevier Health Sciences, 2006.
27. Arslan NP. Nanopartiküllerin fare testis dokusunda mitokondri stresi üzerine olan etkileri. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2015.
28. Ruggeri M, Cannas S, Cubeddu M, Molicotti P, Piras GL, Dessole S, Zanetti S. Bacterial agents as a cause of infertility in humans. *New Microbiol*, 2016, 39: 206-209.
29. Walker MH, Tobler KJ. *Female infertility*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.
30. Olooto WE, Amballi AA, Banjo TA. A review of Female Infertility; important etiological factors and management. *J Microbiol Biotech Res*, 2012, 2: 379-385.
31. Tao X, Ge SQ, Chen L, Cai L, Hwang MF, Wang CL. Relationships between female infertility and female genital infections and pelvic inflammatory disease: a population-based nested controlled study. *Clinics*, 2018: 73.
32. Hruska KS, Furth PA, Seifer DB, Sharara FI, Flaws JA. Environmental factors in infertility. *Clinical obstetrics and gynecology*, 2000, 43: 821-829.
33. Mendiola J, Torres-Cantero AM, Moreno-Grau JM, Ten J, Roca M, Moreno-Grau S, Bernabeu R. Exposure to environmental toxins in males seeking infertility treatment: a case-controlled study. *Reproductive biomedicine online*, 2008, 16: 842-850.
34. World Health Organization. Preventing and managing the global epidemic. Report of the World Health Organization on obesity. Geneva: World Health Organization, 1997.

35. Dağ ZÖ, Dilbaz B. Impact of obesity on infertility in women. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 2015, 16: 111.
36. Dalal R. Infection and Infertility. In *Genital Infections and Infertility*, 2016.
37. Wu W, Tang Q, Gu H, Chen Y, Xia Y, Sha J, Wang X. Infection and Infertility. In *Genital Infections and Infertility*, 2016.
38. Mancini T, Casanueva FF, Giustina A. Hyperprolactinemia and prolactinomas. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 2008, 37: 67-99.
39. Kaiser UB. Hyperprolactinemia and infertility: new insights. *The Journal of clinical investigation*, 2012, 122: 3467-3468.
40. Aydos A, Öztemur Y, Dedeoğlu, BG. Polikistik over sendromu ve moleküler yaklaşımlar. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 2016, 73: 81-88.
41. Lentscher JA, Slocum B, Torrealday S. Polycystic ovarian syndrome and fertility. *Clinical obstetrics and gynecology*, 2021, 64: 65-75.
42. Albu AI, Albu D. The Impact of Aging on Fertility: Similarities and Differences between Ovaries and Testes. In (Ed.), *Testes and Ovaries- Functional and Clinical Differences and Similarities*. IntechOpen, 2017.
43. Amanvermez R, Tosun M. An update on ovarian aging and ovarian reserve tests. *International journal of fertility & sterility*, 2016, 9: 411.
44. Erickson GF, Shimasaki S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 2000, 11: 193-198.
45. Erickson GF. Follicle Growth and Development The Global Library of Women's Medicine's. 2008.

46. Te Velde ER, Scheffer GJ, Dorland M, Broekmans FJ, Fauser BCJM. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. *Molecular and cellular endocrinology*, 1998, 145: 67-73.
47. Thompson JE. The Eggsplotation of the United States' Organ and Egg Donation Systems. *Val. UL Rev.*, 2013, 48: 469.
48. Greely HT. *The end of sex and the future of human reproduction*. Harvard University Press, 2016.
49. Szafarowska M, Jerzak M. Ovarian aging and infertility. *Ginekologia Polska*, 2013, 84: 298-304.
50. Ansere VA, Ali-Mondal S, Sathiaselalan R, Garcia DN, Isola JV, Henseb JD, Freeman WM. Cellular hallmarks of aging emerge in the ovary prior to primordial follicle depletion. *Mechanisms of ageing and development*, 2021, 194: 111425.
51. Krarup T, Pedersen T, Faber M. Regulation of oocyte growth in the mouse ovary. *Nature*, 1969, 224: 187-188.
52. Gougeon A, Ecochard R, Thalabard JC. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearance rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. *Biology of reproduction*, 1994, 50: 653-663.
53. Meldrum DR, Casper RF, Diez-Juan A, Simon C, Domar AD, Frydman R. Aging and the environment affect gamete and embryo potential: can we intervene? *Fertility and sterility*, 2016, 105: 548-559.
54. Chiang JL, Shukla P, Pagidas K, Ahmed NS, Karri S, Gunn DD, Singh KK. Mitochondria in ovarian aging and reproductive longevity. *Ageing Research Reviews*, 2020, 63: 101168.

55. Ceylan B, Özerdoğan N. Factors affecting age of onset of menopause and determination of quality of life in menopause. *Turkish journal of obstetrics and gynecology*, 2015, 12: 43.
56. Daan NM, Fauser BC. Menopause prediction and potential implications. *Maturitas*, 2015, 82: 257-265.
57. Cramer DW, Xu H, Harlow BL. Family history as a predictor of early menopause. *Fertility and sterility*, 1995, 64: 740-745.
58. Klein NA, Soules MR. Endocrine changes of the perimenopause. *Clinical obstetrics and gynecology*, 1998, 41: 912-920.
59. Harden CL, Pulver MC, Ravdin L, Jacobs AR. The effect of menopause and perimenopause on the course of epilepsy. *Epilepsia*, 1999, 40: 1402-1407.
60. Baldwin MK, Jensen JT. Contraception during the perimenopause. *Maturitas*, 2013, 76: 235-242.
61. McNamara M, Batur P, DeSapri KT. Perimenopause. *Annals of internal medicine*, 2015, 162: ITC1-ITC16.
62. Figge MT, Reichert AS, Meyer-Hermann M, Osiewacz HD. Deceleration of fusion–fission cycles improves mitochondrial quality control during aging. *PLoS computational biology*, 2012, 8: e1002576.
63. Srivastava S. The mitochondrial basis of aging and age-related disorders. *Genes*, 2017, 8: 398.
64. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chinese journal of physiology*, 2001, 44: 1-12.

65. Sasaki H, Hamatani T, Kamijo S, Iwai M, Kobanawa M, Ogawa S, Tanaka M. Impact of oxidative stress on age-associated decline in oocyte developmental competence. *Frontiers in endocrinology*, 2019, 10: 811.
66. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*, 2018, 13: 757.
67. Sugino N. Reactive oxygen species in ovarian physiology. *Reproductive medicine and biology*, 2005, 4: 31-44.
68. Rizzo A, Roscino MT, Binetti F, Sciorsci RL. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reproduction in Domestic Animals*, 2012, 47: 344-352.
69. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. *Current biology*, 2014, 24: R453-R462.
70. Brown DI, Griendling KK. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system. *Circulation research*, 2015, 116: 531-549.
71. Sart S, Song L, Li Y. Controlling redox status for stem cell survival, expansion, and differentiation. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2015.
72. Mittler R. ROS are good. *Trends in plant science*, 2017, 22: 11-19.
73. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circulation research*, 2018, 122: 877-902.
74. Damas J, Samuels DC, Carneiro J, Amorim A, Pereira F. Mitochondrial DNA rearrangements in health and disease—a comprehensive study. *Human mutation*, 2014, 35: 1-14.
75. Lakshmanan LN, Yee Z, Ng LF, Gunawan R, Halliwell B, Gruber J. Clonal expansion of mitochondrial DNA deletions is a private mechanism of aging in long-lived animals. *Aging Cell*, 2018, 17: e12814.

76. Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation research*, 2010, 107: 1058-1070.
77. Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders—A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 2017, 1863: 1066-1077.
78. Manoharan S, Guillemin GJ, Abiramasundari RS, Essa MM, Akbar M, Akbar MD. The role of reactive oxygen species in the pathogenesis of Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and Huntington's disease: a mini review. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016.
79. Moris D, Spartalis M, Spartalis E, Karachaliou GS, Karaolani GI, Tsourouflis G, Theocharis, S. The role of reactive oxygen species in the pathophysiology of cardiovascular diseases and the clinical significance of myocardial redox. *Annals of translational medicine*, 2017, 5.
80. Liu Z, Ren Z, Zhang J, Chuang CC, Kandaswamy E, Zhou T, Zuo L. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases. *Frontiers in physiology*, 2018, 9: 477.
81. Harman D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Science of Aging Knowledge Environment*, 2002, 37: cp14-cp14.
82. Dai DF, Chiao YA, Marcinek DJ, Szeto HH, Rabinovitch PS. Mitochondrial oxidative stress in aging and healthspan. *Longevity & healthspan*, 2014, 3: 1-22.
83. Colella, M., Cuomo, D., Peluso, T., Falanga, I., Mallardo, M., De Felice, M., & Ambrosino, C. (2021). Ovarian Aging: Role of Pituitary-Ovarian Axis Hormones and ncRNAs in Regulating Ovarian Mitochondrial Activity. *Frontiers in Endocrinology*, 12.

84. Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian aging: mechanisms and clinical consequences. *Endocrine reviews*, 2009, 30: 465-493.
85. Park SU, Walsh L, Berkowitz KM. Mechanisms of ovarian aging. *Reproduction*, 2021, 162: R19-R33.
86. Cajas YN, Cañón-Beltrán K, Ladrón de Guevara M, Millán de la Blanca MG, Ramos-Ibeas P, Gutiérrez-Adán A, González EM. Antioxidant nobiletin enhances oocyte maturation and subsequent embryo development and quality. *International journal of molecular sciences*, 2021, 21: 5340.
87. Yang L, Chen Y, Liu Y, Xing Y, Miao C, Zhao Y, Zhang Q. The role of oxidative stress and natural antioxidants in ovarian aging. *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 11: 617843.
88. Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2007, 8: 870-879.
89. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 2012, 1817: 1833-1838.
90. Youle RJ, Van Der Bliek AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*, 2012, 337: 1062-1065.
91. Liu XM, Zhang YP, Ji SY, Li BT, Tian X, Li D, Fan HY. Mitoguardin-1 and-2 promote maturation and the developmental potential of mouse oocytes by maintaining mitochondrial dynamics and functions. *Oncotarget*, 2016, 7: 1155.
92. Liu XM, Zhang YL, Ji SY, Zhao LW, Shang WN, Li D, Fan HY. Mitochondrial function regulated by mitoguardin-1/2 is crucial for ovarian endocrine functions and ovulation. *Endocrinology*, 2017, 158: 3988-3999.

93. Amartuvshin O, Lin CH, Hsu SC, Kao SH, Chen A, Tang WC, Hsu HJ. Aging shifts mitochondrial dynamics toward fission to promote germline stem cell loss. *Aging cell*, 2020, 19: e13191.
94. Cervený KL, Tamura Y, Zhang Z, Jensen RE, Sesaki H. Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends in cell biology*, 2007, 17: 563-569.
95. Gandre-Babbe S, van der Bliek AM. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Molecular biology of the cell*, 2008, 19: 2402-2412.
96. Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara, K. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *Journal of Cell Biology*, 2010, 191: 1141-1158.
97. Losón OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell*, 2013, 24: 659-667.
98. Liu YJ, McIntyre RL, Janssens GE, Houtkooper RH. Mitochondrial fission and fusion: A dynamic role in aging and potential target for age-related disease. *Mechanisms of ageing and development*, 2020, 186: 111212.
99. Ren L, Chen X, Chen X, Li J, Cheng B, Xia J. Mitochondrial dynamics: fission and fusion in fate determination of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020, 8: 580070.
100. Bravo-Sagua R, Parra V, López-Crisosto C, Díaz P, Quest AF, Lavandero S. Calcium transport and signaling in mitochondria. *Compr Physiol*, 2017, 7: 623-634.
101. Michan S, Sinclair D. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochemical Journal*, 2007, 404: 1-13.

102. Ghosh HS. The anti-aging, metabolism potential of SIRT1. *Current opinion in investigational drugs* (London, England: 2000), 2008, 9: 1095-1102.
103. Imai SI, Guarente L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends in Cell Biology*, 2014, 24: 464-471.
104. Verdin E. NAD⁺ in aging, metabolism, and neurodegeneration. *Science*, 2015, 350: 1208-1213.
105. Ding M, Feng NA, Tang D, Feng J, Li Z, Jia M, Pei J. Melatonin prevents Drp1-mediated mitochondrial fission in diabetic hearts through SIRT1-PGC1 α pathway. *Journal of pineal research*, 2018, 65: e12491.
106. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays in biochemistry*, 2018, 62: 341-360.
107. Chan DC. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 2006, 22: 79-99.
108. Caglinec M, Safiulina D, Liiv M, Liiv J, Choubey V, Wareski P, Kaasik A. Principles of the mitochondrial fusion and fission cycle in neurons. *Journal of cell science*, 2013, 126: 2187-2197.
109. Westermann B. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283: 13501-13505.
110. Knott AB, Bossy-Wetzel E. Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, 1147: 283-292.
111. Grohm J, Kim SW, Mamrak U, Tobaben S, Cassidy-Stone A, Nunnari J, Culmsee C. Inhibition of Drp1 provides neuroprotection in vitro and in vivo. *Cell Death & Differentiation*, 2012, 19: 1446-1458.

112. Reddy PH. Inhibitors of mitochondrial fission as a therapeutic strategy for diseases with oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease*, 2014, 40: 245-256.
113. Ježek J, Cooper KF, Strich R. Reactive oxygen species and mitochondrial dynamics: the yin and yang of mitochondrial dysfunction and cancer progression. *Antioxidants*, 2018, 7: 13.
114. Reddy PH, Reddy TP, Manczak M, Calkins MJ, Shirendeb U, Mao P. Dynamin-related protein 1 and mitochondrial fragmentation in neurodegenerative diseases. *Brain research reviews*, 2011, 67: 103-118.
115. Li F, Zhou J, Li Y, Sun K, Chen J. Mitochondrial damage and Drp1 overexpression in rifampicin-and isoniazid-induced liver injury cell model. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, 2019, 7: 40.
116. Wu S, Zhou F, Zhang Z, Xing D. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission–fusion proteins. *The FEBS journal*, 2011, 278: 941-954.
117. Iqbal S, Hood DA. Oxidative stress-induced mitochondrial fragmentation and movement in skeletal muscle myoblasts. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2014, 306: C1176-C1183.
118. Natarajan V, Wilson CL, Hayward SL, Kidambi S. Titanium dioxide nanoparticles trigger loss of function and perturbation of mitochondrial dynamics in primary hepatocytes. *PloS one*, 2015, 10: e0134541.
119. Agarwal S, Yadav A, Tiwari SK, Seth B, Chauhan LKS, Khare P, Chaturvedi RK. Dynamin-related protein 1 inhibition mitigates bisphenol A-mediated alterations in mitochondrial dynamics and neural stem cell proliferation and differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291: 15923-15939.

120. Riba A, Deres L, Eros K, Szabo A, Magyar K, Sumegi B, Szabados E. Doxycycline protects against ROS-induced mitochondrial fragmentation and ISO-induced heart failure. *PLoS One*, 2017, 12: e0175195.
121. Arslan NP, Keles ON, Gonul-Baltaci N. Effect of Titanium Dioxide and Silver Nanoparticles on Mitochondrial Dynamics in Mouse Testis Tissue. *Biological Trace Element Research*, 2022, 200: 1650-1658.
122. Garcia I, Innis-Whitehouse W, Lopez A, Keniry M, Gilkerson R. Oxidative insults disrupt OPA1-mediated mitochondrial dynamics in cultured mammalian cells. *Redox Report*, 2018, 23: 160-167.
123. Liu H, Mao P, Wang J, Wang T, Xie CH. Allicin protects PC12 cells against 6-OHDA-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction via regulating mitochondrial dynamics. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2015, 36: 966-979.
124. Amartuvshin O, Lin CH, Hsu SC, Kao SH, Chen A, Tang WC, Hsu HJ. Aging shifts mitochondrial dynamics toward fission to promote germline stem cell loss. *Aging cell*, 2020, 19: e13191.
125. Bonda DJ, Wang X, Perry G, Smith MA, Zhu X. Mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. *Drugs & aging*, 2010, 27: 181-192.
126. Chen Y, Yan L, Zhang Y, Yang X. The role of DRP1 in ropivacaine-induced mitochondrial dysfunction and neurotoxicity. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47: 1788-1796.
127. Udagawa O, Ishihara T, Maeda M, Matsunaga Y, Tsukamoto S, Kawano N, Ishihara N. Mitochondrial fission factor Drp1 maintains oocyte quality via dynamic rearrangement of multiple organelles. *Current Biology*, 2014, 24: 2451-2458.

128. Chiaratti MR, Garcia BM, Carvalho KF, Macabelli CH, da Silva Ribeiro FK, Zangirolamo AF, Machado TS. Oocyte mitochondria: role on fertility and disease transmission. *Animal Reproduction*, 2018, 15: 231.
129. Zhang M, Bener MB, Jiang Z, Wang T, Esencan E, Scott III R, Seli E. Mitofusin 2 plays a role in oocyte and follicle development, and is required to maintain ovarian follicular reserve during reproductive aging. *Aging (Albany NY)*, 2019, 11: 3919.
130. Niu YJ, Nie ZW, Shin KT, Zhou W, Cui XS. PINK1 regulates mitochondrial morphology via promoting mitochondrial fission in porcine preimplantation embryos. *The FASEB Journal*, 2019, 33: 7882-7895.
131. Zhang J, Fang LI, Lu Z, Xiong J, Wu M, Shi L, Wang S. Are sirtuins markers of ovarian aging? *Gene*, 2016, 575: 680-686.
132. Ying W. Therapeutic potential of NAD⁺ for neurological diseases, 2007.
133. Xie N, Zhang L, Gao W, Huang C, Huber PE, Zhou X, Zou B. NAD⁺ metabolism: pathophysiologic mechanisms and therapeutic potential. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2020, 5: 1-37.
134. Cantó C, Menzies KJ, Auwerx J. NAD⁺ metabolism and the control of energy homeostasis: a balancing act between mitochondria and the nucleus. *Cell Metabolism*, 2015, 22: 31-53.
135. Sultani G, Samsudeen AF, Osborne B, Turner N. NAD⁺: A key metabolic regulator with great therapeutic potential. *Journal of Neuroendocrinology*, 2017, 29: e12508.
136. Yoshino J, Baur JA, Imai SI. NAD⁺ intermediates: the biology and therapeutic potential of NMN and NR. *Cell Metabolism*, 2018, 27: 513-528.
137. Rajman L, Chwalek K, Sinclair DA. Therapeutic potential of NAD-boosting molecules: the in vivo evidence. *Cell Metabolism*, 2018, 27: 529-547.

138. Yang L, Lin X, Tang H, Fan Y, Zeng S, Jia L, Liu X. Mitochondrial DNA mutation exacerbates female reproductive aging via impairment of the NADH/NAD⁺ redox. *Aging Cell*, 2020, 19: e13206.
139. Yoshino J, Mills KF, Yoon MJ, Imai SI. Nicotinamide mononucleotide, a key NAD⁺ intermediate, treats the pathophysiology of diet-and age-induced diabetes in mice. *Cell Metabolism*, 2011, 14: 528-536.
140. Lee HJ, Yang SJ. Nicotinamide riboside regulates inflammation and mitochondrial markers in AML12 hepatocytes. *Nutrition Research and Practice*, 2019, 13: 3-10.
141. Gomes AP, Price NL, Ling AJ, Moslehi JJ, Montgomery MK, Rajman L, Sinclair DA. Declining NAD⁺ induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell*, 2013, 155: 1624-1638.
142. Mills KF, Yoshida S, Stein LR, Grozio A, Kubota S, Sasaki Y, Imai SI. Long-term administration of nicotinamide mononucleotide mitigates age-associated physiological decline in mice. *Cell Metabolism*, 2016, 24: 795-806.
143. Uddin GM, Youngson NA, Doyle BM, Sinclair DA, Morris MJ. Nicotinamide mononucleotide (NMN) supplementation ameliorates the impact of maternal obesity in mice: comparison with exercise. *Scientific Reports*, 2017, 7: 1-11.
144. de Picciotto NE, Gano LB, Johnson LC, Martens CR, Sindler AL, Mills KF, Seals DR. Nicotinamide mononucleotide supplementation reverses vascular dysfunction and oxidative stress with aging in mice. *Aging Cell*, 2016, 15: 522-530.
145. Nadeeshani H, Li J, Ying T, Zhang B, Lu J. Nicotinamide mononucleotide (NMN) as an anti-aging health product—promises and safety concerns. *Journal of Advanced Research*, 2021.

146. Bertoldo MJ, Listijono DR, Ho WHJ, Riepsamen AH, Goss DM, Richani D, Wu LE. NAD⁺ repletion rescues female fertility during reproductive aging. *Cell Reports*, 2020, 30: 1670-1681.
147. Mouchiroud L, Houtkooper RH, Moullan N, Katsyuba E, Ryu D, Cantó C, Auwerx J. The NAD⁺/sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell*, 2013, 154: 430-441.
148. Yamamoto T, Byun J, Zhai P, Ikeda Y, Oka S, Sadoshima J. Nicotinamide mononucleotide, an intermediate of NAD⁺ synthesis, protects the heart from ischemia and reperfusion. *PloS one*, 2014, 9: e98972.
149. Long AN, Owens K, Schlappal AE, Kristian T, Fishman PS, Schuh RA. Effect of nicotinamide mononucleotide on brain mitochondrial respiratory deficits in an Alzheimer's disease-relevant murine model. *BMC Neurology*, 2015, 15: 1-14.
150. Mehmel M, Jovanović N, Spitz U. Nicotinamide riboside—the current state of research and therapeutic uses. *Nutrients*, 2020, 12: 1616.
151. Deckardt K, Weber I, Kaspers U, Hellwig J, Tennekes H, van Ravenzwaay B. The effects of inhalation anaesthetics on common clinical pathology parameters in laboratory rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45: 1709-1718.
152. Luo LL, Huang J, Fu YC, Xu JJ, Qian YS. Effects of tea polyphenols on ovarian development in rats. *Journal of Endocrinological Investigation*, 2008, 31: 1110-1118.
153. Liu WJ, Zhang XM, Wang N, Zhou XL, Fu YC, Luo LL. Calorie restriction inhibits ovarian follicle development and follicle loss through activating SIRT1 signaling in mice. *European Journal of Medical Research*, 2015, 20: 1-8.

154. Park MJ, Han SE, Kim HJ, Choi HJ, Ha KT, Yang SW, Joo BS. Paeonia lactiflora improves ovarian function and oocyte quality in aged female mice. *Animal Reproduction*, 2020, 17.
155. Cruz G, Fernandois D, Paredes AH. Ovarian function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation. *Reproduction*, 2017, 153: R59-R68.
156. Li S, Liu M, Ma H, Jin Q, Ma Y, Wang C, Dai Y. Ameliorative effect of recombinant human lactoferrin on the premature ovarian failure in rats after cyclophosphamide treatments. *Journal of Ovarian Research*, 2021, 14: 1-18.
157. McTavish KJ, Jimenez M, Walters KA, Spaliviero J, Groome NP, Themmen AP, Allan CM. Rising follicle-stimulating hormone levels with age accelerate female reproductive failure. *Endocrinology*, 2007, 148: 4432-4439.
158. Cantó C, Houtkooper RH, Pirinen E, Youn DY, Oosterveer MH, Cen Y, Auwerx J. The NAD⁺ precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metabolism*, 2012, 15: 838-847.
159. Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Schwartz J, Rodgers RJ. Development of the mammalian ovary and follicles. In *The ovary*, Academic Press, 2019: 71-82.
160. Ferré P, Otsuki J, Takayama O, Motohashi H, Wakai T, Nakatsuka M, Funahashi H. 103 The Tunica Albuginea Increases in Thickness and Density Correlatively with the Age of the Patient in Human Ovaries. *Reproduction, Fertility and Development*, 2018, 30: 191-191.
161. Ferré-Pujol P, Otsuki J, Funahashi H, Nakatsuka M. The Thickness and Density of the Ovarian Tunica Albuginea Increases with Age in Transgender Patients. *Reproductive Sciences*, 2021, 28: 1339-1346.

162. Acuña E, Fornes R, Fernandois D, Garrido MP, Greiner M, Lara HE, Paredes AH. Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009, 7: 1-13.
163. Meng L, Jan SZ, Hamer G, van Pelt AM, van der Stelt I, Keijer J, Teerds KJ. Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biology of reproduction*, 2018, 99: 853-863.
164. Beg MA, Bergfelt DR. Folliculogenesis. *Equine reproduction, Volume 2*, 2011, (Ed. 2), 2009-2019.
165. Baerwald AR, Adams GP, Pierson RA. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human reproduction update*, 2012, 18: 73-91.
166. Kuyucu Y, Özgül TAP. Oosit Olgunlaşma Süreci ve Düzenleyici Faktörler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 2009, 18: 227-240.
167. Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB. Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, 2000, 63: 1245-1252.
168. Lin P, Rui R. Effects of follicular size and FSH on granulosa cell apoptosis and atresia in porcine antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 2010, 77: 670-678.
169. Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, 2012, 58: 44-50.
170. Şükür YE, Kıvançlı İB, Özmen B. Ovarian aging and premature ovarian failure. *Journal of the Turkish German Gynecological Association*, 2014, 15: 190.
171. Steger RW, Peluso JJ. Effects of age on hormone levels and in vitro steroidogenesis by rat ovary and adrenal. *Experimental Aging Research*, 1982, 8: 203-208.

172. Gruenewald DA, Naai MA, Marck BT, Matsumoto AM. Age-related decrease in hypothalamic gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression, but not pituitary responsiveness to gnrh, in the male brown norway rat. *Journal of Andrology*, 2000, 21: 2-84.
173. Racoubian E, Aimagambetova G, Finan RR, Almawi WY. Age-dependent changes in anti-Müllerian hormone levels in Lebanese females: correlation with basal FSH and LH levels and LH/FSH ratio: a cross-sectional study. *BMC Women's Health*, 2020, 20: 1-6.
174. Alsafi WG. The Correlation Between Female Age and Ovarian Reserve Biomarkers (FSH & AMH) and Its' Effect on The Response to Controlled Ovarian Hyperstimulation (COS) and Pregnancy Rate Following Intracytoplasm sperm injection (ICSI). *Eastern Journal of Medicine*, 2021, 26: 555-560.
175. Saadia Z. Follicle stimulating hormone (LH: FSH) ratio in polycystic ovary syndrome (PCOS)-obese vs. Non-obese women. *Medical Archives*, 2020, 74: 289.
176. Hehenkamp WJ, Looman CW, Themmen AP, de Jong FH, Te Velde ER, Broekmans FJ. Anti-Mullerian hormone levels in the spontaneous menstrual cycle do not show substantial fluctuation. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, 91: 4057-4063.
177. Streuli I, Fraisse T, Pillet C, Ibecheole V, Bischof P, De Ziegler D. Serum antimüllerian hormone levels remain stable throughout the menstrual cycle and after oral or vaginal administration of synthetic sex steroids. *Fertility and sterility*, 2008, 90: 395-400.
178. Depmann M, Eijkemans MJC, Broer SL, Scheffer GJ, Van Rooij IAJ, Laven JSE, Broekmans FJM. Does anti-Müllerian hormone predict menopause in the general

- population? Results of a prospective ongoing cohort study. *Human Reproduction*, 2016, 31: 1579-1587.
179. Lee TH, Liu CH, Huang CC, Hsieh KC, Lin PM, Lee MS. Impact of female age and male infertility on ovarian reserve markers to predict outcome of assisted reproduction technology cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2009, 7: 1-10.
180. Mishra P, Carelli V, Manfredi G, Chan DC. Proteolytic cleavage of Opa1 stimulates mitochondrial inner membrane fusion and couples fusion to oxidative phosphorylation. *Cell Metabolism*, 2014, 19: 630-641.
181. Choi SY, Huang P, Jenkins GM, Chan DC, Schiller J, Frohman MA. A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nature Cell Biology*, 2006, 8: 1255-1262.
182. Chang CR, Blackstone C. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Annals of the new York Academy of Sciences*, 2010, 1201: 34-39.
183. Zhang Z, Liu L, Wu S, Xing D. Drp1, Mff, Fis1, and MiD51 are coordinated to mediate mitochondrial fission during UV irradiation-induced apoptosis. *The FASEB Journal*, 2016, 30: 466-476.
184. Grabowska W, Sikora E, Bielak-Zmijewska A. Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. *Biogerontology*, 2017, 18: 447-476.
185. Braidy N, Jayasena T, Poljak A, Sachdev PS. Sirtuins in cognitive ageing and Alzheimer's disease. *Current Opinion in Psychiatry*, 2012, 25: 226-230.
186. Pallàs M, Verdaguer E, Tajés M, Gutierrez-Cuesta J, Camins A. Modulation of sirtuins: new targets for antiageing. *Recent Patents on CNS Drug Discovery (Discontinued)*, 2008, 3: 61-69.

187. Luo LL, Chen XC, Fu YC, Xu JJ, Li L, Lin XH, Zhang XM. The effects of caloric restriction and a high-fat diet on ovarian lifespan and the expression of SIRT1 and SIRT6 proteins in rats. *Aging Clinical and Experimental Research*, 2012, 24: 125-133.
188. Zhang XM, Li L, Xu JJ, Wang N, Liu WJ, Lin XH, Luo LL. Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression. *Gene*, 2013, 523: 82-87.
189. Tatone C, Di Emidio G, Vitti M, Di Carlo M, Santini S, D'Alessandro AM, Amicarelli F. Sirtuin functions in female fertility: possible role in oxidative stress and aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015.
190. Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Galano A, Jou MJ, Acuna-Castroviejo D. Melatonin mitigates mitochondrial meltdown: interactions with SIRT3. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19: 2439.
191. Iljas JD, Wei Z, Homer HA. Sirt1 sustains female fertility by slowing age-related decline in oocyte quality required for post-fertilization embryo development. *Aging Cell*, 2020, 19: e13204.
192. Wang N, Luo LL, Xu JJ, Xu MY, Zhang XM, Zhou XL, Fu YC. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. *Metabolism*, 2014, 63: 94-103.
193. Imai SI, Guarente L. NAD⁺ and sirtuins in aging and disease. *Trends in cell biology*, 2014, 24: 464-471.
194. Johnson S, Imai SI. NAD⁺ biosynthesis, aging, and disease. *F1000Research*, 2018, 7.

195. Bonkowski MS, Sinclair DA. Slowing ageing by design: the rise of NAD⁺ and sirtuin-activating compounds. *Nature reviews Molecular Cell Biology*, 2016, 17: 679-690.



EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Graduate School of Health Sciences

ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU¹

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Nazlı Pınar ARSLAN
Öğrencinin Numarası	
Ana Bilim Dalı	Histoloji ve Embriyoloji
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 0	% 15
II. Genel Bilgiler	% 13	% 35
III. Materyal ve Metod	% 27	% 35
IV. Bulgular	% 8	% 15
V. Tartışma	% 4	% 20

Not: Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

¹ Bu form bilgisayar ortamında doldurulmalı, çıktısı imzalanıp Tez Savunması Jüri Öneri Formu'yla birlikte Ana Bilim Dalı Başkanlığı aracılığıyla ÜBYS üzerinden Enstitüye iletilmelidir.

EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük

Sayı : E-75296309-050.01.04-2100111196
Konu : HADYEK Kararı.

20.04.2021

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 06.04.2021 tarihli ve 42190979-050.01.04-E.2100099091 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 12.04.2021 tarihli ve 3 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 92 no'lu kararı ile sözkonusu doktora tez çalışmasında değişiklik yapılarak yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuvarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü'nün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nın Başkanlığınıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

TOPLANTI TARİHİ : 12.04.2021

TOPLANTI SAYISI : 3

KARAR N0 92: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Osman Nuri KELEŞ'in yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuarlarında yürütülecek olan "**Nikotinamid Mononükleotid (NMN) ve Nikotiamid Ribozidin (NR) İle Mitokondriyal Stres İnhibisyonunun Orta Yaşlı Sıçanlarda Anovulasyon Üzerine Etkilerinin Araştırılması**" isimli doktora tez çalışmasındaki değişiklik ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 06.04.2021 tarihli ve 42190979-050.01.04-E.2100099091 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen doktora tez çalışmasında değişiklik yapılarak yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, taahhütname hükümleri gereğince çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesine, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

