



**TC  
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ YAŞ GRUPLARINDAKİ SIÇAN OVARYUMLARINDA  
ANTİ MÜLLERİAN HORMON VE İNHİBİN B EKSPRESYONUNUN  
OVARYUM YAPISI VE FOLLİKÜLOGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Gizem SÖYLER**

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

**Ağustos 2017**

**BOLU**





**TC  
ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ÇEŞİTLİ YAŞ GRUPLARINDAKİ SIÇAN OVARYUMLARINDA  
ANTİ MÜLLERİAN HORMON VE İNHİBİN-B EKSPRESYONUNUN  
OVARYUM YAPISI VE FOLLİKÜLOGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ**

**Gizem SÖYLER**

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

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Aysel KÜKNER**

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje Numarası: 2016.08.03.1080)

**Ağustos 2017**

**BOLU**

**Abant İzzet Baysal Üniversitesi**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne**

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği / oy çokluğu ile .....  
..... Anabilim Dalında Yüksek Lisans / Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

(Unvanı, Adı ve Soyadı)*	(imza) .....
(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)	
(Ünvanı, Adı ve Soyadı)**	(imza) .....
(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)	
(Unvanı, Adı ve Soyadı)	(imza) .....
(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)	
(Unvanı, Adı ve Soyadı)	(imza) .....
(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)	
(Unvanı, Adı ve Soyadı)	(imza).....
(Anabilim Dalı, Üniversite Adı)	

Tarih\*\*\*:...../...../.....

Bu tez ile AİBÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu  
.....\*\*\*\*'nın Yüksek Lisans / Doktora derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. Erol AYZ	(imza).....
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü	

- \* Jüri Başkanının adı yazılmalıdır.
- \*\* Tez danışmanın adı yazılmalıdır.
- \*\*\* Savunma tarihi yazılmalıdır.
- \*\*\*\*Öğrencinin adı, soyadı yazılmalıdır.

## ÖZET

### ÇEŞİTLİ YAŞ GRUPLARINDAKİ SIÇAN OVARYUMLARINDA ANTI-MÜLLERIAN HORMON VE İNHİBİN-B EKSPRESYONUNUN OVARYUM YAPISI VE FOLİKÜLOGENESİS ÜZERİNE ETKİLERİ

Folikül Stimüle Edici Hormon (FSH) ekspresyonu ile birlikte ovaryumlardaki folliküller gelişmeye başlar. Primordiyal follikülleri oluşturan pre-granüloza hücreleri, granüloza hücrelerine dönüşerek primer follikülleri oluştururlar. Oosit gelişiminden sorumlu granüloza hücreleri, gerekli östradiol, progesteron, inhibin-B ve Anti Müllerian Hormon (AMH) gibi hormonları sentezlemekle görevlidirler.

AMH, follikül gelişimi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Puberteden itibaren devam eden follikülogenezde primer folliküllerden salgılanmaya başlayan AMH, granüloza hücrelerinin çoğalarak follikül boyutunu artırmasında rol oynar. Aynı zamanda AMH, gelişmekte olan küçük folliküller için daha uzun yaşamalarını sağlayan bir faktördür. FSH'ü baskılayarak erken menopoza girilmesini engeller. Bu yüzden, yaygın olarak ovaryum rezervini ve ovaryum yaşını belirlemede kullanılır. AMH ekspresyonu pubertede en üst seviyeye ulaşır ve menopozdan itibaren AMH miktarı ölçülemez duruma gelir. AMH'nun etkilerinden biri de aromataz aktivasyonunu baskılaması ve dominant follikül seçiminde rol almasıdır. Anti-müllerian hormon ile birlikte inhibin-B ekspresyonu da follikül gelişimi için oldukça önemlidir. Granüloza hücrelerinden salgılanan inhibin-B, FSH'nun düzenlenmesinde ve follikül çapının belirlenmesinde görev alır.

Bu çalışma sonucunda serum AMH ve INHB hormon miktarının yaşa bağlı değişiklik gösterdiği, follikül gelişimi üzerinde bir etkiye sahip olduğu, ovaryum rezervini ile gelişen follikül sayısını belirlemede ve menopoz yaşını tayin etmede kullanılabileceği gözlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-Müllerian Hormon, İnhibin-B, Ovaryum

## **ABSTRACT**

### **EFFECTS OF ANTI-MÜLLERIAN HORMONE AND INHIBIN-B EXPRESSION ON OVARIUM MORPHOLOGY AND FOLLICULOGENESIS IN DIFFERENT AGE GROUPS OF FEMALE RATS**

Ovarian follicles begin growing with the stimulation of Follicle Stimulation Hormone (FSH). Pregranulosa cells which produce primordial follicles, turn to granulosa cells and form primer follicles. Granulosa cells responsible for synthesizing of different types of hormones like estradiol, progesteron, inhibin-B, and antimüllerian hormone (AMH) for evaluation of oocytes.

Anti-Müllerian Hormon has an important role for evaluation of the follicles. AMH is synthesised by primer follicles since puberty, and provide to grow of granulosa cells into increase the follicle size. Moreover, AMH repress the FSH activity and restricts entry early menopause. Therefore, AMH is an important factor for allowing the developing small follicles to live longer. AMH expression reaches the highest level in puberty and gets uncountable level in serum with menopause. Also, AMH repress aromatase activity and take a role in dominant follicle selection. Inhibin B expression is also has an important role like AMH in follicle evaluation. Inhibin B is synthesized by granulosa cells, take place in the regulation of FSH and determining diameter of the follicles.

In conclusion, serum AMH and inhibin-B hormones take place in folliculogenesis. Quantity of these hormones can be used to define ovarian reserve and developing follicle amount in ovaries, and also determine menopause age of female individuals.

**Keywords:** Anti-Müllerian Hormone, Inhibin-B, Ovary

## TEŞEKKÜR

Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı yüksek lisans eğitimim boyunca her anlamda ve her ihtiyaç duyulduğu vakit desteklerini eksik etmeyen tez danışmanım ve değerli hocam Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Aysel KÜKNER'e saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı üyesi Yrd. Doç. Dr. Tülin FIRAT hocama çok teşekkür ederim.

Projemi destekleyen Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi'ne, Biyokimya Anabilim Dalı Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Güler BUĞDAYCI, Anabilim Dalı Araştırma Görevlileri Dr. Hamdi Oğuzman ve Neslihan Yüce'ye, deney süresince yardımlarını esirgemeyen Deney Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi ve Patoloji Anabilim Dalı çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Tezin neredeyse her aşamasında yardımına koşan sevgili bölüm arkadaşlarım Cemre Nur BALCI, Hande YILMAZ ve Gizem DEDE'ye ve diğer bölüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm yaşamım ve eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini eksik etmeyen her kararımın arkasında duran değerli aileme çok teşekkür ederim.

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar.....	vi
ŞEKİLLER.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xi
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>4</b>
2.1. Ovaryum Anatomisi.....	4
2.2. Ovaryum Embriyolojisi ve Follikül Gelişimi.....	5
2.3. Ovaryum Histolojisi.....	6
2.3.1. Ovaryan folliküller ve follikülogenezis.....	7
2.3.1.1. Primordiyal Folliküller.....	7
2.3.1.2. Gelişmekte olan folliküller.....	8
2.3.1.3. Gelişmiş folliküller.....	9
2.3.1.4. Atretik folliküller.....	10
2.4. Ovulasyon.....	10
2.7. Ovaryum rezervi.....	12
2.8. Mentrual Siklus.....	13
2.9. Sıçanlarda Östrus Siklusu.....	14
2.10. Anti-Müllerian Hormon.....	19
2.11. İnhibin-B.....	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>23</b>
3.1. Deney Hayvanları Bakımı ve Gruplandırma.....	23
3.2. Östrus Siklusu Değerlendirme.....	23
3.3. Doku örneklerinin toplanması.....	24
3.4. Histolojik Takip.....	24
3.5. Işık Mikroskopik Boyamalar.....	25

3.5.1. Hematoksilen ve eozin boyama .....	25
3.5.2. Mosson trikrom boyama .....	26
3.5.3. Periyodik asit schiff boyama .....	27
3.5.4. İmmünohistokimyasal boyamalar .....	28
3.5.5. Ovaryum dokusunun histolojik değerlendirmesi .....	29
3.6. Biyokimyasal Analiz .....	30
3.7. İstatistiksel Hesaplama .....	30
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>31</b>
4.1. Biyokimyasal Sonuçlar .....	31
4.2. Hayvan ve Ovaryum Ağırlıkları .....	37
4.3. Follikül Sayımı .....	40
4.4. İmmünohistokimyasal Anti-Müllerian Hormon Değerlendirmesi .....	51
4.5. TUNEL Boyama Değerlendirmesi .....	56
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>64</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....</b>	<b>71</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>73</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>81</b>

## TABLÖLAR

Tablo 4.1: AMH, INHB, FSH, E2 ve Testosteron hormonlarının serum miktarları. (Ortalama değer $\pm$ Standart sapma).....	32
Tablo 4.2: Serum AMH hormon miktarının diğer hormonlarla ilişkisi. ....	32
Tablo 4.3: Serum INHB miktarının diğer hormon miktarları ile karşılaştırılması. ...	32
Tablo 4.4: Serum AMH, INHB miktarları ile hayvan ve ovaryum ağırlıklarının gruplara göre dağılımı. (Ortalama $\pm$ Standart Sapma).....	37
Tablo 4.5: Serum AMH, INHB miktarları ile gelişen ve toplam follikül sayısının gruplara göre dağılımı. Ortalama $\pm$ Standart Sapma.....	47
Tablo 4.6: Serum AMH ve INHB miktarlarının ovaryum follikül sayıları ile karşılaştırılması. ....	47

## ŞEKİLLER

Şekil 2.1.: Ovaryum anatomisi. Kaynak: Drake RL, Vogl AW, Mitchell A, Tibbitts R, Richardson P, Gray's Atlas of Anatomy, Elsevier, Churchill Livingstone. Copyright 2008. ....	5
Şekil 2.2.: Ovaryum histolojisi. Kaynak: Gartner LP, Hiatt JL, Color Atlas of Histology, 3. Baskı Baltimore, Lippincott Williams& Wilkins, 2000, sayfa 342. ....	7
Şekil 2.3: Follikülogenez. Kaynak: Ross, P. Histology; A Text and Atlas. 7. Baskı sf 836. Copyright 2016. ....	12
Şekil 2.4: Menstrual Siklus. Kaynak: Greys anatomy 41. Baskı sf 1307. Copyright 2016.....	14
Şekil 2.5: Proöstrus Dönemi vajinal simir örneği. Yoğun miktarda epitel hücre (E) döküntüsü görülmektedir. 100x büyütmede, herhangi bir boyama uygulanmadan gözlendi.....	15
Şekil 2.6: Östrus Dönemi vajinal simir görünümü. 100x büyültmede.....	16
Şekil 2.7: Metaöstrus Dönemi vajinal simir görünümü. 100x büyültmede. ....	17
Şekil 2.8: Diöstrus Dönemi vajinal simir görünümü. 100x büyültme. ....	18
Şekil 2.9: Anti-Müllerian Hormon ve follikülogenez. Kaynak: Garcia A., Grynnerup A., Lindhard A., Sorensen S. The role of anti-Müllerian hormone in female fertility and infertility-an overview. 2012 91:1252-1260. ....	20
Şekil 4.1: Deney gruplarına ait serum AMH miktarları.....	33
Şekil 4.2: Serum AMH miktarının yaşa bağlı dağılımı. ....	33
Şekil 4.3: Deney gruplarına ait serum INHB miktarları. ....	34
Şekil 4.4: Serum INHB miktarının yaşa bağlı dağılımı. ....	34
Şekil 4.5: Serum FSH miktarının yaşa bağlı dağılımı. ....	35
Şekil 4.6: Serum östradiol miktarının yaşa bağlı dağılımı.....	35
Şekil 4.7: Serum testosteron miktarının yaşa bağlı dağılımı.....	36
Şekil 4.8: Hayvan ağırlıklarının yaşa bağlı dağılımı.....	38
Şekil 4.9: Ovaryum ağırlıklarının yaşa bağlı dağılımı. ....	38
Şekil 4.10: Serum AMH miktarı ile hayvan ağırlıkları.....	39
Şekil 4.11: Serum INHB miktarı ile hayvan ağırlıkları arasında. ....	39

Şekil 4.12.: Prepubertal döneme ait sıçan ovariyumu. Diğer gruplara kıyasla daha yoğun miktarda gelişen follikül (ok ucu) görülmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 20x büyültme. ....	41
Şekil 4.13: Prepubertal döneme ait sıçan ovariyumunda atretik folliküller (AF), camsi membran (beyaz ok) ve apoptotik cisimcikler (siyah ok) görülmektedir. PAS boyaması. 200x büyültme. ....	41
Şekil 4.15: Aktif üreme dönemine ait sıçan ovaryumlarında preantral follikül görülmektedir (ok ucu). Hematoksilen Eozin boyama 200x büyütme. ....	42
Şekil 4.14: Prepubertal döneme ait ovariyumda çok katlı kübik hücrelerden oluşan primer follikül görülmektedir (ok ucu). Hematoksilen Eozin boyama 200x büyütme. ....	42
Şekil 4.16: Aktif üreme dönemine ait sıçan ovariyumu. Gelişen folliküllerle (ok ucu) birlikte korpus luteum yapıları (KL) gözlenmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 20x büyültme.....	43
Şekil 4.17.: Aktif üreme dönemine ait tek katlı yassı hücrelerden oluşan primordiyal folliküller (ok ucu) görülmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 200x büyütme. ....	43
Şekil 4.18: Aktif üreme dönemine ait tek katlı kübik hücrelerden oluşan primer follikül (ok ucu) görülmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 200x büyütme.....	44
Şekil 4.19.: Aktif üreme dönemine ait ovariyumda sekonder (antral) follikül görülmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 200x büyültme.....	44
Şekil 4.20.: Aktif üreme dönemine ait ovariyumda tersiyer follikül görülmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 100x büyültme. ....	45
Şekil 4.21.: Menopoz dönemine ait sıçan ovariyumu. Az miktarda follikül (ok ucu) ve yoğun miktarda korpus luteum (KL) yapıları gözlenmektedir. HE boyama 20x büyültme.....	45
Şekil 4.22: Menopoz dönemine ait sıçan ovariyumu. Gelişen follikül siyah ok, primordiyal follikül beyaz ok), korpus luteum (KL) yapıları ve stroma içerisinde dağılmış lüteal hücreler (L) görülmektedir. Masson Trikrom boyama 40x büyültme. ....	46
Şekil 4.23: Primordiyal follikül sayılarının yaşa bağlı dağılımı. ....	48
Şekil 4.24: Gelişen follikül sayılarının yaşa bağlı dağılımı. ....	48

Şekil 4.25: Serum AMH miktarı ile primordiyal sayıları arasındaki farkın gruplara göre dağılımı. ....	49
Şekil 4.26: Serum AMH miktarı ile gelişen follikül sayıları arasındaki farkın gruplara göre dağılımı. ....	49
Şekil 4.27: Serum INHB miktarı ile primordiyal sayıları arasındaki farkın gruplara göre dağılımı. ....	50
Şekil 4.28: Serum INHB miktarı ile gelişen follikül sayıları arasındaki farkın gruplara göre dağılımı. ....	50
Şekil 4.29.: Prepubertal dönem sıçan ovaryumunda farklı follikül yapılarında AMH ekspresyonu. primordiyal (siyah ok), primer (beyaz ok), sekonder(SF), atretik (A) follikül, korpus luteum (KL). 100x büyültme.....	51
Şekil 4.30: Prepubertal döneme ait sıçan ovaryumunda tek katlı follikül hücreli primer follikül (ok ucu) ve çok katlı follikül hücreli primer follikül yapısında AMH ekspresyonu görülmekte. Teka interna ve eksterna hücreleri (T). 200x büyültme....	52
Şekil 4.31: Prepubertal döneme ait sıçan ovaryumunda primordial folliküllerde AMH ekspresyonunun olmadığı görülmekte (ok ucu). 400x büyültme.....	52
Şekil 4.32.: Prepubertal döneme ait sıçan ovaryumunda. çok katlı primer follikül hücrelerinde AMH ekspresyonu görülmektedir. 400x büyültme.....	53
Şekil 4.33: Prepubertal döneme ait sıçan ovaryumunda tersiyer follikül görülmektedir. Mural granüloza (beyaz ok), kumulus hücreleri (siyah ok) 100x büyültme.....	53
Şekil 4.34: Aktif üreme dönemine ait sıçan ovaryumundaki primer follikül hücrelerinde AMH ekspresyonu görülmektedir. 400x büyültme.....	54
Şekil 4.35: Aktif üreme dönemine ait sıçan ovaryumunda sekonder follikül hücrelerinde AMH ekspresyonu görülmektedir. 200x büyültme.....	54
Şekil 4.36: Premenopoz ve menopoz dönemine ait sıçan ovaryumunda. preantral follikül hücrelerinde AMH ekspresyonu görülmektedir. 400x büyültme.....	55
Şekil 4.37: Premenopoz-menopoz dönemi sıçan ovaryumu negatif kontrol. 40x büyültme.....	56
Şekil 4.38: Premenopoz-menopoz dönemi sıçan ovaryumu pozitif kontrol. 40x büyültme.....	57

Şekil 4.39: Premenopoz-menopoz dönemi sıçan ovaryumu. Primer (beyaz ok), tersiyer follükül (siyah ok) ve korpus luteum (KL) görülmektedir. 100x büyültme. .	57
Şekil 4.40: Premenopoz-menopoz dönemi sıçan ovaryumu. Sekonder follükül görülmektedir. 100x büyültme. ....	58
Şekil 4.41: Premenopoz-menopoz dönemi sıçan ovaryumu. Çok katlı primer follükül görülmektedir. 400x büyültme. ....	58
Şekil 4.42: Aktif üreme dönemi sıçan ovaryumu. Gelişen follüküller (ok), atretik follükül (A) ve ovaryum stroması görülmektedir. 100x büyültme. ....	59
Şekil 4.43: Aktif üreme dönemi sıçan ovaryumu. Çok katlı primer ve sekonder follükül, teka interne-eksterna hücreleri ve ovaryum stroması görülmektedir. 200x büyültme. ....	59
Şekil 4.44: Aktif üreme dönemi sıçan ovaryumu. Sekonder follüküller görülmektedir. 200x büyültme. ....	60
Şekil 4.45: Prepubertal dönem sıçan ovaryumu. Gelişen follüküller germinal epitel ve ovaryum stroması görülmektedir. 100x büyültme. ....	60
Şekil 4.46: Prepubertal dönem sıçan ovaryumu. Gelişen follüküller (ok), atretik follükül (A) ve ovaryum stroması (S) görülmektedir. 200x büyültme. ....	61
Şekil 4.47: Prepubertal dönem sıçan ovaryumu. Tersiyer follükül görülmektedir. 100x büyültme. ....	61
Şekil 4.48: Prepubertal dönem sıçan ovaryumu. Tersiyer follükül lümenindeki TUNEL pozitif hücreler (ok) ve teka interna ve eksterna tabakası (T) görülmektedir. 200x büyültme. ....	62
Şekil 4.49: Prepubertal dönem sıçan ovaryumu. Tersiyer follükülün bir kısmı görülmektedir. 400x büyültme. ....	62
Şekil 4.50: Prepubertal dönem sıçan ovaryumunda atretik follükül görülmektedir. Lümen içerisinde apoptotik cisimcikler bulunmaktadır. 400x büyültme. ....	63

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AMH:	Anti-Müllerian Hormon
DAB:	3,3'-Diaminobenzidine
E2:	Östradiol
ELISA:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FSH:	Folikül Stimüle Edici Hormon
H.E.:	Hematoksilen Eozin
INHB:	İnhibin-B
i.p.:	İntraperitoneal
KL:	Korpus Luteum
LH:	Lüteinleştirici Hormon
MIS:	Müllerian İnhibe Edici Madde
OMI:	Oosit Maturasyon İnhibitorü
PAS	Periyodik Asit Schiff
PBS:	Phosphate Buffer Saline
PMF:	Primordial Follikül
TGF- $\beta$ :	Transforme Edici Büyüme Faktörü Beta
TUNEL:	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling

## 1. GİRİŞ

Dişi embriyolarda oogenez prenatal dönemde başlar. Vitellüs kesesinden köken alan eşey hücreleri 6. haftada ovaryumlara ulaşır, oogonyumlar mitoz bölünmeler ile primer oositleri oluşturur (1). Doğuma çok az kala primer oositlerin tümü birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin sonunda baskılanır. Oosit gelişimi kaldığı yerden pubertede devam eder (2). Her menstrüal döngüde belirli sayıda follikül gelişmeye başlar ve bunlardan bir tanesi olgun folliküle dönüşür, içindeki sekonder oosit ovulasyon ile ovaryumlardan atılır (3). Oogenez vücutta salgılanan çeşitli hormonlarla düzenlenir. Hormonal etkileşim çerçevesinde follikül gelişimi, gonadotropin bağımlı ve gonadotropin bağımsız olmak üzere iki bölümde incelenir (4). Puberteye erişen bireyde hipotalamustan salgılanan Follikül Stimüle Edici Hormon (FSH) ovaryumlardaki follikülleri gelişmeleri için uyarır. Uyarı ile birlikte primordiyal follikülleri oluşturan tek katlı yassı haldeki pre-granüloza hücreleri, kübik hale gelerek granüloza hücrelerini ve primer follikülleri oluştururlar (5). Granüloza hücreleri, oositin gelişiminden sorumlu hücreler olup, oositin gelişimi için gerekli östradiol, progesteron, inhibin-B ve Anti Müllerian Hormon (AMH) gibi hormonsal faktörleri sentezlemekle yükümlüdürler (6).

Dimerik glikoprotein yapıda ve Transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) süper ailesinin bir üyesi olan AMH, follikül gelişimi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir. Puberteden itibaren primer folliküllerden salgılanmaya başlayan AMH, granüloza hücrelerinin çoğalarak follikül boyutunu artırmasında rol oynar. AMH ekspresyonu granüloza hücrelerinde otokrin etki yaratıp, hücreler üzerinde bulunan tip II reseptörlerine bağlanır ve hücre içerisindeki Smad proteinlerini aktive ederek gen ekspresyona sebep olur. Bu sayede granüloza hücreleri çoğalarak follikülün büyümesini sağlar (7). Aynı zamanda da AMH, FSH'ü baskılayarak primordiyal folliküllerin gelişimini durdurur. Bu olay primordiyal follikül havuzunu koruyarak erken menopoza girilmesini engeller (8). AMH salınım miktarı preantral ve antral folliküllerde en yüksek seviyeye ulaşır. 8mm'ye ulaşan antral folliküllerdeki AMH

seviyesi bu aşamadan sonra kademeli olarak düşüğe geçer (9). Preovulatuvar seviyede mural granüloza ve kümülüs ooforus olarak ikiye farklılaşan follikül hücrelerine bakıldı zaman; kümülüs ooforusta AMH sekresyonu devam ederken mural granüloza ve apoptoza giden atretik folliküllerde AMH sekresyonu gözlenmez (10). Normal bir bireyde ayda 6-12 follikül gelişmeye başlarken AMH eksikliği ovaryumlarda normal döngüde gelişenden çok daha fazla follikülün gelişmesine sebep olur, oosit dejenerasyonu ve folliküler atrezi daha fazla gözlenir (11). AMH gelişmekte olan küçük folliküller için daha uzun yaşamalarını sağlayan bir faktördür. Bu yüzden AMH, yaygın olarak ovaryum rezervini ve ovaryum yaşını belirlemede kullanılır (10, 12). Menstrüal siklus boyunca serumda AMH ekspresyonuna bakıldığı zaman salınım miktarında anlamlı bir farklılık gözlenmezken; yaşa bağlı değerlendirildiğinde ise doğumdan itibaren başlayan AMH ekspresyonu pubertede en üst seviyeye ulaşır ve menopozdan itibaren AMH miktarı ölçülemez duruma gelir (13, 14). Follikül sıvısında bakıldığında ise serumun aksine yaşlandıkça granüloza hücrelerinde AMH ekspresyonu artar (10). AMH'nun etkilerinden biri de aromataz aktivasyonunu baskılaması ve dominant follikül seçiminde rol almasıdır. FSH'na bağlı östrojen tiplerinden olan östradiolün ekspresyonu için gerekli olan aromataz sentezi AMH tarafından azaltılır ve bu durum Lüteinizan Hormon (LH) reseptör ekspresyonunu indirgeyerek tüm hücrelerin ovule olmasını engeller. Böylelikle FSH'na duyarlı tek bir oosit gelişmeye devam eder (15).

Anti-müllerian hormon ile birlikte inhibin-B ekspresyonu da follikül gelişimi için oldukça önemlidir. Dimerik protein hormonlarından olan İnhibin-B hem dişi hem erkek bireylerde endokrin düzenleyici olarak görev alır. Granüloza hücrelerinden salgılanan inhibin-B, özellikle FSH'nun düzenlenmesinde rol oynar (16). Bunun yanında inhibin-B follikül çapı ile de ilişkilidir. Lüteal fazla karşılaştırıldığı zaman, folliküler fazda inhibin-B'nin daha fazla salgılandığı, antral folliküllerdeki inhibin-B ekspresyonunun pre-ovulatuvar folliküllerde daha fazla olduğu görülür. 9-10mm çapındaki folliküllerde artışa geçen inhibin-B, 11-12mm'ye ulaşan folliküllerde azalmaya başlar (17, 18).

AMH ve İnhibin-B ekspresyonunun yaşa bağlı ovaryum yapısına ve follikülogeneze etki ettiği düşünülmektedir. Konu ile ilgili yapılan kaynak taramalarında ratlarda yapılmış histolojik çalışmaların çok az sayıda olduğu

görülmüştür. Bu çalışmada farklı yaş gruplarındaki ve proöstrus dönemindeki dişi ratların ovaryum ağırlıkları tartılıp, yapıları mikroskopik incelenecektir. Ovaryum rezervi ve kalitesini tanımlamak için folliküllerdeki AMH ekspresyonu immünohistokimyasal olarak incelenecektir. Biyokimyasal olarak serum AMH, FSH, inhibin-B, testosteron, östradiol düzeyleri ölçülecektir.



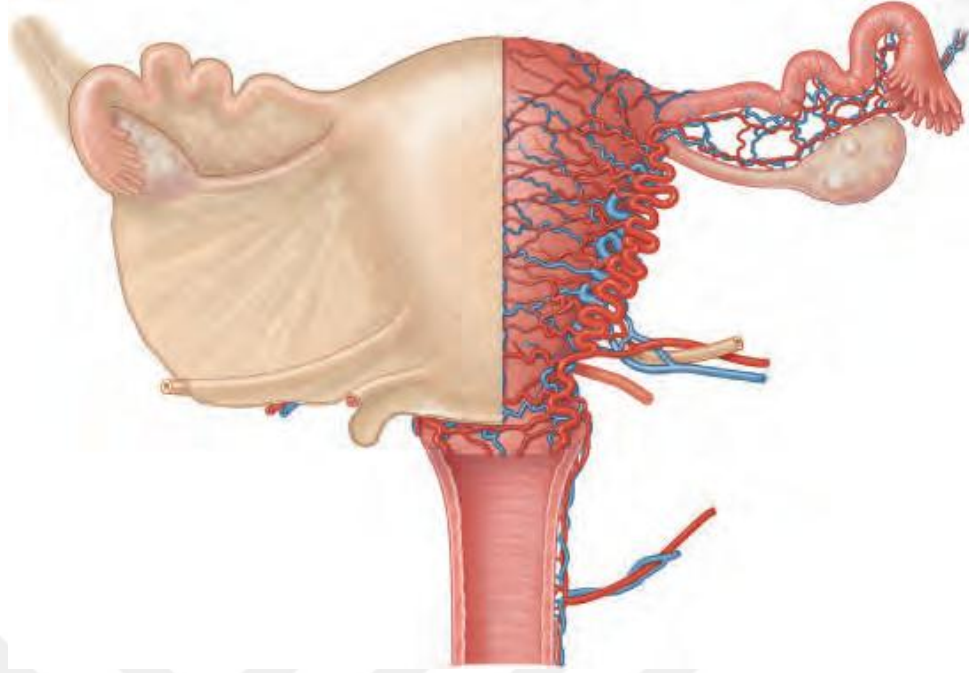
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Ovaryum Anatomisi

Dişi üreme sisteminin en fonksiyonel birimi olan ovaryumlar, fertilizasyon ve embriyonik gelişim için gerekli oosit üretimi ve steroid hormon salınımı görevlerini üstlenirler. Ovaryumlar, bilateral olarak pelvik duvarın lateralinde, uterusu yakın olacak şekilde pelvik kaviteye asılı olarak bulunurlar. Donuk beyaz renkte ve yoğun fibröz dokudan oluşurlar. Yeni doğanda  $1,3 \times 0,6 \times 0,4 \text{ cm}^3$  çapında bulunan ovaryumlar, ilk adetten (menarjdan) itibaren boyutları artarken son adet (menopoz) ile birlikte boyutları azalışa geçer. Olgun ve hamilelik geçirmemiş bir kadında ovaryum çapları  $4 \times 2 \times 3 \text{ cm}^3$  iken hamilelikte bu boyutlar iki katına kadar ulaşır. Ovaryumlar, lateralde pelvik duvara suspensor ligamanlarıyla, medialde de uterusu ovaryum ligamanlarıyla bağlanırlar. Ek destek olarak ovaryumlar anteriordan mezoovaryum (periton kıvrımı) ile broad ligamanının arkasına bağlanırlar (19).

Ovaryumun dış kısmını gelişimin farklı evrelerindeki oositleri içeren korteks ile merkezi kısmını stromal hücrelerin, kan damarlarının ve sinirlerin bulunduğu medulla oluşturur (20, 21).

Kan ve lenf damarları ile sinirler hilustan ovaryuma girer (22). Abdominal aortadan dallanan ovaryan arter suspensor ligamanından geçip broad ligamanının mezoovaryumundan ovaryum içerisine girer. Ovaryum venleri ise hilusta pleksus oluşturarak ovaryan ven ile kaynaşırlar. Mezoovaryum ve suspensor ligaman boyunca ilerleyen ovaryan venler sağda inferior vena cava, solda renal ven ile birleşirler (Şekil 2.1) (23).



**Şekil 2.1.: Ovaryum anatomisi. Kaynak: Drake RL, Vogl AW, Mitchell A, Tibbitts R, Richardson P, Gray's Atlas of Anatomy, Elsevier, Churchill Livingstone. Copyright 2008.**

## **2.2. Ovaryum Embriyolojisi ve Follikül Gelişimi**

Gonadlar, epitel ve altındaki mezenşimin artışıyla bir çift uzunlamasına gonadal şişkinlik olarak ortaya çıkar. Ovaryumlar primitif gonadların kortikal bölgesinden gelişir.

Primordiyal germ hücreleri fetal hayatın üçüncü haftasında yolk kesesi endotel hücrelerinin arasına yerleşir. Dördüncü haftada ameboid hareketlerle bağırsak mezenteri boyunca ilerlerler ve beşinci haftanın başında primitif gonadlara ulaşırlar (2). Radiks mezenterinin sağ ve sol gonad bölgelerine ulaşan primordiyal folliküller stroma içerisine yerleşirler (3). Primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaşamazsa dejenere olurlar. Aynı şekilde gonadların gelişimi için de primordiyal germ hücrelerinin gonadlara ulaşması gerekir (2, 24-26).

XX cinsiyet kromozomlarına sahip dişi embriyolarda östrojen varlığına, testosteron yokluğuna bağlı olarak ovaryum ve diğer dişi genital organların gelişimi başlar (27). Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara yerleşmesiyle genital sırttaki epitelyum hücreleri uyarılarak prolifer olmaya başlar ve primitif cinsiyet kordonlarını oluştururlar. Kordonlar alttaki mezenşim doku içine ilerler. Primitif

cinsiyet kordonları daha sonra düzensiz hücre kümelerine ayrılarak yerini vasküler bir stromaya, ovaryan medullaya bırakır (2).

Gonadlara ulaşan primordiyal germ hücreleri farklılaşarak oogonyumları oluştururlar. Ovaryum korteksinde 6 ve 28inci haftalar arası çok fazla mitotik bölünme sonucunda oogonyumların sayısı artar. 20.haftanın sonunda oogonyumların sayısı yaklaşık 7 milyona ulaşır. Oogonyumların mayoz bölünmeye girmesiyle primer oositler oluşur. Primitif cinsiyet kordonlarından farklılaşan hücreler tek katlı yassı epitel şeklinde oositlerin etrafını sarar ve primordiyal folliküller ortaya çıkar (2, 27). Gebeliğin yirminci haftasında gonadlar maksimum kapasitesine ulaşır (28). 20.-22. haftalarından sonra oogonyumların ve mayozda girmiş oositlerin büyük bir kısmı atreziye uğrar. Doğumda yaklaşık 1 milyon, pubertede yaklaşık 300-400 bin primordiyal follikül kalır. Bunlardan sadece 500 kadarı ovulasyon yoluyla ovaryum dışına atılabilme şansına sahiptir.

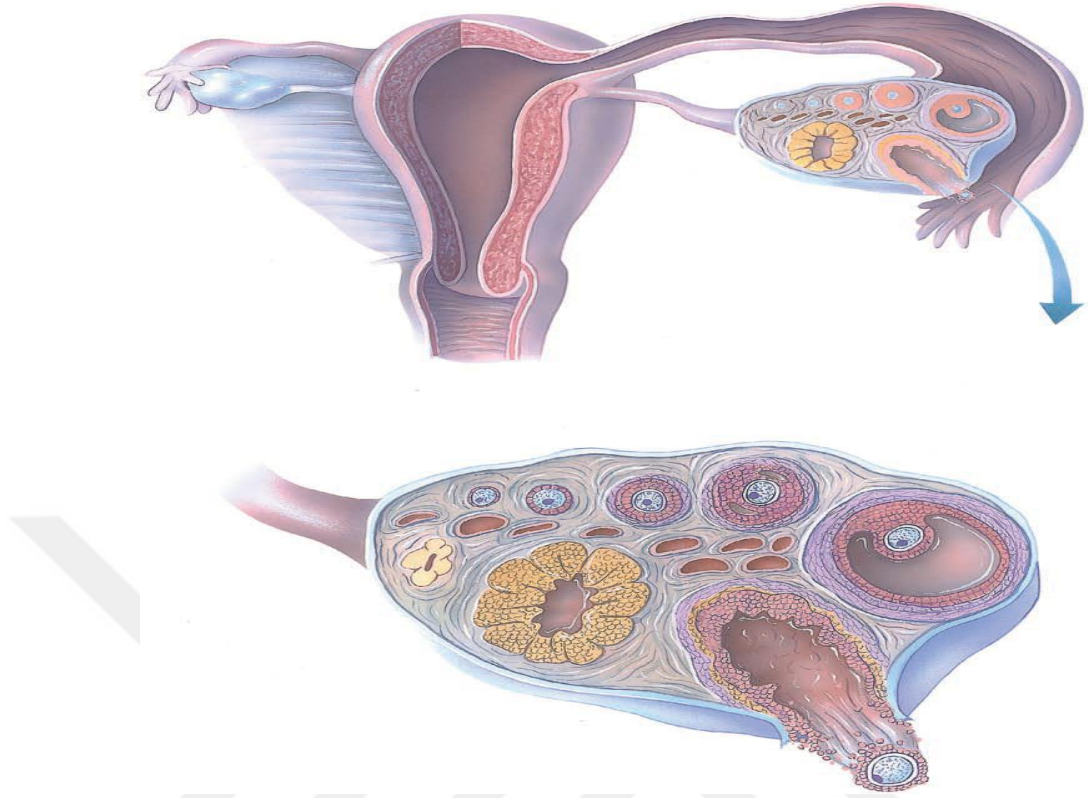
### **2.3. Ovaryum Histolojisi**

Ovaryumlar, pelvik kavitenin lateralinde uterusun her iki tarafında birer tane olacak şekilde yerleşmiş oval şekilli organlardır.

Ovaryumlar dışta korteks içte medulla olmak üzere iki bölüme ayrılır. Korteks, en dışta tek katlı yassıdan tek katlı kübik hücrelere kadar değişkenlik gösteren bir epitel (germinal epitelyum) ile sarıdır. Germinal epitel altında ince bir fibröz yapıdan oluşan tunika albuginea, korteksi bir bağ dokusu tabakası olarak çevreler. Ovaryumların korteks bölümü farklı dönemlerdeki folliküller ile atreziye uğrayan folliküller, korpus luteum ve korpus albikanslara ev sahipliği yapar. Bu yapıların dışında korteks yoğun bir hücreli stromadan oluşur (24).

Medulla gevşek bağ dokusundan oluşan merkezi bölümdür. Arter, ven, lenf damarları ve sinirleri barındırır. Medullada ovaryan arter, ovaryan ven ve sinir liflerinin giriş çıkış yaptığı hilus denilen bir açıklık bulunur. Ovaryum medullası dıştan hilusa kadar korteks ile sarıdır (Şekil 2.2) (29).

Dişi gametlerin üretilmesi, östrojen progesteron gibi steroid hormonların üretilmesi, üreme organlarının büyümesi ve sekonder seks karakterlerinin kazanılması ovaryumun görevleridir (30).



Şekil 2.2.: Ovaryum histolojisi. Kaynak: Gartner LP, Hiatt JL, Color Atlas of Histology, 3. Baskı Baltimore, Lippincott Williams& Wilkins, 2000, sayfa 342.

### 2.3.1. Ovaryan folliküller ve follikülogenezis

Follikül gelişim süreci follikülogenez olarak adlandırılır. Ovaryum korteksi içerisinde gerçekleşir. Follikülogenez fetal dönemde (gebeliğin 18-20.haftalarında) başlar, menopoz ile son bulur (Şekil 2.3) (31).

#### 2.3.1.1. Primordiyal Folliküller

Prenatal dönemde ovaryum korteksindeki hücreler farklılaşarak yassılaşır. Tek katlı yassı hücreler bir araya gelerek primer oositleri sarar ve primordiyal follikülleri oluştururlar. Bu tek katlı yassı hücreler follikül hücreleri veya pregranüloza hücreler olarak adlandırılır. Primordiyal folliküller, yaklaşık 25µm

çapındadır. Kortekste en fazla görülen follikül çeşididir ve gelişecek folliküllere kaynak oluşturan ovaryum yapılarıdır.

Fötal dönemde başlayan bu gelişim, primordiyal folliküllerin oluşumundan sonra oosit mayoz bölünmeye girer. Birinci mayoz bölünmenin profaz evresini tamamlar, follikül hücrelerinden salgılanan Oosit Maturasyon İntibitörü (OMİ) ile oosit ve follikül gelişimi puberteye kadar baskılanır ve bekleme dönemine girer. Bu bekleme seksüel hayatın sonuna kadar yaklaşık 40-50 yıl sürebilir (24).

### **2.3.1.2. Gelişmekte olan folliküller**

Puberteye erişen dişi bireyde hipotalamusun gonadotropin uyarımıyla hipofiz bezinden Follikül Stimüle Edici Faktör (FSH) salgılanmaya başlar. FSH ile mayoz bölünmede duraksayan belirli sayıdaki oosit gelişimine devam eder. Bu döngü düzenli olarak her ay yinelenir. Her siklik döngüde iki ovaryumdan bir tanesinde oogenez gerçekleşir ve her dönem primordiyal folliküllerin yaklaşık 5-20 kadarı gelişmeye başlar fakat hepsi ovulasyona ulaşamaz (3). Follikül hücreleri FSH uyarısı ile tek katlı yassı halden tek katlı kübik hale geçerler. Bu aşamada artık follikül hücreleri Granüloza hücreleri olarak da adlandırılır ve oluşan yapı tek tabakalı primer follikül adını alır. Boyutu yaklaşık 35µm çapındadır (32). Granüloza hücreleri soluk sitoplazmalı hücrelerdir. Çekirdekleri poligonal ve hiperkromatik yapıdadır (33).

Primer follikül hücreleri oositin salgılanan aktivin etkisi ile çoğalmaya devam eder ve follikül hücre katmanı tek katlıdan çok katlı bir yapıya geçer, buna çok katlı primer follikül denir. Granüloza hücreleri, oositin gelişiminden sorumlu hücreler olup, oositin gelişimi için gerekli östradiol, progesteron, inhibin-B ve Anti Müllerian Hormon (AMH) gibi birçok hormonal faktörü sentezlemekle yükümlüdürler (6). Aynı zamanda granüloza hücreleri ve oositin salgılanan glikoprotein yapıdaki parlak ve homojen zar oositin etrafını sarar zona pellusidayı oluşturur. Zona pellusida follikül hücreleri ile oosit arasında bir kılıf görevi görür. Follikül hücreleri sitoplazmik uzantılarla zonayı delerek oositin mikrovilluslarına dokunur, dokunulan yerde oluklu bağlantılar oluşarak follikül hücrelerinin oosit ile iletişimde kalması devam eder. Granüloza hücre zarında FSH reseptörleri çok sayıda bulunur. Ovaryum stromasındaki hücreler farklılaşarak folliküllerin etrafını çevreler.

Dıştaki fibröz teka eksterna, içteki vasküler teka interna olarak tanımlanır. Teka interna hücreleri poligonal şekilli olup çekirdekleri ovaldir ve sitoplazmalarında lipid damlacıkları vardır. Teka internadaki hücrelerden salgılanan androstenodion hormonu granüloza hücrelerinde aromataz enzimiyle östradiole çevrilir. Teka interna ve teka eksterna arasındaki sınır belirgin değildir (3, 24). Follikül içerisinde damar bulunmaz. Beslenmesini difüzyon yoluyla dışarıdan sağlar (3, 24, 33).

Granüloza hücre tabakası genişlemeye devam eder. Follikülün çapı genişler ve granüloza hücreleri 6-12 kata ulaştınca follikül içerisinde ufak düzensiz boşluklar oluşturmaya başlar. Boşlukların içi başlangıçta hücrelerin salgıladığı berrak renkte follikül sıvısı ile dolar. Daha sonra bu sıvı plazmadan elde edilmeye başlar. Sıvıda granüloza hücrelerinin salgıladığı östrojen, progesteron, anti-Müllerian hormon, inhibin B gibi oositin gelişimini etkileyen hormonlar bulunur. Bu folliküller preantral follikül olarak adlandırılır. Preantral dönemde follikül 40µm çapından 120µm'ye kadar ulaşır.

Folliküller çaplarını genişletmeye devam eder. Follikül içerisindeki boşluklar birleşerek antrum boşluğunu oluşturur. Bu durumda follikül artık antral (sekonder) follikül adını alır. Antrum sıvısı hialuronik asitten zengindir. Hialuronik asit daha fazla su tutulmasına ve follikül çapının daha da artmasına sebep olur. Antral follikülün başlangıcında follikül çapı 200µm'yi bulur. Bu aşamada gelişen folliküller arasından dominant follikül belirlenir (30, 34).

### **2.3.1.3. Gelişmiş folliküller**

Gelişmeye başlayan folliküllerden her ay sadece bir tanesi dominant olarak seçilir. Antral follikül büyümeye, antrum genişlemeye devam eder. Oosit, granüloza hücrelerinin oluşturduğu bir tepelik (ovaryum tepeciği, kümülüs ooforus) üzerine yerleşmiştir. Oosit çevresinde sadece birkaç katlı granüloza hücresi kalır. Bu hücreler korona radiata adını alır ve oosit ile bağlantı kompleksleri direkt ilişki halindedirler. Oosite yakın olan hücreler kümülüs ooforus adını alırken diğer dış kısımda kalan hücreler mural granüloza hücreleri adını alır. Oosit, korona radiata ile birlikte kümülüs ooforustan ayrılır, follikül sıvısı içinde yüzerek follikülün bir köşesine çekilir. Folliküller erişebilecekleri en geniş çaplara (18 – 20 mm) erişir ve boyutları

korteksten medullaya kadar uzanır. Follikül artık olgun (graaf) follikülü, tersiyer follikül adını alır.

Graaf folliküllerde FSH reseptörlerine az rastlanır. Hücre reseptörleri Lutein hormonu (LH) için farklılaşmış durumdadır. Follikül oositin olduğu bölgeden ovaryum yüzeyine doğru bir çıkıntı yapar. Bu çıkıntı stigma adını alır (24, 33).

#### **2.3.1.4. Atretik folliküller**

Dominant olarak seçilmeyen veya follikülogenez sırasında gelişimi durmuş folliküller atreziye uğrar. Atreziye uğrayan bu folliküller Atretik Follikül olarak adlandırılır. Folliküller, gelişimlerinin herhangi bir aşamasında atreziye uğrayabilir. Follikül hücrelerinin mitozu durur ve hücreler arası hidrolitik enzimler çoğalır ve hücreler apoptoza gider, follikül büzülür. Atretik folliküllerde parlak, kalın kıvrılmış membran (camsı membran), yapısı bozulmuş oosit ve follikül hücreleri ile lümende çok miktarda makrofaj bulunur (30, 33, 34).

#### **2.4. Ovulasyon**

Olgunlaşan graaf follikülü LH reseptörü bakımından zengindir. Granüloza hücrelerinden salgılanan östradiol ve FSH miktarındaki artış devam eder ve en yüksek seviyeye ulaşır. Oluşan FSH ve östradiol yükselişi yaklaşık 12-24 saat sonra hipofiz bezinden LH ekspresyonunu tetikler. Follikül gelişiminin 14-16. günde oluşan LH ekspresyonu bir anda zirveye ulaşır. LH salınımından sonra follikül sıvısı daha da artar, follikülün çapı 15-25mm'ye ulaşır. Gonadotropin etkisiyle follikül sıvısında ve granüloza hücrelerinde bulunan pazmojen aktivatör follikül içi plazminin artmasına ve buna bağlı olarak kollajenaz enziminin aktivasyonuna yol açar. Kollajenaz, follikül çeperindeki fibröz yapıyı zayıflatır. Graaf follikülünün teka tabakası ve tunika albugenia tabakası stigma bölgesinden LH etkisiyle bölgedeki proteolitik enzimlerce incelerek yırtılır. Sekonder oosit, zona pellusida, korona radiata ve bir miktar da follikül sıvısı ile birlikte periton boşluğuna atılır. Bu olay ovulasyon olarak adlandırılır (3, 27, 30, 33).

LH zirvesinden hemen önce oosit birinci mayoz bölünmesini tamamlar, ikinci mayoz girer. İkinci mayozun profazını tamamlar ve metafaz safhasında beklemeye girer. Bu aşamadan itibaren oosit ovum olarak adlandırılır. Ovulasyondan sonra uterin tüplere alınan ovum 24 saat içerisinde döllenmezse dejenere olur (3).

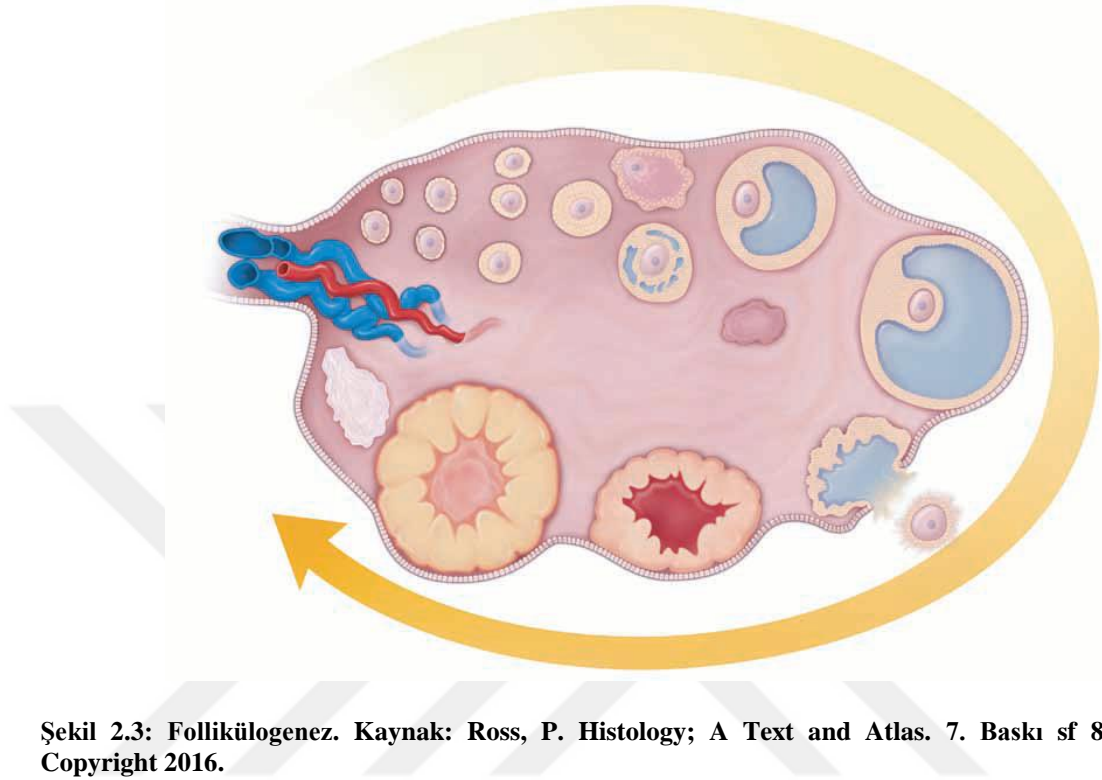
## **2.5. Korpus luteum**

Ovulasyon sırasında yırtılan folliküllerin bazal membranındaki teka interna tabakasının kılcıl damarlarından antrum içerisine kan sızar ve pıhtılaşır. Teka eksterna tabakasındaki düz kas hücrelerinin etkisiyle de follikül büzülür (33). İçi kanlı bu yapı korpus hemorojikum olarak adlandırılır. Devamında korpus hemorojikum içerisinde yeni kan damarları oluşur. Follikül hücreleri ve teka interna hücreleri farklılaşır, folliküler lütein hücreleri ve teka lütein hücrelerine dönüşürler. Hücreler, yağ damlacıkları ve lütein pigmenti ile dolar. Genişleyen yapı sarı bir renge dönüşür. Bu yapı korpus luteum adını alır (35). Folliküler lütein hücreleri poligonal şekilli, soluk renkte boyanan hücrelerdir. Heterokromatin çekirdeği ve belirgin çekirdekçiği vardır. Stipolazmalarında bol miktarda yağ damlacıkları bulunur. Korpus luteumun %80'ini oluşturur. Teka lütein hücreleri ise folliküler lütein hücrelerine göre daha küçük ve koyu boyanan hücrelerdir ve korpus luteumun %20'lik bir kısmını oluşturur (33). Korpus luteum hücreleri FSH ve LH salınımına bağlı olarak steroid (östrojen ve progesteron) salgılama görevini üstlenir. Progesteron ve östrojen, olası bir hamilelik için gebeliğin yaklaşık 10. haftasına kadar endometriyumun devamlılığını sağlamakla görevlidir (27). Döllenme olmaması durumunda korpus luteum ovulasyondan yaklaşık iki hafta sonra gerilemeye başlar (30).

## **2.6. Korpus albicans**

Herhangi bir gebelik oluşmazsa korpus luteumun devamlılığı için gerekli LH salgılanmaz ve korpus luteum geriler. Luteal hücreler apoptoz yolu ile yapısını kaybeder ve teka eksternadaki fibroblastlar kollajen sentezleyerek apoptoza uğrayan hücrelerin yerini stromal bağ dokusu ile doldurur. Oluşan bu beyaz renkli yapı

korpus albicans (beyaz cisim) adını alır. Zamanla küçülür fakat ovaryumdan kaybolmaz (27, 30, 33, 35).



Şekil 2.3: Follikülojeniz. Kaynak: Ross, P. Histology; A Text and Atlas. 7. Baskı sf 836. Copyright 2016.

## 2.7. Ovaryum rezervi

Ovaryum rezervi, herhangi bir dönemde ovaryumda kalan primordiyal ve gelişen folliküllerin miktarı ile var olan folliküllerdeki oosit kalitesidir. Amaç ovaryumun potansiyel kapasitesini belirlemektir (36). Yardımcı üreme tekniklerinin kullanımında ovaryum rezervinin bilinmesi gerekmektedir.

Ovaryum rezervini belirlemede, klinik bulgular (yaşa bağlı değerlendirme), biyokimyasal (FSH, AMH, İnhibin B, bazal östradiol miktarı) ve ultrason (ovaryum hacmi, antral follikül sayısını ölçme) gibi yöntemler kullanılır.

Föetal dönemde germ hücreleri ile stroma hücrelerinin oluşturduğu follikül hücreleri doğumda yaklaşık 1 milyon kadardır. Bu sayı menarje kadar azalır ve menarjda primordiyal follikül havuzunda yaklaşık 400bin follikül bulunur (20).

Yaşam boyunca folliküller primordiyal follikül havuzundan gelişen follikül havuzuna geçiş yapar, gelişen folliküllerin fazlalığı atreziye uğrayarak yok olur (31).

Oosit kaybı devamlı bir süreçtir ve oositlerin atreziye uğraması primer, sekonder ve antral aşamalarda gözlenir. Oosit kaybı yaklaşık 14 yaşlarına kadar artış gösterirken daha sonra bireyin menarjından itibaren menopoza kadar atrezi azalır. Menopoza girince ovaryumda yaklaşık 1000 tane primordiyal follikül gelişmeden kalır (37).

Primordiyal follikül havuzundaki başlangıç sayısı ile oosit kaybındaki miktar bireysel olarak değişkenlik gösterir. Ortalama bir rakam verilecek olursa başlangıçta her bir ovaryumda yaklaşık 35 bin ile 2,5 milyon primordiyal follikül bulunur ve bu sayı 14 yaşına kadar ayda 100 ile 7,500 primordiyal follikülün atreziye uğraması ile en yüksek seviyeye ulaşır (28).

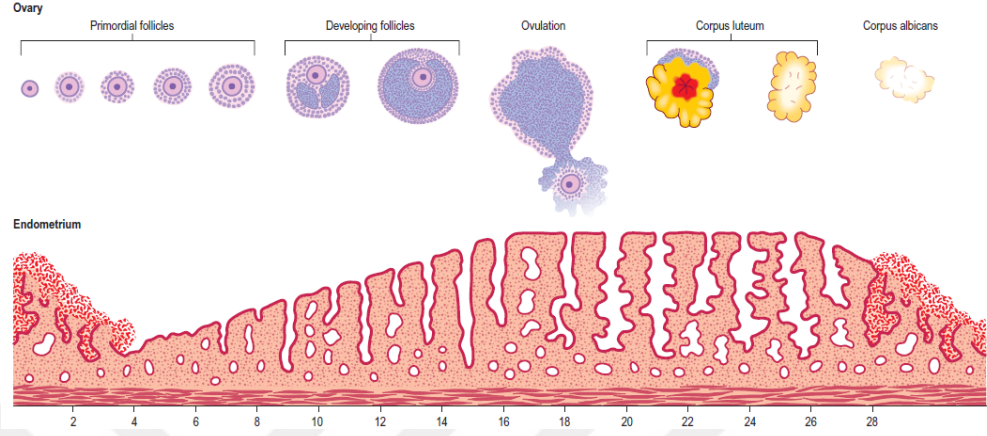
## **2.8. Menstrual Siklus**

Kadınlarda her ay ovaryum siklusunda gerçekleşen değişikliklere bağlı olarak uterus endometriyumunun fonksiyonel (pars fonksiyonalis) tabakasında görülen farklılaşmalardır. Menstrual siklus 28 günde bir tekrar eder. Menstruasyon, proliferasyon, sekresyon ve iskemi olmak üzere 4 aşamada gerçekleşir (Şekil 2.4). Proliferasyon evresi ovaryumlarda gelişen folliküllerden salgılanan östrojen hormonunun artışı ile uyarılır. Endometriyumun bazal tabakası, fonksiyonel kısmını yeniler, bez yapıları ve kan damarları uzar ve endometriyumun esnekliği artar. Proliferasyon evresinin sonunda LH artışına bağlı olarak ovaryumlarda ovulasyon gerçekleşir (35).

Sekresyon evresinde ovaryum korpus luteumundan üretilen progesteron miktarındaki artış östrojen etkisiyle gelişen endometriyumdaki arterler (spiral arterler) daha çok kıvrılır, endometriyuma daha fazla kan akımı artar. Progesteron ayrıca endometriyal bezlerin boyutları artar, hücrelerde glikojen birikimi olur ve bezler uterus boşluğuna besin salgılamaya başlar. Besinler embriyonun implante olana kadarki besin ihtiyacını karşılar.

Döllenme olmazsa spiral arterler kasılır ve endometriyumun fonksiyonel tabakasına yeterli miktarda kan akımı sağlanamaz ve iskemik evreye girer.

İskemik evrede endometriyumun fonksiyonel tabakası nekroza uğrar. Spiral arterlere tekrar kan akımı gelmesi ile fonksiyonel tabaka yüzeyden ayrılır ve kanla birlikte vajinadan atılır. Mestruasyon evresi yaklaşık 3-5 gün sürer (35, 38).

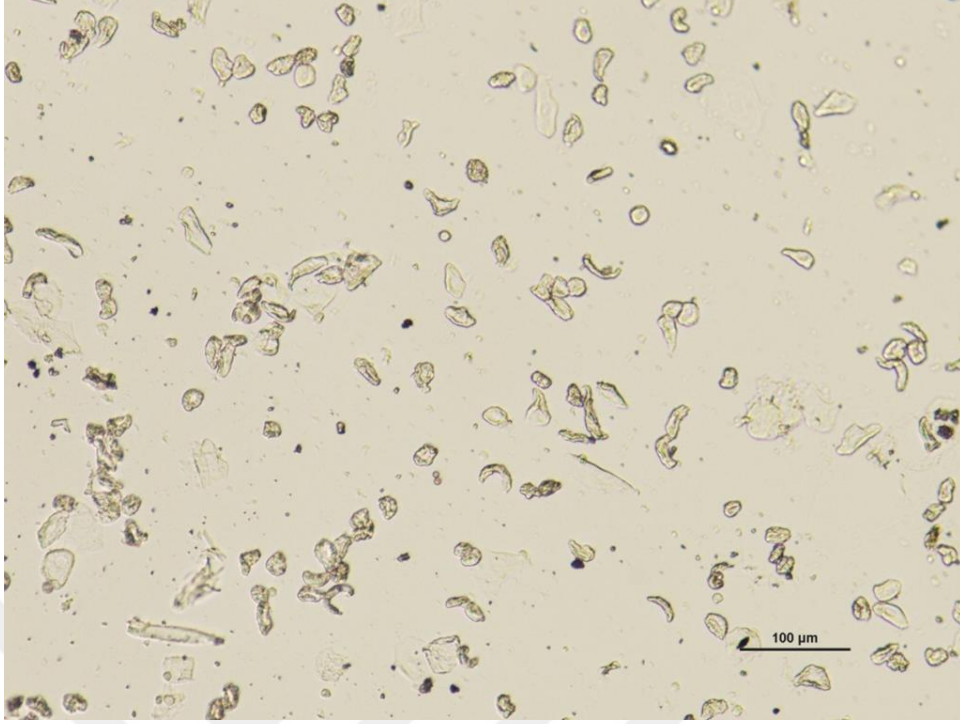


Şekil 2.4: Menstrual Siklus. Kaynak: Greys anatomy 41. Baskı sf 1307. Copyright 2016

## 2.9. Sıçanlarda Östrus Siklusu

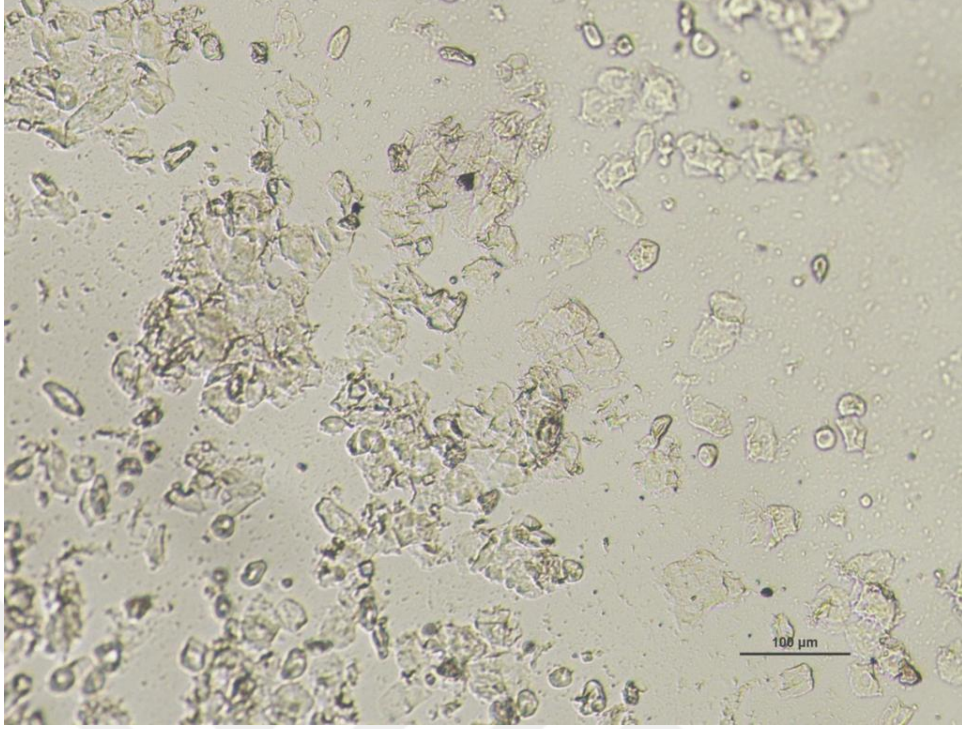
İnsanlardaki menstrual sıklusa karşılık sıçanlarda görülen sıklustur. Ortalama 4-5 günde bir gerçekleşir (39, 40). Vajinal simir bu dönemleri belirlemede kullanılan en genel yöntemdir. Dört fazdan oluşur; proöstrus, östrus, metaöstrus, diöstrus.

Proöstrus Dönemi: 12-14 saat sürer. Vajinal simirde yoğun miktarda keratohiyalin granülleri içeren yassı epitel hücreleri gözlenir (Şekil 2.5). Dönemin erken ve orta dönemlerinde bir miktar lökosit ile geç dönemlerinde keratinize olmuş epitel hücreleri bulunur. Epitel hücreler histolojik olarak asidofilik özelliktedir. Yapısı bozulmuş olan korpora lutea da merkezde fibröz doku oluşumu ve hücrelerde yaygın olarak sitoplazmik vakuoller tanımlanır. Ovulasyon bu dönem sonunda gerçekleşir.



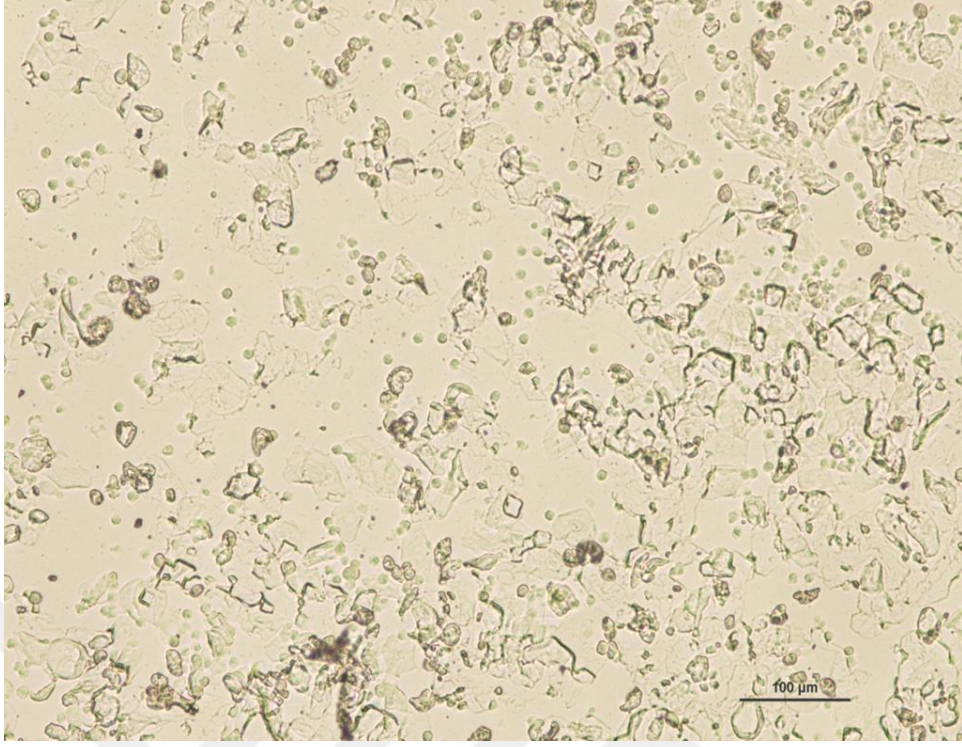
**Şekil 2.5: Proöstrus Dönemi vajinal simir örneği. Yoğun miktarda epitel hücre (E) döküntüsü görülmektedir. 100x büyütmede, herhangi bir boyama uygulanmadan gözlemlendi.**

Östrus Dönemi: 25-27 saat sürer. Vajinal simirde yoğun miktarda çekirdeğini kaybetmiş keratinize hücreler bulunur (Şekil 2.6). Dönem sonunda lökosit sayısında artış gözlenir. Histolojik olarak hücreler daha bazofilik boyanır. Östrus döneminde ovaryumda yapısı bozulmuş corpora lutea ve yeni oluşan ufak boyutlu corpora lutea yer alır. Yeni oluşarlarda merkezde follüküler evreden kalma sıvı birikintili kavite bulunur, merkezi fibröz doku henüz oluşmamıştır. Bu dönem dişi sıçanların erkek sıçanları kabul ettiği dönemdir, döllenme bu dönemde gerçekleşir.



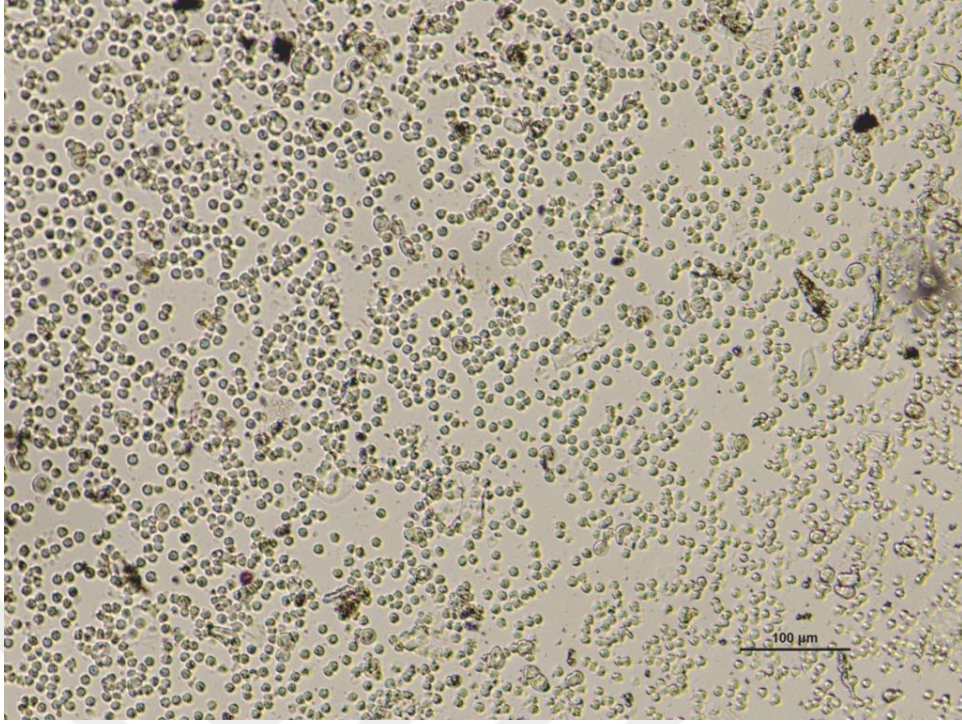
**Şekil 2.6: Östrus Dönemi vajinal simir görünümü. 100x büyültmede.**

Metaöstrus Dönemi: 6-8 saat sürer. Vajinal simirde neredeyse eşit miktarda dağılım gösteren lökosit ve epitelyal hücreler ile bir miktar keratinize hücre bulunur (Şekil 2.7). Korpora lutea sıvı dolu merkezi boşluğa sahiptir. Östrus dönemine göre daha bazofilik boyanır. Boyut olarak diöstrus dönemindeki Korpora lutea'dan daha küçük çaptadır.



**Şekil 2.7: Metaöstrus Dönemi vajinal simir görünümü. 100x büyültmede.**

Diöstrus Dönemi: 55-57 saat sürer. Vajinal simirde yoğun miktarda çekirdekleri bazofilik lökositler görülür (Şekil 2.8). Ovaryumlarda yeni oluşmuş korpora lutea hücrelerinde çok sayıda vakuoller gözlenir. Vakuoller steroid sentezine bağlı olarak erimiş kolesterol damlalarından oluşur (41).



**Şekil 2.8: Diöstrus Dönemi vajinal simir görünümü. 100x büyültme.**

## 2.10. Anti-Müllerian Hormon

Müllerian inhibe edici madde (MIF) olarak da bilinen anti-Müllerian hormon (AMH) dimerik glikoprotein yapıda olup büyüme ve farklılaşma faktörlerinden transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) süper ailesinin bir üyesidir (42, 43). AMH erkek bireylerde fetal dönemde Müller kanalının gerilemesi ve puberteye dek testiküler farklılaşmanın gerçekleşebilmesi için gerekli bir faktördür ve Sertoli hücrelerinden salgılanır (44). Kadınlarda ise AMH, ovaryumlarda kübik hale gelen primer folliküllerin granüloza hücrelerinden eksprese edilir. AMH üretimi prenatal dönemde başlar ve menopoza kadar devam eder (45). Dişi rodentlerde, AMH salınımı doğumdan önce gözlenmez, fakat doğumdan birkaç gün sonra gelişen folliküllerde AMH salınımı ortaya çıkar. AMH salınımı ilk olarak erken dönemdeki primer follikül hücrelerinde gözlenir. Ekspresyonun en yüksek seviyeye ulaştığı folliküller preantral ve küçük çaptaki antral folliküllerdir. Preovulatuvar düzeydeki folliküllerin mural granüloza hücrelerinde ve atreziye uğrayan folliküllerde AMH salınımı gözlenmez (46, 47). Preovulatuvar folliküllerin kumulus hücrelerinde gözlenir (48).

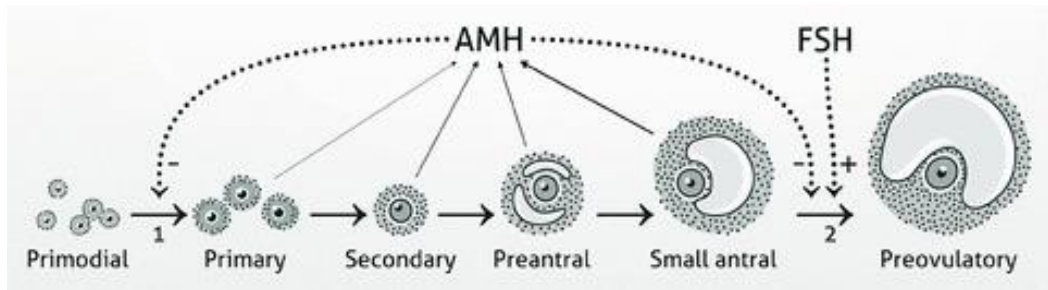
AMH ovaryumlarda follikülogenezin erken dönemlerinde bir çeşit inhibe edici büyüme faktörü olarak fonksiyon gösterir ve primordiyal follikül gelişimini inhibe eder. Bu inhibisyon nedeni olarak primordiyal folliküllerdeki pregranulosa hücre kökenli AMH ekspresyonunun parakrin etkisi olabileceği düşünülmektedir (47). AMH eksikliğinde primordiyal folliküller sayıca daha fazla gelişim gösterir; normal ovulasyon oranına rağmen ovaryumlarda daha fazla gelişen follikül olması, oosit dejenerasyonunu ve follikül atrezisini artırarak erken yaşlarda primordiyal follikül havuzunun boşalmasına neden olur (12, 49).

AMH, FSH uyarımına bağlı follikül gelişimini baskılayarak fazla miktarda follikülün gelişimini engeller (50). Her follikülün kendine ait bir FSH eşik değeri vardır ve preovulatuvar evreye geçmek için bu eşğin aşılması gerekir. AMH, FSH uyarımını baskılar. Aynı zamanda tüm folliküllerin ovulasyona erişimini engelleyerek dominant follikülün seçimde de rol oynar (Şekil 2.9) (51).

Ayrıca anti-Müllerian hormon aromataz aktivitesini inhibe ederek LH reseptör sayısını ve östrojen biyosentezini azaltır. AMH salınımı küçük antral folliküllere kadar devam eder. Follikül yaklaşık 8mm çapa ulaştınca AMH salınımı azalır, AMH azalınca FSH ve östrojen serbet kalır. Östrojen ve FSH en yüksek değere ulaşır ve LH pikini tetikler ovulasyon gerçekleşir (52).

Benzer yaşlardaki kadınlarda bireysel farklılıklara bağlı olarak AMH salınımında da farklılıklar gözlenebilir. Özellikle kadın bireylerdeki etnik farklılıklar antral follikül sayısında ve buna bağlı olarak da AMH salınımı miktarında farklılıklara sebep olur (53-55).

Yapılan bazı çalışmalarda AMH miktarının vücut kütle indeksi ile de ilişkili olduğu görüldü. Yaşa bağlı vücut kütle indekslerinin AMH salınımı ile negatif korelasyon içerisinde olduğu saptandı (53, 54, 56). Ayrıca dominant folliküllerden ve korpus luteumdan salgılanmamasına rağmen AMH miktarı menstrual siklus boyunca değişiklik göstermemektedir (16, 57, 58). Dolaşımda AMH miktarı değişkenlik gösterir. Doğumdan hemen sonra ilk en yüksek seviyesine erişir ve yaklaşık 9 yaşına kadar bu seviye sürdürülür. Puberteye girince, 9-15 yaşları arasında, AMH miktarında ufak bir azalma gözlenir. İkinci en yüksek seviyeyi de 25'li yaşlarda yaşayan AMH, bu süreden itibaren 50-51 yaşlarına kadar yavaşça azalma gösterir ve menopoza ile birlikte serumda neredeyse ölçülemez hale gelir (59). Dolaşımdaki amh miktarı iki ovaryumda toplam gelişmemiş granüloza hücreleri ile toplam gelişen follikül sayısını yansıtır. Buna bağlı olarak serum amh miktarı orayum rezervi için çok iyi bir belirteçtir (60, 61). Erken yaşlarda AMH miktarının az olması menopoza da erken yaşlarda girilmesine sebep olur. Menopoz yaş farklılıklarının belirlenmesinde genetik faktörler büyük rol oynar (62, 63).



**Şekil 2.9: Anti-Müllerian Hormon ve follikülogenez. Kaynak: Garcia A., Grynnerup A., Lindhard A., Sorensen S. The role of anti-Müllerian hormone in female fertility and infertility-an overview. 2012 91:1252-1260.**

## 2.11. İnhibin-B

İnhibin terimi ilk olarak 1932 yılında McCullagh tarafından pitüiter FSH'ünü düzenleyici proteinli gonadal faktör olarak belirlendi (64). 1977 yılında Schwartz and Channing bu protein maddesinin follikül sıvısında FSH dalgalanmasını sağlama yeteneği olduğunu gösterdi (65). Transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  ailesinin bir diğer peptid üyesi olan inhibinler, heterodimerik glikoprotein yapıdadır. Bir  $\alpha$  ve iki farklı  $\beta$  alt birimden oluşur. Alt birimler  $\alpha\beta_A$  şeklinde dizilmiş ise inhibin A,  $\alpha\beta_B$  şeklinde dizilmiş ise inhibin B olarak adlandırılır (66-68). İnhibin A ve inhibin B üreme sistemini düzenleyen yapılardır (69). Gonadotropin dalgalanmaları, ovaryum steroidleri ve ovaryum protein hormonları ile olan etkileşimi ovulasyonun gerçekleşmesinde ve fertilizasyon olmaması halinde yeni siklusun oluşumunda tam bir orkestra şefi gibi davranır (70, 71). İnhibin-B, granüloza hücrelerine özgü bir hormondur ve gelişen uyarılmamış preovulatuvar folliküllerden, preantral ve küçük antral folliküllerden salgılanır. Bu yüzden dolaşımdaki miktarı genelde follikül sentezini belirtmektedir. İnhibin B gelişen küçük antral follikül sayısını gösteren bir belirteç görevi de üstlenir. INHB miktarının azalması üretken yaşlarda follikül sayısının azaldığını gösteren en erken dönem belirteçidir (72). İnhibin-B folliküler kompartmanda birtirilir ve bir kısmı dolaşıma verilir. Böylelikle ara folliküler dönemde dolaşımdaki INHB'in en fazla salgılandığı dönem, ovaryumda da aynı tipteki folliküllerde follikül sıvısı içerisinde en yoğun salgılamasını yapması beklenir, özellikle de yeni seçilmiş dominant follikülde. Follikül sıvısındaki INHB miktarının follikülogenezde follikül çaplarıyla ilişkili olduğu belirlendi. O kadar ki 10-12 mm çapına sahip folliküller en yüksek INHB konsantrasyonuna sahiptir; follikül sıvısı içerisinde dolaşımdan bin kat daha fazla miktarda ölçülürken 6-7mm çapından az boyuttaki folliküllerde ise INHB miktarı çok daha az miktarda ölçülür (73).

Menstrual siklus boyunca da INHB miktarı değişkenlik gösterir. İnhibin B ekspresyonu follikül hücreleri luteinizasyona giderken artış gösterir. INHB zirvesi, FSH zirvesinden 1-2 gün sonra gözlenir (74). INHB endokrin düzenleyici olarak görev alır. INHB ekspresyonu hipofiz bezinden direk FSH salınımını baskılar (75).

Folikülogenezin ortasında östradiol ve inhibin B sekresyonunda artış olur. Bu artış gelişmeye devam edecek küçük antral folliküllerin seçilimini gösterir. Daha sonra inhibin B ve östradiol merkeze negatif geri bildirimde bulunarak FSH salınımını azaltır ve dominant follikül seçilir. Ovulasyon sırasında da ikinci en yüksek seviyede görülür (76).

Küçük antral follikül (3-12mm çaplı) sıvısında INHB konsantrasyonu ile testosteron/ androstenodion arasında pozitif yönde güçlü anlamlılık vardır. inhibin-B teka hücre bağımlı androjen üretiminde parakrin etki yarattığı düşünülmektedir. Inhibin-B hormonunun menstrüal siklusta endokrin ve parakrin etki yaratarak folliküler fazda dominant follikülün belirlenmesinde fizyolojik hormon olarak önemli bir görev üstlendiği düşünülmektedir (77).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Abant İzzet Baysal Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 2016/05 numaralı izni ile gerçekleştirildi (Bkz.EK.1). Aynı zamanda Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendi (Proje Numarası: 2016.08.03.1080).

#### 3.1. DeneY Hayvanları Bakımı ve Gruplandırma

DeneY hayvanları, Abant İzzet Baysal Üniversitesi DeneY Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezinden elde edildi. DeneYde Wistar Albino sıçanlar kullanıldı. Gruplar içerisindeki bireyler rastgele seçildi, aşağıdaki şekilde düzenlendi;

Grup 1	Prepubertal Dönem	6 adet
Grup 2	Aktif Üretken Dönem	6 adet
Grup 3	Premenopoz-menopoz Dönem	6 adet

Hayvanlar, her grup ayrı olarak tabanı ve yanları plastik, üstü demir tel ile kaplı standart kafeslere yerleştirildi. Oda sıcaklığı 20°C’de sabit tutuldu. Işıklar sabah 6’da açılmak sureti ile 12 saat gündüz ve 12 saat gece olacak şekilde ayarlandı. Hayvanlar *ad libitum* olarak standart pellet ve çeşme suyu ile beslendi.

#### 3.2. Östrus Siklusu Değerlendirme

Deneklerin östrus sikluslarını belirlemek için vajinal simir alındı. Vajinal salgı, 10µL serum fizyolojik (NaCl %0,9) plastik pastör pipetine çekilerek sıçan vajinasına çok derine girmeyecek şekilde verilip geri çekilerek toplandı. Toplanan salgı lamlara alındı. Her hayvan için ayrı temiz pipet ve lam kullanıldı. Materyal boyanmadan ışık mikroskobunda 10 ve 40’lık objektiflerle incelenerek üç tip hücre gözlemlendi. Hücrelerin yoğunluklarına bağlı olarak dönemler belirlendi (78, 79).

### 3.3. Doku örneklerinin toplanması

Proöstrus dönemindeki sıçanlar 0,1ml/g ksilazin ve 0,2ml/g ketamin intraperitoneal enjeksiyon ile anestezi altına alındı. Ağırlıkları terazi ile ölçüldü ve operasyona alındı. Kan, venakava inferiordan alındı. Kanlar biyokimyasal analizler için 5cc'lik vakumlu enjektörlerle tüplere alındı, 3000 rpm/dk'da 10dk santrifüj edilerek pastör pipeti ile serumlar eppendorf tüplere alındı. Serumlar -80°C'de saklandı.

Kan alımından sonra deneğin karın bölgesi açılarak ovaryumlar çıkarıldı, ağırlıkları tartıldı ve %10'luk nötral formalin içerisine koyuldu. Örnekler +4 °C'de muhafaza edildi.

### 3.4. Histolojik Takip

Takibi yapılacak dokular formaldehitten temizlenmek amacıyla önce yıkamaya alındı. Histolojik takip dehidratasyon, şeffaflandırma ve gömme olmak üzere üç aşamada gerçekleştirildi. Dehidratasyon için dokular %70ten başlayan %100'e kadar giden etil alkol solüsyonlarından geçirildi. Şeffaflandırma için ksilol kullanıldı ve dokular parafin bloklara gömüldü. Takip aşamaları bekleme süreleri aşağıdaki şekilde yapıldı.

Aşama	Bekleme Süresi
%70'lik Alkol	1 saat
%80'lik Alkol	1 saat
%96'lık Alkol	1 saat
%100'lük Alkol	1 saat
Alkol + Ksilol	1 saat
Ksilol	1 saat
Ksilol + Parafin	1 saat
Sıvı Parafin	1 saat
Parafine Gömme	

### 3.5. Işık Mikroskopik Boyamalar

Hazırlanan parafin bloklardan mikrotom (Leica RM 2125 RT) ile 5 mikrometre kalınlığındaki seri kesitler, rutin boyamalar için rodajlı (Patolab Ref. No:165014), immünohistokimyasal boyamalar için pozitif şarjlı (Patolab Ref:165013) lamlara alındı.

#### 3.5.1. Hematoksilen ve eozin boyama

Rutin incelemeler amacıyla hematoksilen-eozin boyaması yapıldı. Boyama öncesinde kesitler 60°C'de 30 dakika bekletildi. Boyama aşamaları aşağıda gösterildiği şekilde yapıldı.

Aşama	Bekleme Süresi
Ksilen I	5 dakika
Ksilen II	5 dakika
%100'lük Alkol I	5 dakika
%100'lük Alkol II	1 dakika
%96'lık Alkol I	1 dakika
%96'lık Alkol II	1 dakika
Distile suda yıkama	3 kez
Mayer Hematoksilen	5 dakika
Distile suda yıkama	3 kez
Asit Alkol	10 saniye
Distile suda yıkama	3 kez
Amonyum	10 saniye
Distile suda yıkama	3 kez
%80'lik Alkol solüsyonu	2 dakika
Eozin	2 dakika
%96'lık Alkol I	2 dakika
%96'lık Alkol II	2 dakika
%100'lük Alkol I	2 dakika
%100'lük Alkol II	2 dakika
Ksilol I	2 dakika

Ksilol II 2 dakika  
Entellan ile kapatma

### 3.5.2. Mosson trikrom boyama

Bağ dokuyu inceleme amacıyla Masson üçlü boyaması yapıldı. Boyamadan önce kesitler 60°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi. Boyama aşamaları aşağıda gösterildiği şekilde yapıldı.

Aşama	Bekleme Süresi
Ksilen I	5 dakika
Ksilen II	5 dakika
%100'lük Alkol I	5 dakika
%100'lük Alkol II	3 dakika
%96'lık Alkol I	3 dakika
%96'lık Alkol II	3 dakika
Distile suda yıkama	3 kez
Hematoksilen (A+B eşit miktarda artırılarak hazırlanır)	20 dakika
Distile suda yıkama	3 kez
Asit Fucsin	5 dakika
Distile suda yıkama	3 kez
Fosfotungustik Asit	6 dakika
Metilen Mavisi	5 dakika
%50'lik Alkol solüsyonu	30 saniye
%70'lik Alkol solüsyonu	30 saniye
%96'lık Alkol solüsyonu	30 saniye
%100'lük Alkol solüsyonu	30 saniye
Ksilol I	1 dakika
Ksilol II	1 dakika
Entellan ile kapatma	

### 3.5.3. Periyodik asit schiff boyama

Zona pellusida, bazal membran değerlendirmesi için PAS boyaması yapıldı. Boyamadan önce kesitler 60°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi. Boyama aşamaları aşağıdaki şekilde yapıldı.

Aşama	Bekleme Süresi
Ksilen I	5 dakika
Ksilen II	5 dakika
%100'lük Alkol I	5 dakika
%100'lük Alkol II	1 dakika
%96'lık Alkol I	1 dakika
%96'lık Alkol II	1 dakika
Distile suda yıkama	2 kez
Periyodik Asit	7 dakika
Distile suda yıkama	2 kez
Schift	20 dakika
Akan su altında yıkama	10 dakika
Mayer Hematoksilen	1 dakika
Akan su altında yıkama	15 dakika
%70'lik Alkol solüsyonu	30 saniye
%80'lik Alkol solüsyonu	30 saniye
%96'lık Alkol solüsyonu	30 saniye
%100'lük Alkol solüsyonu	1 dakika
Ksilol I	1 dakika
Ksilol II	1 dakika
Entellan ile kapatma	

### 3.5.4. İmmünohistokimyasal boyamalar

Kesitler bir gece 37°C'lik etüvde bekletildi. AMH boyaması için primer polyclonal goat anti-anti-Müllerian hormon (Santa Cruz sc-6886, 1:100); sekonder olarak Thermo Scientific UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent, HRP (Ref. No.: TP-060-HL); Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) boyama için Roche In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Cat. No.: 11684817910) kullanıldı.

İmmünohistokimyal boyama aşamaları aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Deparafinizasyon amacıyla kesitler sırayla ksilol ve alkol serilerinden geçirildi.
2. Rehidratasyon için distile su ile kesitler yıkandıktan sonra Phosphate Buffer Saline (PBS) içerisine alınır, 2-3dk kesitler PBS içerisinde yıkandı.
3. Kesitler pH:6.00 sitrat tampon çözeltisi içerisinde mikrodalgada 360Watt'ta 10dk kaynatıldı.
4. Kaynamadan sonra kesitler sitrat tampon içerisinde oda sıcaklığında 20-30 dakika soğumaya alındı.
5. Dokuların etrafları PAP pen ile silindi, tablaya dizildi.
6. PBS ile 2 kez yıkandı, suyun fazlası dokulardan alındı.
7. Hidrogen Peroxidase ile 10-20dk oda sıcaklığında muamele edildi.
8. PBS ile 2 kez yıkandı, suyun fazlası dokulardan alındı.
9. Serum Block (Ultra V Block) ile 10-15dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
10. Yıkama yapmadan, ürün uygulama prosedürüne uygun olarak primer antikor kesitler üzerine damlatıldı ve inkübe edildi.
11. PBS ile 2-3 kez yıkandı, suyun fazlası dokulardan alındı.
12. Biotinylated sekonder antikor ile 20-45dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı.
13. PBS ile 2-3 kez yıkandı, suyun fazlası dokulardan alındı.
14. Horse Radish Proxidase (HRP) ile 15-30dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
15. PBS ile 2-3 kez yıkandı, suyun fazlası dokulardan alındı.
16. DAB kromojen damlatıldı, 15-60sn inkübe edildi.
17. Distile su ile 2-3 kez yıkandı.
18. Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
19. Distile su ile 2-3 kez yıkandı.
20. Dehidratasyon amacıyla dokular sırasıyla alkol serileri ve ksilolden geçirildi.

21. Entellan damlatılarak boyalı dokuların üzeri lam ile kapatıldı.

#### TUNEL Boyama Prosedürü

Ovaryum dokusundaki apoptotik hücreleri belirlemek amacıyla TUNEL (Roche Cat. No.:11684817910) boyaması yapıldı. Aşamalar aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Deparafinizasyon amacıyla kesitler sırayla ksilol ve alkol serilerinden geçirildi.
2. Rehidratasyon için distile su ile kesitler yıkandıktan sonra Phosphate Buffer Saline (PBS) içerisine alındı, 2-3dk kesitler PBS içerisinde yıkandı.
3. Dokuların etrafları PAP pen ile silinir, tablaya dizildi.
4. Proteinaz K damlatılarak 37°C'de 15-30dk inkübe edildi.
5. PBS ile 2-3 kez yıkandı, suyun fazlası dokulardan alındı.
6. Hidrojen Peroksit damlatılarak 5-10dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
7. PBS ile 2-3 kez yıkandı, suyun fazlası dokulardan alındı.
8. Enzim solüsyonu ve label solüsyonu karıştırılarak (1µl Enzim solüsyonuna 80µl label solüsyonu olacak şekilde) Tunel karışımı hazırlandı ve kesitler üzerine damlatıldı.
9. PBS ile 2-3 kez yıkandı, suyun fazlası dokulardan alındı.
10. Her bir dokunun üzeri örtülecek şekilde converter POD damlatılarak 37°C'de 30dakika inkübe edildi.
11. PBS ile 2-3 kez yıkandı, suyun fazlası dokulardan alındı.
12. DAB kromojen damlatıldı, 15-60sn inkübe edildi.
13. Distile su ile 2-3 kez yıkandı.
14. Mayer hematoksilen ile zıt boyama yapıldı.
15. Distile su ile 2-3 kez yıkandı.
16. Dehidratasyon amacıyla dokular sırasıyla alkol serileri ve ksilolden geçirildi.
17. Entellan damlatılarak boyalı dokuların üzeri lam ile kapatıldı.

#### 3.5.5. Ovaryum dokusunun histolojik değerlendirmesi

Hematoksilen eozin boyaması yapılan seri kesitler ışık mikroskobu (Olympus CX21) ile incelendi ve fotoğraflandı (Nikon eclipse 80i). Tunika albugineya altından başlanarak medullaya kadar ovaryum dokusunda net bir şekilde gözlenen tüm folliküller primordiyal, primer, preantral, sekonder ve tersiyer olarak sınıflandırılarak

sayıldı. Önce her bir kesitteki folliküller belirlendi, daha sonra tek bir ovaryuma ait follikül sayıları toplandı, ortalama alınarak her bir ovaryumda bulunan follikül sayısı çeşitlerine göre belirlendi (20x objektif).

Her gruptaki bireylerde AMH boyaması gösteren ve göstermeyen folliküller değerlendirildi. AMH pozitif boyanan follikül hücreleri ve boyanma şiddeti belirlendi (200x büyültme ile).

Apoptotik hücre değerlendirmesi için çekirdekleri koyu kahverengi boyanan follikül hücreleri TUNEL pozitif olarak kabul edildi.

### **3.6. Biyokimyasal Analiz**

Biyokimya analizler Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda yapıldı. Analizleri yapılacak serumlar önce -80°C dereceden alınıp -20°C'ye daha sonra +4°C dereceye alınarak kademeli olarak ısıtıldı. Hormon olarak AMH, İNHB, FSH, E2 ve testosteron düzeylerine bakıldı. Hormon ölçümleri için elektrokemoluminescent immunoassay (ELISA) yöntemi kullanıldı. Referans aralıkları AMH (kit Elabscience E-EL-R0640) için 0.156-10ng/mL, FSH (kit Elabscience E-EL-R0391) için 3.125-200ng/mL, İNHB (kit Elabscience E-EL-R1027) için 15.625-1000pg/mL, E2 (kit Elabscience E-EL-0065) için 40-1400pg/mL, testosteron (kit Elabscience E-EL-0072) için 0,1-20ng/mL alındı. Ölçüm cihazı olarak BioRad ELISA okuyucu kullanıldı. Elde edilen değerler istatistiksel olarak değerlendirildi.

### **3.7. İstatistiksel Hesaplama**

Verilerin istatistiksel analizleri için SPSS 17.0 paket programı kullanıldı. Grupların öncelikle ortalama ve ortanca değerleri ve standart sapmaları hesaplandı. Parametreler gruplar arası dağılımı One Way ANOVA analizi ile belirlendi. Her bir grup arasındaki ilişki ise Post Hoc Test ile ölçüldü. İstatistiksel anlam değeri  $p < 0,05$  olarak alındı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyokimyasal Sonuçlar

Biyokimya analizleri sonucunda AMH, INHB, FSH, E2 ve testosteron hormonları ölçüldü. AMH ve E2 değerlerinde gruplar arası dağılım istatistiksel olarak anlamlılık sağlarken INHB FSH ve testosteron arasında bir fark görülmedi (İstatistiksel anlamlılık değeri  $p < 0,05$ ) (Tablo 4.1). Serum AMH miktarının gruplar arasında değişkenlik gösterdiği saptandı. AMH seviyesi prepubertal dönemde, diğer dönemlere oranla daha az miktarda ekspresyon gösterdi. Aktif üreme döneminde ise artış gösterirken premenopoz-menopoz döneminde AMH ekspresyon miktarının azaldığı gözlemlendi (Şekil 4.2). Prepubertal dönem ile aktif üreme dönemi arasında anlamlı bir fark görüldü  $p = 0,033$ . Prepubertal dönem ile premenopozal ve menopoz dönemi, aktif üreme dönemi ile premenopozal ve menopoz dönem arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.1). Serum AMH miktarı aynı zamanda inhibin B ve östradiol miktarı ile pozitif yönde anlamlılık gösterdi (Tablo 4.2). Serum inhibin B miktarında da yaşa bağlı değişkenlik gözlemlendi. Aktif üreme döneminde diğer dönemlere göre daha fazla ekspresyon olduğu görüldü (Şekil 4.4). Serum inhibin B, FSH miktarı ile negatif yönde, AMH, östradiol ve testosteron miktarları ile pozitif yönde korelasyon gösterdi (Tablo 4.3). Deney grupları ile INHB miktarı arasında anlamlı bir fark gözlenmedi (Şekil 4.3). Serum FSH miktarının prepubertal dönemde en yüksek seviyede, aktif üreme döneminde en az miktarda eksprese edildiği gözlemlendi. Premenopoz-menopoz döneminde ise bir miktar artış gösterdi (Şekil 4.5). Serum E2 miktarının prepubertal dönemde diğer gruplara oranla az miktarda salgılandığı gözlemlendi. Aktif üreme döneminde ekspresyon artış göstermekte ve premenopoz-menopoz döneminde ise bu miktar azaldı (Şekil 4.6). Serum testosteron miktarı prepubertal ve aktif üreme döneminde oldukça yüksek seviyede iken premenopoz-menopoz döneminde ise oldukça düşük seviyede gözlemlendi (Şekil 4.7).

**Tablo 4.1: AMH, INHB, FSH, E2 ve Testosteron hormonlarının serum miktarları. (Ortalama değer ± Standart sapma).**

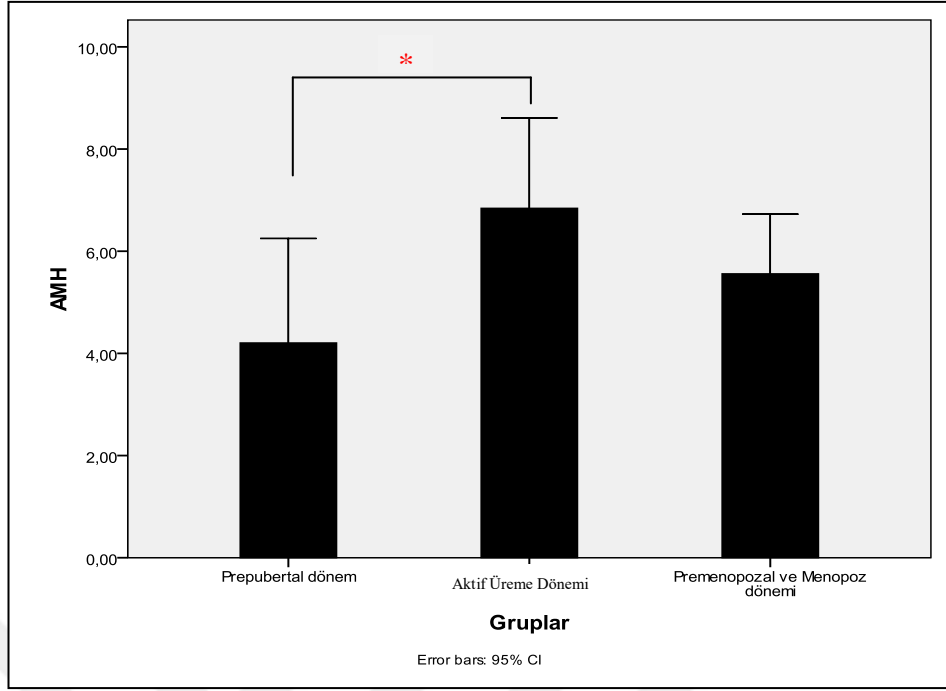
Mean ± SD	AMH	INHB	FSH	E2	TESTO
Grup 1	4,21 ± 1,95	44,01 ± 16,55	22,77 ± 14,29	150,00 ± 29,00	2,40 ± 0,59
Grup 2	6,84 ± 1,68	48,09 ± 9,38	12,69 ± 2,35	222,91 ± 34,08	2,34 ± 1,91
Grup 3	5,56 ± 1,11	45,01 ± 7,27	15,79 ± 2,86	155,63 ± 17,48	1,93 ± 0,66
p Değeri	0,041*	0,825	0,145	0,001*	0,512

**Tablo 4.2: Serum AMH hormon miktarının diğer hormonlarla ilişkisi.**

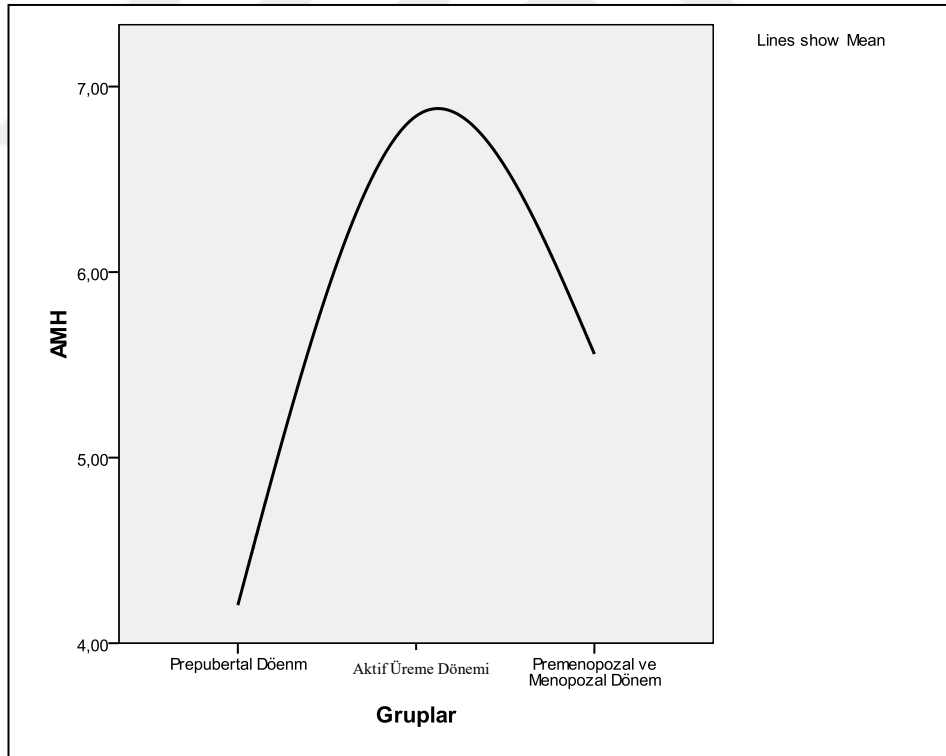
	INHB	FSH	E2	TESTO
AMH	0,000*	0,433	0,000*	0,988

**Tablo 4.3: Serum INHB miktarının diğer hormon miktarları ile karşılaştırılması.**

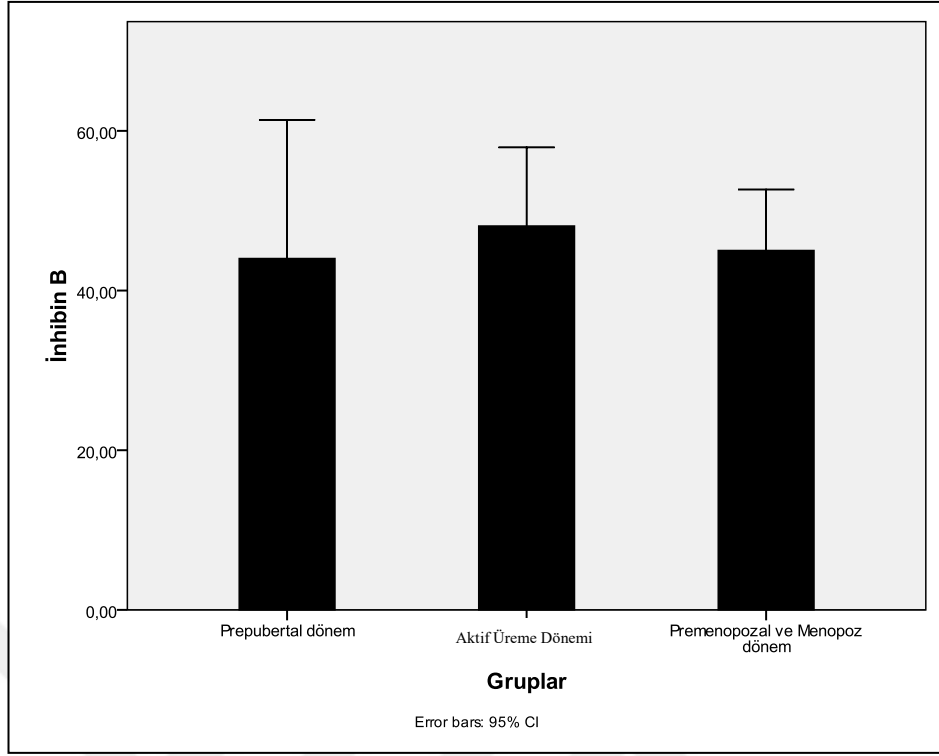
	AMH	FSH	E2	TESTO
INHB	0,000*	0,001*	0,000*	0,000*



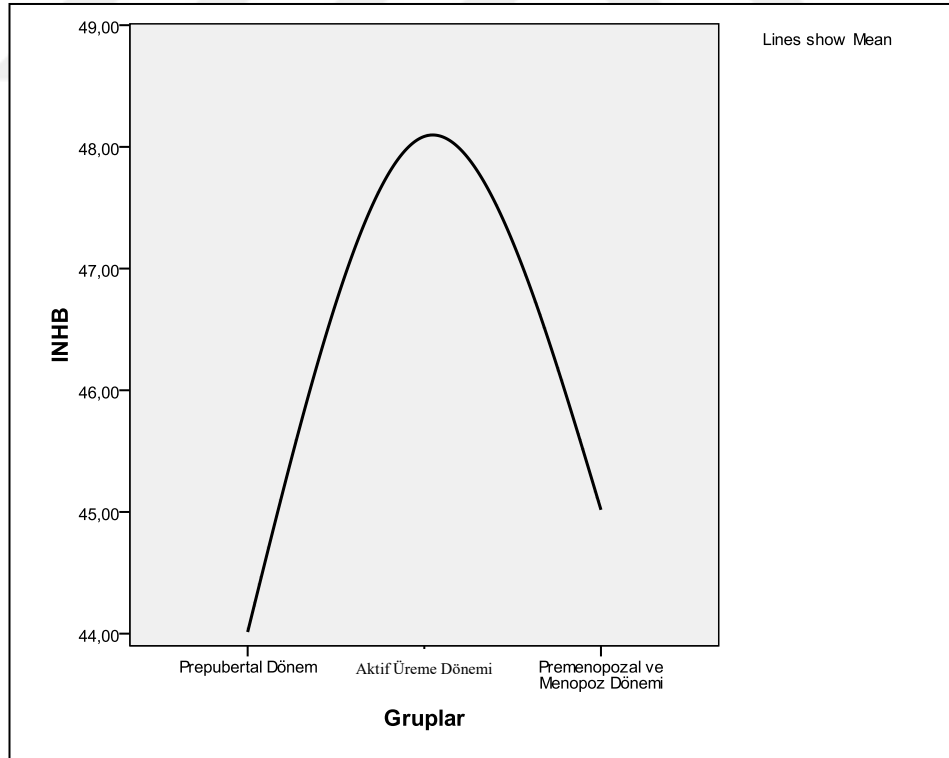
Şekil 4.1: Deney gruplarına ait serum AMH miktarları.



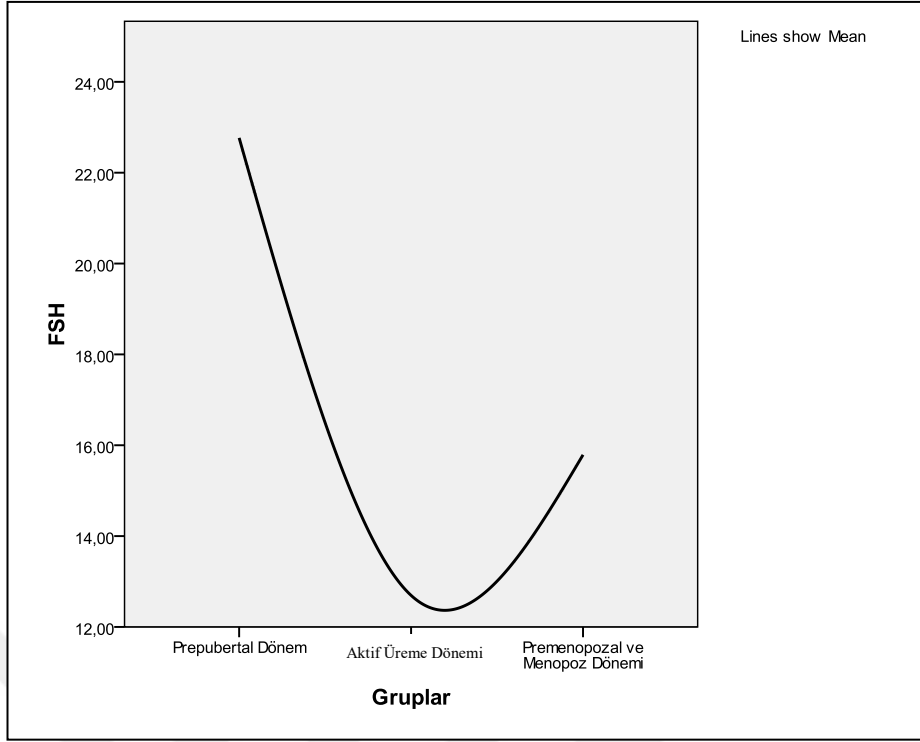
Şekil 4.2: Serum AMH miktarının yaşa bağlı dağılımı.



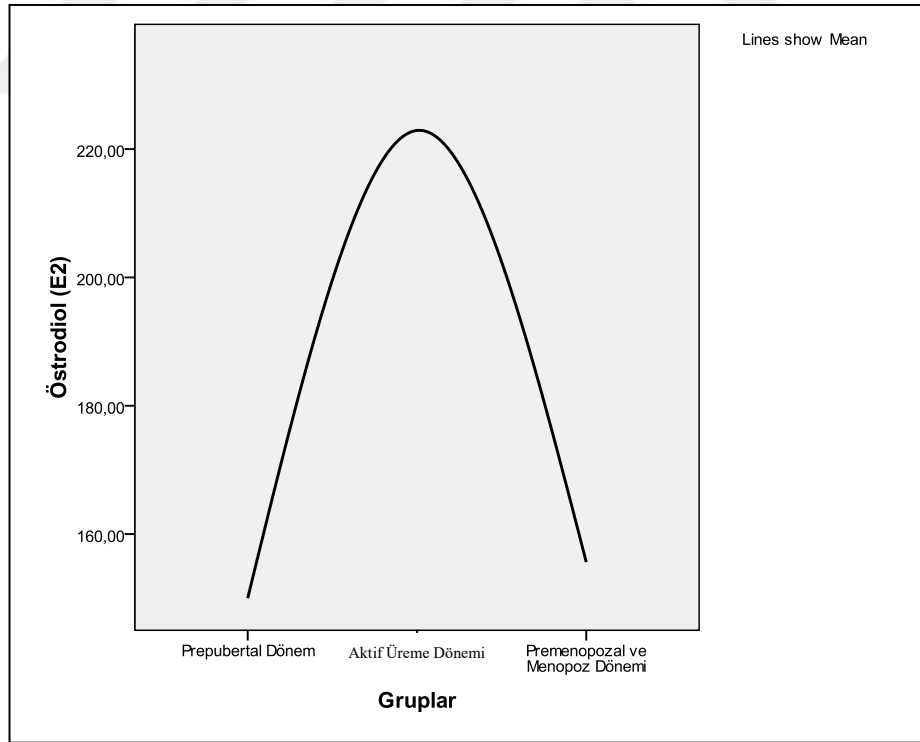
Şekil 4.3: Deneç gruplarına ait serum İNHİB miktarları.



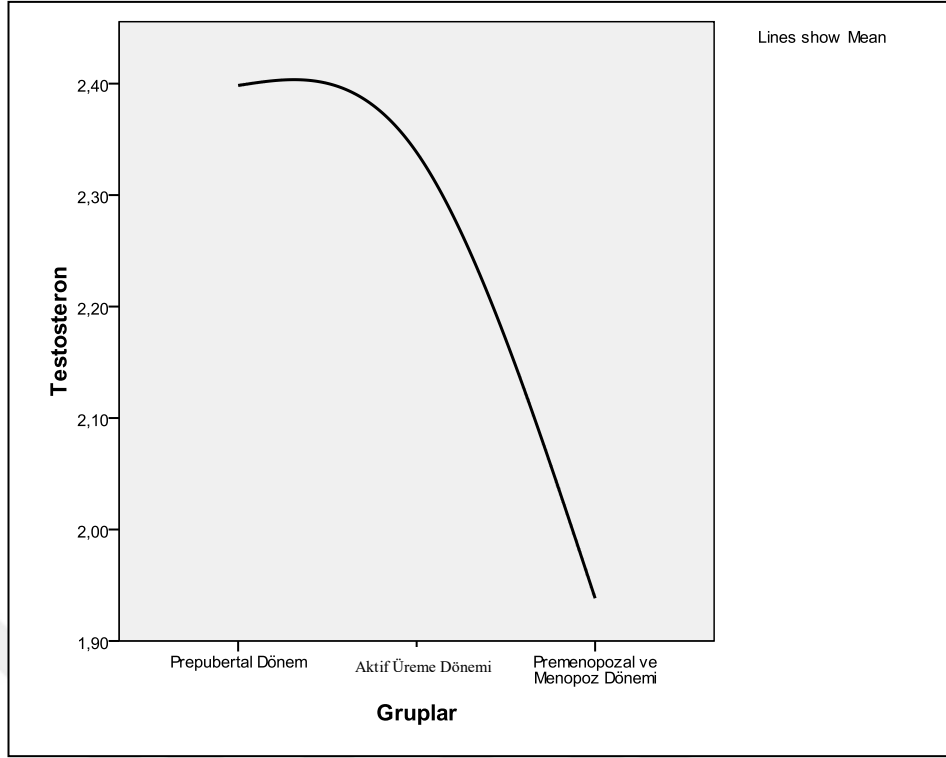
Şekil 4.4: Serum İNHİB miktarının yaşa bağı dağılımı.



Şekil 4.5: Serum FSH miktarının yaşa bağlı dağılımı.



Şekil 4.6: Serum östrodioil miktarının yaşa bağlı dağılımı.



Şekil 4.7: Serum testosteron miktarının yaşa bağlı dağılımı.

## 4.2. Hayvan ve Ovaryum Ağırlıkları

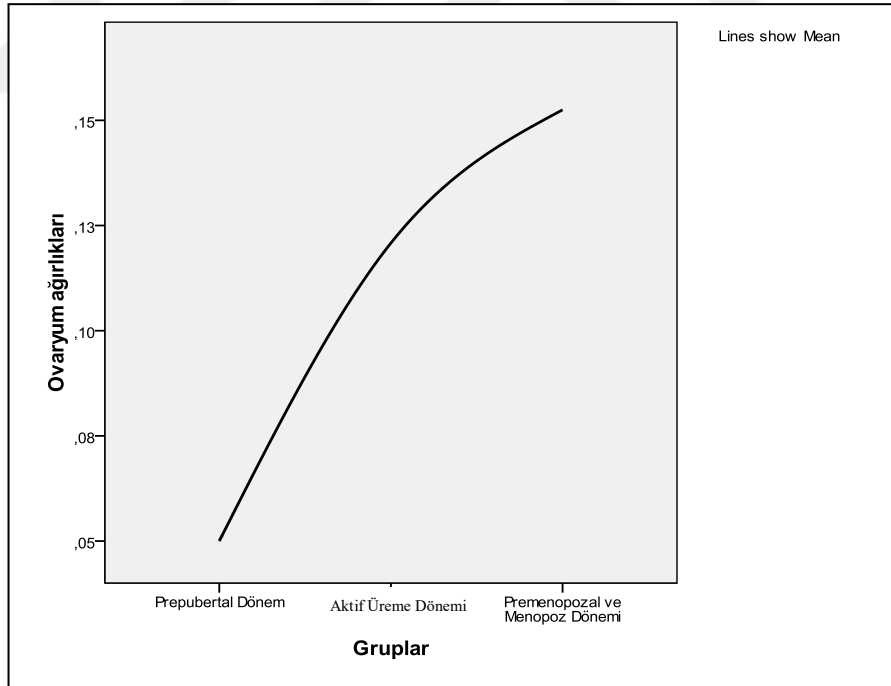
Hayvan ve ovaryum ağırlıklarına bakıldığı zaman gruplar arasında anlamlı bir fark bulundu (istatistiksel anlamlılık değeri  $p < 0,05$  olarak alındı) (Tablo 4.4). Hayvan ağırlıkları ve ovaryum ağırlıkları yaşa bağlı olarak artış gösterdiği gözlemlendi (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Yaşa bağlı değişkenlik gösteren serum AMH miktarı ile hayvan ağırlıkları anlamlı fark gösterdi  $p < 0,005$  (Şekil 4.10). Serum AMH miktarı ile ovaryum ağırlıkları istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermedi. Yaşa bağlı serum inhibin B salınım miktarı ise hem hayvan hem de ovaryum ağırlıkları ile anlamlı bir fark gösterdi  $p < 0,005$  (Şekil 4.11).

**Tablo 4.4: Serum AMH, INHB miktarları ile hayvan ve ovaryum ağırlıklarının gruplara göre dağılımı. (Ortalama  $\pm$  Standart Sapma).**

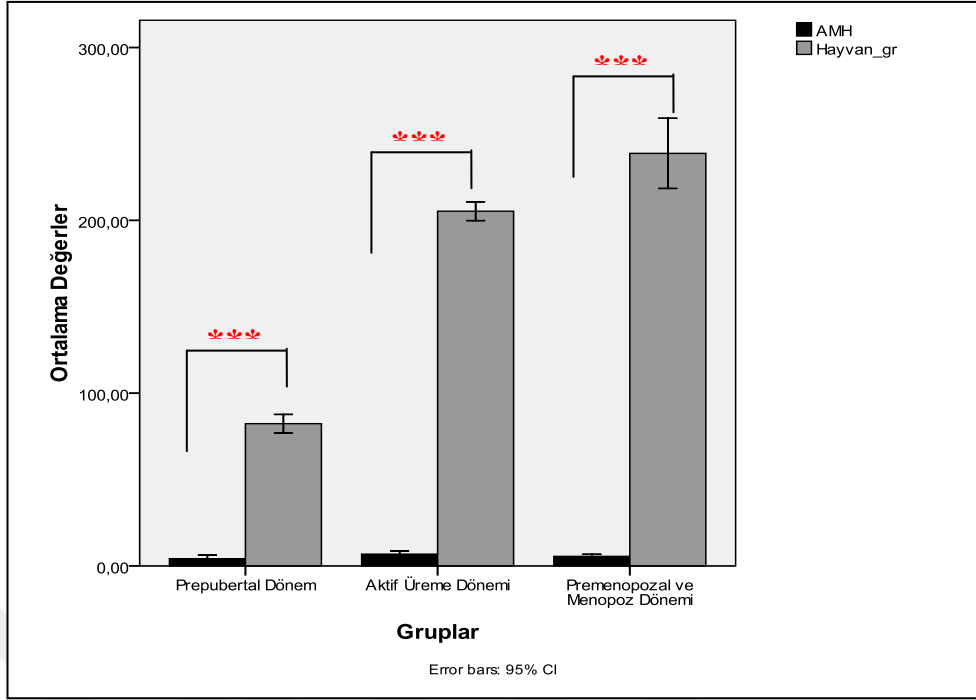
Mean $\pm$ SD	AMH	INHB	Hayvan Ağırlıkları	Ovaryum Ağırlıkları
Grup 1	4,21 $\pm$ 1,95	44,01 $\pm$ 16,55	82,33 $\pm$ 5,09	0,05 $\pm$ 0,01
Grup 2	6,84 $\pm$ 1,68	48,09 $\pm$ 9,38	205,29 $\pm$ 5,20	0,12 $\pm$ 0,01
Grup 3	5,56 $\pm$ 1,11	45,01 $\pm$ 7,27	238,75 $\pm$ 19,33	0,15 $\pm$ 0,02
p Değeri	0,041*	0,825	0,000*	0,000*



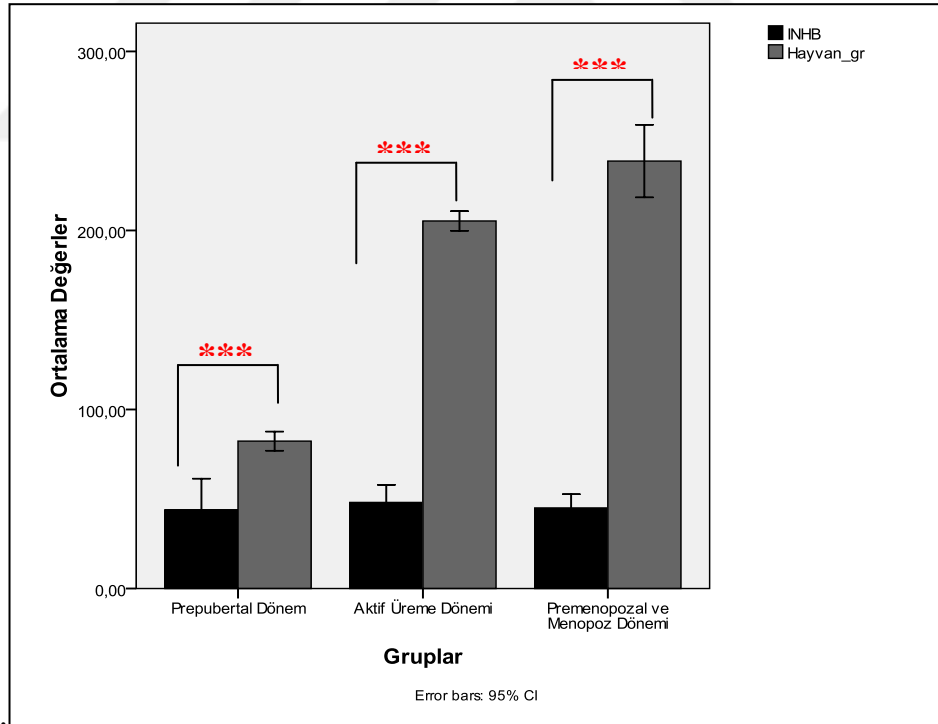
Şekil 4.8: Hayvan ağırlıklarının yaşa bağlı dağılımı.



Şekil 4.9: Ovaryum ağırlıklarının yaşa bağlı dağılımı.



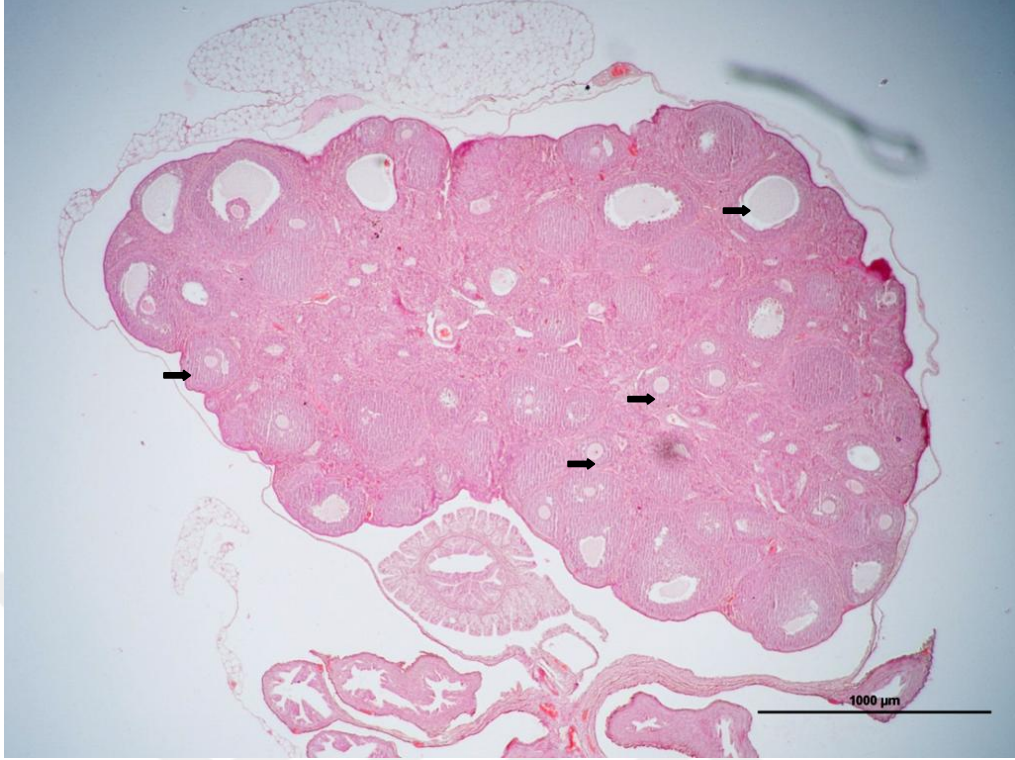
Şekil 4.10: Serum AMH miktarı ile hayvan ağırlıkları.



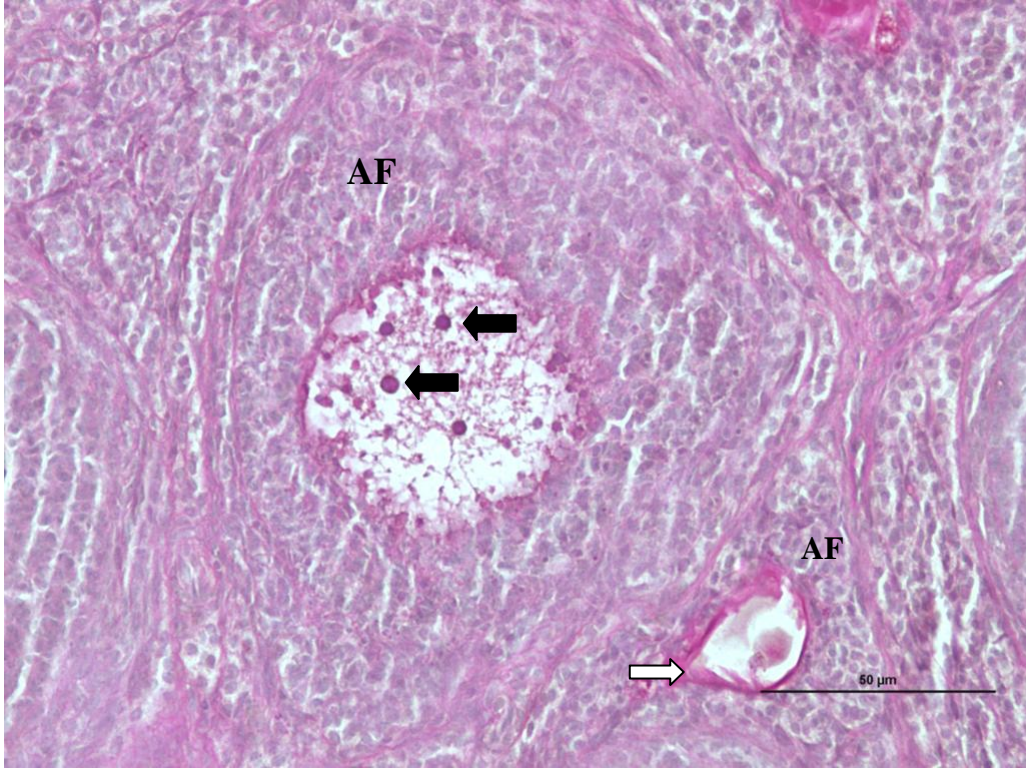
Şekil 4.11: Serum INHB miktarı ile hayvan ağırlıkları arasında.

### 4.3. Follikül Sayımı

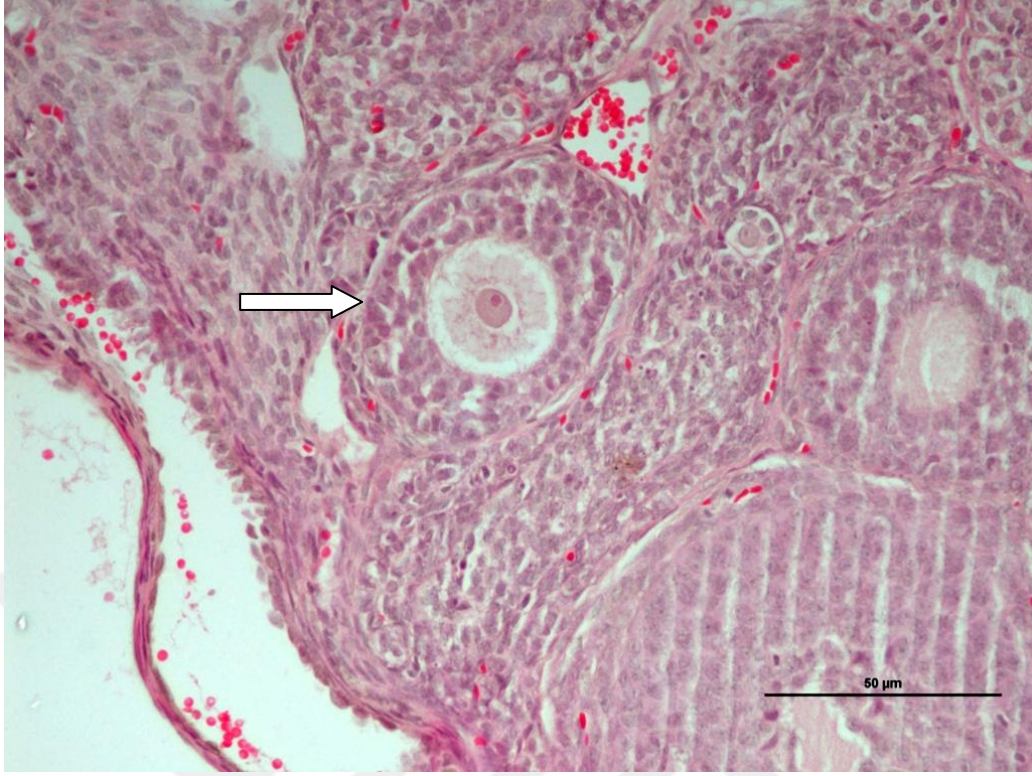
Yapısal değerlendirme ve follikül sayımı yapılan sıçan ovaryumlarında yaşa bağlı olarak ovaryum hacminin attığı gözlemlendi. Yaşa bağlı olarak damarlanmanın arttığı ve korteks stromasına bol miktarda lüteal hücre yayıldığı gözlemlendi (Şekil 4.21, Şekil 4.22). Prepubertal dönemdeki hayvanlarda diğer gruplara oranla daha fazla miktarda gelişen folliküle rastlandı ve korpus luteum yapıları gözlenmedi (Şekil 4.12). Korpus luteum, aktif üreme ve premenopoz-menopoz dönemindeki hayvanlarda gözlemlendi. Özellikle premenopoz-menopoz dönemindeki hayvanlarda diğer gruplara göre daha fazla korpus luteuma rastlandı (Şekil 4.16, Şekil 4.21). Premenopoz-menopoz dönemindeki hayvanlarda diğer gruplara kıyasla az miktarda olsa da gelişen folliküle rastlandı (Şekil 4.22). Primordiyal ve gelişen follikül sayılarında yaşa bağlı gruplar arasında anlamlı fark vardı ve yaşa bağlı iki parametrede de azalma gözlemlendi (Tablo 4.5). Prepubertal dönem ile premenopozal-menopoz dönemi arasında ve prepubertal dönem ile aktif üreme dönemi arasında anlamlı ilişki olduğu görüldü (Şekil 4.23). Prepubertal dönem ile premenopoz-menopoz dönemi arasında ve prepubertal dönem ile aktif üreme dönemi arasında anlamlı ilişki gözlemlendi (Şekil 4.24). Hem serum AMH hem de serum INHB miktarları ile primordiyal ve gelişen follikül sayıları arasında anlamlılık görüldü (Tablo 4.6). İstatistiksel anlamlılık değeri  $p<0,05$  olarak alındı. Serum Anti-Müllerian hormon ile primordiyal ve gelişen follikül sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. Prepubertal ve aktif üreme döneminde primordiyal follikül sayıları ile serum AMH miktarı istatistiksel olarak anlamlılık görüldü (Şekil 4.25). Prepubertal dönemde gelişen follikül sayıları ile serum AMH miktarı istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi (Şekil 4.26). Prepubertal, aktif üreme ve premenopoz-menopoz dönemde primordiyal follikül sayıları ile serum INHB miktarı istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi (Şekil 4.27). Prepubertal, aktif üreme ve premenopoz-menopoz dönemde gelişen follikül sayıları ile serum INHB miktarı istatistiksel olarak anlamlılık gösterdi (Şekil 4.28).



Şekil 4.12.: Prepubertal döneme ait sıçan ovariyumu. Diğer gruplara kıyasla daha yoğun miktarda gelişen follikül (ok ucu) görülmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 20x büyültme.



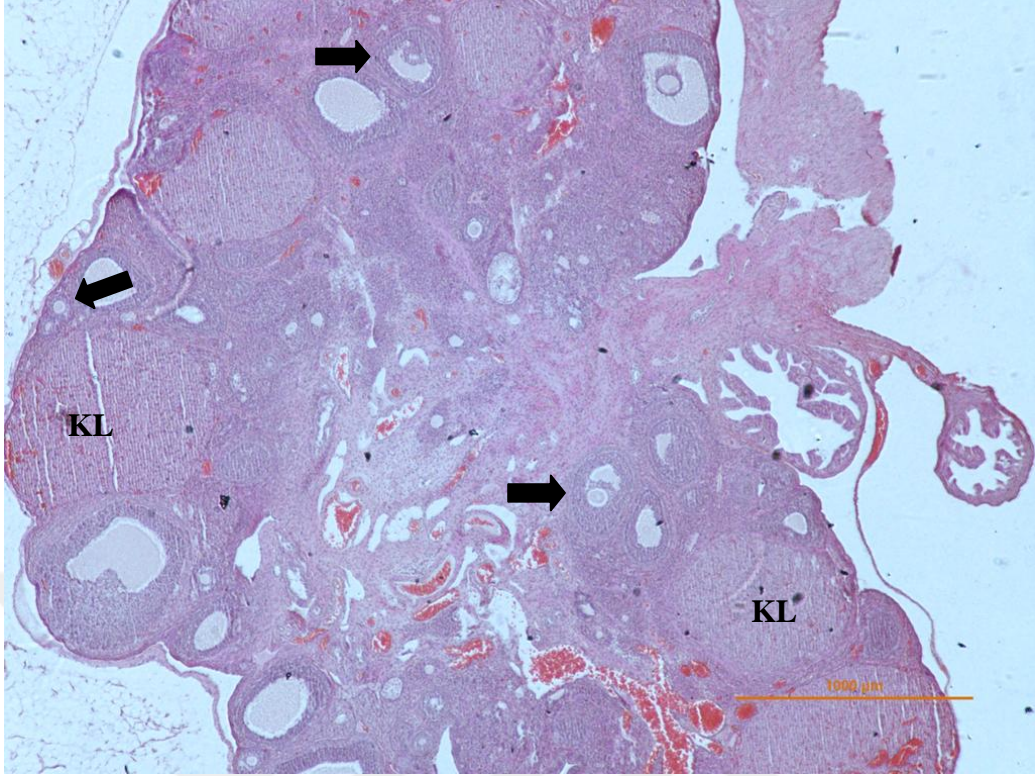
Şekil 4.13: Prepubertal döneme ait sıçan ovariyumunda atretik folliküller (AF), camsı membran (beyaz ok) ve apoptotik cisimcikler (siyah ok) görülmektedir. PAS boyaması. 200x büyültme.



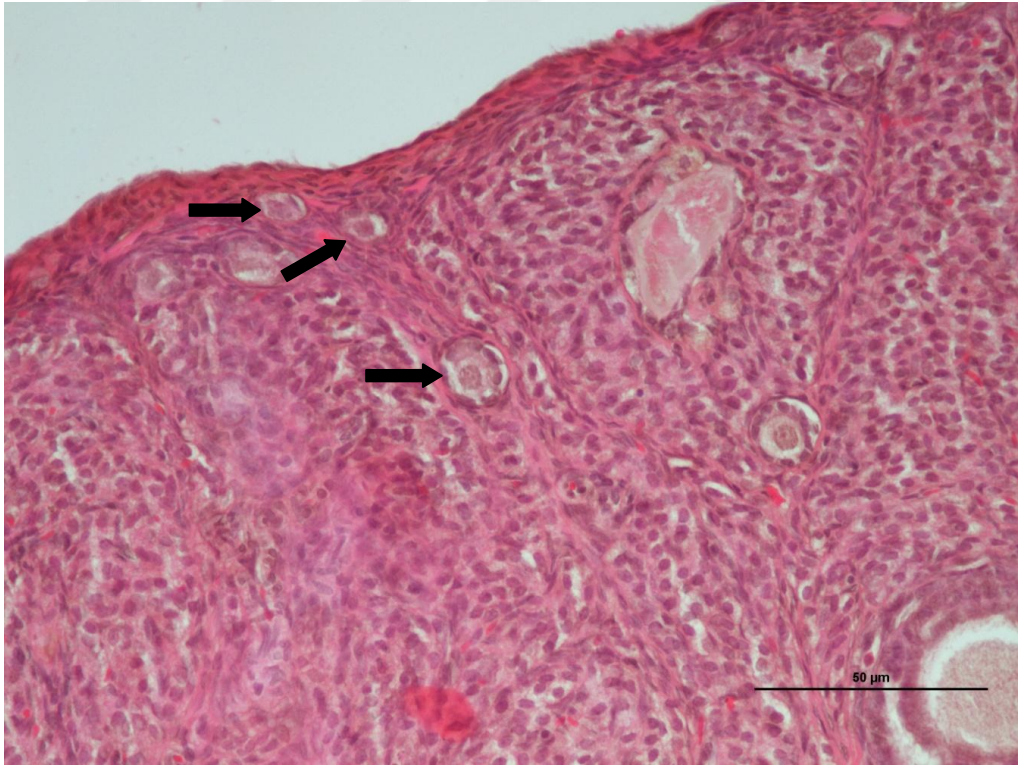
Şekil 4.14: Prepubertal döneme ait ovaryumda çok katlı kübik hücrelerden oluşan primer follikül görülmektedir (ok ucu). Hematoksilen Eozin boyama 200x büyütme.



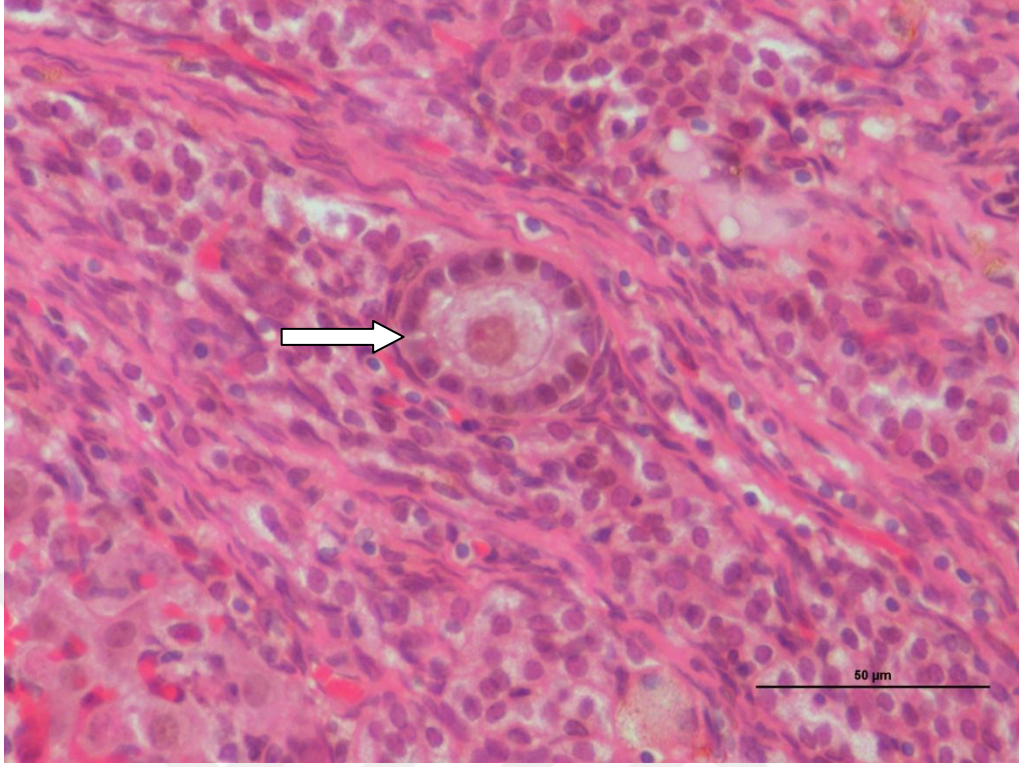
Şekil 4.15: Aktif üreme dönemine ait sıçan ovaryumlarında preantral follikül görülmektedir (ok ucu). Hematoksilen Eozin boyama 200x büyütme.



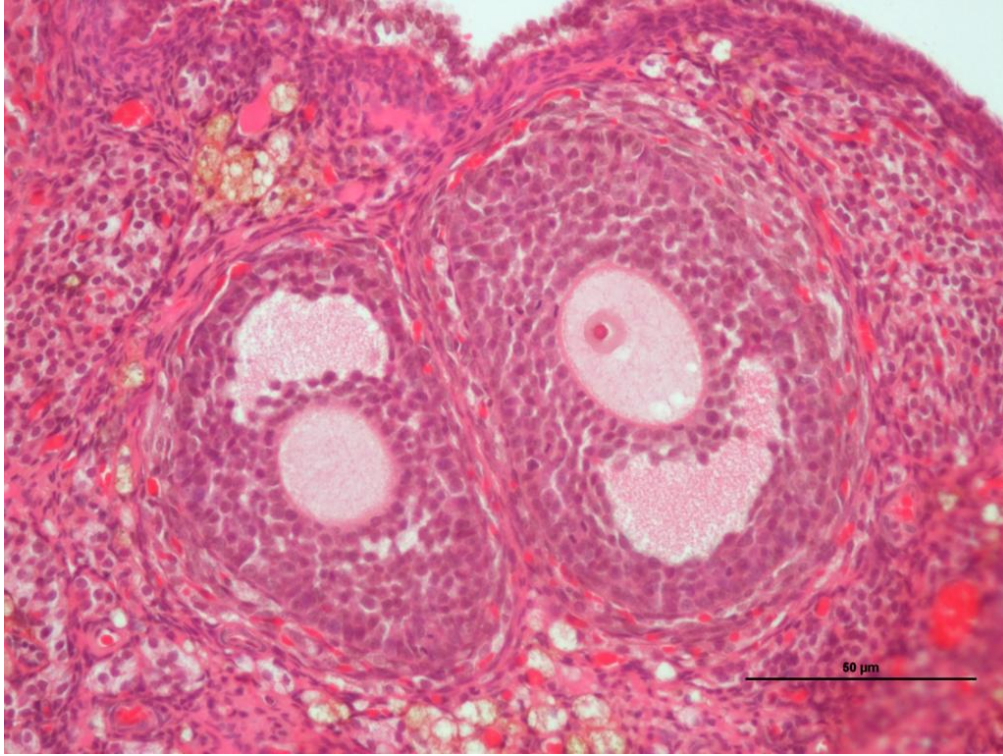
Şekil 4.16: Aktif üreme dönemine ait sıçan ovaryumu. Gelişen folliküllerle (ok ucu) birlikte korpus luteum yapıları (KL) gözlenmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 20x büyütme.



Şekil 4.17.: Aktif üreme dönemine ait tek katlı yassı hücrelerden oluşan primordiyal folliküller (ok ucu) görülmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 200x büyütme.



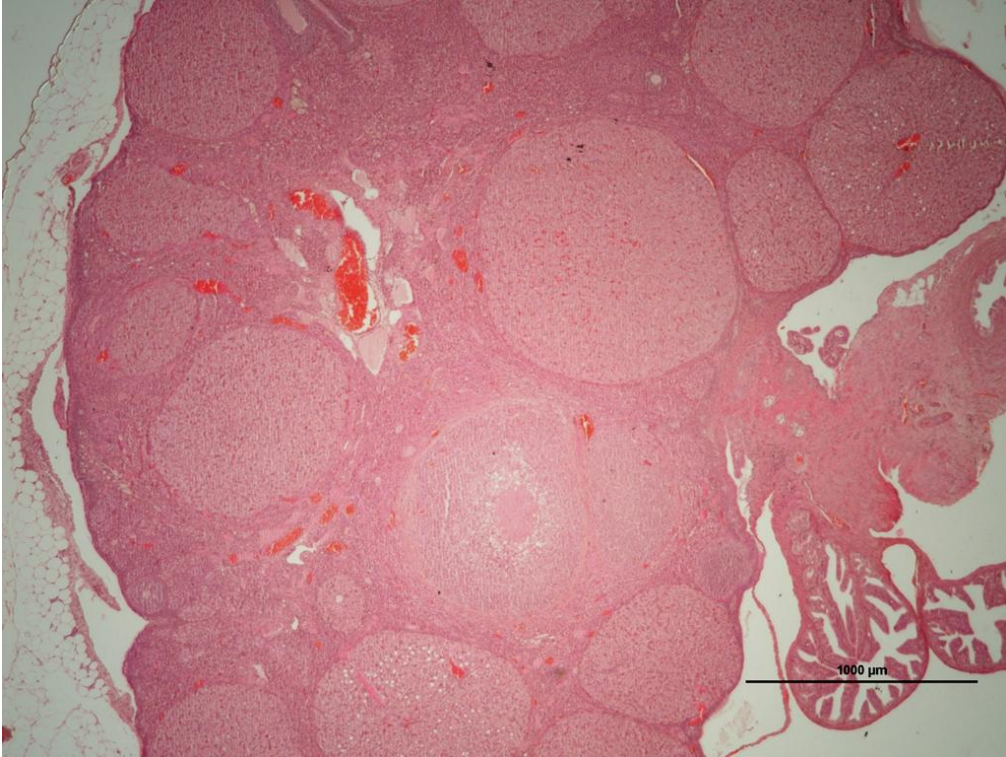
**Şekil 4.18:** Aktif üreme dönemine ait tek katlı kübik hücrelerden oluşan primer follikül (ok ucu) görülmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 200x büyütme.



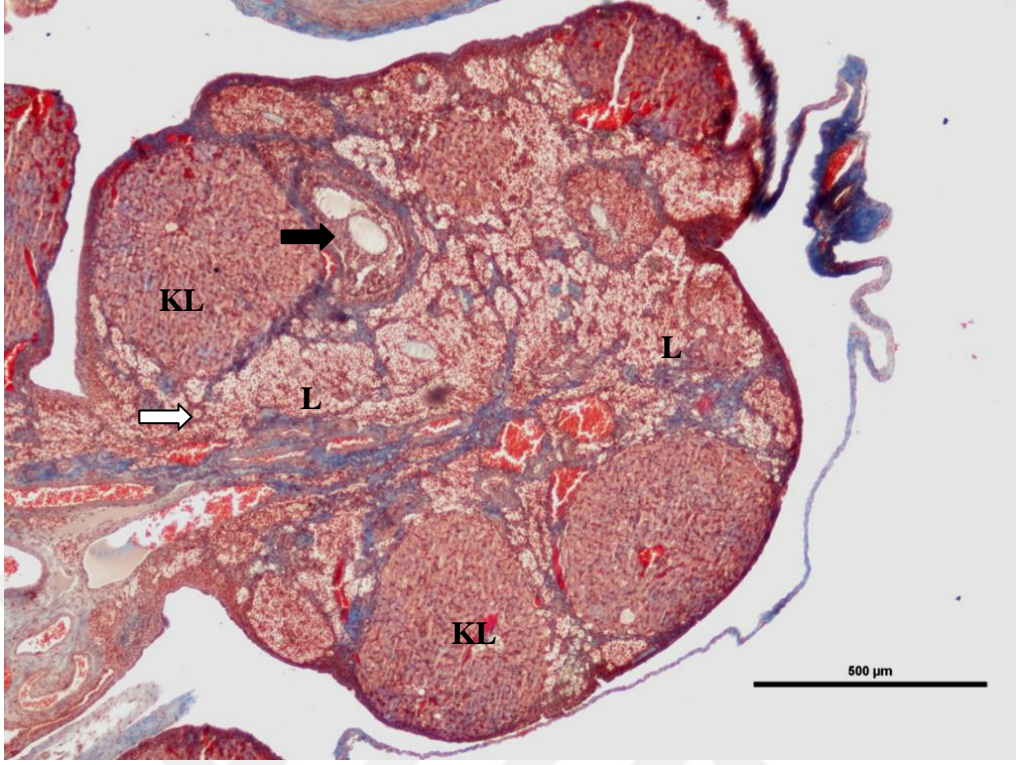
**Şekil 4.19.:** Aktif üreme dönemine ait ovaryumda sekonder (antral) follikül görülmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 200x büyütme.



**Şekil 4.20.:** Aktif üreme dönemine ait ovaryumda tersiyer follikül görülmektedir. Hematoksilen Eozin boyama 100x büyültme.



**Şekil 4.21.:** Menopoz dönemine ait sıçan ovariyumu. Az miktarda follikül (ok ucu) ve yoğun miktarda korpus luteum (KL) yapıları gözlenmektedir. HE boyama 20x büyültme.



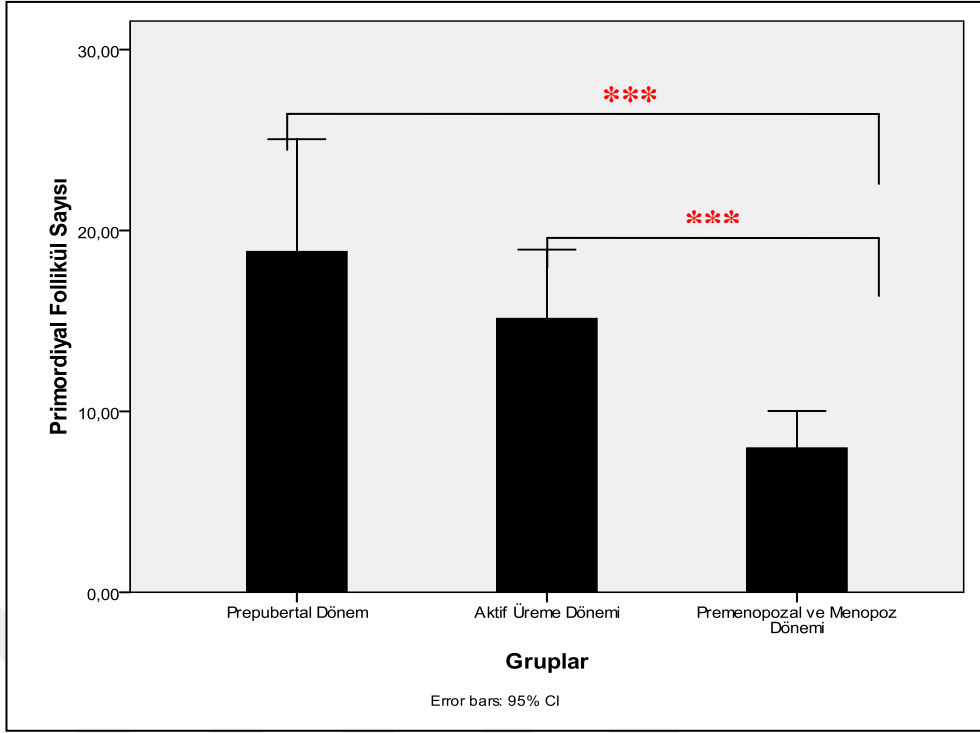
**Şekil 4.22: Menopoz dönemine ait sıçan ovaryumu. Gelişen follükül siyah ok, primordial follükül beyak ok), korpus luteum (KL) yapıları ve stroma içerisinde dağılmış lüteal hücreler (L) görülmektedir. Masson Trikrom boyama 40x büyültme.**

**Tablo 4.5: Serum AMH, INHB miktarları ile gelişen ve toplam follikül sayısının gruplara göre dağılımı. Ortalama  $\pm$  Standart Sapma.**

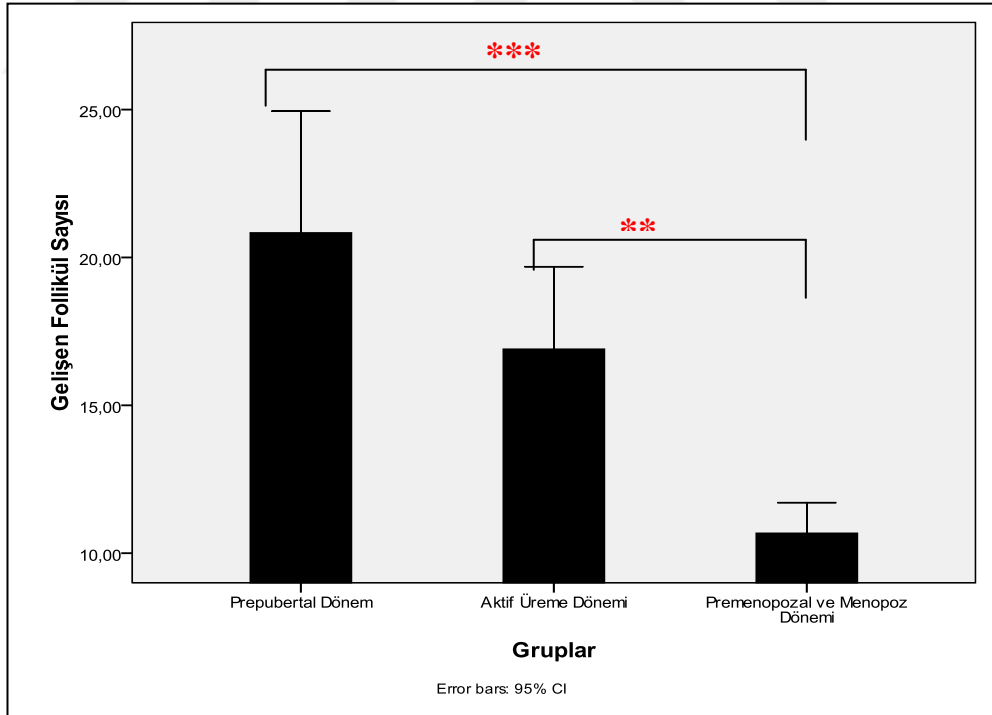
	<b>AMH</b>	<b>INHB</b>	<b>Gelişen Follikül Sayısı</b>	<b>Primordiyal Follikül Sayısı</b>
<b>Grup 1</b>	4,21 $\pm$ 1,95	44,01 $\pm$ 16,55	20,83 $\pm$ 3,92	18,83 $\pm$ 5,91
<b>Grup 2</b>	6,84 $\pm$ 1,68	48,09 $\pm$ 9,38	16,90 $\pm$ 2,66	15,13 $\pm$ 3,63
<b>Grup 3</b>	5,56 $\pm$ 1,11	45,01 $\pm$ 7,27	10,68 $\pm$ 0,99	7,98 $\pm$ 1,96
<b>p Değeri</b>	0,041*	0,825	0,000*	0,001*

**Tablo 4.6: Serum AMH ve INHB miktarlarının ovaryum follikül sayıları ile karşılaştırılması.**

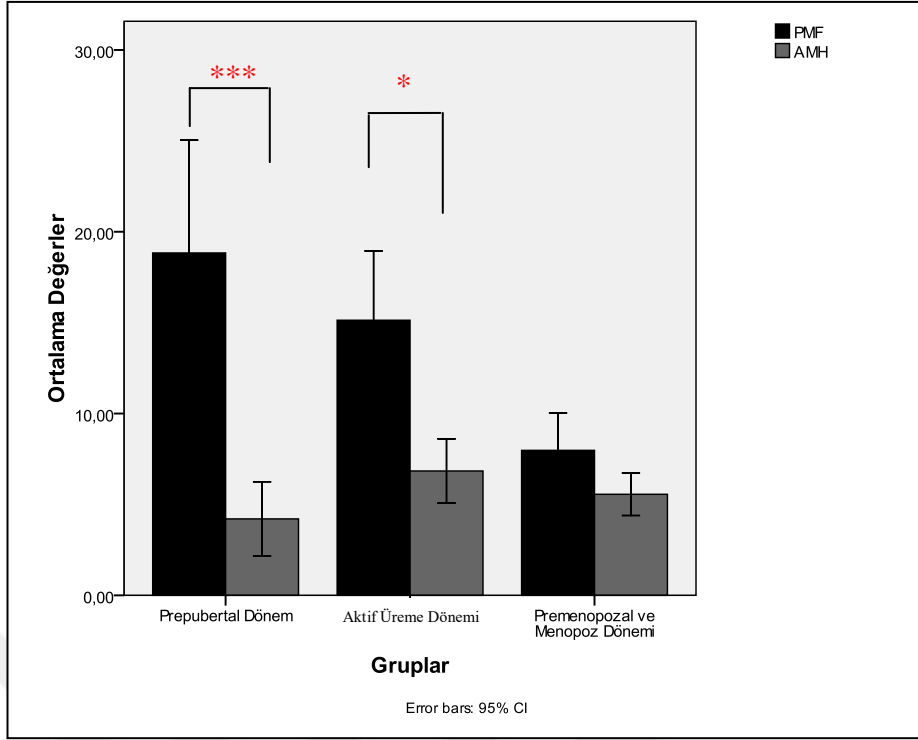
	<b>Primordiyal Follikül Sayısı</b>	<b>Gelişen Follikül Sayısı</b>
<b>AMH</b>	0,000*	0,001*
<b>INHB</b>	0,000*	0,000*



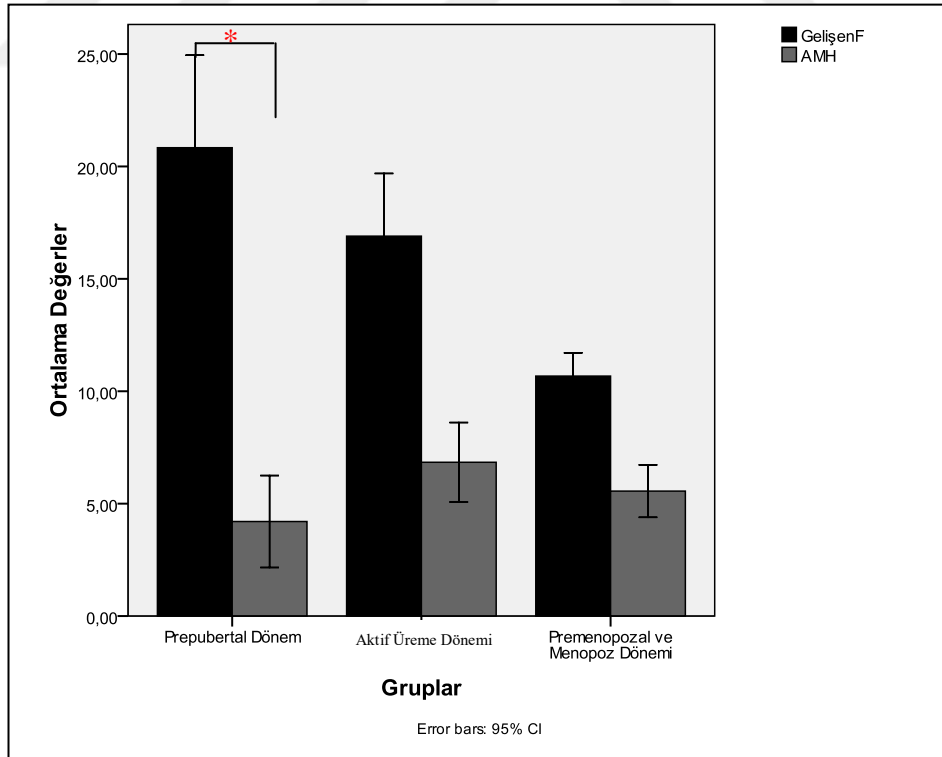
Şekil 4.23: Primordiyal follikül sayılarının yaşa bağlı dağılımı.



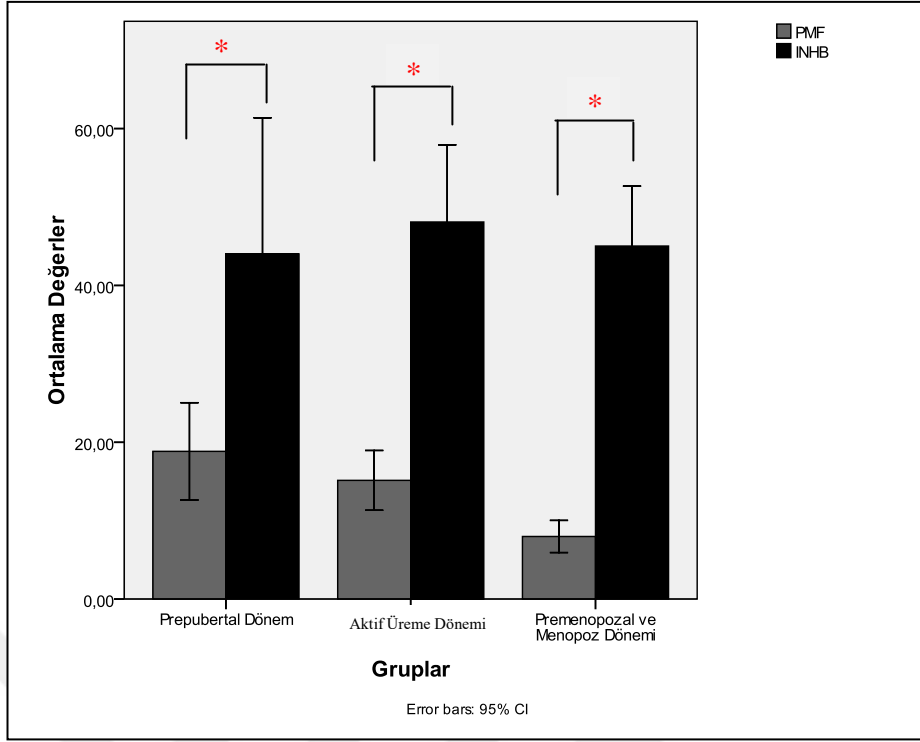
Şekil 4.24: Gelişen follikül sayılarının yaşa bağlı dağılımı.



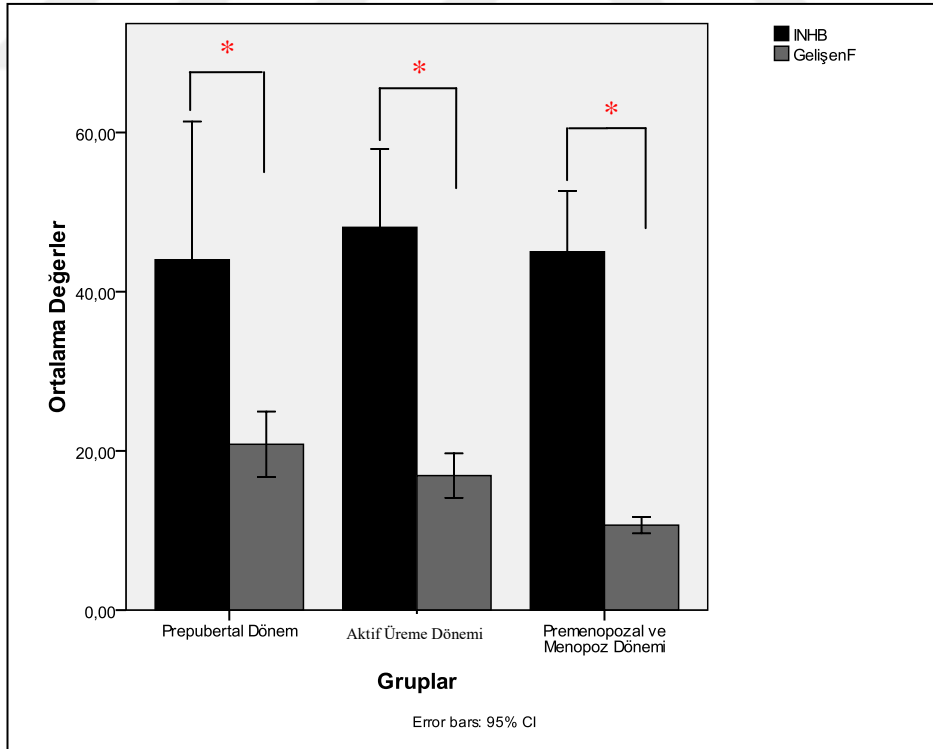
Şekil 4.25: Serum AMH miktarı ile primordiyal sayıları arasındaki farkın gruplara göre dağılımı.



Şekil 4.26: Serum AMH miktarı ile gelişen follükül sayıları arasındaki farkın gruplara göre dağılımı.



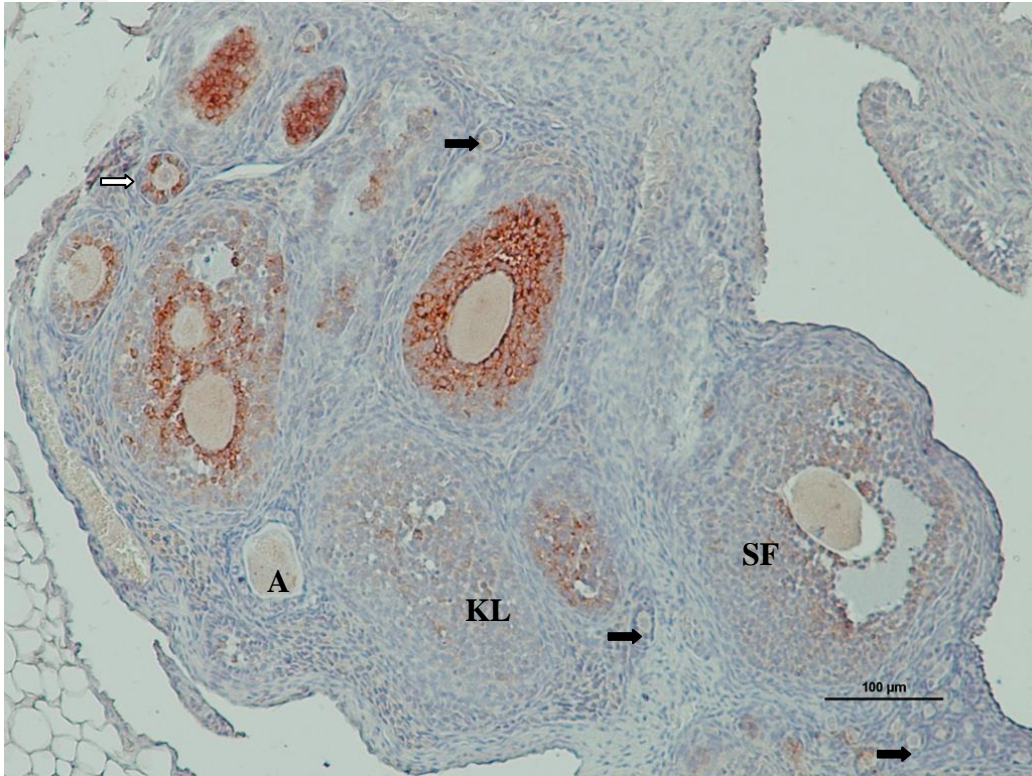
Şekil 4.27: Serum INHB miktarı ile primordiyal sayıları arasındaki farkın gruplara göre dağılımı.



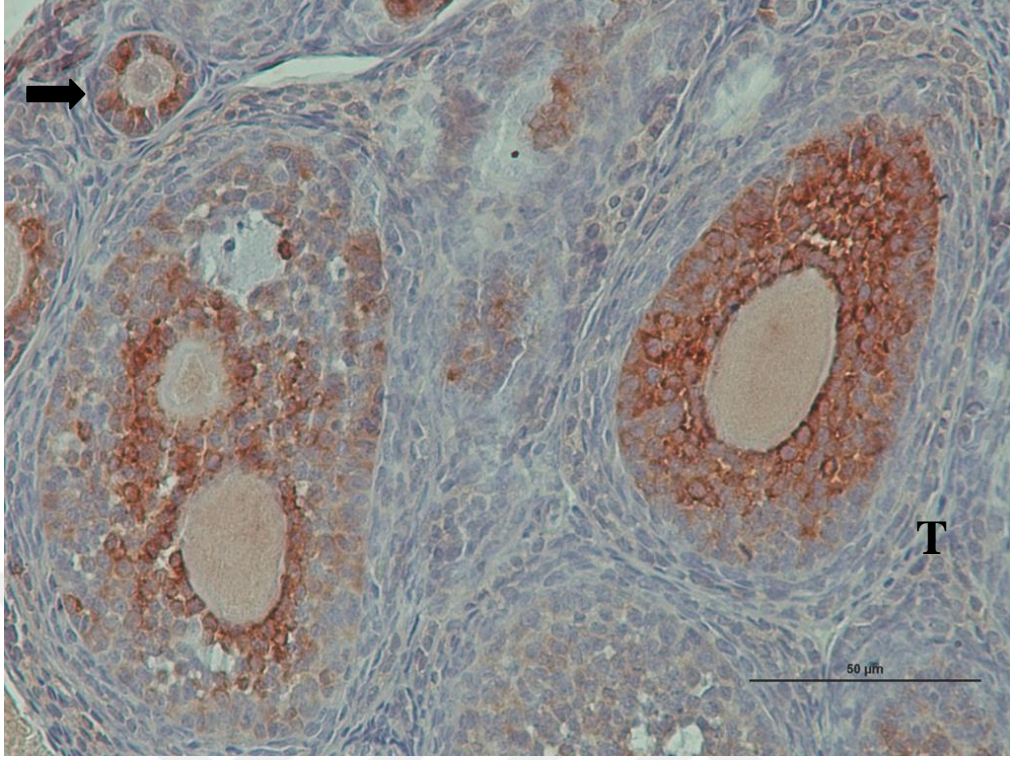
Şekil 4.28: Serum INHB miktarı ile gelişen follikül sayıları arasındaki farkın gruplara göre dağılımı.

#### 4.4. İmmünohistokimyasal Anti-Müllerian Hormon Değerlendirmesi

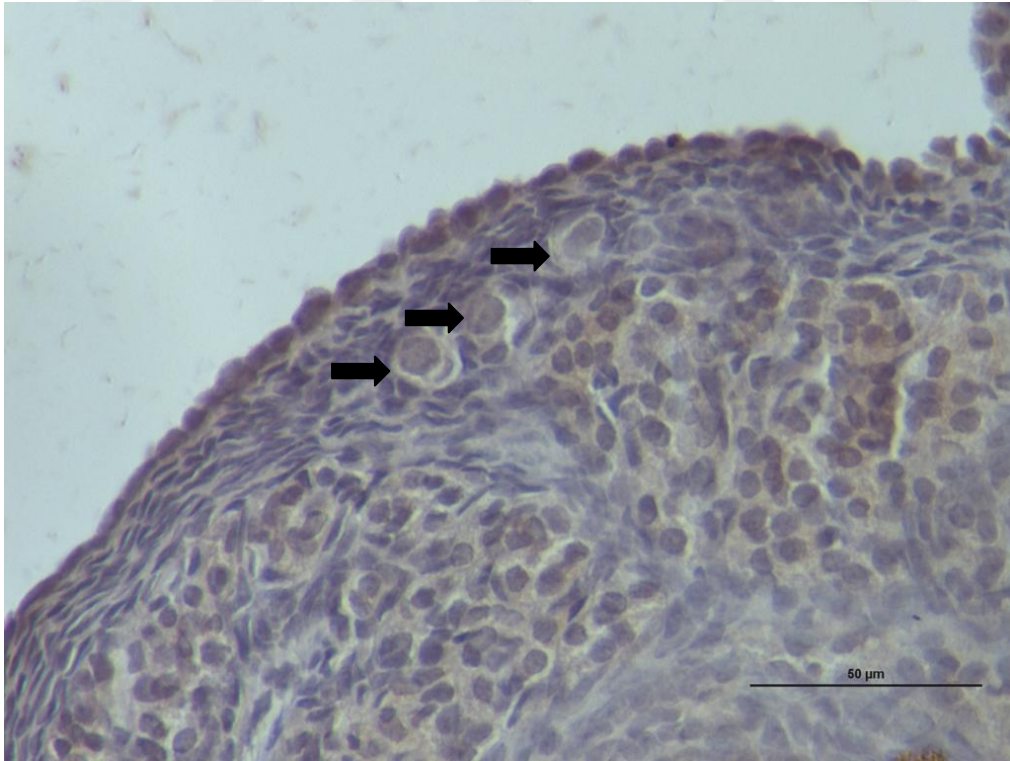
Tüm gruplara ait primordiyal folliküllerde herhangi bir AMH ekspresyonu gözlenmedi. AMH ekspresyonu gelişen (primer, preantral, sekonder ve tersiyer) folliküllerde gözlendi. Folliküller yaşa bağlı olarak değerlendirildiğinde aynı tipteki folliküller arasında ekspresyonda bir fark gözlenmedi. Geç dönemdeki sekonder folliküllerde ve tersiyer folliküllerde AMH salgılayan hücre miktarında azalma olduğu, tersiyer folliküllerde sadece mural granüloza ve kümülüs hücrelerinde az miktarda salınım olduğu gözlendi. Atretik folliküllerde, teka interna ve teka eksterna hücrelerinde AMH salınımı gözlenmedi.



Şekil 4.29.: Prepubertal dönem sıçan ovariumunda farklı follikül yapılarında AMH ekspresyonu. primordiyal (siyah ok), primer (beyaz ok), sekonder(SF), atretik (A) follikül, korpus luteum (KL). 100x büyültme.



**Şekil 4.30:** Prepubertal döneme ait sıçan ovaryumunda tek katlı follükül hücreli primer follükül (ok ucu) ve çok katlı follükül hücreli primer follükül yapısında AMH ekspresyonu görülmekte. Teka interna ve eksterna hücreleri (T). 200x büyültme.



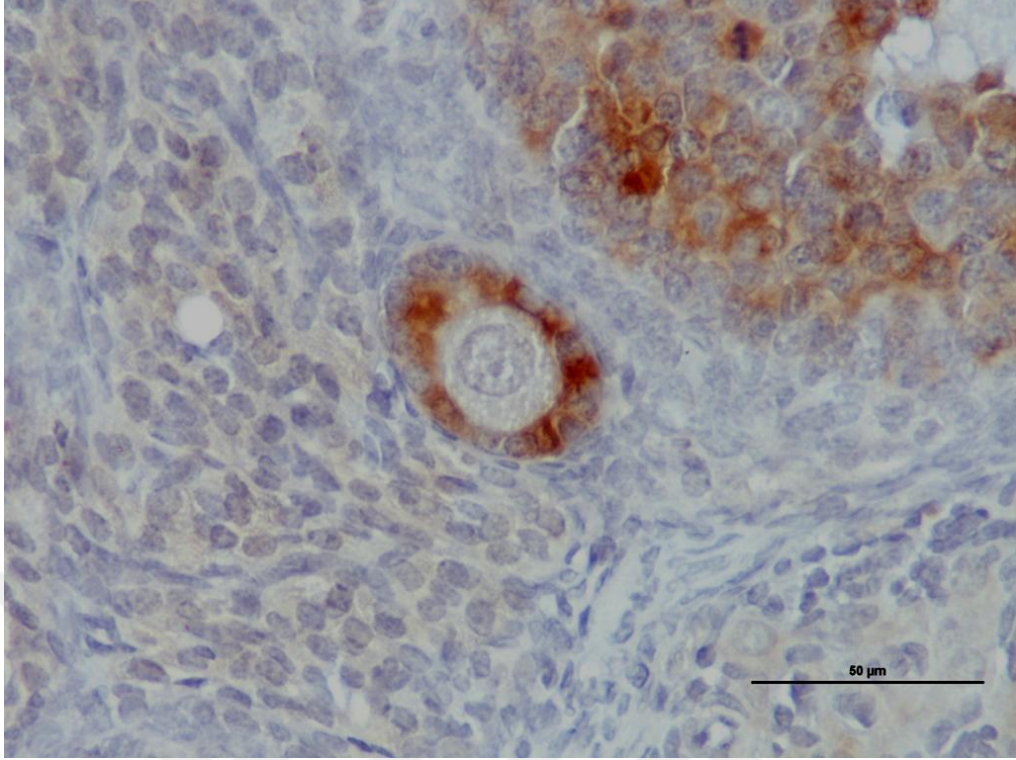
**Şekil 4.31:** Prepubertal döneme ait sıçan ovaryumunda primordial follüküllerde AMH ekspresyonunun olmadığı görülmekte (ok ucu). 400x büyültme.



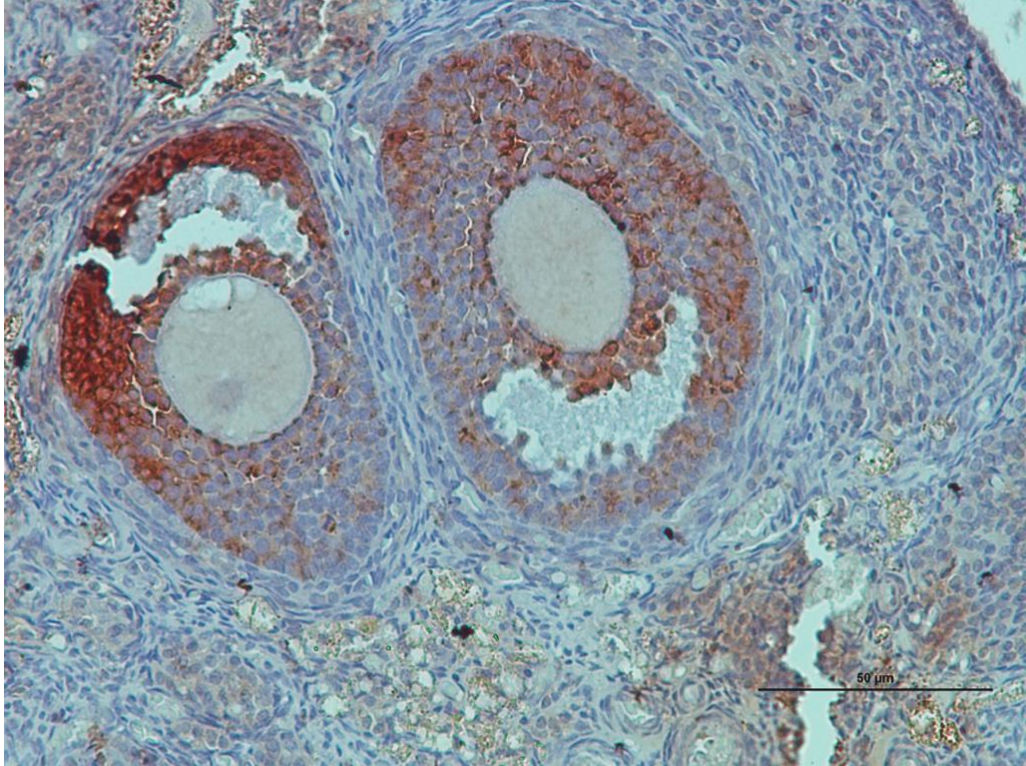
Şekil 4.32.: Prepubertal döneme ait sıçan ovaryumunda, çok katlı primer follükül hücrelerinde AMH ekspresyonu görülmektedir. 400x büyültme.



Şekil 4.33: Prepubertal döneme ait sıçan ovaryumunda tersiyer follükül görülmektedir. Mural granüloza (beyaz ok), kumulus hücreleri (siyah ok) 100x büyültme.



**Şekil 4.34:** Aktif üreme dönemine ait sıçan ovaryumundaki primer follikül hücrelerinde AMH ekspresyonu görülmektedir. 400x büyültme.



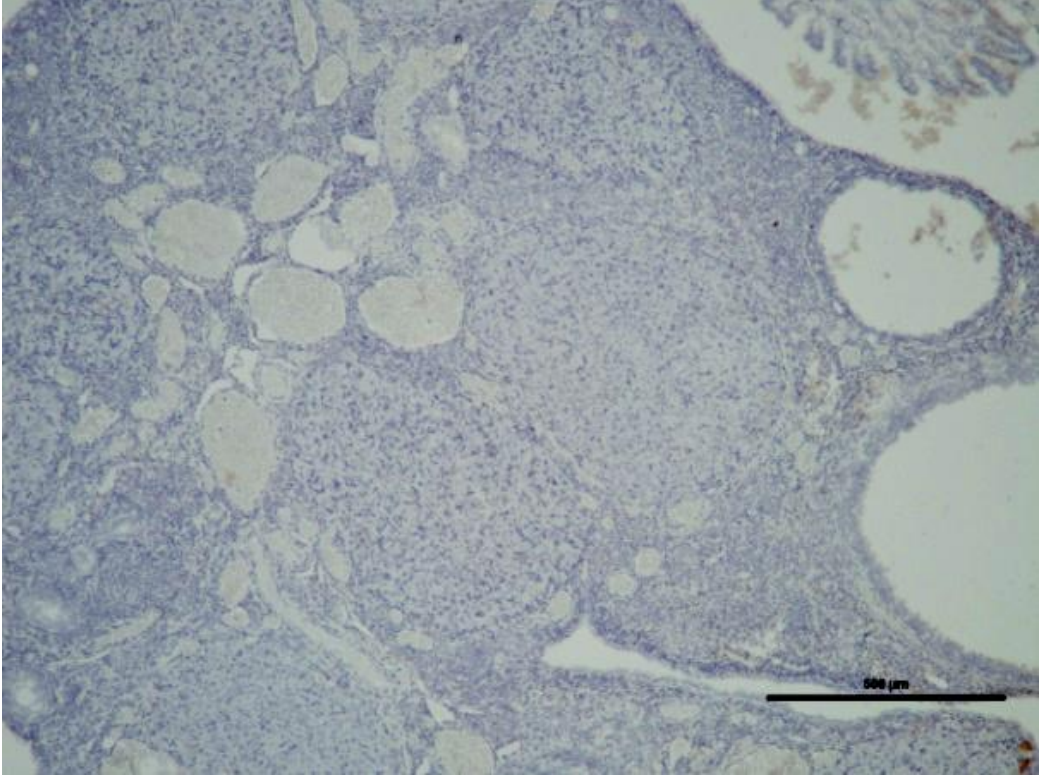
**Şekil 4.35:** Aktif üreme dönemine ait sıçan ovaryumunda sekonder follikül hücrelerinde AMH ekspresyonu görülmektedir. 200x büyültme.



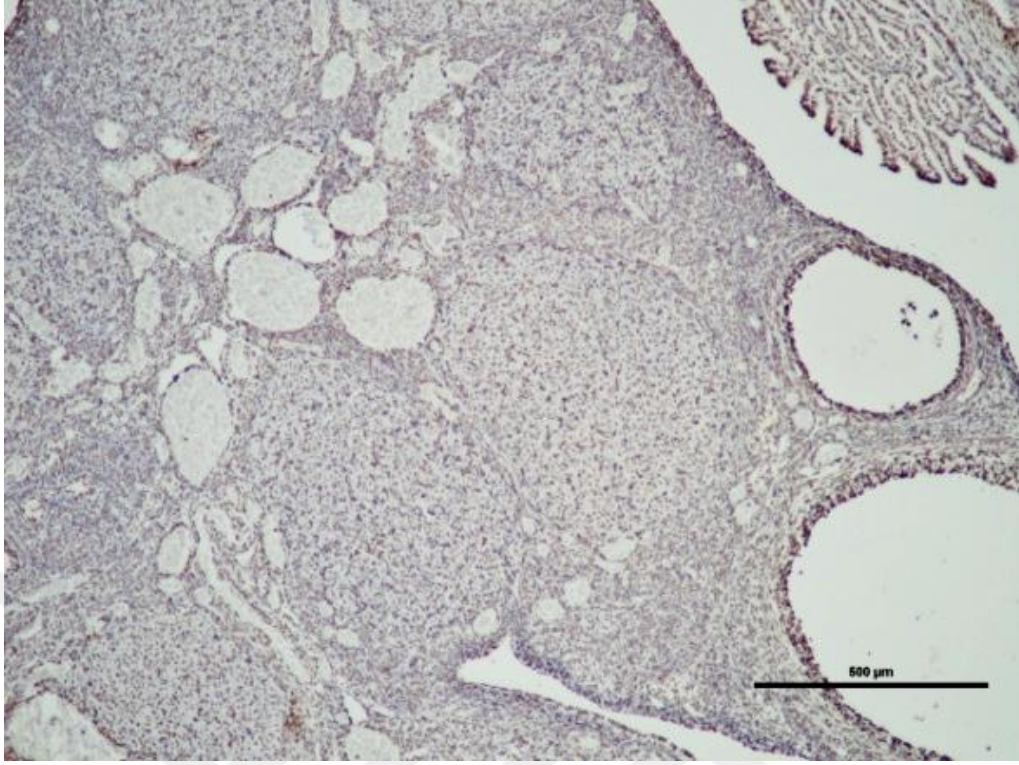
**Şekil 4.36: Premenopoz ve menopoz dönemine ait sıçan ovaryumunda, preantral follikül hücrelerinde AMH ekspresyonu görülmektedir. 400x büyültme.**

#### 4.5. TUNEL Boyama Değerlendirmesi

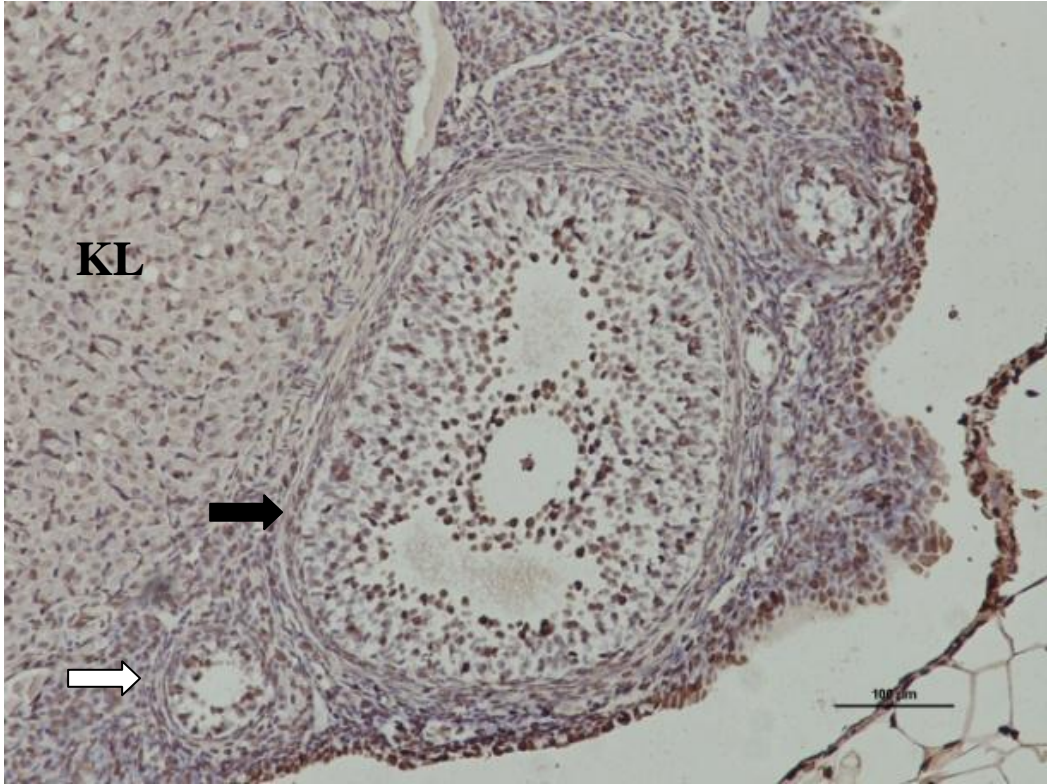
TUNEL boyama yapılan doku preparatlarında tüm gruplara ait dokularda her yaşta yoğun miktarda apoptoz gözlendi. Apoptoz sadece folliküllerde değil, atretik folliküllerde, korpora lutea, ovaryum stroması ve germinal epitelde de gözlendi. Follikül hücrelerindeki apoptotik hücreler lümeneye yakın bölgede ve lümen içerisinde daha yoğun halde görüldü. Follikül büyüklüğü arttıkça TUNEL pozitif hücrelerde de artış olduğu gözlendi.



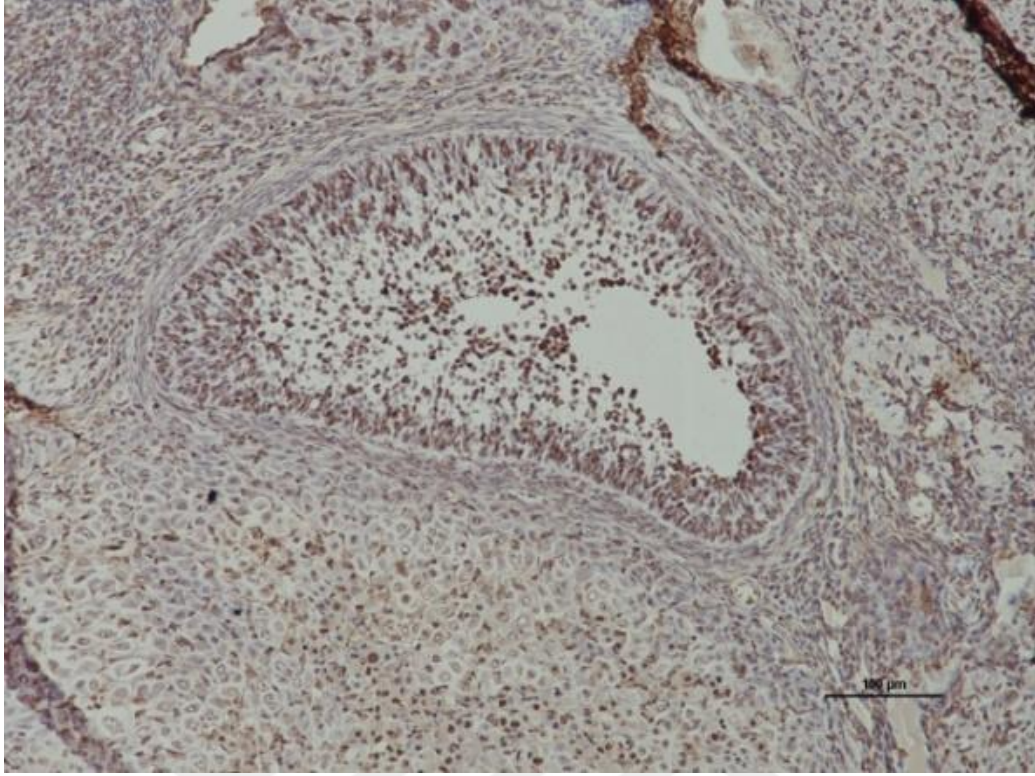
Şekil 4.37: Premenopoz-menopoz dönemi sıçan ovaryumu TUNEL boyaması negatif kontrol. 40x büyültme.



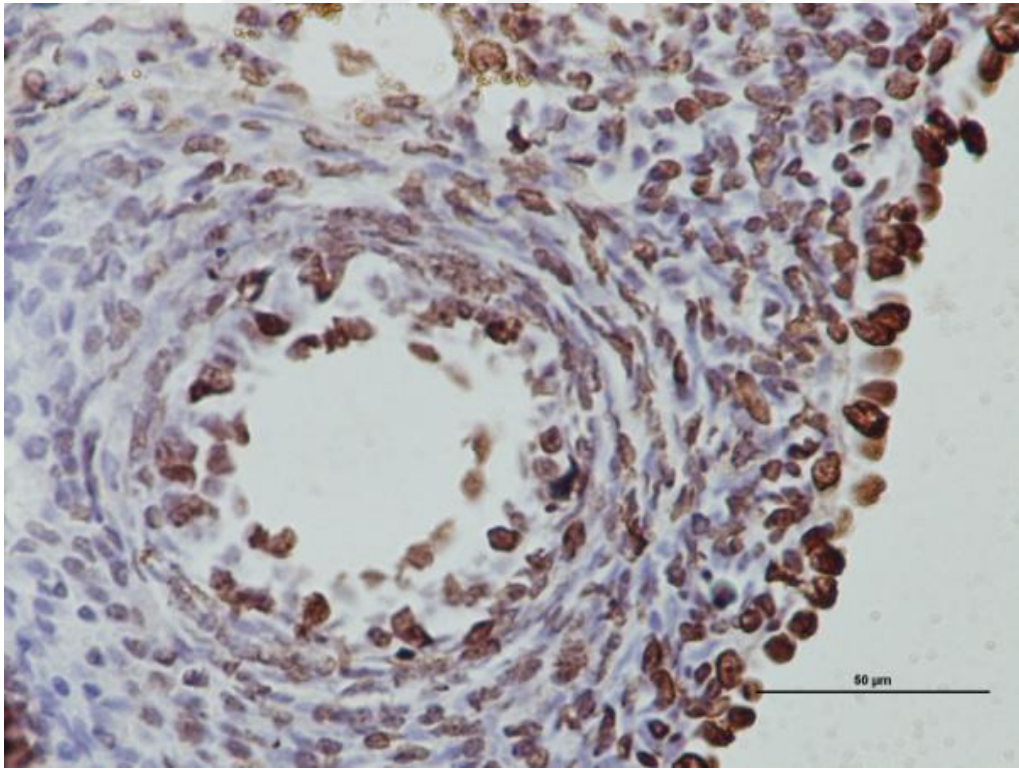
Şekil 4.38: Premenopoz-menopoz dönemi sıçan ovariyumu TUNEL boyaması pozitif kontrol. 40x büyültme.



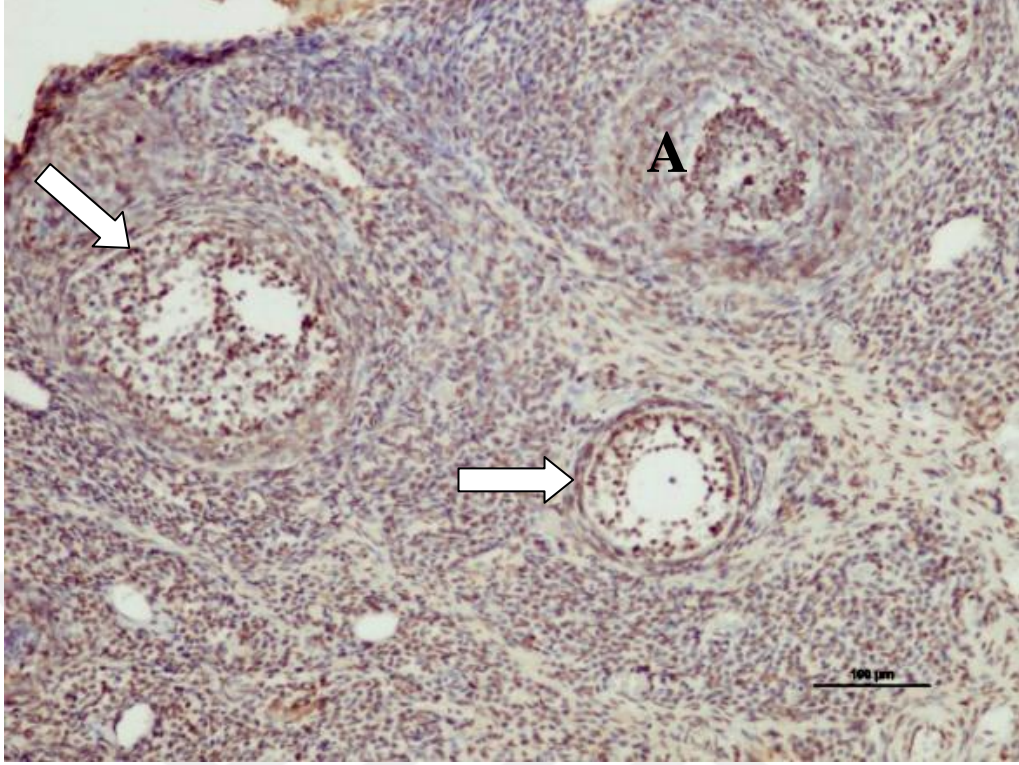
Şekil 4.39: Premenopoz-menopoz dönemi sıçan ovariyumu TUNEL boyaması. Primer (beyaz ok), tersiyer follikül (siyah ok) ve korpus luteum (KL) görülmektedir. 100x büyültme.



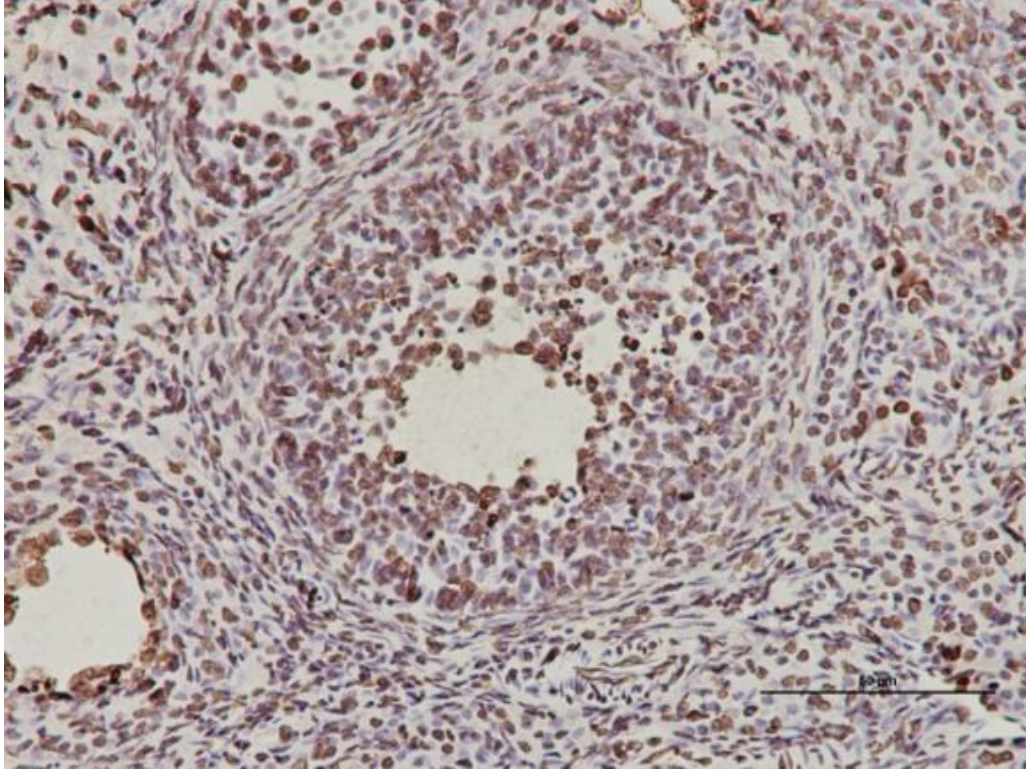
**Şekil 4.40:** Premenopoz-menopoz dönemi sıçan ovariyumu TUNEL boyaması. Sekonder follikül görülmektedir. 100x büyültme.



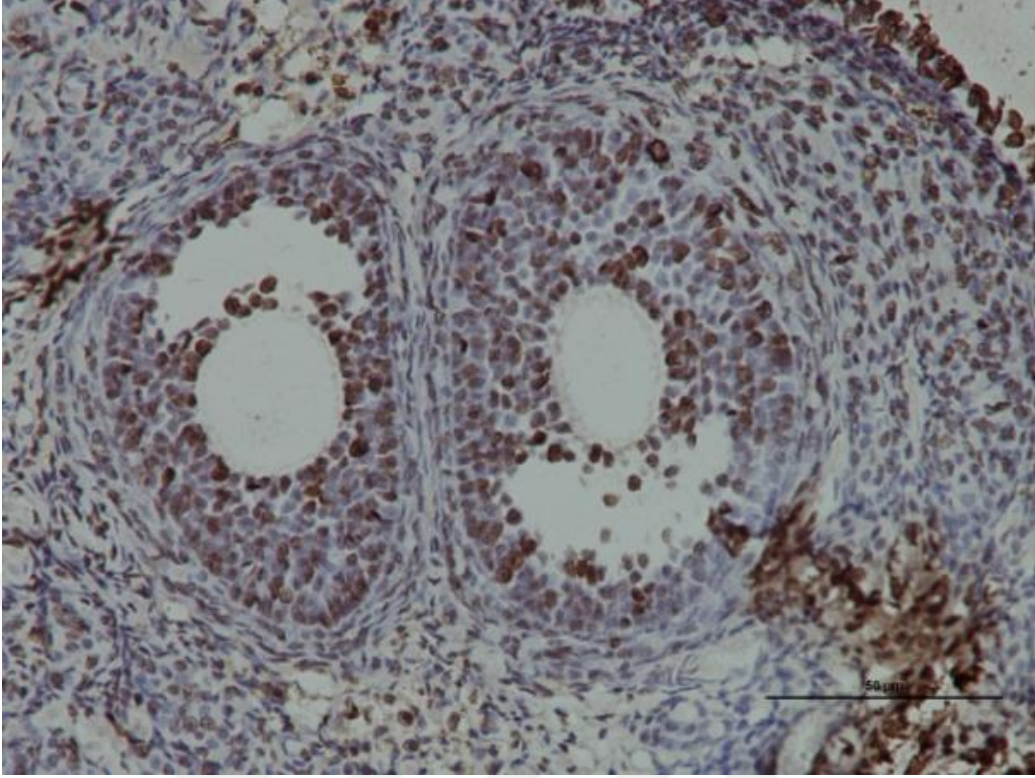
**Şekil 4.41:** Premenopoz-menopoz dönemi sıçan ovariyumu TUNEL boyaması. Çok katlı primer follikül görülmektedir. 400x büyültme.



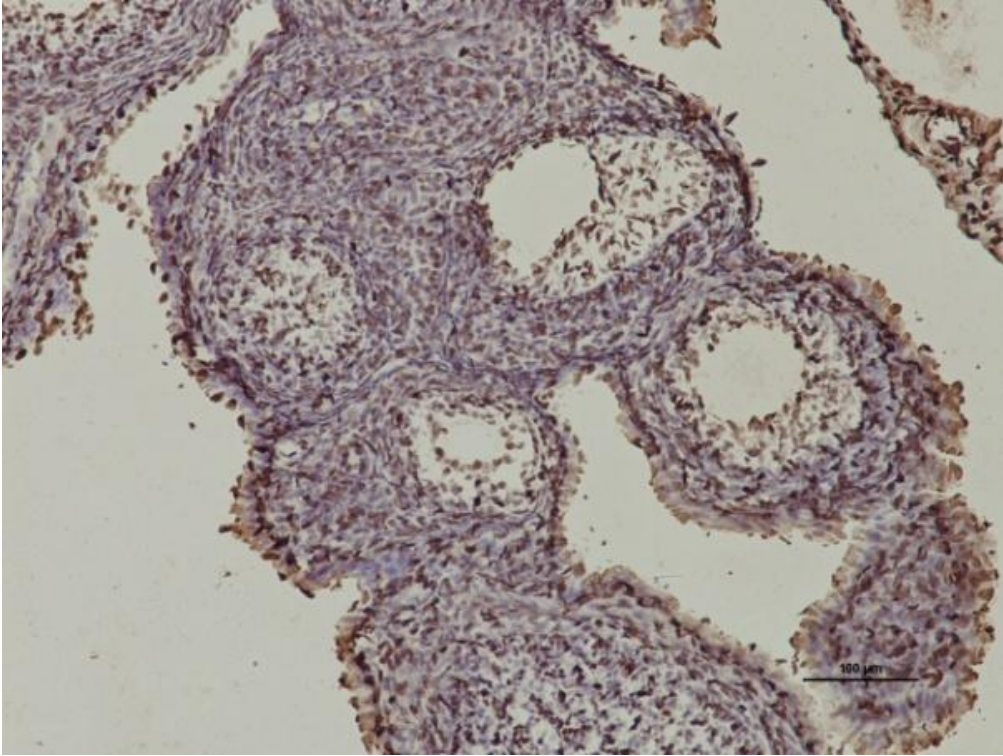
Şekil 4.42: Aktif üreme dönemi sıçan ovariyumu TUNEL boyaması. Gelişen folliküller (ok), atretik follikül (A) ve ovariyum stroması görülmektedir. 100x büyültme.



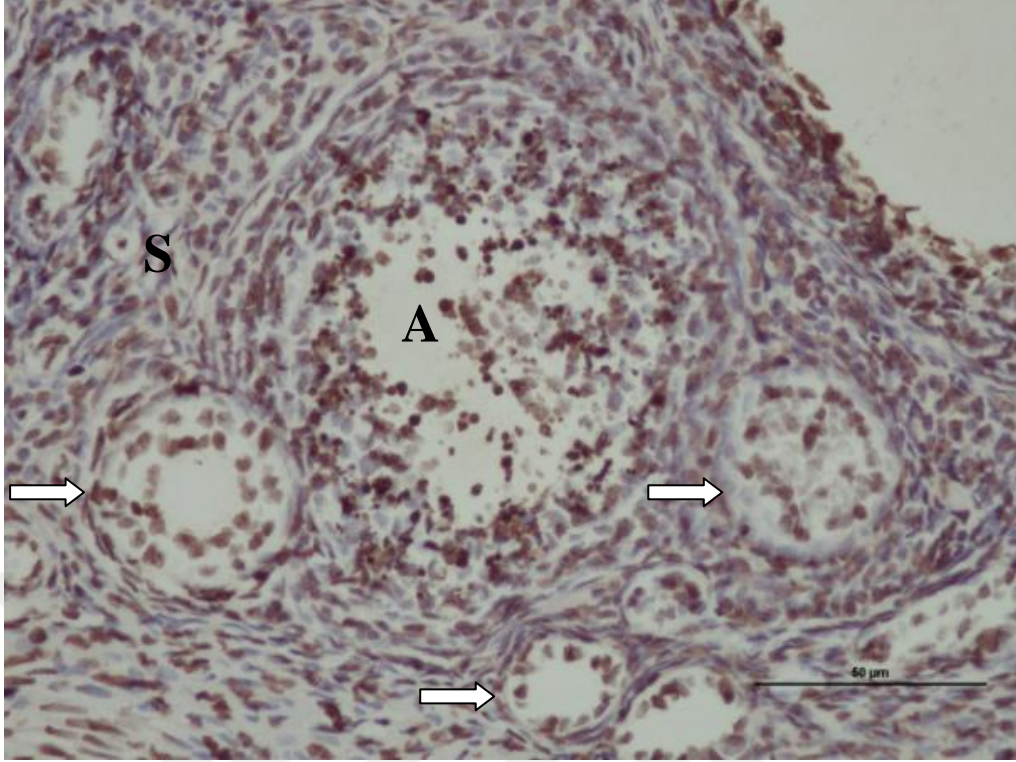
Şekil 4.43: Aktif üreme dönemi sıçan ovariyumu TUNEL boyaması. Çok katlı primer ve sekonder follikül, teka interne-eksterna hücreleri ve ovariyum stroması görülmektedir. 200x büyültme.



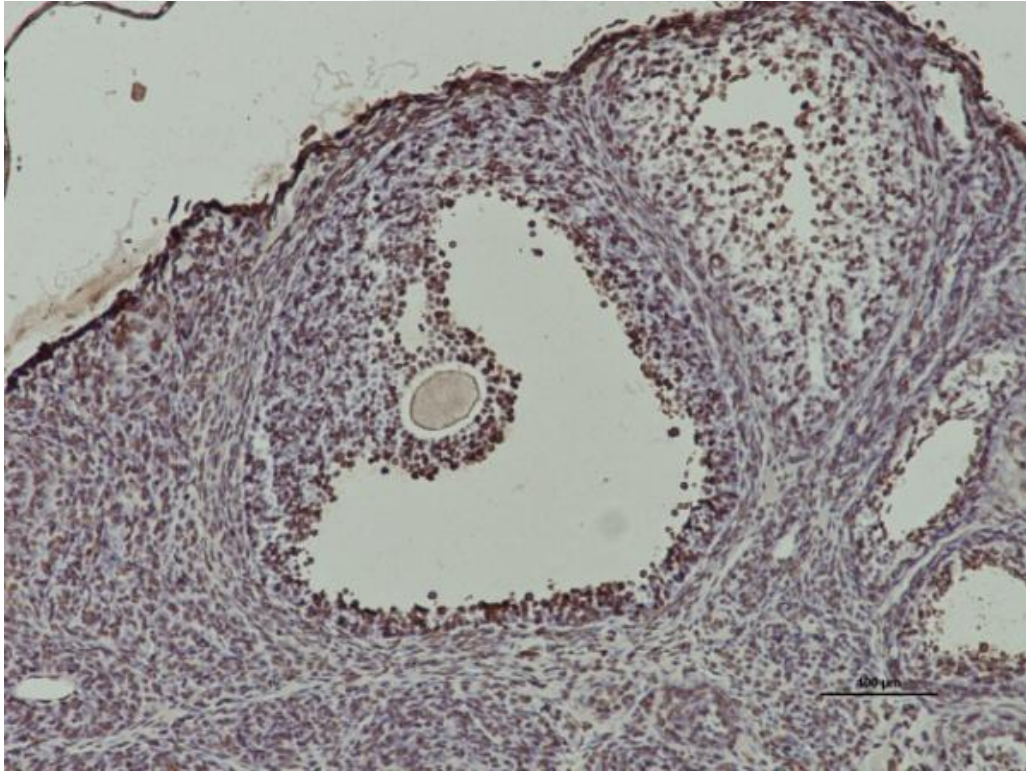
**Şekil 4.44:** Aktif üreme dönemi sıçan ovariyumu TUNEL boyaması. Sekonder folliküller görülmektedir. 200x büyültme.



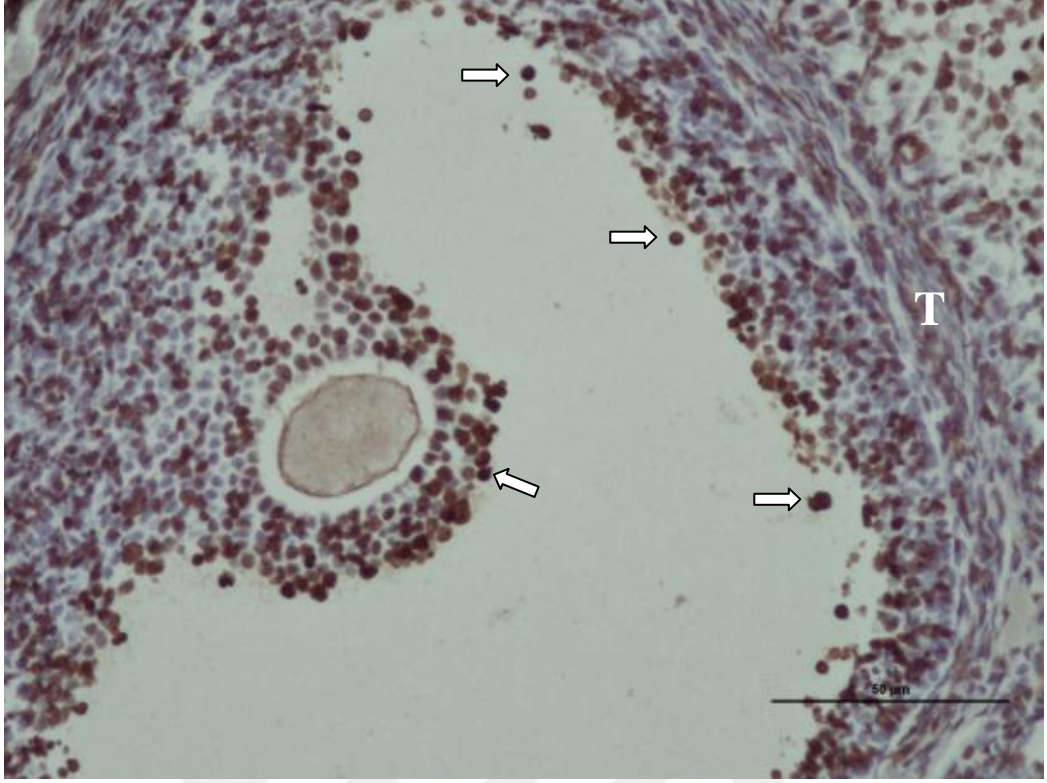
**Şekil 4.45:** Prepubertal dönem sıçan ovariyumu TUNEL boyaması. Gelişen folliküller germinal epitel ve ovariyum stroması görülmektedir. 100x büyültme.



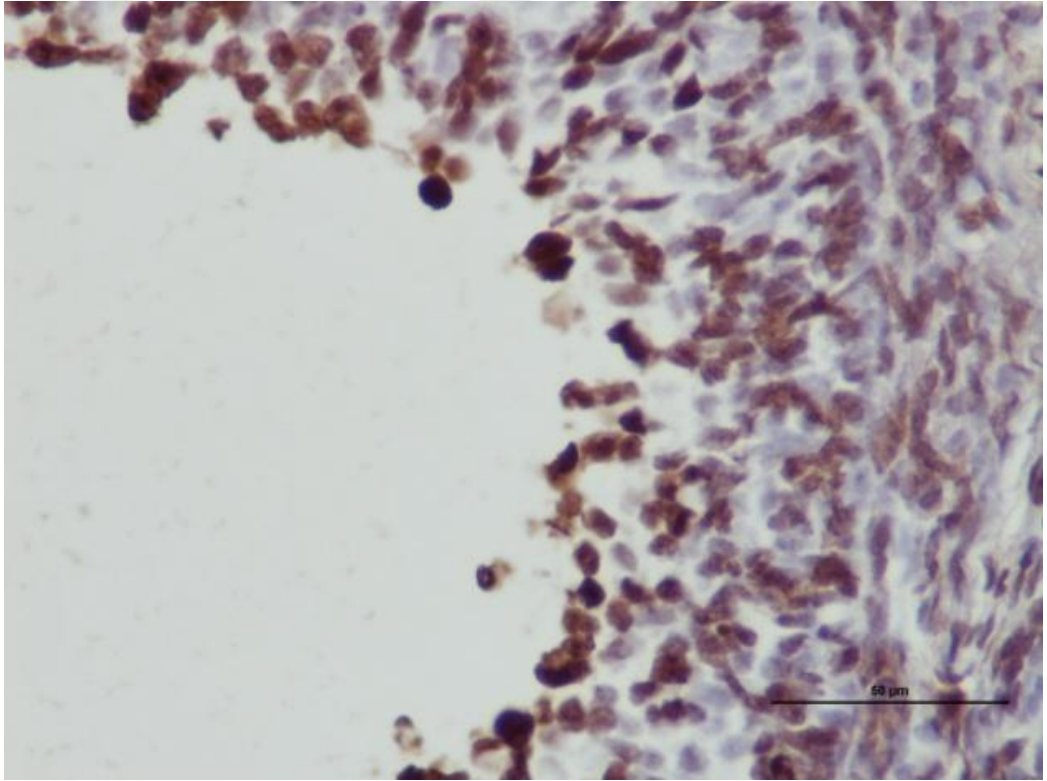
Şekil 4.46: Prepubertal dönem sıçan ovaryumu TUNEL boyaması. Gelişen folliküller (ok), atretik follikül (A) ve ovaryum stroması (S) görülmektedir. 200x büyültme.



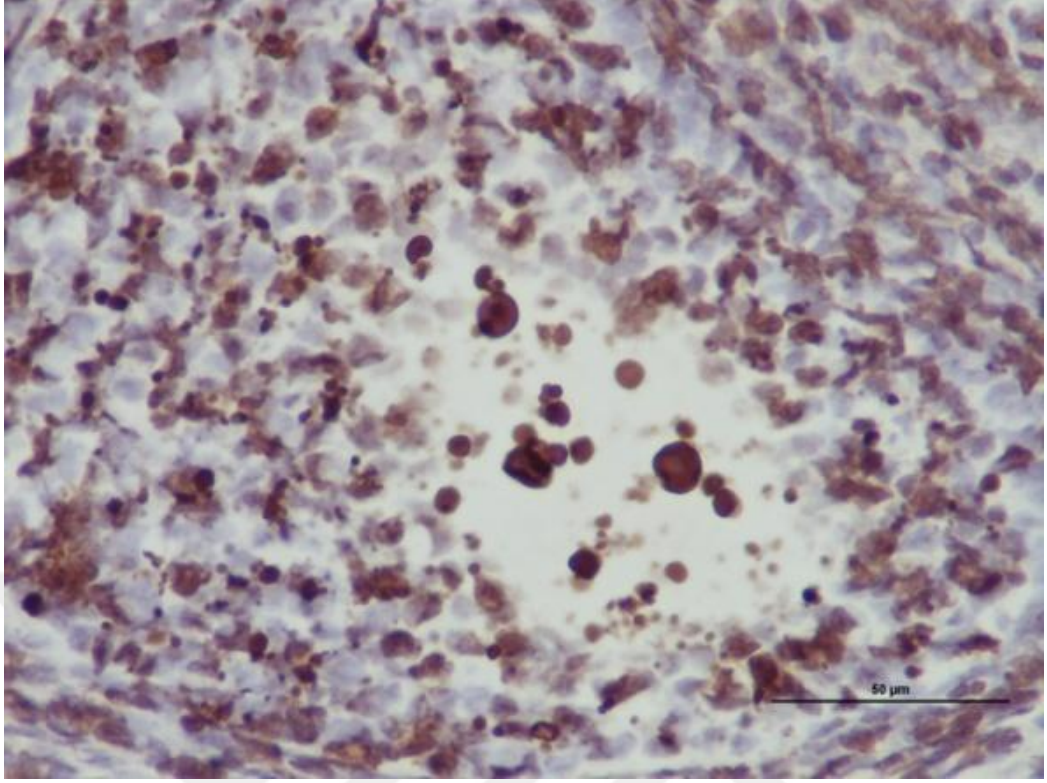
Şekil 4.47: Prepubertal dönem sıçan ovaryumu TUNEL boyaması. Tersiyer follikül görülmektedir. 100x büyültme.



Şekil 4.48: Prepubertal dönem sıçan ovaryumu. Tersiyer follikül lümenindeki TUNEL pozitif hücreler (ok) ve teka interna ve eksterna tabakası (T) görülmektedir. 200x büyültme.



Şekil 4.49: Prepubertal dönem sıçan ovaryumu TUNEL boyaması. Tersiyer follikülün bir kısmı görülmektedir. 400x büyültme.



**Şekil 4.50:** Prepubertal dönem sıçan ovaryumu TUNEL boyaması. Atretik follikül görülmektedir. Lümen içerisinde apoptotik cisimcikler bulunmaktadır. 400x büyültme.

## 5. TARTIŞMA

Folikülogenezin başlaması ve sürdürülebilirliği hipotalamustan salgılanan gonadotropinlerin yanı sıra follikül hücrelerinden salgılanan bazı hormonların varlığına da bağlıdır. Bu çalışmada oogenez süresince, follikül hücrelerinin ürettiği anti-Müllerian hormon ve inhibin-B hormon ekspresyonunun yaşa bağlı olarak sıçan ovaryumlarında gösterdiği değişimler incelendi.

Dimerik glikoprotein yapıya sahip Anti-Müllerian hormon TGF- $\beta$  ailesinin bir üyesidir ve gelişmekte olan folliküllerin granüloza hücrelerinden salgılanır (42, 43, 45). Kadınlarda AMH ekspresyonu prenatal dönemde, ovaryumlarda kübik hale gelen primer folliküllerin tek katlı granüloza hücrelerinden salgılanmaya başlar ve menopoza kadar devam eder (45). AMH salınımı ilk olarak erken dönemdeki primer folliküllerin kübik hücrelerinde gözlenir. Ekspresyonun en yüksek seviyeye ulaştığı folliküller, preantral ve küçük çaptaki antral folliküllerdir. Preovulatuvar düzeydeki folliküllerin mural granüloza ve kümülüs hücrelerinde ve atreziye uğrayan folliküllerde AMH salınımı görülmez (46-48). İmmunohistokimyasal çalışmalarda AMH ekspresyonunun, antral folliküllerde yarı miktarda, küçük antrallerde en yüksek seviyede, 4mm'den sonrakilerde ise düzenli bir düşüş gösterir (11). Bu çalışmada aynı şekilde AMH salınımının primer, preantral, sekonder ve tersiyer follikül hücrelerinden salgılandığı, gözlemlendi. Geç dönem sekonder folliküllerde az miktarda AMH salınımı gözlenirken, tersiyer folliküllerde de sadece mural granüloza ve kümülüs hücrelerinin bazılarında yine az miktarda ekspresyonu tespit edildi. Primordiyal follikül hücrelerinde ekspresyon gözlenmedi. Bu da AMH ekspresyonunun sadece gelişen follikül hücrelerinden salgılandığını kanıtlar niteliktedir. Hormonal etkileşimlere bağlı olarak tek katlı yassı şekilden kübik hale geçen follikül hücrelerinden AMH ekspresyonu ve geç dönem antral folliküllerinde AMH ekspresyonunu azaltan etmenler daha moleküler düzeyde yapılacak çalışmalarla detaylı bir şekilde açıklanabilir. Gruplar arası boyanma miktarlarına bağlı olarak aynı tipteki folliküllerde gözle ölçülebilir düzeyde bir fark gözlenmedi.

Folikül boyutu büyüdükçe follikül hücre sayısı da artmaktadır. Bu da eksprese edilen AMH miktarını etkileyebilir. Farklı yaş gruplarındaki aynı tip folliküller arasında ekspresyon miktarında farklılık olup olmadığı yapılacak başka çalışmalarda follikül sıvısındaki AMH miktarı ölçümü kantitatif düzeyde bilgi verebilir.

Dolaşımında AMH miktarı değişkenlik göstermiş olup doğumdan hemen sonra ilk en yüksek seviyesine erişmekte ve yaklaşık 9 yaşına kadar bu seviye devam eder. Pubertede, 9-15 yaşları arasında, AMH miktarında ufak bir azalma gözlenmektedir. İkinci en yüksek seviyeye 25'li yaşlarda ulaşan AMH, bu süreden itibaren 50-51 yaşlarına kadar yavaşça azalma gösterir ve menopoza ile birlikte serumda neredeyse ölçülemez hale gelir (59). AMH, FSH uyarımına bağlı follikül gelişimini baskılayarak fazla miktarda follikülün gelişimini engeller (50). Aynı zamanda tüm folliküllerin ovulasyona erişimini engelleyerek dominant follikülün seçiminde de rol oynar (51). Ovaryumlarda AMH ekspresyonu azalınca FSH ve östrojen serbest kalır. Östrojen ve FSH en yüksek değere ulaşır ve LH pikini tetikler, ovulasyon gerçekleşir. Daha sonra follikül gelişimi tekrarlayınca anti-Müllerian hormon aromataz aktivitesini inhibe ederek LH reseptör sayısını ve östrojen biyosentezini azaltır (52). Erken yaşlarda AMH miktarının az olması menopoza da erken yaşlarda girilmesine sebep olur. Menopoz yaş farklılıklarının belirlenmesinde genetik faktörler büyük rol oynar (62, 63). Yaptığımız çalışmada aktif üreme döneminin yanı sıra prepubertal dönemde ve premenopoz-menopoz dönemindeki hayvan serumlarında AMH salınımının olduğu görüldü. Serum AMH miktarı gruplar arası anlamlı bir fark gösterdi  $p=0,041$ . Elde ettiğimiz verilerde prepubertal dönem ile aktif üreme dönemi arasında anlamlı bir fark bulunurken  $p=0,033$ , diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılık bulunmadı. Gruplardaki denek sayısının azlığı biyokimyasal sonuçlarda etkili olabilmektedir. Grafiklere baktığımız zaman ise serum AMH miktarının prepubertal dönemde belirli bir seviyede olduğu aktif üreme döneminde bu miktarın artış gösterdiği ve premenopoz-menopoz dönemindeki grupta bu miktarın azaldığı gözlemlendi. Sonuçlarımız, önceden yapılan çalışmalar ile paralellik göstermektedir. Ayrıca bu çalışmada yaşa bağlı serum AMH miktarı ile serum östradiol miktarı arasında pozitif yönde bağlantı gözlemlendi. Prepubertal dönemde en az seviyede eksprese edilen AMH ve E2 seviyelerinin, aktif üreme döneminde en fazla seviyede olduğu gözlemlendi. Premenopoz-menopoz döneminde ise iki hormon

miktarının da üretken döneme göre daha az olduğu fakat prepubertal döneme göre premenopoz-menopoz döneminde daha fazla olduğu tespit edildi. Aktif üreme dönemindeki bireylerden diğer gruplara kıyasla yaşa bağlı olarak daha fazla E2 ve AMH ekspresyonu olması beklenen bir sonuçtur. AMH ekspresyonunun aromataz aktivitesini bloke ederek östradiol miktarını azaltması durumu menstrual siklusta bireysel olarak yapılacak çalışmalar ile belirlenebilir. AMH ekspresyonu ile FSH salınım miktarı arasında yaptığımız incelemede herhangi bir ilişki bulunamadı. Bunun nedeni AMH'nın FSH duyarlılığını follikül düzeyinde bloke etmesi bu nedenle serum FSH miktarına etki etmemesinden kaynaklanıyor olabileceği şeklinde yorumlanmıştır.

Transforme edici büyüme faktörü  $\beta$  ailesinin bir diğer peptid üyesi olan inhibin B de granüloza hücrelerinden salgılanır (70, 71). Follikülogenezin ortasında östradiol ve inhibin B sekresyonunda artış olur. Bu artış gelişmeye devam edecek küçük antral folliküllerin seçilimini gösterir. Daha sonra inhibin B ve östradiol merkeze negatif geri bildirimde bulunarak FSH salınımını azaltmakta ve dominant follikül seçilir. Ovulasyon sırasında da ikinci en yüksek seviyede görülür (76). İnhibin B ekspresyonu, follikül hücreleri luteinizasyona giderken, FSH pikinden 1-2 gün sonra gözlenir (74). INHB endokrin düzenleyici olarak görev alır ve INHB ekspresyonu hipofiz bezinden doğrudan FSH salınımını baskılar (75). Küçük antral follikül (3-12mm çaplı) sıvısında INHB konsantrasyonu ile testosteron/androstenedion arasında pozitif yönde güçlü anlamlılık bulunur. İnhibin-B teka hücre bağımlı androjen üretiminde parakrin etki yarattığı düşünülmektedir. İnhibin-B hormonunun menstrüal siklusta endokrin ve parakrin etki yaratarak folliküler fazda dominant follikülün belirlenmesinde fizyolojik hormon olarak önemli bir görev üstlendiği düşünülmektedir (77). Yaptığımız çalışmada yaşa bağlı serum INHB miktarlarında gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı tespit edildi. Bunun nedeni biyokimyasal sonuçlarda elde edilen verilerin birbirine yakın olmasından kaynaklanabilir. Gruplar arası INHB miktarında anlamlı bir fark çıkmamasına rağmen grafikte INHB hormonunun aktif üreme döneminde daha fazla eksprese edildiği gözlemlendi. INHB miktarı diğer hormon miktarları ile karşılaştırıldığı zaman, serum AMH, FSH, E2 ve testosteron hormonları ile INHB salınım miktarı arasında anlamlı fark olduğu belirlendi. INHB ve E2 miktarının pozitif yönde bağlantılı

olması ve FSH'na göre negatif yönde ilişki göstermesi daha önce yapılan çalışmaları destekler niteliktedir. Yaşa bağlı AMH ve INHB hormonun yine pozitif yönde ilişkili olması ve aktif üreme döneminde daha fazla salgılanmaları önceki çalışmaları aynı şekilde destekler niteliktedir ve follikülogenezde birlikte önemli rol oynadıklarını göstermektedir. Serum INHB ile testosteron arasında çıkan anlamlı ilişki de iki hormonun follikülogenez süresince birbiri arasında parakrin etki yarattığını göstermektedir.

Fötal dönemde germ hücreleri ile stroma hücrelerinin oluşturduğu follikül hücreleri doğumda yaklaşık 1 milyon kadardır. Bu sayı menarje kadar azalır ve menarjda primordiyal follikül havuzunda yaklaşık 400bin follikül bulunur (20). Yaşam boyunca primordiyal follikül havuzundan gelişen folliküllerin fazlalığı atreziye uğrayarak yok olur (31). Oosit kaybı devamlı bir süreç olup oositlerin atreziye uğraması primer, sekonder ve antral aşamalarda gözlenir. Oosit kaybı yaklaşık 14 yaşlarına kadar artış gösterirken daha sonra bireyin menarjından itibaren menopoza kadar azalır. Menopoza girince ovaryumda yaklaşık 1000 tane primordiyal follikül gelişmeden kalır (37). Yaptığımız çalışmada ovaryumlarda yaşa bağlı korpus luteum miktarının arttığı gözlemlendi. Özellikle prepubertal dönemdeki bireylerde korpusa rastlanmadı. Bu da ovulasyonun gerçekleşmediğini göstermektedir. Aynı zamanda yaşa bağlı olarak artan ovaryum hacmini ve geniş damarlanmayı da korpus fazlalığı açıklamaktadır. Ayrıca yaşa bağlı olarak ovaryum stromasına yayılmış luteal hücre birikimi gözlemlendi. Bu da özellikle premenopoz-menopoz dönemindeki bireylerde artan ve apoptoza giden korpora luteadan kalan lütein hücreleri göstermektedir. Primordiyal follikül sayısında yaşa bağlı azalma olduğu, prepubertal dönemde fazla seviyede gözlenen primordiyal follikül sayısının menopoz dönemine doğru azaldığı tespit edildi. Premenopoz-menopoz dönemindeki bireylerde de az miktarda primordiyal follikül varlığı gözlemlendi. Çalışmamızda gelişen follikül miktarının da yaşa bağlı olarak azalış gösterdiği saptandı. Prepubertal dönemdeki bireylerde yoğun miktarda gelişen follikül görülmesi ve korpus luteuma rastlanmaması folliküllerin ovulasyona erişmeden atreziye uğradığını göstermektedir. Bu da doğumla birlikte yaklaşık 1 milyon primordiyal follikül varken sayının giderek azalmasını ve puberteye erişen bireyde 400 bin civarında follikül kalmasını açıklamaktadır. Premenopoz-menopoz dönemindeki hayvanlarda da bir miktar

gelişen follüküle rastlandı. Bu da menopoza girmenin direkt ovaryum rezervinin tükenmesinden dolayı değil, aslında daha çok morfolojik ve fizyolojik nedenlere bağılı olarak üretkenliğin durdurulduğunu, gelişen follüküllerin ovulasyona uğramadan atreziye uğradığını göstermektedir.

AMH ovaryumlarda follükülogenezin erken dönemlerinde bir çeşit inhibe edici büyüme faktörü olarak fonksiyon gösterir ve primordiyal follükül gelişimini inhibe eder (47). AMH eksikliğinde, daha fazla sayıda primordiyal follükül gelişir. Normal ovulasyon oranına rağmen ovaryumlarda daha fazla gelişen follükül olması, oosit dejenerasyonu ve follükül atrezisini artırarak erken yaşlarda primordiyal follükül havuzunun boşalmasına neden olur (12, 49). Dolaşımdaki AMH miktarı, iki ovaryumda toplam gelişmemiş granüloza hücreleri ile toplam gelişen follükül sayısını yansıtır. Buna bağılı olarak serum AMH miktarı ovaryum rezervi için çok iyi bir belirteçtir (60, 61). Yaptığımız çalışmada da serum AMH miktarı ile primordiyal follükül sayısı arasında anlamlı bir fark tespit edildi. Gruplar değerlendirildiğinde, prepubertal ve aktif üreme dönemindeki PMF ve AMH arasında anlamlı bir fark gözlenirken ( $p<0,005$ ), premenopoz-menopoz dönemi ile diğer gruplar arasında bir fark bulunmadı. Bu da menopoz dönemindeki bireylerde primordiyal follükül ve AMH miktarı arasında bir düzensizlik olduğunu, menopoz dönemindeki bireylerde AMH miktarının ovaryum rezervini tam yansıtmadığını göstermektedir. Bunun yanında serum AMH miktarı ile gelişen follükül sayısı arasında anlamlı bir fark saptandı. Yaşa bağılı gelişen follükül sayısının da menopoza kadar azaldığı gözlendi. Prepubertal dönemde serumda AMH görülmesi ovaryumlarda gelişen follükül olmasından kaynaklanmaktadır. Fakat prepubertal dönemde gelişen follükül sayısının diğer gruplara göre daha fazla olmasına rağmen serum AMH miktarının aktif üreme dönemine göre daha az olması prepubertal dönemde gelişen follüküllerin birçoğunun preantral ve antral seviyeye ulaşmadan atreziye uğraması olabilir. Buna bağılı olarak ovaryumda bulunan primer follüküllerden eksprese edilen AMH miktarı üretken dönemdeki miktara erişmiyor olabilir. Böylelikle AMH primordiyal follüküllerin hepsinin FSH duyarlılığını baskılayamıyor, bu nedenle de daha fazla follükül gelişmeye başlıyor olabilir. Bu durum doğumdan puberte dönemine kadar yoğun miktarda gelişen follükül olmasını ve buna bağılı olarak primordiyal havuzunun kısa sürede azalmasını açıklayabilir. Puberte öncesindeki bireylerde yapılacak çalışmalar

bunun kesin nedenini ortaya koyarak bireylerde önceden alınacak önlemlerle puberteye daha fazla sayıda primordiyalle girilmesini sağlayabilir. Ayrıca, puberte dönemine giren bireydeki ovaryum rezervinin miktarı ve menopoz yaşını tayin etmede serum AMH miktarı kullanılabilir. Aynı zamanda puberteye erişen bireylerde ovaryum rezervinin yüksek tutulmasının menopoz yaşını geciktireceği düşünülmektedir. Menopoz dönemine giren dişi bireylerde de az miktarda olsa follikül olduğu ve bu yüzden gelişme evresine giren folliküllerden anti-müllerian hormon ekspresyonu, serumda bulunma nedenini göstermektedir. Menopoz döneminde kalan az miktardaki primordiyal folliküllerin gelişmeye devam etmesi fakat ovulasyon gözlenmemesi morfolojik veya hormonal yönden uygun ortam sağlanamadığından dolayı olabilir. Bu durum menopoz dönemindeki bireylerde yapılacak moleküler ve endokrinolojik çalışmalarla daha iyi açıklanabilir ve menopoz dönemi rezervleri kullanılarak gerektiğinde menopoz durdurulabilir veya menopoza erken girme önenebilir.

İnhibin-B, granüloza hücrelerine özgü bir hormondur ve gelişen uyarılmamış preovulatuvar folliküllerden, preantral ve küçük antral folliküllerden salgılanır. Bu yüzden dolaşımdaki miktarı genelde follikül sentezini belirtir. İnhibin B gelişen küçük antral follikül sayısını gösteren bir belirteç görevi de üstlenir. INHB miktarının azalması üretken yaşlarda follikül sayısının azaldığını gösteren en erken dönem belirteçidir (72). Follikül sıvısındaki INHB miktarı preovulatuvar folliküllerde küçük antral folliküllere göre iki kat daha yoğun gözlenir (77, 80). Yaptığımız çalışmada serum INHB miktarı ile primordiyal ve gelişen follikül sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlılık gözlemlendi  $p < 0,0005$ . Böylelikle serum INHB miktarı dişilerde hem gelişen follikül miktarını hem de ovaryum rezervini yansıtmaktadır.

Kadınlarda yapılan bazı klinik çalışmalarda AMH miktarının vücut kütle indeksi ile ilişkili olduğu görüldü ve yaşa bağlı vücut kütle indekslerinin AMH salınımı ile negatif korelasyon gösterdiği saptandı (53, 54, 56). Bizim sonuçlarımızda, serum AMH miktarı ile hayvan ağırlıkları arasında pozitif yönlü bir ilişki olduğu gözlemlendi ( $p < 0,0005$ ). Bu konuda bildirilmiş herhangi bir hayvan çalışması bulunmamaktadır. Klinik çalışmalarda denek sayısının oldukça fazla olması farklı değerlendirme kriterleri çalışma sonuçlarının farklı olmasına neden

olmaktadır. Serum INHB miktarı ile hayvan ağırlıkları ve ovaryum ağırlıkları arasında da pozitif yönlü bir ilişki vardı ( $p<0,0005$ ).

Ovaryum rezervini oluşturan primordiyal follüküller düzenli olarak antral follükülleri oluşturmak amacıyla gelişir ve sadece bir kaçı seçilerek olgun ovumu oluşturur. Geriye kalan seçilmemiş follüküller dejenere olmakta ve apoptoz yoluyla ortadan kaldırılır. Bu durum ovaryum rezervinin azalarak bireyin menopoza gitmesine kadar sürer. Follüküler gelişimin erken evrelerinde oositlerdeki apoptoz, granüloza hücrelerinin dejenerasyonunu başlatan bir süreçtir (81). Follüküler olgunlaşma sürecinin ileriki evrelerinde granüloza hücrelerinin farklı bölgelerinde görülen apoptoz dejenerasyonunu başlatır, daha sonra tüm granüloza hücrelerinin apoptoza uğraması ile oosit ölür (82). Yaptığımız çalışmada sadece follüküllerde değil aynı zamanda ovaryum dokusunun hemen hemen her bölgesinde (ovaryum follükülleri, korpus luteum, germinal epitel, teka interna ve teka eksterna tabakası) her yaşa ait hayvanda yoğun miktarda apoptotik hücreye rastladık. Bu da apoptozun sadece follüküllerin dejenerasyonunda değil, tüm ovaryumun düzenli olarak yenilenmesinde kullanıldığı düşünülmektedir.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmaya göre;

1. AMH ekspresyonu gelişen folliküllerin granüloza hücrelerinden eksprese edilir.
2. AMH ekspresyonu preantral ve erken dönem antral folliküllerde en fazla seviyede salgılanır.
3. AMH ekspresyonu geç dönem sekonder folliküllerden itibaren azalmaya başlar.
4. AMH ekspresyonu tersiyer folliküllerde az miktarda da olsa mural granüloza ve kümülüs hücrelerinde gözlenir.
5. Geç dönem antral folliküllerinde AMH ekspresyonunu azaltan etmenler daha moleküler düzeyde yapılacak çalışmalarla belirlenebilir.
6. AMH miktarı en fazla aktif üreme döneminde eksprese edilir.
7. Serum AMH miktarı üretkenliği prepubertal ve premenopoz-menopoz dönemi göz önüne alındığında tam olarak yansıtmamaktadır.
8. İnhibin B hormonu FSH ekspresyonunu inhibe edici göreve sahiptir.
9. Serum inhibin B miktarı üretkenliği prepubertal ve premenopoz-menopoz dönemi göz önüne alındığında tam olarak yansıtmamaktadır.
10. AMH ve İNHB gelişen folliküllerden salgılanması nedeni ile follikülogenezde önemli role sahiptir.
11. AMH ekspresyonunun aromataz aktivitesini bloke ederek östradiol miktarını azaltması durumu menstrual siklusta bireysel olarak yapılacak çalışmalar ile belirlenebilir.
12. Ovaryum endokrinolojisini daha detaylı anlamak amacı ile moleküler düzeyde daha geniş çaplı araştırmalar yapılmalıdır.
13. İNHB ve testosteron hormonu follikülogenez süresince parakrin etki yaratmaktadır.
14. Ovaryum rezervi yaşa bağlı olarak azalmaktadır.
15. Prepubertal dönemde salgılanan AMH miktarı menopoz yaşını belirler.

16. Menopoza giren bireylerde de primordiyal ve gelişen folliküle rastlanmaktadır.
17. Vücut ağırlı hem serum AMH miktarı hem de INHB miktarı ile pozitif yönde ilişki göstermektedir.
18. Ovaryum dokusu sürekli yenilenen bir organdır.



## KAYNAKLAR

1. **Moore KL, Persaud TVN.** Klinik yönleri ile insan embriyolojisi. 6. Baskı. Ankara: Palme Yayınları, **2002**.
2. **Sadler TW.** Langman Medikal Embriyoloji. 11. Baskı. Ankara : Pamle Yayıncılık, **2005**.
3. **Demir R.** İnsanın gelişimi ve implantasyon biyolojisi. Ankara : Palme Yayıncılık, **1995**.
4. **Cossigny D.A., Findlay J.K., Drummond A.E.** The effects of FSH and activin A on follicle development in vitro. *Reproduction*, **2012**; 143: 221-229.
5. **Eppig JJ.** Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, **2001**; 122: 829-838.
6. **Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S.** Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells. *J Reprod Dev*, **2012**; 58: 44-50.
7. **Knight PG, Glistler C.** TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* **2006**; 136: 191-206.
8. **Visser JA, Themmen APN.** Anti-Müllerian hormone and folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol*, **2005**; 234: 81-86.
9. **McGee EA, Smith R, Spears N, Nachtigal MW, Ingraham H, Hsueh AJ.** Mullerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. *Biol Reprod* **2001**; 64: 293–298.
10. **Kadem A, Yung Y, Yerushalmi GM, Haas J, Maman E, ve ark.** Anti müllerian hormone level and expression in mural and cumulus cells in relation to age. *Journal of Ovarian Research*, **2014**; 7: 113.
11. **Weenen C, Laven JS, von Bergh AR, Cranfield M, Groom NP, Visser JA, ve ark.** Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Mol Hum Reprod*, **2004**; 10: 77-83.
12. **Visser JA, Durlinger AL, Peters IJ, van den Heuvel ER, Rose UM, Kramer P, ve ark.** Increased oocyte degeneration and follicular atresia during the estrous cycle in anti-Mullerianhormone null mice. *Endocrinology*, **2007**; 148: 2301–2308.
13. **Nelson SM, Anderson RA, Broekmans FJ, Raine-Fenning N, Fleming R, La Marca A.** Anti-Mullerian hormone: clairvoyance or crystal clear? *Hum Reprod*, **2012**; 27: 631–636.
14. **Garcia A, Grynnerup A, Lindhard A, Sorensen S.** The role of anti-müllerian hormone in female fertility and infertility – an overview. *AOGS*, **2012**; 91: 1252-1260.
15. **Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, van de Lang-Born BM, de Jong FH, Groome NP, ve ark.** Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology*, **2006**; 147: 3228–3234.

16. **La Marca A, Stabile G, Carducci Artensio A, Volpe A.** Serum anti-mullerian hormone throughout the human menstrual cycle., *Hum Reprod*, **2006**; 12: 3103-3107.
17. **Yong PY, Baird DT, Thong KJ, McNeilly AS, Anderson RA.** Prospective analysis of the relationship between the ovarian follicle cohort and basal FSH concentration, the inhibin response to exogenous FSH and ovarian follicle number at different stages of the normal menstrual cycle and after pituitary down-regulation. *Hum Reprod*, **2003**; 18: 35-44.
18. **Andersen CY, Schmidt KT, Kristensen SG, Rosendahl M, Byskov AG, Ernst E.** Concentrations of AMH and inhibin-B in relation to follicular diameter in normal human small antral follicles. *Hum Reprod*, **2010**; 25: 1282–1287.
19. **Standring S.** Greys anatomy: The anatomical basis of clinical practice. 41. Baskı, London: Elsevier, **2016**.
20. **Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF.** Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*, **1992**; 7: 1342-6.
21. **Gougeon A.** Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional Aspects. Elsevier, **2004**; 25-39.
22. **Senger, P.** The Organization and Function of the Female Reproductive System. In: Pathways to Pregnancy and Parturition. **2005**; 10-43.
23. **Clement, P.B.** Anatomy and Histology of the Ovary: Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract, **2002**; 649-650.
24. **Ross MH, Pawlina W.** Histology, a Text and Atlas. 6. Baskı. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, **2011**.
25. **Motta PM, Makebe S, Notta SA.** The ultrastructure of human reproduction. 1. the natural history of the female germ cell: Origin, migration and differentiation inside the developing ovary. *Hum Reprod*, **1997**; 3:281–295.
26. **Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Hoyer PB.** Ultrastructural evaluation of oocytes during atresia in rat ovarian follicles. *Biol Reprod*, **2000**; 63: 1245-1252.
27. **Krohmer R.** The reproductive system. Texas: Chelsea House **2004**.
28. **Wallace WH, Kelsey TW.** Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One*, **2010**; 5: 8772.
29. **Snell SR.** Clinical anatomy. 8. Baskı. Baltimore : Lippincott Williams and Wilkins., **2007**.
30. **Kierszenbaum AL.** Histoloji ve Hücre Biyolojisi. Ankara : Palme Yayıncılık, **2006**. s. 576-575.
31. **McGee EA, Hsueh AJ.** Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, **2000**; 21: 200–214.
32. **Gougeon A.** Dynamics of follicular growth in the human: a model from preliminary results. *Hum Reprod*, **1986**; 1: 81-87.
33. **Tekelioğlu M.** Özel histoloji ince yapı ve gelişme. Ankara : A.Ü., **2002**.
34. **Eşrefoğlu M.** Özel Histoloji. İstanbul : İstanbul Tıp Kitabevi, **2015**.

35. **Ganong W.** Review of Medical Physiology. 21. Baskı. San Francisco : McGraw-Hill Companies, **2003**.
36. **Gleicher N, Weghofer A, Barad DH.** Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. *Reprod Biol Endocrinol.* **2011**; 9: 23.
37. **Oktem O, Oktay K.** The ovary: anatomy and function throughout human life. *Ann N Y Acad Sci,* **2008**; 1127: 1-9.
38. **Scanlon V, Sanders T.** Essentials of anatomy and physiology. 5. Baskı. Philadelphia : A. Davis Company, **2007**.
39. **Astwood EB.** Changes in weight and water content of the uterus of the normal adult rat. *Am J Physiol,* **1939**; 126: 162–70.
40. **Blandau RJ, Boling JK, Young WC.** The length of heat in the albino rat as determined by copulatory response. *Anat Rec,* **1941**; 79: 453–63.
41. **Westwood FR.** The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol,* **2008**; 36: 375-384.
42. **Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, ve ark.** Isolation of the bovine and human genes for Mullerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. *Cell,* **1986**; 45(5): 685-698.
43. **Massagué J1, Cheifetz S, Boyd FT, Andres JL.** TGF-beta receptors and TGF-beta binding proteoglycans: recent progress in identifying their functional properties. *Ann N Y Acad Sci,* **1990**, 593: 59-72.
44. **Munsterberg A, Lovell-Badge R.** Expression of the Mouse Anti-Müllerian Hormone Gene Suggests a Role in Both Male and Female Sexual Differentiation. *Development,***1991**, 113: 613-624.
45. **Rajpert-De Meyts E, Jørgensen N, Graem N, ve ark.** Expression of anti-Müllerian hormone during normal and pathological gonadal development: association with differentiation of Sertoli and granulosa cells. *J Clin Endocrinol Metab.,* **1999**, 84 (10): 3836-3844.
46. **Hirobe S, He WW, Lee MM, Donahoe PK.** Müllerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. *Endocrinology,* **1992**; 131(2): 854–862.
47. **Durlinger AL, Visser JA, Themmen AP.** Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. *Reproduction,* **2002**; 124: 601–609.
48. **Salmon NA, Handyside AH, Joyce IM.** Oocyte regulation of anti-Müllerian hormone expression in granulosa cells during ovarian follicle development in mice. *Dev Biol,* **2004**; 266(1): 201–208.
49. **Durlinger AL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JT, Grootegoed JA, ve ark.** Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology,* **1999**, 140, 5789–5796.

50. **Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, Karels B, Kumar TR, Matzuk MM, ve ark.** Anti-Mullerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, **2001**; 142: 4891–4899.
51. **Brown JB.** Pituitary control of ovarian function--concepts derived from gonadotrophin therapy. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*, **1978**; 18(1): 46–54.
52. **Jeppesen JV, Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, ve ark.** Which follicles make the most anti-Mullerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *Mol Hum Reprod*, **2013**; 19: 519–527.
53. **La Marca A, Spada E, Sighinolfi G, Argento C, Tirelli A, Giulini S, ve ark.** Age-specific nomogram for the decline in antral follicle count throughout the reproductive period. *Fertil Steril*, **2011 a**; 95: 684–688.
54. **La Marca A, Nelson SM, Sighinolfi G, Manno M, Baraldi E, Roli L, Xella S, ve ark.** Anti-Mullerian hormone-based prediction model for a live birth in assisted reproduction. *Reprod Biomed Online*, **2011 b**; 22: 341–349.
55. **Seifer DB, Golub ET, Lambert-Messerlian G, Benning L, Anastos K, Watts H, ve ark.** Variations in Serum Mullerian Inhibiting Substance Between White, Black and Hispanic Women. *Fertil Steril*, **2009**; 92 (5): 1674–1678.
56. **Freeman EW, Gracia CR, Sammel MD, Lin H, Lim LC, Strauss JF.** Association of anti-mullerian hormone levels with obesity in late reproductive-age women. *Fertil Steril*, **2007**; 87: 101–106.
57. **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. *J Clin Endocrinol Metab*, **2006**; 91: 4057–4063.
58. **Tsepelidis S, Devreker F, Demeestere I, Flahaut A, Gervy C, Englert Y.** Stable serum levelsof anti-Mullerian hormone during the menstrualcycle: a prospective studyin normo-ovulatory women. *Hum Reprod*, **2007**; 22: 1837–1840.
59. **Fleming R, Kelsey TW, Anderson RA, Wallace WH, Nelson SM.** Interpreting human follicular recruitment and antimullerian hormone concentrations throughout life. *Fertil and Steril*, **2012**; 98: 1097–1102.
60. **Coccia ME, Rizzello F.** Ovarian reserve. *Ann N Y Acad Sci*, **2008**, 1127, 27–30.
61. **Robertson DM.** Anti-Mullerian hormone as a marker of ovarian reserve: an update. *Womens Health*, **2008**; 4: 137–141.
62. **Broer SL, Eijkemans MJ, Scheffer GJ, van Rooij IA, de Vet A, Themmen AP, ve ark.** Anti-Mullerian hormone predicts menopause: a long-term follow-up study in normoovulatory women. *J Clin Endocrinol Metab*, **2011 b**; 96: 2532–2539.
63. **Voorhuis M, Onland-Moret NC, van der Schouw YT, Fauser BC, Broekmans FJ.** Human studies on genetics of the age at natural menopause: a systematic review. *Hum Reprod Update*, **2010**; 16: 364–377.

64. **McCullagh GR.** Dual endocrine activity of the testes. *Science*, **1932**; 76: 19-20.
65. **Schwartz N, Channing C.** Evidence for ovarian “inhibin” suppression of the secondary rise in serum follicle stimulating hormone levels in prooestrus rats by injection of porcine follicular fluid. *Proc Natl Acad Sci*, **1977**; 74: 5721-5724.
66. **Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T.** Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. *Rec Prog Horm Res*, **1988**; 44: 1-34.
67. **Woodruff T, Mayo K.** Regulation of inhibin synthesis in the rat ovary. *Annu Rev Physiol*, **1990**; 52: 807-821.
68. **Woodruff T, Mather J.** Inhibin, activin and the female reproductive axis. *Annu Rev Physiol*, **1995**; 219-244.
69. **de Paolo L, Bicsak T, Erikson G, Shimasaki S, Ling N.** Follistatin and activin: a potential intrinsic regulatory system within diverse tissues. *Soc Exp Med Biol*, **1991**; 500-512.
70. **D’Agostino J, Woodruff T, Mayo K, Schwartz N.** Unilateral ovariectomy increases inhibin mRNA levels in newly recruited follicles. *Endocrinology*, **1989**; 124: 310-317.
71. **Ackland J, D’Agostino J, Ringstrom S, Hostetler J, Mann B, Schwartz M.** Circulating radioimmunoassayable inhibin during periods of transient follicle-stimulating hormone rise: secondary surge and unilateral ovariectomy. *Biol Reprod*, **1990**; 43: 347-352.
72. **Welt CK.** Regulation and function of inhibins in the normal menstrual cycle. *Semin Reprod Med*, **2004**; 22: 187–193.
73. **Welt CK, McNicholl DJ, Taylor AE, Hall JE.** Female reproductive aging is marked by decreased secretion of dimeric inhibin. *J Clin Endocrinol Metab*, **1999b**; 84: 105-111.
74. **Welt CK, Schneyer AL.** Differential regulation of inhibin B and inhibin A by follicle-stimulating hormone and local growth factors in human granulosa cells from small antral follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, **2001**; 86: 330–336.
75. **Welt C, Sidis Y, Keutmann H, Schneyer A.** Activins, inhibins, and follistatins: from endocrinology to signaling. A paradigm for the new millennium. *Exp Biol Med*, **2002**; 227: 724–752.
76. **McLachlan RI, Robertson DM, Healy DL, Burger HG, de Kretser DM.** Circulating immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*, **1987**; 65: 954–961.
77. **Yding Andersen C, Rosendahl M, Byskov AG.** Concentration of Anti-Mullerian hormone and inhibin-B in relation to steroids and age in follicular fluid from small antral human follicles. *J Clin Endocrinol Metab*, **2008**; 93: 2344-2349.
78. **Long JA, Evans HM.** The estrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Memories of University of California*, **1922**; 6: 1-148.
79. **Mandl AM.** The phases of the oestrous cycle in the adult white rat. *Journal of Experimental Biology*, **1951**; 28: 576-584.

80. **Yding Andersen C, Byskov AG.** Estradiol and regulation of anti-Mullerian hormone, inhibin-A, and inhibin-B secretion: analysis of small antral and preovulatory human follicles' fluid. *J Clin Endocrinol Metab*, **2006**; 4064–4069.
81. **Gougeon A.** Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev*, **1996**; 121-155.
82. **Broekmans FJ, Knauf EA, te Velde ER, Macklon NS, Fauser BC.** Female reproductive aging: current knowledge and future trends. *Trends Endocrinology Metabolism*, **2007**; 18: 58-65.



## **EKLER**

### **1. Etik kurul kararı**



**EK-1: Etik kurul kararı**

T.C.

**ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ****Hayvan Araştırmaları Yerel Etik Kurulu**

Sayı : 2

13.11.2016

Konu : Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)	ARAŞTIRILANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Çeşitli yaş gruplarındaki siçan ovaryenlerinde anti müllerian hormon ve inhibin-B ekspresyonunun ovaryum yapısı ve folliküllogenesis üzerine etkileri.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATOR)	Prof.Dr. Aysel KÜKNER
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATORS)	Y.Lis .Gizem SÖYLER ,Prof. Dr.Güler BUĞDAYCI
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	ABÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Öğretim Üyesi

KARAR (DECISION)	Karar no (Decision No): 2016/05	Tarih (Date): 13.11.2016
	Prof.Dr. Aysel KÜKNER'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcutun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık Alanı	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Aysel KÜKNER (Başkan)	Histoloji ve Embriyoloji AD. Öğretim Üyesi	ABÜ Tıp Fakültesi	[İmza]
Prof. Dr. Erol AĞAZ (Üye)	Tıbbi Parazitoloji AD. Öğretim Üyesi	ABÜ Tıp Fakültesi	[İmza]
Prof. Dr. Hamit DOŞKUN (Üye)	Psikoloji Bölümü Öğretim Üyesi	ABÜ Fen Edebiyat Fakültesi	[İmza]
Prof. Dr. Neriman ŞENGÖL (Invivo Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	ABÜ Tıp Fakültesi	[İmza]
Doç. Dr. Serkan ÇAKIR (Üye)	Kanazlı sıyvan üretiliciliği Bölümü Öğretim Üyesi	ABÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	[İmza]
Doç. Dr. Ali Rıza GEZGİ (Üye)	Beyn Cer. AD Öğretim Üyesi	ABÜ Tıp Fakültesi	[İmza]
Doç. Dr. Fatih İLAŞ (Üye)	Göz Hastalıkları AD Öğretim Üyesi	ABÜ Tıp Fakültesi	[İmza]
Doç. Dr. Yeşim FENER (Üye)	İlköğretim Bölümü Öğretim Üyesi	ABÜ Eğitim Fakültesi	[İmza]
Yrd. Doç. Dr. Serdar GÖÇÜTOK (Üye)	Yabanc Hayvan ve Ekolojisi Bölümü Öğretim Üyesi	ABÜ Ziraat ve Doğa Bilimleri Fakültesi	[İmza]
Yrd. Doç. Dr. Emre KEMAHİ (Üye)	Üroloji AD Öğretim Üyesi	ABÜ Tıp Fakültesi	[İmza]
Yrd. Doç. Dr. Mustafa ŞİT (Üye)	Genel Cer. AD Öğretim Üyesi	ABÜ Tıp Fakültesi	[İmza]
Yrd. Doç. Dr. Oğuz TOPTAŞ (Üye)	Cerrahi AD Öğretim Üyesi	ABÜ Diş Hek. Fakültesi	[İmza]
Vet. Hek. Aylhan ÇETİNKAYA (Sorumlu Veteriner Hekim)	Veteriner Hekim	ABÜ Deneysel Hayvanların Uygulama ve Araştırma Merkezi	[İmza]
Vet. Hek. Orhan BULUT (TC Üyesi)	Veteriner Hekim	BOLCA İhsan /BOLU	[İmza]
Av. Çiğdem KARAGÖZ (Sivil Toplum Kuruluşu üyesi)	Avukat	Tıbbi Kurumlar Hakkında Kanun No:477/Mezke/ BOLU	[İmza]

## ÖZGEÇMİŞ

17.10.1991 tarihinde Lefkoşa'da doğdum. İlk, orta ve lise öğretimimi Lefkoşa'da tamamladım. 2009 yılında girdiğim Abant İzzet Baysal Üniversitesi Biyoloji bölümünden 2014 yılında mezun oldum. 2014 yılında Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Histoloji ve Embriyoloji bölümünde yüksek lisansa başladım. Yüksek lisans öğrenimim halen devam etmektedir.

