



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

**KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**OVERYAN YAŞLANMA SÜRECİNDE OVER  
DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN STROMAL KÖK  
HÜCRELERİN OVARYUM DOKUSUNA TERAPÖTİK  
ETKİSİ**

**GÜL YILDIRIM**

**Aralık 2022  
DENİZLİ**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**OVERYAN YAŞLANMA SÜRECİNDE OVER  
DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN STROMAL KÖK  
HÜCRELERİN OVARYUM DOKUSUNA TERAPÖTİK  
ETKİSİ**

**KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**GÜL YILDIRIM**

**Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL**

**DENİZLİ-2022**

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

Öğrenci Adı Soyadı: Gül YILDIRIM

İmza:

## ÖZET

### OVERYAN YAŞLANMA SÜRECİNDE OVER DOKUSUNDAN ELDE EDİLEN STROMAL KÖK HÜCRELERİN OVARYUM DOKUSUNA TERAPÖTİK ETKİSİ

Gül YILDIRIM

Yüksek Lisans Tezi, Kök Hücre AD

Tez Yöneticisi: Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL

Aralık 2022, 80 Sayfa

Doğal overyan yaşlanma (DOY), ovaryumun korteksinde yer alan primordiyal folikül rezervinin, yaşa bağımlı olarak kademeli bir şekilde tükenmesi ve oosit kalitesinin azalması durumudur. Mezenkimal kök hücreler, kendini yenileyebilen ve birçok dokuya farklılaşabilen multipotent karakterli heterojen hücre topluluğudur. Rejeneratif tıpta oldukça önemli bir yere sahip olan kök hücre tedavileri, son dönemlerde doğal overyan yaşlanma tedavisinde de kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Doğal overyan yaşlanmasını tedavi etmek için çeşitli kaynaklardan izole edilen mezenkimal kök hücreler (MKH) kullanılmıştır. Ancak, ovaryum dokusunun kendi mikroçevresine ait kök hücreler kullanılarak bu hücrelerin doğal overyan yaşlanma üzerindeki etkilerini gösteren araştırma sayısı kısıtlıdır.

Bu çalışmadaki amacımız, ovaryumun kendi mikroçevresine ait stromal kök hücrelerin yaşlanma sürecine girmiş olan ovaryum dokusu üzerindeki etkilerini incelemek ve iyileştirici etkilerini göstermektir.

Çalışmamızda 12-14 aylık, düzenli östrus döngüsüne sahip ve folikül sayıları azalmış Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar kontrol grubu (K) (n=6) ve stromal kök hücre grubu (SKH) (n=6) olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Stromal kök hücre grubundaki sıçanların sol ovaryumuna, yaşları 23-25 günlük olan prepubertal sıçanların ovaryum dokusundan izole edilen stromal kök hücreler (OSKH) transplante edildi. Ovaryum dokusundaki fonksiyonel ve morfolojik değişimler hematoksilen-eozin (H&E) boyama yöntemi ile incelenirken folikül sayılarındaki değişimler ise yapılan folikül sayımı ile incelendi. OSKH'lerin over dokusu üzerindeki etkileri IGF-1, FSHR, AMH kullanılarak immünohistokimya yöntemi ile değerlendirildi. Ovaryumdaki serum AMH, FSH, E2 konsantrasyonları ise ELISA yöntemi ile değerlendirildi.

OSKH transplantasyonundan 30 gün sonra, stroma ve teka hücrelerinde meydana gelen ayrılmalar ve granüloza hücrelerindeki piknotik hücreler azalırken SKH sol grubunda ovaryum dokusunun normal morfolojiye sahip olduğu gözlemlenmiştir. SKH grubunda kontrol grubuna kıyasla serum E2 seviyeleri ( $p<0,001$ ) ve ovaryumda IGF-1, AMH ekspresyon düzeyleri artırmıştır ( $p<0,02$ ,  $p<0,02$ ). Bütün bunlara bağlı olarak stromal kök hücreler, foliküllerin gelişimine olumlu etkilerde bulunurken ovaryum dokusu üzerinde iyileştirici etkiler göstermiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Doğal overyan yaşlanma, Mezenkimal kök hücreler, over rezervi, infertilite,

**Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2021SABE008).**

**ABSTRACT****THERAPEUTIC EFFECT OF STROMAL STEM CELLS OBTAINED FROM OVARIAN TISSUE ON OVARIAN TISSUE DURING OVARIAN AGING PROCESS**

YILDIRIM, Gül

M.Sc. Thesis in Stem Cell

Supervisor: Dr. Lecturer Murat Serkant ÜNAL

December 2022, 80 Page

Natural ovarian aging (CAI) is the age-dependent gradual depletion of the primordial follicle reserve located in the cortex of the ovary and a decrease in oocyte quality. Mesenchymal stem cells are heterogeneous multipotent cells that can self-renew and differentiate into many tissues. Stem cell therapies, which have a very important place in regenerative medicine, have recently become a method used in the treatment of natural ovarian aging. Mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from various sources have been used to treat natural ovarian aging. However, the number of studies showing the effects of these cells on natural ovarian aging using stem cells from the microenvironment of the ovarian tissue is limited.

Our aim in this study is to examine the effects of stromal stem cells belonging to the ovary's microenvironment on the ovarian tissue that has entered the aging process and to show their healing effects.

In our study, a 12-14-month-old Sprague-Dawley female rat with a regular oestrus cycle and reduced follicle count was used. Rats were divided into 2 groups control group (C) (n=6) and stromal stem cell group (SCH) (n=6). Stromal stem cells (OSC) isolated from the ovarian tissue of prepubertal rats aged 23-25 days were transplanted into the left ovary of rats in the stromal stem cell group. While the functional and morphological changes in the ovarian tissue were examined by the hematoxylin-eosin (H&E) staining method, the changes in the number of follicles were examined by the follicle count. The effects of OSCHs on ovarian tissue were evaluated by immunohistochemistry using IGF-1, FSHR, and AMH. Serum AMH, FSH, and E2 concentrations in the ovary were evaluated by the ELISA method.

30 days after ASC transplantation, ovarian tissue was observed to have normal morphology in the left SCI group, while separations in stroma and theca cells and pycnotic cells in granulosa cells decreased. Serum E2 levels ( $p<0.001$ ) and IGF-1 and AMH expression levels in the ovary increased in the SCI group compared to the control group ( $p<0.02$ ,  $p<0.02$ ). Depending on all these, stromal stem cells have positive effects on the development of follicles and have healing effects on ovarian tissue.

**Keywords:** Natural ovarian aging, Mesenchymal stem cells, ovarian reserve, infertility

**This study was supported by PAU Scientific Research Projects Coordination Unit (Project No: 2021SABE008).**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince ve tez çalışmamın her aşamasında tecrübeleri ve desteğini esirgemeyen tez danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam sırasında engin bilgilerini ve yardımlarını esirgemeyen Araştırma Görevlisi Semih Tan, Uz. Dr. Hatice Şiyzen Çoban, Uz. Dr. Elif Önder'e, arkadaşım Araştırma Görevlisi Faruk Altınbaşak'a ve arkadaşım Esra ARAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca yanımda olan beni sevgiyle, özveriyle büyüten, eğitim gördüğüm süre boyunca da maddi ve manevi her türlü desteği sağlayan aile üyelerime başta sevgili babam Hüseyin YILDIRIM olmak üzere, annem Samiye YILDIRIM'a, kardeşlerim İsmail Can YILDIRIM ve Muhammet YILDIRIM'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Bu süreç boyunca desteğini esirgemeyen çok kıymetli arkadaşım Sefa ÜNAL'a sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

|                                                                       |             |
|-----------------------------------------------------------------------|-------------|
| <b>ÖZET .....</b>                                                     | <b>V</b>    |
| <b>ABSTRACT .....</b>                                                 | <b>VI</b>   |
| <b>TEŞEKKÜR.....</b>                                                  | <b>VII</b>  |
| <b>İÇİNDEKİLER.....</b>                                               | <b>VIII</b> |
| <b>ŞEKİLLER DİZİNİ.....</b>                                           | <b>X</b>    |
| <b>TABLolar DİZİNİ.....</b>                                           | <b>XII</b>  |
| <b>SİMGE VE KISALTMALAR.....</b>                                      | <b>XIII</b> |
| <b>1. GİRİŞ.....</b>                                                  | <b>1</b>    |
| 1.1 Amaç.....                                                         | 3           |
| <b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI.....</b>                | <b>4</b>    |
| 2.1. Ovaryumların Embriyonik Gelişimi.....                            | 4           |
| 2.2. Ovaryum Histolojisi.....                                         | 5           |
| 2.3. Folikül Gelişiminin Histolojisi .....                            | 5           |
| 2.3.1. Korpus Luteum .....                                            | 6           |
| 2.4. Folikülogenez Mekanizması / Folikülogenezin Fizyolojisi.....     | 7           |
| 2.5. Ovulasyon .....                                                  | 9           |
| 2.6. Menstrüel Siklus .....                                           | 9           |
| 2.7. Over Rezervi .....                                               | 10          |
| 2.8. Doğal Overyan Yaşlanma.....                                      | 10          |
| 2.8.1. Tanı Kriterleri .....                                          | 10          |
| 2.8.2. Doğal Overyan Yaşlanma Nedenleri .....                         | 11          |
| 2.9. Kök Hücreler .....                                               | 12          |
| 2.9.1. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri.....                          | 12          |
| 2.9.2. Kök Hücrelerde Kendini Yenileme, Farklılaşma ve Köklülük ..... | 12          |
| 2.9.3. Kök Hücre Çeşitleri .....                                      | 14          |
| 2.9.4. Mezenkimal Kök Hücreler .....                                  | 15          |
| 2.9.5. Mezenkimal Kök Hücre Yüzey Belirteçleri.....                   | 16          |
| 2.9.5.1. CD90 (Thy-1) .....                                           | 16          |
| 2.9.5.2. CD45 (Ly-5).....                                             | 16          |
| 2.9.5.3. CD54 (ICAM-1).....                                           | 16          |
| 2.9.5.4. CD29 (İntegrin Beta-1) .....                                 | 16          |

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.9.5.5. RT1D (MHC II) .....                                                             | 17        |
| 2.9.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Uygulamalarda Avantajları ve Dezavantajları..... | 17        |
| 2.10. Hipotez .....                                                                      | 18        |
| <b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>                                                        | <b>19</b> |
| 3.1. Deney Grupları .....                                                                | 20        |
| 3.2. Ovaryum Kaynaklı Stromal Kök Hücrelerin İzole Edilmesi .....                        | 20        |
| 3.3. İkinci Gruptaki Sıçanlara Ovaryum Kaynaklı Stromal Kök Hücrelerin Verilmesi .....   | 21        |
| 3.4. Doku Takip Yöntemi .....                                                            | 22        |
| 3.5. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi.....                                              | 23        |
| 3.6. Folikül Sayımı Yöntemi.....                                                         | 23        |
| 3.7. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi .....                                            | 24        |
| 3.8. ELİSA Yöntemi .....                                                                 | 26        |
| 3.8.1. Rat Anti-Mullerian Hormone (AMH) ELISA Kit.....                                   | 26        |
| 3.8.2. Rat Follicle-Stimulating Hormone (FSH) ELISA Kiti.....                            | 28        |
| 3.8.3. Rat Estradiol (E2) ELİSA Kiti.....                                                | 29        |
| 3.9. İstatiksel Analiz .....                                                             | 31        |
| <b>4. BULGULAR .....</b>                                                                 | <b>32</b> |
| 4.1. Kök Hücre İzolasyonu ve Flow Sitometri Bulguları.....                               | 32        |
| 4.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları.....                                            | 34        |
| 4.3. Folikül Sayımı Sonuçları.....                                                       | 38        |
| 4.4. İmmunohistokimyasal Sonuçlar .....                                                  | 39        |
| 4.4.1. Anti-Mullerian Hormonun Ekspresyonu .....                                         | 39        |
| 4.4.2. Folikül Uyarıcı Hormon Reseptörünün Ekspresyonu .....                             | 41        |
| 4.4.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 'in Ekspresyonu.....                             | 43        |
| 4.5. ELİSA Sonuçları .....                                                               | 46        |
| <b>5. TARTIŞMA .....</b>                                                                 | <b>48</b> |
| <b>6. SONUÇ.....</b>                                                                     | <b>54</b> |
| <b>7. KAYNAKLAR.....</b>                                                                 | <b>55</b> |
| <b>8. ÖZGEÇMİŞ .....</b>                                                                 | <b>64</b> |
| <b>9. EKLER .....</b>                                                                    | <b>65</b> |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 2.1:</b> Ovaryumun genel görüntüsü (Eroschenko ve Di Fiore 2016).....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 7  |
| <b>Şekil 3.1:</b> Deney için gruplandırılmış 12-14 aylık sıçanlar.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 19 |
| <b>Şekil 3.2:</b> A: Anestezi uygulanmış sıçanlar B: Sıçanların ovaryumuna stromal kök hücre enjeksiyonu.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 21 |
| <b>Şekil 3.3:</b> Sıçanlardan ovaryumların alınması. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 22 |
| <b>Şekil 4.1:</b> Ovaryum dokusundan göç eden stromal kök hücrelerin proliferasyonu. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | 32 |
| <b>Şekil 4.2:</b> Overyan stromal kök hücrelerin faz kontrast mikroskobu altındaki görüntüleri. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 33 |
| <b>Şekil 4.3:</b> Ovaryumdan izole edilen stromal kök hücrelerin flow sitometri analizi ile immünofenotiplendirilmesi. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 33 |
| <b>Şekil 4.4:</b> Ovaryumdan izole edilen stromal kök hücrelere ait flow sitometri analizi sonuçlarının grafik görüntüleri.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 34 |
| <b>Şekil 4.5:</b> Ovaryumların genel histolojik görüntüsü. A-B görseli; kontrol grubu, C-D görseli; stromal kök hücre grubu. H&E boyama. (→; foliküller) (A, B, C ve D görselleri X4 büyütme). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 35 |
| <b>Şekil 4.6:</b> Primordiyal foliküllerin histolojik görüntüsü. A-B; kontrol grubu C-D; stromal kök hücre grubu. H&E boyama. (→; primordiyal foliküller) (A ve C görselleri X40, B ve D görselleri X100 büyütme). ....                                                                                                                                                                                                                                                                         | 36 |
| <b>Şekil 4.7:</b> Primer foliküllerin histolojik görüntüsü. A-B; kontrol grubu, C-D; stromal kök hücre grubu. A görselinde oosit morfolojisinin bozulduğu, B görselinde ise folikülün saran stroma dokusunda ayrılmalar gözlemlendi. H&E boyama. (→; stroma hücreleri ➡; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A, B, C ve D görselleri X40 büyütme). ....                                                                                                                                              | 36 |
| <b>Şekil 4.8:</b> Sekonder foliküllerin histolojik görüntüsü. A-B-C; kontrol grubu, D-E-F; stromal kök hücre grubu. A ve B görsellerinde oosit ve zona pellusida dejenerasyonu gözlemlendi. C görselinde apoptik granüloza hücrelerinin antruma dağıldığı gözlemlendi. H&E boyama. (→; teka hücreleri ➡; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A, B ve E görselleri X40 büyütme, C, D ve F görselleri X20 büyütme).....                                                                                | 37 |
| <b>Şekil 4.9:</b> Graff foliküllerin histolojik görüntüsü. A-B; kontrol grubu, C-D; stromal kök hücre grubu. A görselinde oosit ve zona pellusida dejenerasyonu, granüloza hücrelerinin yapısında bozulmalar ve antruma yayılan piknotik hücreler izlendi. B görselinde ise granüloza hücrelerinin yapısında bozulma ve antruma yayılan piknotik hücreler izlendi. H&E boyama. (→; teka hücreleri ➡; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A ve B görselleri X20, C ve D görselleri X40 büyütme). .... | 37 |
| <b>Şekil 4.10:</b> Hematoksilen-Eozin boyama sonucu folikül sayımı. SKH; stromal kök hücre. Primer ve preantral foliküller primer folikül grubunda değerlendirildi.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 38 |
| <b>Şekil 4.11:</b> Genel ovaryum kesitinde AMH ekspresyonu. A-B; kontrol grubu, C-D; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; foliküller) (A, B, C ve D görselleri X4 büyütme). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 40 |
| <b>Şekil 4.12:</b> Primer foliküllerde AMH ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; stroma hücreleri ➡; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A ve B görselleri X40 büyütme). ....                                                                                                                                                                                                                                                         | 40 |

- Şekil 4.13:** Sekonder foliküllerde AMH ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➡; granüloza hücreleri ►; oosit) (A ve B görselleri X20 büyütme). ..... 41
- Şekil 4.14:** Graff foliküllerde AMH ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➡; granüloza hücreleri ►; oosit) (A görseli X20, B görseli X10 büyütme). ..... 41
- Şekil 4.15:** Genel ovaryum kesitinde FSHR ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; foliküller) (A ve B görselleri X4 büyütme). ..... 42
- Şekil 4.16:** Primer foliküllerde FSHR ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; stroma hücreleri ➡; granüloza hücreleri ►; oosit) (A ve B görselleri X40 büyütme). ..... 42
- Şekil 4.17:** Sekonder foliküllerde FSHR ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➡; granüloza hücreleri ►; oosit) (A ve B görselleri X20 büyütme). ..... 43
- Şekil 4.18:** Graff foliküllerde FSHR ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➡; granüloza hücreleri ►; oosit) (A X20 büyütme ve B görselleri X10 büyütme). ..... 43
- Şekil 4.19:** Genel ovaryum kesitinde IGF-1 ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; foliküller) (A ve B görseli X4 büyütme). ..... 44
- Şekil 4.20:** Primer foliküllerde IGF-1 ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; stroma hücreleri ➡; granüloza hücreleri ►; oosit) (A görseli X40 büyütme, B görseli X20 büyütme). ..... 44
- Şekil 4.21:** Sekonder foliküllerde IGF-1 ekspresyonu. A; kontrol grubu, B-C; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➡; granüloza hücreleri ►; oosit) (A görseli X40, B görseli X20, C görseli X10 büyütme). . 45
- Şekil 4.22:** Graff foliküllerde IGF-1 ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➡; granüloza hücreleri ►; oosit) (A ve B görselleri X20 büyütme). ..... 45
- Şekil 4.23:** Gruplardan alınan ovaryum dokusunda IGF-1, FSHR, AMH ekspresyonlarının H skor analiz sonuçlarına göre grafik görüntüsü. .... 45
- Şekil 4.24:** Stromal kök hücre grubunda ve kontrol grubunda AMH, FSH, E2 değerleri. .... 47

**TABLolar DİZİNİ**

|                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 3.1:</b> Sıçanların deney gruplarına dağılımı. ....                                              | 20 |
| <b>Tablo 3. 2:</b> Folikül sayımı için belirlenen folikül kriterleri. ....                                | 24 |
| <b>Tablo 3.3:</b> AMH, FSHR ve IGF-1 ekspresyonlarının İHK boyama yöntemine göre derecelendirilmesi. .... | 25 |
| <b>Tablo 3.4:</b> Ana stok standart solüsyonunun seyreltilmesi. ....                                      | 27 |
| <b>Tablo 3.5:</b> Ana stok standart solüsyonunun seyreltilmesi. ....                                      | 28 |
| <b>Tablo 3.6:</b> Ana stok standart solüsyonunun seyreltilmesi. ....                                      | 30 |
| <b>Tablo 4. 1:</b> Folikül sayımının istatistiksel sonuçları. ....                                        | 38 |
| <b>Tablo 4.2:</b> Gruplar arasında AMH ekspresyonunun H skor analiz sonuçları. ....                       | 39 |
| <b>Tablo 4.3:</b> Gruplar arasında FSHR ekspresyonunun H skor analiz sonuçları. ....                      | 42 |
| <b>Tablo 4.4:</b> Gruplar arasında IGF-1 ekspresyonunun H skor analiz sonuçları. ....                     | 44 |
| <b>Tablo 4.5:</b> ELİSA kontrol ve stromal kök hücre grubunun AMH sonuçları. ....                         | 46 |
| <b>Tablo 4.6:</b> ELİSA kontrol ve stromal kök hücre grubunun FSH sonuçları. ....                         | 46 |
| <b>Tablo 4.7:</b> ELİSA kontrol ve stromal kök hücre grubunun E2 sonuçları. ....                          | 46 |

## SİMGE VE KISALTMALAR

|        |                                    |
|--------|------------------------------------|
| %      | Yüzde                              |
| °C     | Santigrat Derece                   |
| µl     | Mikrolitre                         |
| A.O    | Aritmetik Ortalama                 |
| AF     | Antral Folikül                     |
| AGE    | İleri Glikasyon Son Ürünleri       |
| AMH    | Anti Mullerian Hormonu             |
| AMHR   | Anti-Mullerian Hormon Reseptörü    |
| B7-H1  | B7 Homolog 1                       |
| bFGF   | b-Fibroblast Büyüme Faktörü        |
| BMP-15 | Kemik Morfogenik Proteini-15       |
| BMP-4  | Kemik Morfogenik Proteini-4        |
| BMP-7  | Kemik Morfogenik Proteini -7       |
| CD     | Clusters of differentiation        |
| CYP19  | Aromataz Enzim                     |
| DAB    | Diamino Benzidin                   |
| dk     | Dakika                             |
| DMEM   | Dulbecco's Modified Eagle's Medium |
| DMSO   | Dimetil Sülfoksit                  |
| DNA    | Deoksiribonükleik Asit             |
| DOY    | Doğal Overyan Yaşlanma             |
| E2     | Estradiol                          |
| EDTA   | Etilendiamin Tetraasetik Asit      |
| EGF    | Epidermal Büyüme Faktörü           |
| FBS    | Fetal Bovine Serum                 |
| FOXL2  | Forkhead Box Proteini L2           |
| FOXO3a | Forkhead Box O <sub>3</sub> a      |
| FSC    | Forward Scatter Hücre Büyüklüğü    |
| FSH    | Folikül Uyarıcı Hormon             |
| FSHR   | Folikül Uyarıcı Hormon Reseptörü   |

|                                     |                                                             |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Gadd45b .....                       | Büyümenin Durdurulması ve DNA Hasarıyla İndüklenebilir Beta |
| GDF-9 .....                         | Büyüme Farklılaşma Faktörü-9                                |
| GPI .....                           | Glikosilfosfatidilinositol                                  |
| H&E .....                           | Hematoksilen Eozin                                          |
| H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ..... | Hidrojen Peroksit                                           |
| HCl .....                           | Hidroklorik Asit                                            |
| HGF .....                           | Hepatosit Büyüme Faktörü                                    |
| HKH .....                           | Hematopoetik Kök Hücre                                      |
| HRP .....                           | Horseradish Peroxidase                                      |
| IFN- $\gamma$ .....                 | Otokrin İnterferon- $\gamma$                                |
| IGF-1 .....                         | İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü                              |
| IL-1 $\beta$ .....                  | İnterlökin-1 $\beta$                                        |
| ISCT .....                          | Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği                        |
| ITGB1 .....                         | İntegrin Beta-1                                             |
| iAEH .....                          | İnsan Amniyotik Epitel Hücreler                             |
| iAMKH .....                         | İnsan Amniyotik Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler            |
| İHK .....                           | İmmünohistokimyasal                                         |
| K .....                             | Kontrol Grubu                                               |
| KH .....                            | Kök Hücre                                                   |
| LH .....                            | Luteinizan Hormonu                                          |
| LIF .....                           | Lösemi İnhibitör Faktör                                     |
| MHC I .....                         | Major Doku Uyumluluk Kompleksi I                            |
| MHC II .....                        | Major Doku Uyumluluk Kompleksi II                           |
| miRNA .....                         | Mikro RNA                                                   |
| MKH .....                           | Mezenkimal Kök Hücre                                        |
| mM .....                            | Milimolar                                                   |
| mRNA .....                          | Mesajcı RNA                                                 |
| ng/mL .....                         | Nanogram/Mililitre                                          |
| NK .....                            | Doğal Öldürücü                                              |
| nm .....                            | Nanometre                                                   |
| Oct4 .....                          | Oktamer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü                    |
| OSKH.....                           | Ovaryum Kaynaklı Stromal Kök Hücreler                       |
| P27 .....                           | Sikline Bağımlı Kinaz İnhibitörü 1B (CDKN1B)                |
| PAUHDEK .....                       | Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu         |

|                     |                                                                  |
|---------------------|------------------------------------------------------------------|
| PAÜ .....           | Pamukkale Üniversite                                             |
| PBS .....           | Phosphate Buffered Saline                                        |
| PTEN .....          | Fosfataz ve Tensin Homoloğu 10                                   |
| PTP .....           | Protein Tirozin Fosfataz/ Ly-5/ CD45                             |
| RAGE .....          | İleri Glikasyon Son Ürünleri İçin Reseptör                       |
| RNA .....           | Ribonükleik Asit                                                 |
| ROS .....           | Reaktif Oksijen Türleri                                          |
| RT1-A .....         | Sıçanda MHCII'in karşılığı                                       |
| RT1-B .....         | Sıçanda MHCII'in karşılığı/ İnsanda HLA-DR'nin Karşılığı         |
| RT1-D .....         | Sıçanda MHCII'in karşılığı/ İnsanda HLA-DQ'nun Karşılığı         |
| S.S .....           | Standart Sapma                                                   |
| SCF .....           | Kök Hücre Faktörü                                                |
| SIRT1/FOXO1 .....   | Sirtuin 1/Forkhead Box O 1                                       |
| SKH .....           | Stromal Kök Hücre Grubu                                          |
| sn .....            | Saniye                                                           |
| Sox2 .....          | SRY (Cinsiyet Belirleme Bölgesi Y)- Box Transkripsiyon Faktörü 2 |
| SSA1 .....          | Isı Şoku Proteini-1                                              |
| SSA4 .....          | Isı Şoku Proteini-4                                              |
| SSC .....           | Side Scatter Hücre Granülaritesi                                 |
| std .....           | Standart                                                         |
| Thy-1 .....         | Timosit Antijeni /CD90                                           |
| TNF- $\alpha$ ..... | Tümör Nekroz Faktörü- $\alpha$                                   |
| TRA-1-60 .....      | T Hücre Reseptör Alfa Lokusu                                     |
| TSC-1 .....         | Tümör Baskılayıcı Tüberoskleroz Kompleksi 1                      |
| VEGF .....          | Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü                               |

## 1. GİRİŞ

Modern yaşamın etkisiyle, kadınlarda gebeliğin ileri yaşlara ertelenmesi ve buna bağlı olarak anne olma yaşlarının artması infertilite oranlarını da artırmaktadır. Bu durum, çocuk sahibi olmak isteyen kadınları olumsuz yönde etkilemektedir (Amanak vd 2014). Yaş faktörü infertiliteye yol açan nedenler arasındadır (Eniola vd 2012). Kadınlarda otuzlu yaşların altında fertilite hızı yüksek seviyelerde gözlemlenirken, otuzlu yaşlardan sonra bu seviyelerde düşüşler meydana gelmektedir (Amanak vd 2014). Artan yaşla beraber kadınlarda oosit sayısı ve kalitesi de azalmaktadır. Bu durum, doğal overyan yaşlanmaya neden olarak kadınlarda fertilitenin azalmasına yol açmaktadır (Meczekalski vd 2016). Ayrıca otuzlu yaşlardan sonra hamilelik, düşük yapma, hipertansiyon ve diabetes mellitus (gebelik diyabeti) riskleri artmaktadır. Folikül ve oositlerin hasarlı olma olasılığının artması, fetüsün genetik malformasyon riskini de artırmaktadır (Cruz vd 2017).

Ovaryum pubertede yaklaşık 400.000 primordiyal foliküle sahiptir ve bu foliküllerin her biri primer oosit içerir. Yetişkin bir kadının üreme ömrü boyunca yaklaşık 300 ila 400 folikül ovulasyon sürecine ulaşır (Amanvermez ve Tosun 2016). Kadınlarda ileri yaşlara doğru over rezervi, primordiyal foliküllerin apoptotik kaybına bağlı olarak azalmaya başlar. Bu azalma sürecinde over yaşlanması büyük bir rol oynar. Doğal overyan yaşlanma ile birlikte; primordiyal folikül sayısı ve implantasyon oranı azalır, oosit kalitesi bozulur, embriyoda kromozomal anomali oranı ve buna bağlı olarak düşük yapma oranı artar (Doğan Durdağ ve Berker 2008).

Over rezervinin azalıp azalmadığını anlayabilmek için, antral folikül (AF) sayısı ve over hacmi değerlendirilir. Ayrıca AMH (anti-mullerian hormon), E2 (estradiol) ve FSH (folikül uyarıcı hormon) gibi bazı endokrin faktörler de bu süreci anlamaya yardımcı olmaktadır. Antral foliküller FSH'a duyarlıdır ve FSH hormonunu bağlayan reseptörlere sahiptirler. Antral folikül sayılarının azalması ve FSH seviyelerinin artması,

primordiyal folikül rezervinin azalmasına yol açmaktadır. AMH primordiyal folikül hücreleri tarafından üretilir ve over rezervinin devamlılığını sağlar. Over rezervinde meydana gelen azalma AMH seviyelerinin azalmasına yol açar (Nelson vd 2013). Doğal overyan yaşlanma sürecinde FSH'a duyarlı foliküllerin ve over rezervinin kademeli olarak azalması foliküllerde birçok değişikliğe yol açmaktadır. Bu değişiklikler; dominant folikül gelişiminin gecikmesi, menstrual siklularda düzensizlik, östrojen hormonunun geri çekilmesi ve siklusun uzaması olarak sıralanabilir (Şükür vd 2014).

Granüloza hücreleri oositlerin gelişimi boyunca oositi beslemede ve desteklemede önemli rol oynar (Ben-Meir vd 2015). Bu hücreler, oosit için enerjiyi sağlayan, moleküler sinyalleri ileten ve oosit gelişimini kolaylaştıran foliküler mikroçevreyi oluşturur (Tatone ve Amicarelli 2013). Bu hücrelerin sağkalımı ve ölümü birçok farklı gen tarafından düzenlenir. Granüloza hücrelerinin sağkalımı ve ölümü arasındaki dengenin sağlanması, ovaryumun parakrin ve otokrin sinyal yollarındaki dengenin sağlanması ile mümkündür. Ovaryum foliküllerinin kaderini bu dengeler belirlemektedir (Huang vd 2018). Yapılan araştırmalar, granüloza hücrelerinde ilerleyen yaşa bağlı olarak meydana gelen işlevsel bozulmaların, oositlerin büyümesini ve yeterliliğini olumsuz yönde etkileyeceğini göstermektedir (Wu vd 2015). İnsülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) FSH'nin granüloza hücreleri üzerindeki etkilerini güçlendirir. Ayrıca bu faktör, steroidogenez mekanizması ile etkileşim halindedir ve foliküler hücrelerin proliferasyonunu artırır. Yapılan çalışmalar, FSH ve IGF-1 genlerinin eksprese edilmemesi durumunda, foliküllerin gelişiminin ve granüloza hücrelerinin farklılaşmasının azaldığını bunun sonucunda ise steroidogenez mekanizmasının bozulduğunu göstermiştir (Zhou vd 2013).

Doğal overyan yaşlanma menopoza kadar uzanan bir süreçtir. Bu süreci yavaşlatmak için hormon replasmanı gibi birçok tedavi kullanılmaktadır. Fakat bu tedaviler birçok dokuda kanserleşme risklerini artırdıkları ya da çeşitli dezavantajlara sahip oldukları için bilim insanları alternatif tedaviler aramaya yönelmişlerdir. Bu nedenle, çeşitli dokulardan elde edilen ve terapötik potansiyel gösteren mezenkimal kök hücrelerin (MKH) kullanımı, doğal overyan yaşlanma sürecinde yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (Ding vd 2018).

Mezenkimal kök hücreler çok sayıda dokudan veya organdan izole edilebilmekte ve birçok dokuya ya da organa farklılaşabilmektedir. Bu nedenle, her dokuda farklı oranda farklılaşma yetisine ve farklı CD belirteçlerine sahip olabilmektedirler. ISCT (Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği) bu sebeplerden ötürü

mezenkimal kök hücreleri stromal kök hücre ya da mezenkimal stromal kök hücre olarak adlandırma fikrini öne sürmüştür (Can 2014).

Günümüzde kök hücre tedavileri rejeneratif tıpta oldukça önemli bir yere sahiptirler. Bununla birlikte, kök hücre tedavisi ile ovaryumlarda folikülogenezin tekrar başladığı, fonksiyonların iyileştiği; folikülogenez ile ilgili gen ifadelerinin ve protein miktarlarının arttığı bildirilmiştir (Ding vd 2017, Huang vd 2020).

### 1.1 Amaç

Stromal kök hücre tedavisinin ovaryum dokusunun restorasyonuna ve fonksiyonuna olumlu etki edebileceği gösterilmiştir. Doğal overyan yaşlanma tedavisi için çeşitli kaynaklardan izole edilen kök hücreler kullanılmıştır. Ancak, ovaryum dokusunun kendi mikroçevresine ait kök hücreler kullanılarak bu hücrelerin doğal overyan yaşlanma üzerindeki etkilerini gösteren bir çalışma henüz yapılmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmada ovaryumdan elde ettiğimiz stromal kök hücreleri overyan yaşlanma sürecinde olan sıçanların ovaryum dokusuna transplante ederek, bu hücrelerin kendi mikroçevresinde ovaryum dokusu ve folikülogenez üzerindeki etkilerini inceledik.

## 2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

### 2.1. Ovaryumların Embriyonik Gelişimi

Gonadlar, gelişimin yedinci haftasına kadar erkek veya dişi morfolojik karakterlerine sahip değildir. Epitel hücrelerin proliferasyonu ve alt tabakadaki mezenşimin yoğunlaşması ile oluşan gonadlar, başlangıçta uzunlamasına bir çift sırt, genital sırtlar ve gonadal sırtlar olarak üç şekilde görünürler. Epiblastlardan köken alan primordiyal germ hücreleri primitif çizgi boyunca göç ederler ve gelişimin üçüncü haftasında yolk kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücrelerinin arasında ortaya çıkarlar (Sadler 2012). Embriyo katlanması sırasında, vitellusun dorsal parçası embriyo içine dahil olur. Bu esnada primordiyal foliküller, ameboid hareketlerle arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca gonadal sırtı doğru göç eder (Moore vd 2016). Altıncı haftada genital sırtları istila ederler. Primordiyal germ hücreleri sırtlara ulaşmazsa gonadlar gelişemez. Dolayısıyla bu hücreler, gonadın ovaryuma farklılaşmasında önemli bir rol oynar. Primordiyal germ hücreleri genital sırtlara ulaşmadan hemen önce bu bölgedeki epitel hücreler çoğalır ve alt tabakadaki mezenşime nüfus ederler. Burada primitif cinsiyet kordonları olarak bilinen düzensiz şekilli bir dizi kordon oluştururlar. Erkek ve dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır. Bu nedenle, erkek ve dişi gonadları arasında ayırım yapılamaz ve farklılaşmamış gonadlar olarak adlandırılır (Sadler 2012).

XX cinsiyet kromozomuna sahip dişi embriyolarda primitif cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrışırlar. Primordiyal germ hücre grupları içeren bu kümeler, ovaryumun medulla kısmını işgal ederler ve kaybolurlar. Daha sonra, ovaryum medullasını oluşturacak olan vasküler bir stromaya dönüşürler. Yedinci haftada, primitif cinsiyet kordonları kortikal kordonlara farklılaşır. Üçüncü ayda bu

kordonlar izole hücre kümelerine ayrılarak çoğalmaya devam ederler. Foliküler hücre adı verilen epitel bir tabaka oogonyumları çevrelemeye başlar. Bu sayede primordiyal folikül oluşur ve fetal yaşam sırasında aktif mitoz ile binlerce primordiyal folikül meydana gelir (Sadler 2012, Moore vd 2016).

## **2.2. Ovaryum Histolojisi**

Ovaryumlar, gametogenez ve steroidogenez olmak üzere iki ana fonksiyona sahip dişi üreme organlarıdır. Bu nedenle, dişi gametlerinin üretilmesinde ve steroid hormonları olan östrojen ve progesteronun salgılanmasında aktif rol oynarlar. Ovaryumlar 1 cm kalınlığında, 3 cm boyunda ve 1,5 cm eninde bir çift badem şekilli organdır. Puberteye kadar düzgün bir yüzeye sahipken, puberteden sonra tekrarlanan ovulasyon nedeniyle yüzeyleri düzensiz ve skarlı bir hal alır. Pubertedeki ovaryumların boyutu postmenopozal dönemdeki overlerden dört kat daha büyüktür. Ovaryumlar histolojik olarak medulla ve korteksten oluşur. Medullar bölge, gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar ağı içerir ve ovaryumun merkezinde yer alır. Korteks bölgesi ise, zengin bir selüler bağ dokusu içine gömülü ovaryum folikülerine sahiptir ve medullayı çevreleyecek şekilde ovaryumun periferik bölgesinde yer alır.

Ovaryumun yüzeyi germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı yassı ya da kübik epitelle kaplıdır. Germinal epitel ile korteks arasında sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea tabakası yer almaktadır (Ross ve Pawlina 2017).

## **2.3. Folikül Gelişiminin Histolojisi**

Ovaryumun fonksiyonel birimi olan folikül; gelişmekte olan oositler için mikroçevreyi oluşturmaktadır (Ross ve Pawlina 2017). Ovaryum folikülleri bir oosit, onu çevreleyen granüloza hücreleri ve teka hücrelerinden oluşmaktadır (Elvin ve Matzuk 1998). Bu foliküllerin gelişimi primordiyal folikülün farklılaşmasıyla başlar. Primordiyal foliküller, tunika albuginea tabakasının hemen altında yerleşim gösterir ve tek tabakalı yassı folikül hücreleri ile çevrenirler. Bu foliküller, immatür primer oosit içerirler.

Foliküller büyüdükçe, primordiyal foliküllerin etrafını çevreleyen folikül hücreleri kübik ya da alçak prizmatik biçimine farklılaşırlar ve primer folikülleri oluştururlar. Büyümekte olan primer folikül hücreleri çok sayıda mitoz geçirerek çoğalırlar ve çok katlı kübik biçiminde olan granüloza hücrelerini oluştururlar (Eroschenko ve DiFiore 2016). Bu hücreler, gap junctionlar aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurarlar. Granüloza hücreleri ve immatür oosit arasında zona pellusida adı verilen özel bir glikoprotein tabakası belirir. Oositlerin mikrovillusları ile folikül hücrelerinin filopodları zona pellusidanın içine doğru uzanır ve aralık bağlantılar aracılığıyla iletişim kurarlar. Büyümeye devam ettikçe folikül hücreleri arasına folikül sıvısı birikmeye başlar. Folikül sıvısına sahip olan alanlar, folikül duvarının belirli bir yerine kümelenirler ve antrum adı verilen sıvı dolu boşluklar oluşturmaya başlarlar. Bu esnada folikülün bitişiğinde yer alan stroma hücreleri, iki teka folikülünü oluşturmak için farklılaşırlar (Junqueira ve Carneiro 2006). Teka interna, kübik salgı hücrelerinden oluşur ve vasküler bir yapıya sahiptir. Çok sayıda LH (luteinizan hormonu) reseptörüne sahip olan bu hücreler, LH stimülasyonu sonucu androjenleri sentezlerler. Androjenler granüloza hücrelerine geçerek östrojene dönüştürülür. Teka eksterna ise, düz kas hücreleri ve kollajen fiber demetleri içeren dış bağ doku tabakasıdır (Ross ve Pawlina 2017). Antrumlara sahip olan bu foliküllere sekonder folikül (antral folikül) denir. Sekonder foliküllerde büyüme devam ettikçe, kümelenen granüloza hücreleri antrumun iç kısmına doğru oositi içeren bir tepecik yapar ve kumulus ooforus denilen yapıyı oluştururlar. Granüloza hücrelerinin bir kısmı oositin etrafında yoğunlaşarak korona radiata hücrelerini oluşturur. Diğer hücreler ise antrumun etrafını çevreleyerek mural granüloza hücrelerini oluştururlar (Junqueira ve Carneiro 2006).

Olgun graff folikülün boyutu yaklaşık 10 mm çapındadır ve ovaryum yüzeyine stigma adı verilen bir çıkıntı oluşturur. Folikül maksimum boyutuna ulaşırken granüloza hücrelerinin mitotik aktivitelerinde düşüş gözlemlenir. Antral boşluk genişledikçe granüloza tabakası incelik. Mural granüloza hücreleri, kumulus hücreleri ve ovulasyon sırasında oositle ovaryumdan atılacak olan korona radiata hücreleri arasındaki bağlantılar gevşer. Ovulasyona hazırlanılır. (Ross ve Pawlina 2017).

### **2.3.1. Korpus Luteum**

Ovum, ovulasyonla dışarı atıldıktan sonra yırtılan folikülden geriye kalan granüloza ve teka hücreleri morfolojik değişim geçirerek korpus luteumu oluşturur. Korpus luteum devamlılığını koruyabilmek için LH varlığına ihtiyaç duyar (Bozdoğan



Primordiyal folikül büyümesinin aktivasyonu, bir takım inhibe edici ve stimüle edici otokrin ve parakrin etkili lokal büyüme faktörleri aracılığıyla gerçekleşir (Dunlop ve Anderson 2014). Bu faktörlerin, luteinizasyon inhibisyonu ve foliküllerin gonadotropinlere olan yanıtının düzenlenmesi gibi görevleri de bulunmaktadır. Bu faktörler ovaryum, granüloza hücreleri ve teka hücreleri tarafından sentezlenir ve salınırlar. Ovaryum ve teka hücrelerinden salınan BMP-4 (kemik morfogenetik proteini-4), BMP-7 ((kemik morfogenetik proteini-7), BMP-15 (kemik morfogenetik proteini-15) ve GDF-9 (büyüme farklılaşma faktörü-9) primordiyal foliküllerin aktive olarak olgunlaşma sürecine girmesinde rol alan bazı faktörlerdendir. Tsc-1 (tümör baskılayıcı tüberoskleroz kompleksi 1), PTEN (fosfataz ve tensin homoloğu 10), FOXO3a (forkhead box O<sub>3</sub> a), p27, FOXL2 (forkhead box proteini L2) ve AMH gibi inhibitör faktörler ise primordiyal foliküllerin olgunlaşma sürecine girmesini baskırlar. Bu inhibitör faktörlerin delesyonu primordiyal foliküllerin geri dönüşümsüz aktivasyonuna ve over rezervinin erkenden tükenmesine neden olur (Öktem ve Urman 2012). Bu inhibitör faktörler arasından AMH, büyüyen folikül sayısının düzenlenmesi ve folikülün ovulasyon için seçilmesi aşamasında önemli rol oynamaktadır. Aynı zamanda büyümekte olan folikül rezervinin boyutu için bir gösterge olan AMH seviyeleri, klinik araştırmaları için de önemli bir fayda sağlamaktadır (Visser ve Themmen 2005).

Antral folikül aşamasında folikül büyümesi, otokrin ve parakrin etkili lokal büyüme faktörlerine ve gonadotropin hormonlarına bağımlı olarak uyarılır. Gonadotropin hormonlarından biri olan FSH (folikül stimüle edici hormon), bu aşamada etkinliğini sürdürebilmek için stimüle edici otokrin-parakrin etkili lokal büyüme faktörlerine ihtiyaç duyar (Öktem ve Urman 2012). Gonadotropinlerin salgılanmasında östrojenlerin düzenleyici feedback etkisi vardır. Östrojen granüloza hücrelerinin proliferasyonunu uyararak ve FSHR eksprese ederek FSH'nin etkinliğini artırır (Drummond ve Findlay 1999). IGF-1 faktörü ise, granüloza hücreleri üzerindeki FSH etkisini artırarak granüloza ve teka hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını uyarır (Ipsa vd 2019).

Ovulasyonla atılmak için olgunlaşma sürecine giren foliküllerden bir tanesi dominant folikül olarak seçilir. FSH seviyelerinin artışı, dominant folikül seçimi ve gelişmesi için kritik bir öneme sahiptir. Bu nedenle LH (luteinleştirici hormon) dominant folikül seçiminde androjen üretimini uyararak yüksek oranda östrojen salgılanmasını sağlar. Folikülün dominant seçilebilmesi için diğer foliküllere oranla daha fazla FSHR eksprese ediyor olması gerekmektedir. FSHR dominant folikül seçiminin yanı sıra hücre proliferasyonunda ve foliküler sıvı oluşumunun uyarılmasında önemli rol oynar (Erickson ve Shimasaki 2001).

## 2.5. Ovulasyon

Ovulasyon hormon aracılı bir işlemdir ve sekonder oositin graff foliküllerden serbest bırakılmasıyla sonuçlanır. Menstrüel siklusun ortalarına doğru ovaryum folikülleri gonadotropin hormonlarının etkisiyle ani bir büyüme gösterir ve ovaryumun yüzeyine stigma oluşturur. Ovulasyonun başlaması için büyüyen foliküller tarafından salınan östrojen seviyelerinde artış meydana gelir ve bu artışa yanıt olarak ön hipofizden salınan LH seviyelerinde ani artışlar meydana gelir. LH seviyelerinin artmasıyla stigma dışı doğru vezikül oluşturarak patlar ve sekonder oosit serbest bırakılır (Moore vd 2016).

Ovulasyonun meydana gelmesi ve oositin serbest bırakılmasında bir takım enzimatik etkiler ve hormonal değişimler rol oynamaktadır. Bunlar;

- Foliküler sıvıdaki basıncın artması
- Foliküler duvarın enzimatik proteolizisi
- Oosit-kumulus kompleksi ile mural granüloza hücreleri arasına glikozaminoglikanların birikmesi
- Teka eksterna tabakasında bulunan düz kas liflerinin kasılması şeklinde sıralanabilir (Ross ve Pawlina 2017).

## 2.6. Menstrüel Siklus

İnsanlarda ve diğer memeli türlerinde folikül gelişimi, ovulasyon ve korpus luteumun gelişmesi evrelerini içeren olaylar döngüsel tarzda meydana gelmektedir. Menstrual döngü, overyan döngüsü ve uterin döngüsünden oluşmaktadır. Overyan döngü foliküler faz ve luteal faz olmak üzere iki kısma ayrılır. Folikül gelişiminin aktif olduğu safha foliküler faz ve korpus luteum gelişiminin aktif olduğu safha ise luteal faz olarak bilinir. Bu fazlar hipofiz gonadotropinleri olan FSH ve LH hormonları tarafından kontrol edilir ve ovaryum hormonları olan östrojen ve progesteron seviyelerinde değişikliğe neden olur. Uterin döngüsü ise salgılanan östrojen ve progesteron hormonlarının endometriumda değişikliklere neden olduğu süreçtir (Bozdoğan 2004, McLaughlin vd 2014).

## 2.7. Over Rezervi

Bir kadının fertilité yeteneğinin devamlılığı overlerde bulunan primordiyal folikül sayısına bağlıdır (Öktem ve Urman 2012). Ovaryum postnatal dönemde folikülogenez mekanizması için sınırlı sayıda oosit içerir. Bu sınırlı sayıda bulunan oositler over rezervini tanımlamaktadır (Roudebush vd 2008). Aynı zamanda over rezervi, folikülogenez ve steroidogenez mekanizmalarının devamlılığını sağlayan foliküllerin, sayısına ve kalitesine bağlı olarak üreme potansiyelini yansıtmaktadır (Doğan Durdağ ve Berker 2008). Azalmış over rezervi ise, menstrual döngüsü düzenli olan bir kadının doğurganlığındaki veya overyan stimülasyona cevabındaki azalma durumudur (Kahyaoğlu 2019).

## 2.8. Doğal Overyan Yaşlanma

Doğal overyan yaşlanma (DOY), ovaryumun korteksinde yer alan primordiyal folikül rezervinin yaşa bağımlı olarak kademeli bir şekilde tükenmesi ve oosit kalitesinin azalması durumudur. DOY ile over rezervi doğrudan ilişkili olduğu için, over rezervinin azalmasına yol açan AMH, FSH, Estradiol (E2) gibi hormonlardaki ve antral folikül sayılarındaki değişimler over yaşlanma hızını da etkilemektedir. Ayrıca doğal overyan yaşlanma etkileri, reproduktif çağda bireysel farklılıklar göstermektedir (Broekmans vd 2009).

### 2.8.1. Tanı Kriterleri

Bir kadında doğal overyan yaşlanmasının var olduğunu anlayabilmek için hastalığın bazı kriterlere uygun olması gerekmektedir. Bunlar;

- Aynı yaşta grubundaki diğer bireylere göre değişiklik gösteren folikülogenez hızı,
- İlerleyen yaşla birlikte oosit kalitesinin, folikül sayısının ve folikülogenez hızının azalması,

Folikülogenezdeki azalan foliküller ve düşük yumurta kalitesi nedeniyle;

- İlerleyen yaşla beraber azalan embriyo kalitesi, spontan doğurganlığın azalması,
- İlerleyen yaşla birlikte yapılan tüp bebek tedavilerinde, oosit sayısında ve oluşan embriyo sayısında azalma,
- Tüp bebek tedavisi ile gebelik ihtimalinin düşmesi olarak sıralanabilir (Gleicher vd 2011).

### 2.8.2. Doğal Overyan Yaşlanma Nedenleri

Endokrinolojik, genetik ve mikro-çevresel faktörler ovaryum yaşlanmasının nedenleri arasında yer almaktadır. FSH, İnhibin A, İnhibin B, E2 gibi endokrinolojik faktörlerin seviyelerindeki değişimler ve FOXL2, CYP19, AMH, BMP15 gibi genetik faktörlerin ekspresyonundaki değişimler over rezervini etkileyerek ovaryum yaşlanmasına yol açmaktadır. Bununla birlikte telomerlerin kısalması, oksidatif stresin artması, seramide duyarlılığın artması ve ileri glikasyon son ürünlerinin oluşması gibi mikro-çevresel faktörler de overyan yaşlanmasına neden olmaktadır (Şükür vd 2014).

Telomerler, tüm ökaryotik kromozomların uç kısmında bulunan ve koruma sağlayan spesifik DNA nükleotid dizileridir. Her replikasyonda yaklaşık 100-200 baz çifti telomerik DNA kaybolur ve telomerler giderek kısalır. Kalan telomerler hücrenin çoğalma kapasitesini yansıtır. Telomerlerin kısalmasına yol açan uç replikasyon sorunları RNA enzimi olan telomeraz enzimi ile tamir edilir (Olovnikov 1996, Rhyu 1995). Ovaryum hücrelerindeki telomeraz aktivitesinin azalması ovaryum yaşlanmasının bir göstergesidir (Kinugawa vd 2000).

Oksidatif stres, antioksidan enzimatik savunmanın zayıflamasından ve serbest radikallerin üretiminin artmasından kaynaklanır (Vercesi vd 2006). Yaşlanma ile birlikte oositlerde, serbest radikallerin yok edilmesinde rol alan glutatyon ve glutatyon transferaz seviyeleri azalır. Antioksidan savunma mekanizmalarının zayıflamasına bağlı olarak meydana gelen oksidatif stres ovaryum yaşlanmasına neden olur (Blerkom 1996).

## 2.9. Kök Hücreler

Kök hücreler, henüz farklılaşmamış hücreler olup kendi kendini yenileyebilen ve özelleşmemiş hücre tiplerine farklılaşabilen, tüm çok hücreli canlıların doku ve organlarını oluşturan öncül hücrelerdir (Ural 2006). Ayrıca bu hücreler, hasarlı dokulara transplante edildiklerinde dokuyu onarabilme yeteneğine sahiptirler. Kök hücrelerin, bol miktarda bulunması, kolay izole edilebilmesi, birçok doku ve organ tipine farklılaşabilmesi, otolog veya allojenik alıcılara güvenli bir şekilde transplante edilebilmesi gibi yetenekleri sayesinde rejeneratif tıp uygulamalarında sıklıkla tercih edilmektedir (Tekeli vd 2016).

### 2.9.1. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

1. Kök hücreler, yoğun telomeraz aktiviteleri sayesinde uzun süre boyunca bölünebilme (proliferasyon) ve kendi kendini yenileyebilme (self-renewal) yeteneğine sahip hücre gruplarıdır (Sağsöz ve Ketani 2008).
2. Özelleşmemiş hücrelerdir.
3. Kök hücreler farklılaşarak özelleşmiş hücrelere kaynaklık edecek öncü hücre grupları oluştururlar (plastisite).
4. Kök hücreler hasar gören dokuya nakil edildiklerinde hasarlı dokuyu onarırlar ve doku işlevselliğini artırır.
5. Doku hasarı olmasa bile in vivo ortamlarda farklılaşmış kuşaklara katkı sağlarlar (Karaöz 2010).

### 2.9.2. Kök Hücrelerde Kendini Yenileme, Farklılaşma ve Köklülük

Kromatin modifikasyonlar ve epigenetik değişimler kök hücrelerin karakterlerinin belirlenmesi için oldukça önemlidir. Kök hücreler, hücre içi düzenleyici mekanizmalarla ve mikroçevreden (niş) aldıkları sinyaller ile dinlenme evresinde kalabilirler, kendini yenileyebilirler ya da farklılaşma gösterebilirler. Bu işlevlerin sinyal ileti yolları, transkripsiyon faktörleri, hücre döngüsü düzenleyicileri ve miRNA'lar aracılığıyla kontrol edildiği gösterilmiştir (Ören 2019).

Kendini yenileyebilme tüm kök hücre türlerinin ortak özelliğidir ve bu sayede kök hücre havuzunun sürekliliği sağlanır. Kök hücreler simetrik ve asimetrik olmak üzere iki farklı şekilde bölünürler. Simetrik bölünmede kök hücreler mitoz bölünme ile iki yavru hücre oluştururlar. Bu durum kendini yenileme olarak bilinir. Asimetrik bölünmede ise DNA, sitoplazma ve hücre zarı iki yavru hücrede farklıdır. Yavru hücrelerden biri kök hücre oluştururken (kendini yenileme) diğer yavru hücre farklılaşarak özelleşmiş öncü hücreleri oluşturur (Yazır 2018).

Kök hücrelerde farklılaşma (plastisite), sitokinlerin, büyüme ve farklılaşma faktörlerinin, hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücreler arası iletişimlerin kombine etkisiyle meydana gelen komplike bir olaydır. Farklılaşma; ileri farklılaşma (transdeterminasyon), ara farklılaşma (transdiferansiyasyon) ve geri farklılaşma (diferansiyasyon) olarak üçe ayrılır. İleri farklılaşma, kök hücrelerin somatik bir hücreye ya da daha az potent bir kök hücreye farklılaşması durumudur. Bu süreç genellikle hücrenin çoğalma sürecinin bittiği anda başlar. Ara farklılaşma, somatik yönde farklılaşmış bir hücrenin farklı bir hücreye doğru farklılaşmasıdır. Geri farklılaşma ise somatik hücrelerin kök hücreye geri farklılaşması durumudur. Uyarılmış pluripotent kök hücreler geri farklılaşma örneklerinden biridir (Can 2009).

Kök hücreler farklılaşma potansiyellerine göre beş gruba ayrılır;

1. Totipotent Hücreler: Hiç farklılaşmaya uğramamış ve potent özelliği en fazla olan hücre gruplarıdır. Bu hücre grubu embriyoya ve plasentaya farklılaşabilir.
2. Pluripotent Hücreler: Tüm doku ve organların geliştiği üç germ tabakasından (ektoderm, endoderm ve mezoderm) meydana gelen hücrelere farklılaşabilirler. Bu hücreler blastosistin iç hücre kitlesinde izole edilirler.
3. Multipotent Hücreler: Çoğu dokuda bulunan hücre grubudur. Tek germ tabakasından köken alan hücrelere farklılaşırlar. Mezenkimal kök hücreler multipotent hücre gruplarıdır.
4. Oligopotent Hücreler: Kendi kendilerini yenileyebilen ve doku içinde iki veya daha fazla soy oluşturabilen hücre gruplarıdır.
5. Unipotent Hücreler: Kendi kendilerini yenileyebilirler ve yalnızca bir tek hücre tipine farklılaşabilirler. Potent özelliği en az olan hücre grubudur (Kolios ve Moodley 2013)

Kök hücreler, özgün gen ifadeleri ya da translasyon sonrası bir dizi değişimler sayesinde farklılaşma olmaksızın özgün yapılarını ve işlevlerini korurlar. Diğer hücrelerden ayırt edilebilmelerini sağlayan bu özellikleri köklülük (stemness) olarak bilinir (Can 2009). Hücrenin her üç germ yaprağına ve bunların türevlerine farklılaşabilme kabiliyeti olarak tanımlanan pluripotensi kök hücreleri diğer hücrelerden

ayırır en önemli özelliklerdendir. Pluripotensi; bir dizi transkripsiyon faktörleri, kromatin modifikasyonları ve proteinler üzerindeki epigenetik mekanizmalar olan iç etkenler ile dış etkenler olan parakrin faktörler, otokrin faktörler, hücre-hücre temasları, reseptörler-ligand etkileşimi ve sinyal yolları varlığını gerektirir. Pluripotensinin bu etkenleri sayesinde kök hücreler diğer hücre türlerinden ayırt edilebilmektedir (Can 2014). Hücre yüzeyinde bulunan, hücre sinyal yolları ya da hücre-hücre yapışma molekülleri olarak rol alan belirteçler kullanılarak kök hücre tipleri belirlenebilmektedir. Bu belirteçler farklılaşma kümesi (Clusters of differentiation; CD) olarak tanımlanır. Embriyonik kök hücreler için yaygın belirteçler olarak: SSA1, SSA4, TRA-1-60, Sox2, Oct4; hematopoetik kök hücreler (HKH) için en yaygın belirteçler olarak: CD33, CD34, CD45 ve mezenkimal kök hücreleri ayırt etmek için en yaygın olarak CD29, CD54, CD90, CD106 kullanılır (Can 2009).

### 2.9.3. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücre çeşitleri farklılaşma potansiyellerine ve elde edildikleri kaynaklara göre iki bölüme ayrılır. Farklılaşma potansiyellerine göre kök hücreler; totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere beş çeşittir. Elde edildikleri kaynaklara göre kök hücreler ise üç bölümde incelenebilir (Çerçi ve Erdost 2019).

1. Embriyonik kök hücreler: Erken evredeki bir embriyoda blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen pluripotent özellikli hücrelerdir.
2. Embriyonik olmayan kök hücreler: Fetüsten, kadavradan, göbek kordonundan, plasentadan, tümör kitlesinden veya farklılaşma ile herhangi bir somatik hücrenin kök hücreye dönüştürülmesi ile oluşan hücrelerdir (kanser kök hücreleri, uyarılmış pluripotent kök hücreler, fetal kök hücreler gibi).
3. Yetişkin (Adult) kök hücreler: Olgun dokulardan alınan kök hücrelerdir. Bu hücreler gelişim evreleri nedeniyle embriyo ya da fetüsten elde edilen kök hücrelere kıyasla sınırlı potansiyele sahiptirler ve multipotent hücrelerdir. Bu hücreler genellikle kaynaklandıkları doku orjinlerine göre adlandırılırlar (MKH'ler, HKH'ler, yağ doku kaynaklı kök hücreler, endotelial hücreler, diş pulpası kök hücreleri gibi) (Hui vd 2011, Çerçi ve Erdost 2019).

#### 2.9.4. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH), kendi kendini yenileme ve çeşitli somatik soylara farklılaşma yeteneğine sahip olan heterojen bir hücre popülasyonudur. MKH'ler klasik olarak kemik iliği kökenli fibroblast benzeri hücreler olarak tanımlanmaktadır. Bu hücreler yağ dokusu, umblikal kord, fetal dokusu, iskelet kası, amniyotik sıvı, ovaryum, diş pulpası, karaciğer gibi birçok dokudan izole edilebilmektedir (Ural 2014). Uluslararası Kriyoterapi Derneği, mezenkimal kök hücreleri tanımlamak için: kültürde izole edilmiş hücrelerin plastiğe yapışması; CD34, CD45, CD14, CD19 yüzey antijenlerini eksprese etmemesi ve CD105, CD73, CD90 yüzey antijenlerini eksprese etmesi; osteositlere, adipositlere ve kondrositlere farklılaşabilmesi olmak üzere üç kriter geliştirmiştir. Ayrıca bu hücreler, immünosupresyon olmadan allojenik transplantasyona izin vermeleri ve MHCII negatif hücreler olmasıyla da tanımlanmaktadırlar (Rastegar vd 2010).

MKH'ler hasarlı dokuya yönelmede ve bu bölgelerde doku onarımı gerçekleştirmede yüksek potansiyele sahiptirler. Bu işlevlerini sitokinlerin, büyüme faktörlerinin, kemokinlerin, adezyon moleküllerinin ve ekstraselüler matriks komponentlerinin kombine çalışması ile gerçekleştirmektedirler (Kang vd 2012, Ural 2014). Mezenkimal kök hücrelerin immünosupresif olarak bilinen bağışıklık sistemini baskılama ve bağışıklık geliştirme özelliği bulunmaktadır. Otokrin interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) bağımlı bir yol aracılığıyla antijen sunan hücreler olarak görev yapar ve bu mekanizma ile bağışıklık sistemini destekleyebilirler. Bununla birlikte IFN- $\gamma$  seviyesi belli bir eşiğin üzerine çıktığında antijen sunumunu engelleyerek bağışıklığın baskılanmasını teşvik ederler. IFN- $\gamma$ , MKH'lerin bağışıklık sistemini baskılamasına desteklik eden B7-H1 yüzey molekülünü yukarı regüle etmektedir. Bu durumda hücre-hücre temasının MKH'lerin bağışıklık sistemini düzenlenmesinde önemli bir yere sahip olduğunu göstermektedir. Bağışıklık düzenlemede kritik rol alan çözünür faktörler ise B lenfositlerin durdurulmasına, farklılaşmasının önlenmesine ve kemotaksisinin bozulmasına neden olur (Rastegar vd 2010). Ayrıca mezenkimal kök hücreler bir takım sitokin ve büyüme faktörleri aracılığıyla monositlerin, dentrik hücrelerin, doğal öldürücü hücrelerin (natural killer: NK) ve T hücrelerinin fonksiyonunu modüle eder. MKH'lerin immün tedavide büyük önem arz eden immünmodülatör etkileri olmasına rağmen bu etkilerin gerçek mekanizmaları henüz tam olarak bilinmemektedir. (Avcu 2008).

## 2.9.5. Mezenkimal Kök Hücre Yüzey Belirteçleri

### 2.9.5.1. CD90 (Thy-1)

CD90, 25-37 kDa glikosilfosfatidilinositol (GPI) bağlı membran proteinidir ve osteoprogenitör hücrelerle bağlantılıdır. Hücre-matriks ve hücreler arası etkileşimlere katılan CD90 aynı zamanda MKH karakterizasyonu için pozitif yüzey belirteci olarak kullanılır (Wiesmann vd 2006)

### 2.9.5.2. CD45 (Ly-5)

CD45, 180-220 kDa'lık bir glikoproteindir ve lökosit ortak antijeni (Ly-5) olarak da bilinen bu genin protein ürünü, protein tirozin fosfataz (PTP) ailesinin bir üyesidir. Hücre büyümesi, farklılaşma, mitotik döngü gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenlerler (Rheinländer vd 2018). Ayrıca, CD45 mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonu için negatif yüzey belirteci olarak kullanılmaktadır (Niyaz vd 2012).

### 2.9.5.3. CD54 (ICAM-1)

CD54, hücreler arası etkileşimlerin stabilitesinde kritik öneme sahiptir. Bu gen tarafından kodlanan protein, bağışıklık hücrelerinin ve endotel hücrelerin zarlarında hücreler arası adezyon molekülü olarak bulunur (Rothlein vd 1986). CD54 aynı zamanda MKH karakterizasyonu için pozitif yüzey belirteci olarak kullanılır (Niyaz vd 2012).

### 2.9.5.4. CD29 (İntegrin Beta-1)

CD29, integrin ailesinin üyesidir ve integrin beta-1 (ITGB1) olarak da bilinir. İntegrin ailesinin, farklı sayıda heterodimerik reseptör oluşturan alfa ve beta transmembran alt birimleri vardır (Sun vd 2018). İnsan mezenkimal kök hücrelerinin karakterizasyonu için pozitif yüzey belirteci olarak kullanılır (Niyaz vd 2012).

#### 2.9.5.5. RT1D (MHC II)

Birçok hayvanda bulunan major doku uyumluluk kompleksinin (MHC) sıçanlardaki versiyonu RT1 olarak adlandırılır (Rigas vd 1994). İmmün sistemin önemli elemanlarından biri olan T hücreleri, bir antijeni tanımlayıp reaksiyon oluşturabilmektedir. Bu işlemin gerçekleştirilebilmesi için MHC molekülünün antijeni işlenmesi ve T hücresine sunması gerekmektedir. MHC I (RT1-A) molekülü intrasitoplazmik alanda yer alan yabancı antijenleri CD8+ sitotoksik T hücrelerine sunmakla görevlidir. MHC II (RT1-B-D) molekülü endositozla internalize edilen bakterileri CD4+ yardımcı T hücrelerine sunmakla görevlidir (Yalçın 2013, Rigas vd 1994). MKH'ler, MHC I molekülünün ekspresyonunu indükleyebilirken MHC II molekülünün ekspresyonunu inhibe edebilirler. Bununla birlikte MKH'ler yüzeylerinde MHC I molekülünü ifade ederken MHC II molekülünü ifade etmezler (Machado vd 2013).

#### 2.9.6. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Uygulamalarda Avantajları ve Dezavantajları

MKH'ler otolog kaynaktan kolayca izole edilebilme, spesifik sitokinleri salgılayabilme, genetik modifikasyonlar ve hücre-hücre teması özellikleriyle terapötik yarar sağlamaktadır. Bu nedenle bu hücreler genetik bozukluklardan doku iskemisine kadar çeşitli hastalıklarda kullanılmaları için incelenmiştir (Rastegar vd 2010).

MKH'lerin klinik kullanım açısından en önemli dezavantajı, izolasyon sonrasında sayılarının çok az olması nedeniyle in vitro kültür ortamında uzun süreli çoğaltmaya gereksinim duyulmasıdır. Bu durumda ciddi bir teknoloji, alt yapı, deneyim ve maliyet gerektirmektedir (Uçkan Çetinkaya 2007). Mezenkimal kök hücrelerin kültür ortamında pasajlandıkları süre boyunca mikroorganizma kontaminasyonunun yanı sıra kültürde hücre yaşlanması, sitogenetik patoloji gelişimi, telomer kısalması, kanser gelişimi gibi riskler de söz konusudur. Diğer sorun ise, bu hücrelerin immünosupresif özelliklerinin enfeksiyon riskini artırmada etkili olmasıdır (İnan ve Özbilgin 2011, Uçkan Çetinkaya 2007).

## 2.10. Hipotez

H1: Ovaryum kaynaklı stromal kök hücreler (OSKH), doğal overyan yaşlanma sürecindeki ovaryum dokusunun restorasyonu ve fonksiyonu üzerinde iyileştirici etkiler gösterecektir.

H2: Stromal kök hücreler overyan yaşlanma sürecine giren sıçanların ovaryumunda AMH, FSHR, IGF-1 gen ekspresyon seviyelerini düzenleyerek ovaryum fonksiyonlarını iyileştirecektir.

H3: OSKH'ler, overyan yaşlanma sürecine giren sıçanlarda AMH, FSH ve E2 hormon seviyelerini düzenleyerek ovaryum fonksiyonlarını iyileştirecektir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma için 03.02.2021 tarihinde PAUHDEK-2021/04 numarasıyla Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan onay alındı. Çalışmamızda Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama Merkezinden temin edilen 12 adet sağlıklı Sprague Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Ortalama ağırlıkları 306-381 gram ve 12-14 aylık olan bu sıçanlara, standart sıçan yemi ve çeşme suyu kısıtlama olmaksızın verildi. Sıçanlar deney protokolü boyunca,  $21 \pm 1$  ° C sıcaklığa ve 65-70% rutubete sahip olan sessiz bir odada ayrı kafesler içinde tutuldu. Bu odalarda 12 saat ışık-karanlık döngüsü uygulandı.



**Şekil 3.1:** Deney için gruplandırılmış 12-14 aylık sıçanlar.

### 3.1. Deney Grupları

Sıçanlar; 1. grup kontrol (K grubu; n=6), 2. grup over kaynaklı stromal kök hücre verilen grup (SKH grubu; n=6) olmak üzere 2 eşit gruba ayrıldı. Bu gruplar için sıçan seçme işlemi rastgele olarak yapıldı. Stromal kök hücre izolasyonu için 3 adet 23-25 günlük prepubertal dişi sıçan kullanıldı. Gruplandırma detayları tablo 3.1'de verilmiştir.

**Tablo 3.1:**Sıçanların deney gruplarına dağılımı.

| Gruplar                                                                                  | Grup Başına Düşen Hayvan Sayısı | Hayvanların Yaşı |
|------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|------------------|
| Kontrol Grubu                                                                            | 6                               | 12-14 aylık      |
| Stromal Kök Hücre Grubu<br>(Ovaryum Kaynaklı Stromal Kök Hücre Enjeksiyonu Yapılan Grup) | 6                               | 12-14 aylık      |

### 3.2. Ovaryum Kaynaklı Stromal Kök Hücrelerin İzole Edilmesi

Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezinden temin edilen yaşları 23-25 günlük olan üç adet sağlıklı ve prepubertal sıçanların ovaryum dokusundan eksplant yöntemi kullanılarak stromal kök hücre (SKH) izole edildi. Steril koşullarda ve anestezi altında sakrifiye edilen sıçanların ovaryumları steril bir kabın içerisinde PBS (Phosphate Buffered Saline) ile yıkandı. Alınan ovaryum dokuları penisilin/streptomisinli DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) içerisinde steril şartlarda laboratuvara getirildi.

Tam besiyeri 450 ml DMEM (Capricorn Scientific, Germany), %10 FBS (Fetal Bovine Serum) (Capricorn Scientific, Germany), 5 ml penisilin/streptomisin (Pan Biotech, Germany) karıştırılarak hazırlandı. Tam besiyeri içeren petri kabında, ovaryum dokusunun etrafındaki adipoz doku uzaklaştırıldı ve ovaryum dokusu diseke edildi. Diseke edilen ovaryum dokusu 100 mm'lik yeni petri kaplarına alındı ve üzerine 8 ml tam besiyeri eklendi. Daha sonra %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C sıcaklığa sahip inkübasyona kaldırıldı. Primer kültürlerdeki hücrelerin over dokusundan migrasyonları, proliferasyonları ve kontaminasyon varlığı 24. saatte takip edildi. Bu süreçte ilk 5 gün

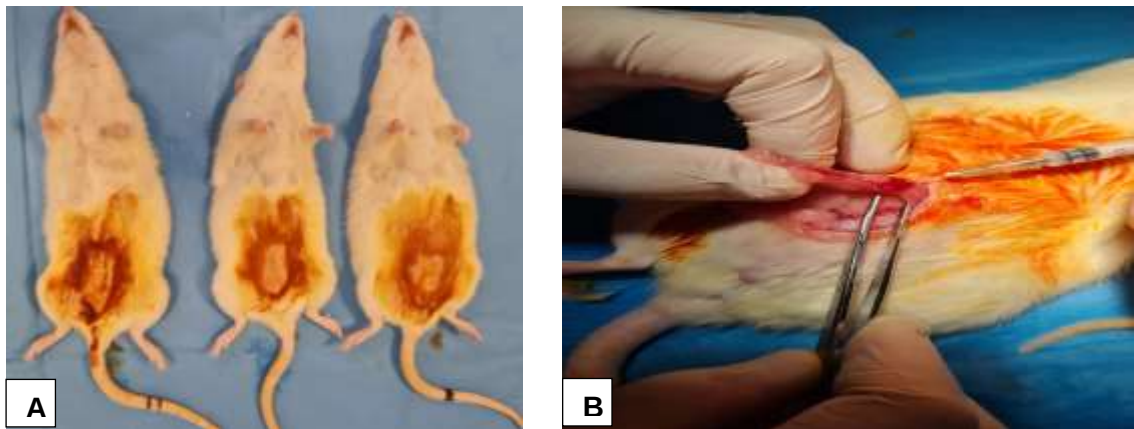
boyunca her gün, daha sonra gün aşırı besiyer (%10 FBS ve %1 penisilin/streptomisin içeren DMEM) değişimi yapıldı.

Konfluente (%70-80) ulaşan hücrelerin besiyerleri çekildi ve 1 defa PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelere, %0.25 tripsin/1 mM EDTA enzimi (Hyclone, USA) ile muamele edildi ve 5 dk 37 °C, %5 CO<sub>2</sub>'li inkübatöre kaldırıldı. Kültür kaplarının tabanına yapışmış olan hücreler süspansiyon haline geldiğinde konik tüpe aktararak 1500 rpm' de 5 dk santrifüj edildi. Daha sonra süpernatant kısım atılarak pellet süspanse hale getirildi. Bu aşamadan sonra hücreler yoğunluklarına göre 25'lik ya da 75'lik flasklara ekildi. Bu süreç boyunca hücreler invert mikroskop (CKX41, Olympus, Japan) kullanılarak takip edildi ve çoğaldıklarında tripan blue ile boyanarak sayıldı.

Pasaj 3'te stromal kök hücrelerin karakterizasyonu için CD90, CD54, CD45, CD29, MHCII (RT1D) kök hücre yüzey belirteçlerinin miktar tayinleri, akım sitometri analizi Kocaeli/Gebze Nepenthe Araştırma Teknolojileri Şirketinde Sysmex Cube 8 Model cihaz kullanılarak incelendi.

### 3.3. İkinci Gruptaki Sıçanlara Ovaryum Kaynaklı Stromal Kök Hücrelerin Verilmesi

Yaşları 23-25 günlük olan prepubertal sıçanların ovaryum dokusundan elde ettiğimiz  $1 \times 10^6$  stromal kök hücre 0.01 ml PBS içerisinde cerrahi yöntem uygulanarak bu grupta yer alan sıçanların sol ovaryumlarına enjekte edildi (şekil 3.2).



**Şekil 3.2:** A: Anestezi uygulanmış sıçanlar B: Sıçanların ovaryumuna stromal kök hücre enjeksiyonu.

Kök hücre enjeksiyonundan 30 gün sonra tüm sıçanların ovaryumları çıkarıldı (şekil 3.3). Daha sonra tüm sıçanlar sakrifiye edildi. Sıçanlardan çıkarılan ovaryumlar rutin ışık mikroskobu altında histopatolojik olarak incelendi. Ovaryumdaki IGF-1, FSHR ve AMH proteinleri immünohistokimyasal yöntem ile değerlendirildi. AMH, FSH ve E2 hormon seviyeleri, ELİSA yöntemi (ELİSA kitindeki protokollere uygun olarak) ile değerlendirildi. Hematoksilen-eozin (H&E) ve immünohistokimyasal (İHK) yöntem ile boyanan kesitler Olympus BX-51 ışık mikroskobu ile incelendi ve Olympus PP72 Digital Kamera ataçmanı ile resimlendi. ELİSA sonuçları BioTek ELx-808 cihazında 450 nm'de okutuldu ve sonuçlar Excel programında analiz edildi.



**Şekil 3.3:** Sıçanlardan ovaryumların alınması.

### 3.4. Doku Takip Yöntemi

Tüm gruplara ait ovaryum dokuları kasetlenerek formaldehit solüsyonu içerisinde 24 saat fikse edildi ve protokollere uygun olarak parafin doku takibine başlandı. Fiksasyon işleminden sonra dokular akar su altında 1 saat yıkandı. Yıkanan dokular artan alkol serilerinden (sırasıyla %70, %80, %90, %100 (2 kere) ve 1'er saat) geçirildi. Alkol serisinden sonra dokular 1 saat ksilende bekletildi ve daha sonra 1 gece

fresh ksilene bırakıldı. Ksilen içerisinde alınan dokular parafin içerisinde bloklandı. Parafin bloklarından mikrotom cihazı ile 5 mikronluk kesitler lam üzerine alındı.

### 3.5. Hematoksilen Eozin Boyama Yöntemi

Alınan kesitler ile yapılan H&E boyama protokol sırası aşağıdaki gibidir.

- a) Lama alınmış dokular 65 C° etüvde 2 saat bekletilerek deparafinize edilir.
- b) Ksilende 3x10 dk boyunca bekletilir ve kurutulur.
- c) Azalan alkolde (%96, %90, %80, %70, %50) 10'er dk bekletilerek rehidrate edilir.
- d) Distile su ile 10 dk yıkanır.
- e) 1 dakika hematoksilende bekletilir ve 1 dk akan suda bekletilir.
- f) Asit alkolde 10 saniye bekletilir ve 1 dk akan suda konulur.
- g) Amonyak içerisinde 10 sn bekletilir ve 1 dk akan suya konulur.
- h) Eozin de 10 sn bekletilir ve 1 dk akan suya konulur.
- i) Artan alkol (%50, %70, %80, %90, %96 alkol) serisinde dehidrate edilir.
- j) Kurutulur.
- k) 2x15 dk ksilende bekletilir.
- l) Entellan ile kapama işlemi yapılır.

### 3.6. Folikül Sayımı Yöntemi

Parafin bloklama yapıldıktan sonra tüm ovaryum dokularından 1., 5. ve 10. kesitler lamlara alındı ve taşıma sepetine yerleştirildi. Alınan bu kesitlerde H&E boyama yapıldıktan sonra primordiyal, primer, sekonder ve graff foliküllerin sayımı yapıldı ve sonuçlar toplandı. H&E yöntemi ile boyanan kesitler Olympus BX-51 ışık mikroskobu altında 4x, 10x, 20x, 40x ve 100x büyütmelemlerde incelendi. Olympus PP72 Digital Kamera ataçmanı kullanılarak resimlendi. Foliküller aşağıdaki tabloda yer alan kriterlere uygun olarak H&E boyama yapılarak belirlenmiştir (Tablo 3.2).

**Tablo 3. 2:** Folikül sayımı için belirlenen folikül kriterleri.

| FOLİKÜLLER                 | TANIM                                                                                                                                     |
|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Primordiyal Folikül</b> | Tek tabakalı yassı epitel hücrelerle çevrili foliküller                                                                                   |
| <b>Primer Folikül</b>      | Tek katlı kübik epitel ile çevrili ya da çok tabakalı granüloza hücreleri içeren foliküller                                               |
| <b>Sekonder Folikül</b>    | Granüloza hücre tabakasında antral boşluklar oluşan, çok tabakalı granüloza hücreleri içeren ve belirgin teka tabakası bulunan foliküller |
| <b>Graff Folikül</b>       | Geniş antrumu olan, kumulus ooforusu olan ve belirgin teka tabakası olan folikül                                                          |
| <b>Atretik Folikül</b>     | Tekrarlayan apoptoz ve granüloza hücrelerinin fagositozu ile dejenere olmuş foliküller                                                    |

### 3.7. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Anti-Rat FSHR (Elabscience, ABD), anti-rat IGF-1 (Finetest, China), anti-human AMH (Finetest, China) primer antikolları ovaryum dokularını karakterize etmek için kullanıldı. Alınan kesitler ile yapılan İHK boyama protokol sırası aşağıdaki gibidir.

- Lama alınmış dokular 65 °C etüvde 1 gece bekletilerek deparafinize edilir.
- Etüvden çıkarılan dokular 3x10 dk ksilende bekletilir ve kurutulur.
- Azalan alkolde (%96, %90, %80, %70, %50) 10'er dk bekletilerek rehidrate edilir.
- 10 dk distile su ile yıkanır.
- Sodyum sitrat tamponu ile antigen retrieval yapılır.

Sodyum sitrat tamponu (10 mM sodyum sitrat, %0.05 Tween 20, pH 6.0) 2.94 g Tri- sodyum sitrat (dihydrate) ile Distile su 1 L karıştırılır ve pH 6.0 olması için 1N HCl ilave edilir. 0.5 mL Tween 20 eklenerek karıştırılır (mikrodalgada kaynamaya bırakılır ve kaynadıktan sonra 5 dk bekletilir).

- 1X PBS ile yıkanır.
- Kesitler hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) içerisinde 15 dk bekletilerek enzim bloklama yapılır.
- 1X PBS ile 3 kez 5 dk yıkanır.
- Dokular pappen ile sınırlandırılır.

- j) Sınırlandırılan doku üzerine A solüsyonu damlatılır ve 30 dk bekletilir.
- k) Primer antikor datasheete uygun olarak dilüe edilir (AMH: 1/100, FSHR: 1/100, IGF-1: 1/100). Primer antikor dokuların üzerine damlatılarak 16 saat +4 derecede inkübasyona bırakılır.
- l) 1X PBS ile 3 kez 5 dk yıkanır.
- m) Pappen ile sınırlandırılan dokuların üzerine B solüsyonu (sekonder antikor) damlatılır ve 30 dk bekletilir.
- n) 1X PBS ile 3 kez 5 dk yıkanır.
- o) Sınırlandırılan dokulara C solüsyonu damlatılarak 30 dk bekletilir.
- p) 1X PBS ile 3 kez 5 dk yıkanır.
- q) Dokulara DAB kromojen damlatılarak karanlık ortamda 15 dk bekletilir.

DAB kromojen hazırlamak için, 3 ml (98 damla) DAB substrat ile 60µl (2 damla) DAB kromojen karıştırılır ve vortekslenir.

- r) 1X distile su ile 3 kez 5 dk yıkanır.
- s) Hematoksilene batırılıp çıkarıldıktan sonra akan suda yıkanır.
- t) Artan alkol (%50, %70, %80, %90, %96 alkol) serisinde dehidrate edilir ve kurutulur.
- u) 3 dk ksilolde bekletildikten sonra fresh ksilene alınır.
- v) Entellan ile kapama yapılır.

AMH, FSHR ve IGF-1'in ifadesi, ImageJ programı kullanılarak H skoru [ $H\text{ SCORE} = \sum P_i (I+1)$ ] ile semikantitatif bir biçimde analiz edildi. I; boyama yoğunluğu (3: kuvvetli, 2: orta, 1: zayıf ve 0: ekspresyon yok) (tablo 3.2).

**Tablo 3.3:** AMH, FSHR ve IGF-1 ekspresyonlarının İHK boyama yöntemine göre derecelendirilmesi.

| Boyama ve Ekspresyon Şiddeti        | Derece |
|-------------------------------------|--------|
| Kuvvetli Boyama ve Ekspresyon       | 3      |
| Orta Derecede Boyama ve Ekspresyon  | 2      |
| Zayıf Derecede Boyama ve Ekspresyon | 1      |
| Ekspresyon ve Boyama Yok            | 0      |

### 3.8. ELİSA Yöntemi

Serum AMH, FSH ve E2 konsantrasyonları ELİSA yöntemi ile hesaplandı. Sıçanların kalbinden biyokimya tüpüne alınan kan kuru buz içerisinde laboratuvara getirildi. Ardından 1500 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı ependorf tüpüne alındı ve soğutmalı santrifüjde 2500 rpm'de 10 dk tekrar santrifüj edilerek süpernatant kısmı yeni bir ependorfa alındı. Bu işlemlerden sonra elde edilen serumlar 1 saat -20 de bekletildikten sonra deney yapılana kadar -80 de muhafaza edildi.

Çalışmamızda, AMH, FSH ve E2 konsantrasyonları, ticari olarak elde edilen ELİSA kitlerinin ilgili protokollerine göre gerçekleştirildi. Kitle birlikte sağlanan 96-kuyucuklu ELİSA plakası, kitte belirtilen dalga boyuna sahip spektrofotometre cihazında okutuldu. Elde edilen absorbans değerleri Excel dosyasına aktararak normalize değerleri hesaplandı. Bu değerler kullanılarak standart eğim grafiği çizildi ve örneklerin absorbans değerlerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri hesaplandı.

#### 3.8.1. Rat Anti-Mullerian Hormone (AMH) ELISA Kit

Cat.No:SG-20022

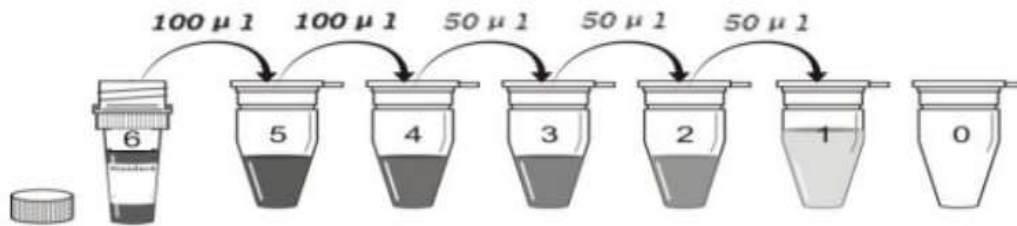
SinoGeneClon Biotech Laboratory

Ana stok standart (std): 18 ng/mL

100 µl (18 ng/mL) ana stok standardı 50 µl standart seyreltici ile sulandırılarak 12 ng/mL standart stok solüsyonu elde edildi. 8 ng/mL, 4 ng/mL, 2 ng/mL ve 1 ng/mL solüsyonlarının her biri, kendinden bir önceki ependorfta bulunan standart stok solüsyonunun (sırasıyla 12 ng/mL, 8 ng/mL, 4 ng/mL, 2 ng/mL) 50 µl standart seyreltici ile sulandırılması sonucu hazırlandı. Seyreltme işlemleri seri bir şekilde yapıldı ve standart seyreltici sıfır standart (0 ng/mL) olarak kabul edildi. ELİSA kitinde önerilen standart çözeltilerin seyreltilme protokolü tablo 3.3 'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.4:** Ana stok standart solüsyonunun seyreltilmesi.

| Standart konsantrasyonu | Standart Numarası | Standart Çözelti                        |
|-------------------------|-------------------|-----------------------------------------|
| 12 ng/mL                | Std No:5          | 100 µl orijinal std + 50 µl std dilüent |
| 8 ng/mL                 | Std No:4          | 100 µl std No:5 + 50 µl std dilüent     |
| 4 ng/mL                 | Std No:3          | 50 µl std No:4 +50 µl std dilüent       |
| 2 ng/mL                 | Std No:2          | 50 µl std No:3 +50 µl std dilüent       |
| 1 ng/mL                 | Std No: 1         | 50 µl std No:2 +50 µl std dilüent       |



| Tube  | 6        | 5        | 4       | 3       | 2       | 1       | 0       |
|-------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| ng/mL | 18 ng/mL | 12 ng/mL | 8 ng/mL | 4 ng/mL | 2 ng/mL | 1 ng/mL | 0 ng/mL |

**Test Prosedürü:**

- 50 µl standart yüklenir. (NOT: standartlara numune örnekleri eklenmez)
- 10 µl örnek yüklenir. 40 µl sample diluent yüklenir. Seal ile kapatılıp 37°C'de 30 dk inkübe edilir.
- Seal kaldırılır ve 5 kez wash buffer ile yıkama yapılır (en az 350 µl wash buffer koyulup yaklaşık 30 sn beklenir).
  - Wash buffer solüsyonu hazırlamak için 30X ana stok ve 580 ml distile su seyreltildi.
- Hem standartlara hem de örneklere 50 µl streptavidin HRP eklenir. (NOT: blank kontrollerine HRP eklenmez). Seal ile kapatılır ve 37°C'de 30 dk inkübe edilir.
- Seal kaldırılır ve 5 kez wash buffer ile yıkama yapılır.
- Her kuyucuğa (blank dahil) 50 µl A kromojen solüsyonu eklenir. Hemen sonra 50 µl B kromojen solüsyonu eklenir. Seal ile kapatılıp 37°C'de 15 dk inkübe edilir.
- Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenir.
- 15 dk içinde 450 nm mikropłaka okuyucuda okunur.

### 3.8.2. Rat Follicle-Stimulating Hormone (FSH) ELISA Kiti

Cat.No:SG-20474

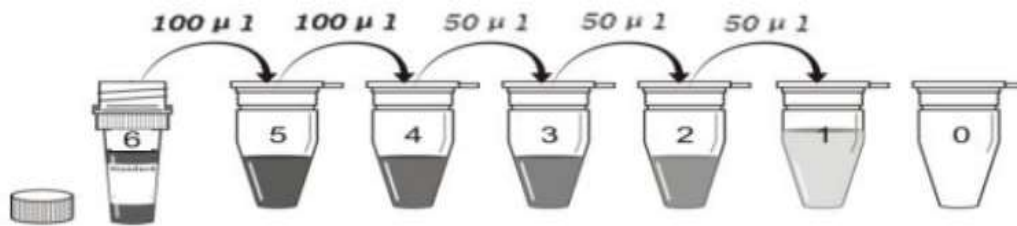
SinoGeneClon Biotech Laboratory

Ana stok standart (std): 54 ng/mL

100 µl (54 ng/mL) ana stok standardı 50 µl standart seyreltici ile sulandırılarak 36 ng/mL standart stok solüsyonu elde edildi. 24 ng/mL, 12 ng/mL, 6 ng/mL, ve 3 ng/mL solüsyonlarının her biri, kendinden bir önceki ependorfda bulunan standart stok solüsyonunun (sırasıyla 36 ng/mL, 24 ng/mL, 12 ng/mL, 6 ng/mL) 50 µl standart seyreltici ile sulandırılması sonucu hazırlandı. Seyreltme işlemleri seri bir şekilde yapıldı ve standart seyreltici sıfır standart 0 ng/mL) olarak kabul edildi. ELİSA kitinde önerilen standart çözeltilerin seyreltilme protokolü tablo 3.4 'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.5:** Ana stok standart solüsyonunun seyreltilmesi.

| Standart konsantrasyonu | Standart Numarası | Standart Çözelti                        |
|-------------------------|-------------------|-----------------------------------------|
| 36 ng/mL                | Std No:5          | 100 µl orijinal std + 50 µl std dilüent |
| 24 ng/mL                | Std No:4          | 100 µl std No:5 + 50 µl std dilüent     |
| 12 ng/mL                | Std No:3          | 50 µl std No:4 +50 µl std dilüent       |
| 6 ng/mL                 | Std No:2          | 50 µl std No:3 +50 µl std dilüent       |
| 3 ng/mL                 | Std No: 1         | 50 µl std No:2 +50 µl std dilüent       |



| Tube  | 6        | 5        | 4        | 3        | 2       | 1       | 0       |
|-------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|
| ng/mL | 54 ng/mL | 36 ng/mL | 24 ng/mL | 12 ng/mL | 6 ng/mL | 3 ng/mL | 0 ng/mL |

Test Prosedürü:

1. 50 µl standart yüklenir. (NOT: standartlara numune örnekleri eklenmez)

2. 10 µl örnek yüklenir. 40 µl sample diluent yüklenir. Seal ile kapatılıp 37°C'de 30 dk inkübe edilir.
3. Seal kaldırılır ve 5 kez wash buffer ile yıkama yapılır (en az 350 µl wash buffer koyulup yaklaşık 30 sn beklenir).
  - Wash buffer solüsyonu hazırlamak için 30X ana stok ve 580 ml distile su seyreltilir.
4. Hem standartlara hem de örneklerle 50 µl streptavidin HRP eklenir. (NOT: blank kontrollerine HRP eklenmez). Seal ile kapatılır ve 37°C'de 30 dk inkübe edilir.
5. Seal kaldırılır ve 5 kez wash buffer ile yıkama yapılır.
6. Her kuyucuğa (blank dahil) 50 µl A kromojen solüsyonu eklenir. Hemen sonra 50 µl B kromojen solüsyonu eklenir. Seal ile kapatılıp 37°C'de 15 dk inkübe edilir.
7. Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenir.
8. 15 dk içinde 450 nm mikropłaka okuyucuda okunur.

### 3.8.3. Rat Estradiol (E2) ELİSA Kiti

Cat.No:SG-20349

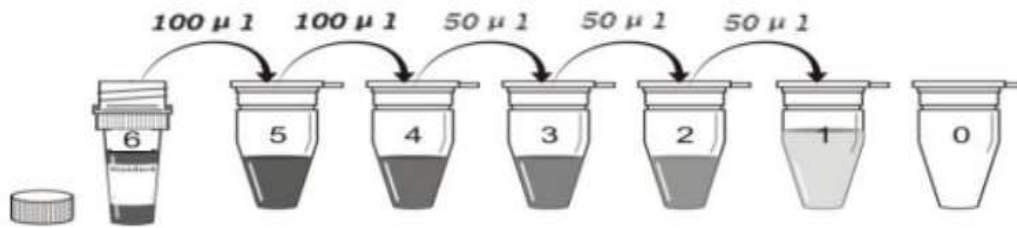
SinoGeneClon Biotech Laboratory

Ana stok standart (std): 72 ng/mL

100 µl (72 ng/mL) ana stok standardı 50 µl standart seyreltici ile sulandırılarak 48 ng/mL standart stok solüsyonu elde edildi. 32 ng/mL, 16 ng/mL, 8 ng/mL ve 4 ng/mL solüsyonlarının her biri, kendinden bir önceki ependorfta bulunan standart stok solüsyonunun (sırasıyla 48 ng/mL, 32 ng/mL, 16 ng/mL, 8 ng/mL) 50 µl standart seyreltici ile sulandırılması sonucu hazırlandı. Seyreltme işlemleri seri bir şekilde yapıldı ve standart seyreltici sıfır standart 0 ng/mL) olarak kabul edildi. ELİSA kitinde önerilen standart çözeltilerin seyreltilme protokolü tablo 3.5 'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.6:** Ana stok standart solüsyonunun seyreltilmesi.

| Standart konsantrasyonu | Standart Numarası | Standart Çözelti                        |
|-------------------------|-------------------|-----------------------------------------|
| 48 ng/mL                | Std No:5          | 100 µl orijinal std + 50 µl std dilüent |
| 32 ng/mL                | Std No:4          | 100 µl std No:5 + 50 µl std dilüent     |
| 16 ng/mL                | Std No:3          | 50 µl std No:4 +50 µl std dilüent       |
| 8 ng/mL                 | Std No:2          | 50 µl std No:3 +50 µl std dilüent       |
| 4 ng/mL                 | Std No: 1         | 50 µl std No:2 +50 µl std dilüent       |



| Tube  | 6        | 5        | 4        | 3        | 2       | 1       | 0       |
|-------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|
| ng/mL | 72 ng/mL | 48 ng/mL | 32 ng/mL | 16 ng/mL | 8 ng/mL | 4 ng/mL | 0 ng/mL |

**Test Prosedürü:**

- 50 µl standart yüklenir. (NOT: standartlara numune örnekleri eklenmez)
- 10 µl örnek yüklenir. 40 µl sample diluent yüklenir. Seal ile kapatılıp 37°C'de 30 dk inkübe edilir.
- Seal kaldırılır ve 5 kez wash buffer ile yıkama yapılır (en az 350 µl wash buffer koyulup yaklaşık 30 sn beklenir).
  - Wash buffer solüsyonu hazırlamak için 30X ana stok ve 580 ml distile su seyreltilir.
- Hem standartlara hem de örneklere 50 µl streptavidin HRP eklenir. (NOT: blank kontrollerine HRP eklenmez). Seal ile kapatılır ve 37°C'de 30 dk inkübe edilir.
- Seal kaldırılır ve 5 kez wash buffer ile yıkama yapılır.
- Her kuyucuğa (blank dahil) 50 µl A kromojen solüsyonu eklenir. Hemen sonra 50 µl B kromojen solüsyonu eklenir. Seal ile kapatılıp 37°C'de 15 dk inkübe edilir.
- Her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklenir.
- 15 dk içinde 450 nm mikrolaka okuyucuda okunur.

### 3.9. İstatiksel Analiz

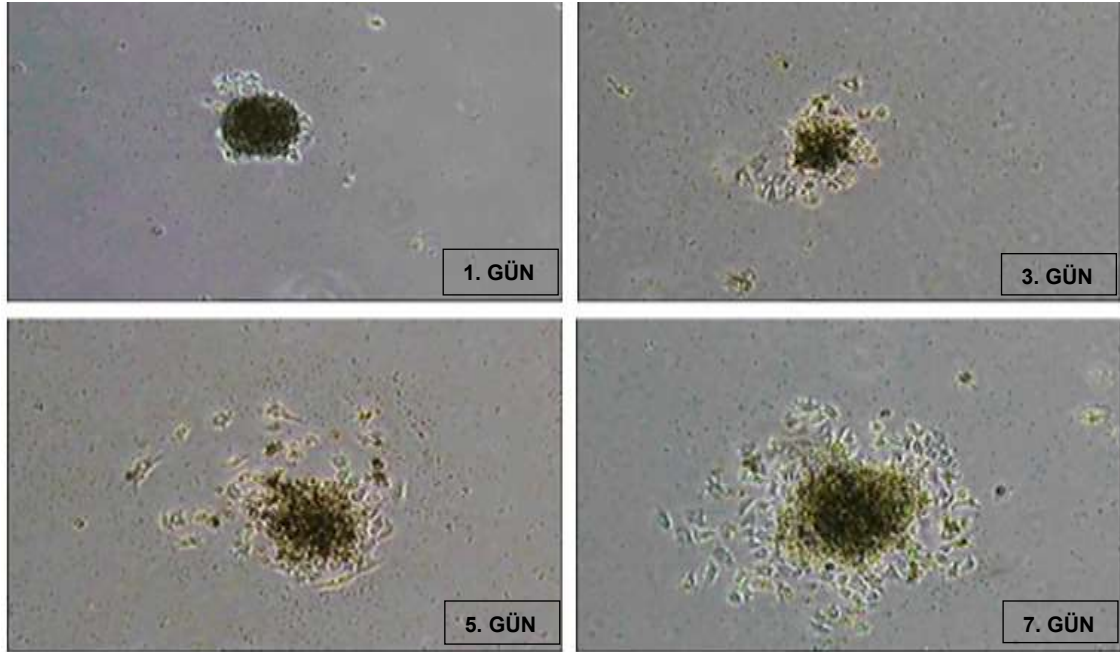
Sürekli değişkenler aritmetik ortalama  $\pm$  standart sapma olarak ifade edildi. Primordiyal, primer, sekonder, graff ve atretik foliküllerin sayımında ve immünohistokimya deneyi için gruplar arası H skoru kıyaslamasında Kruskal-Wallis testi ile kullanıldı. Kruskal-Wallis testi SPSS 25.0 yazılımı (IBM SPSS Statistics 25 yazılımı, Armonk, NY: IBM Corp) ile değerlendirildi. Verilerin normalliği Shapiro-Wilk testi ile hesaplandı. Bağımsız gruplar karşılaştırılırken Kruskal Wallis testi, ikili gruplar karşılaştırılırken Mann-Whitney U testi kullanıldı.  $P<0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



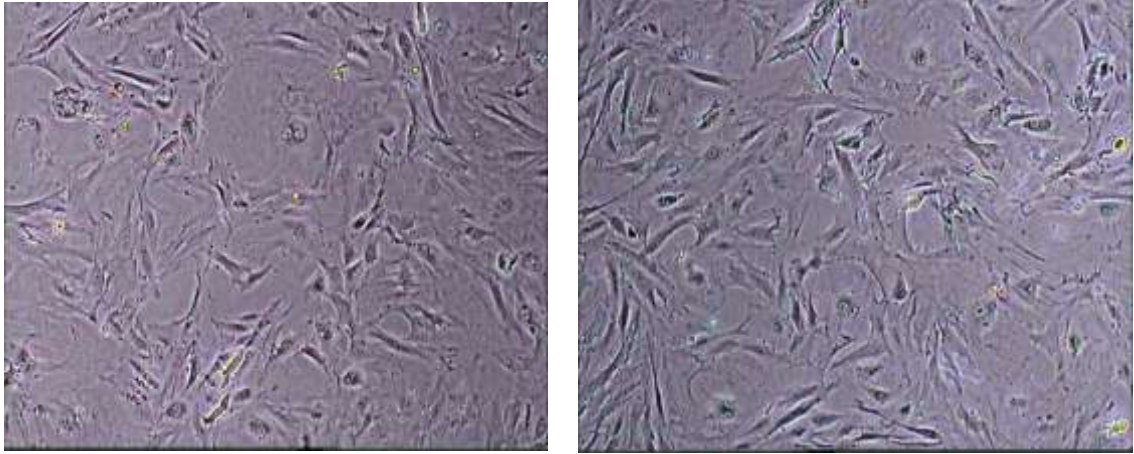
#### 4. BULGULAR

##### 4.1. Kök Hücre İzolasyonu ve Flow Sitometri Bulguları

Over dokusundan eksplant kültür yöntemiyle izole edilen stromal kök hücreler, üçüncü günde kültür kabına tutunmaya ve migrasyon yapmaya başladılar. Takip eden günlerde artan hücre yoğunluğu on ikinci günde konflüente (%70-%80) ulaştı. 3. pasaja ulaşıldığında mikroskop ile yapılan sayıma göre, her kültür kabında yaklaşık  $1,3 \times 10^6$ - $1,5 \times 10^6$  hücre ürediği tespit edildi. Hücrelerin primer kültür süresince proliferasyonları şekil 4.1’de verilmiştir.

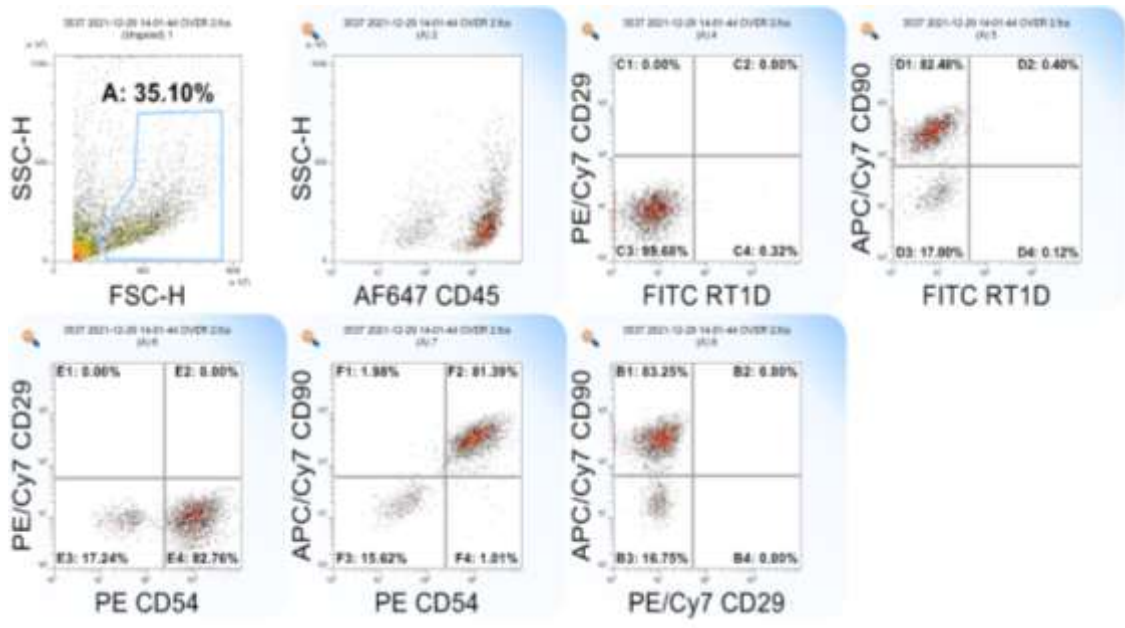


**Şekil 4.1:** Ovaryum dokusundan göç eden stromal kök hücrelerin proliferasyonu.

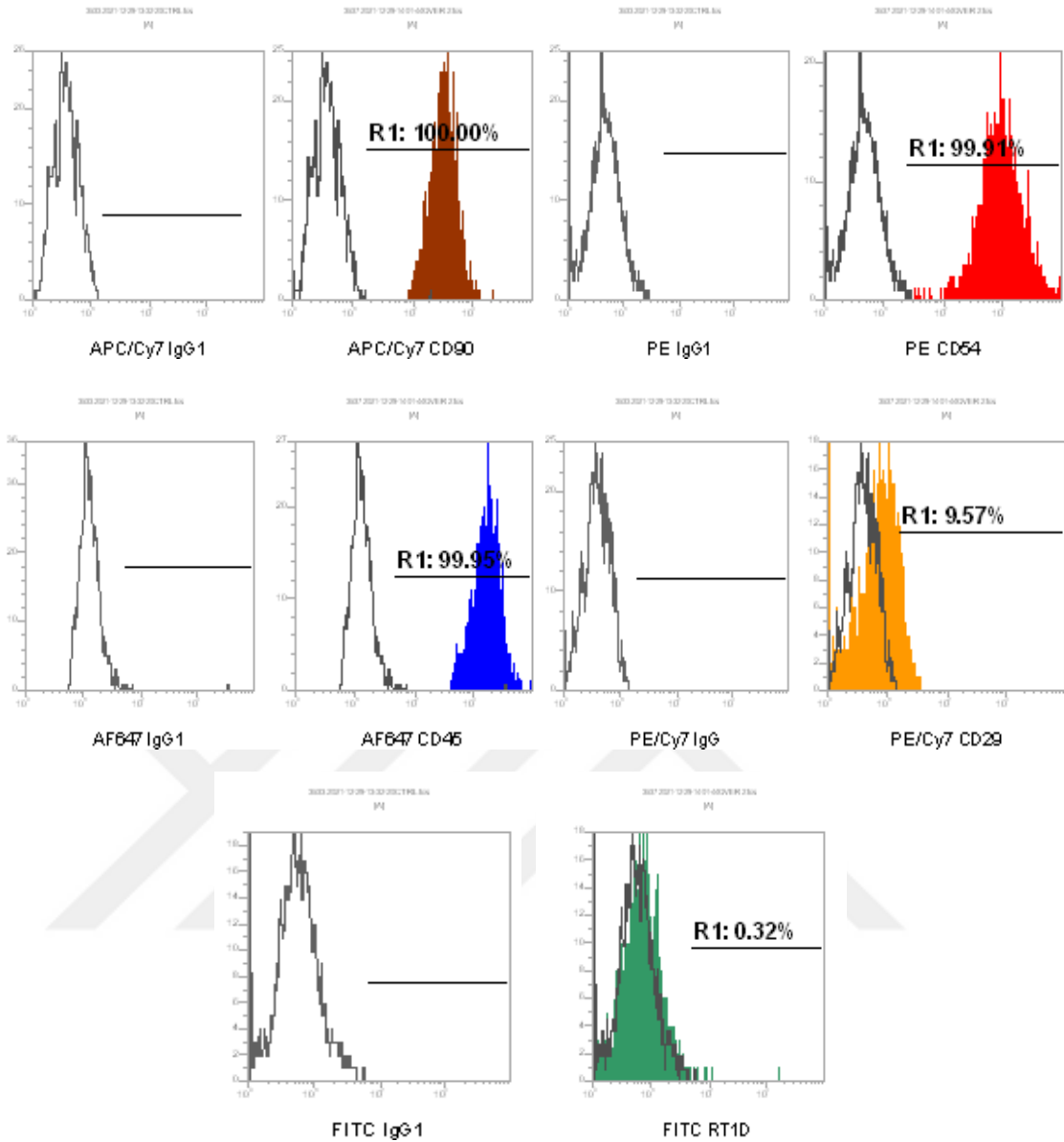


**Şekil 4.2:** Overyan stromal kök hücrelerin faz kontrast mikroskobu altındaki görüntüleri.

Flow sitometri analizi sonuçlarına göre ovaryumdan izole edilen stromal kök hücrelerin (OSKH); CD90 genini %100 oranında, CD54 genini %99.91 oranında ve CD45 genini %99.95 oranında eksprese ettiği belirlendi. Ayrıca bu hücrelerin %81.39'unun CD90 geni ile CD54 genini birlikte eksprese ettikleri tespit edildi. Bu hücrelerin CD29 genini %9.57 oranında ve MHCII molekülünü %0.32 oranında eksprese ettiği belirlendi. Hücre granülaritesi side scatter (SSC) ve hücre büyüklüğü forward scatter (FSC) ile hücrenin genel popülasyonu flow sitometri analizinde değerlendirildi (şekil 4.3, şekil 4.4). Sırasıyla CD90, CD54, CD45, CD29 ve MHCII ekspresyonları grafik üzerinde gösterilmiştir (şekil 4.4).



**Şekil 4.3:** Ovaryumdan izole edilen stromal kök hücrelerin flow sitometri analizi ile immünofenotiplendirilmesi.



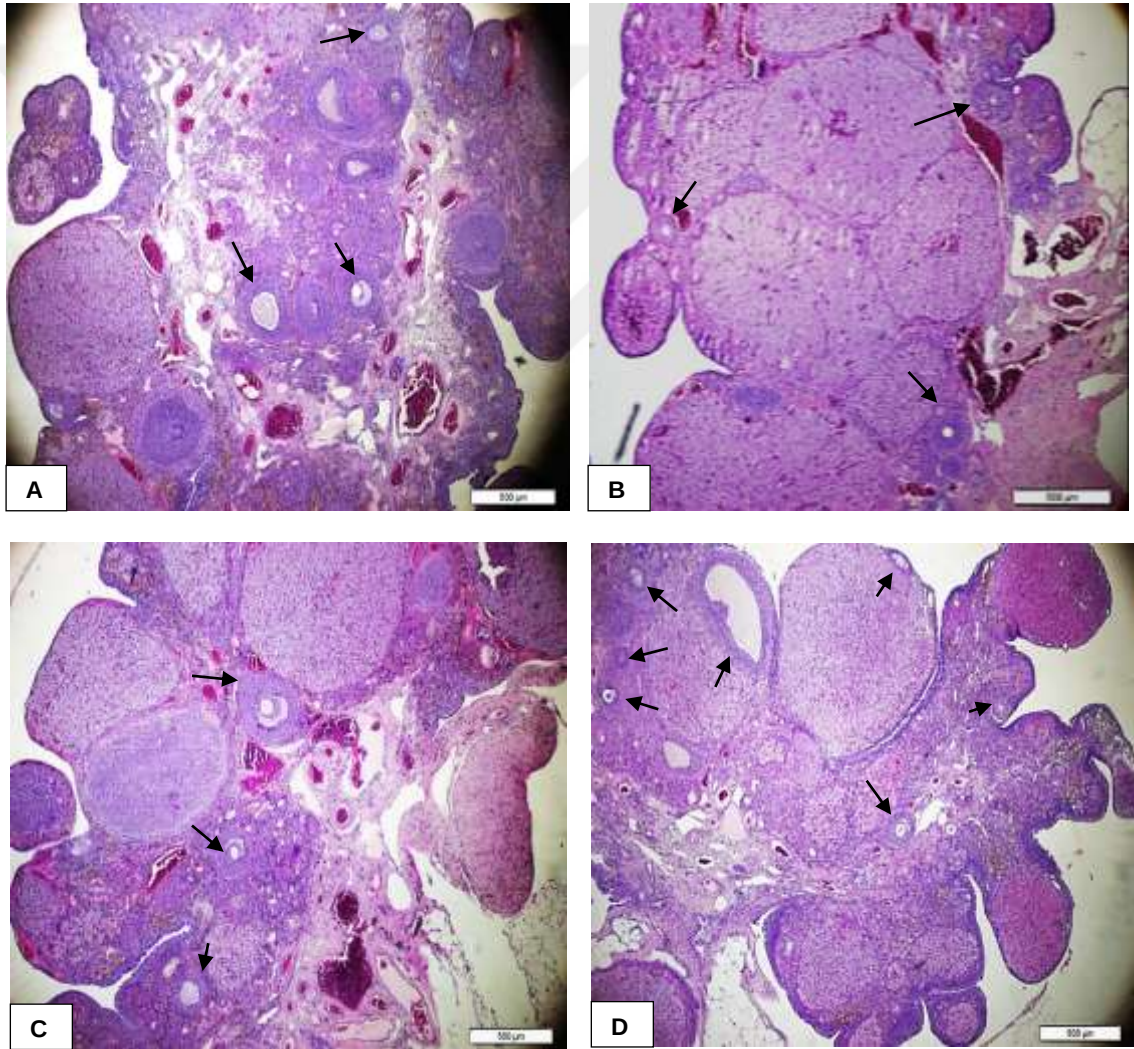
**Şekil 4.4:** Ovaryumdan izole edilen stromal kök hücelere ait flow sitometri analizi sonuçlarının grafik görüntüleri.

## 4.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları

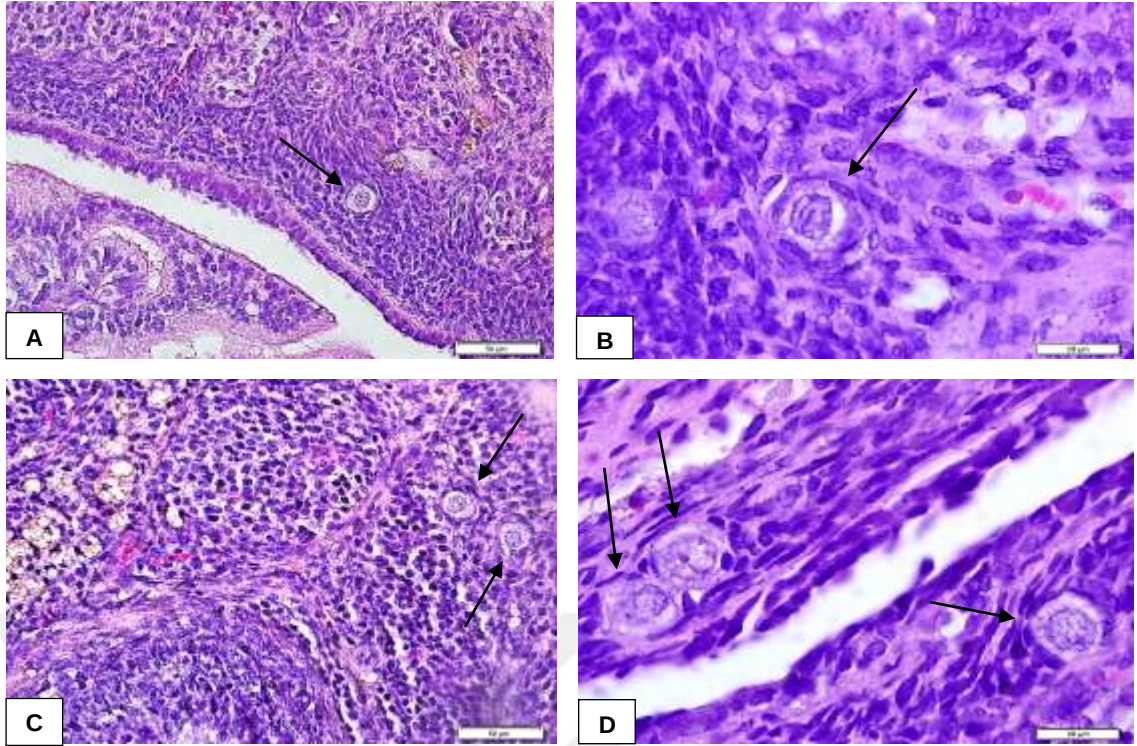
Kontrol grubunda overyan yaşlanma nedeniyle bazı foliküllerin morfolojik yapılarında bozulma ve bazı granüloza hücrelerinde piknotik çekirdekler gözlemlendi (şekil 4.10; A ve B görseli). Sekonder ve graff foliküllerde, granüloza hücrelerinin çevrelediği antrumların dalgalı bir görünüm oluşturduğu ve piknotik hücrelerin antrum içerisine dağıldığı belirlendi (şekil 4.13; C görseli, şekil 4.14; A ve B görseli). Bazı granüloza hücrelerinde ve stroma dokusunda ayrılmalara, hücre azalmaları ve yer yer

boşluklar meydana geldiği izlendi. Primer, sekonder ve graff foliküllerde oosit ve zona pellusida dejenerasyonu görüldü. (şekil 4.12; A ve B görseli, şekil 4.13 A ve B görseli).

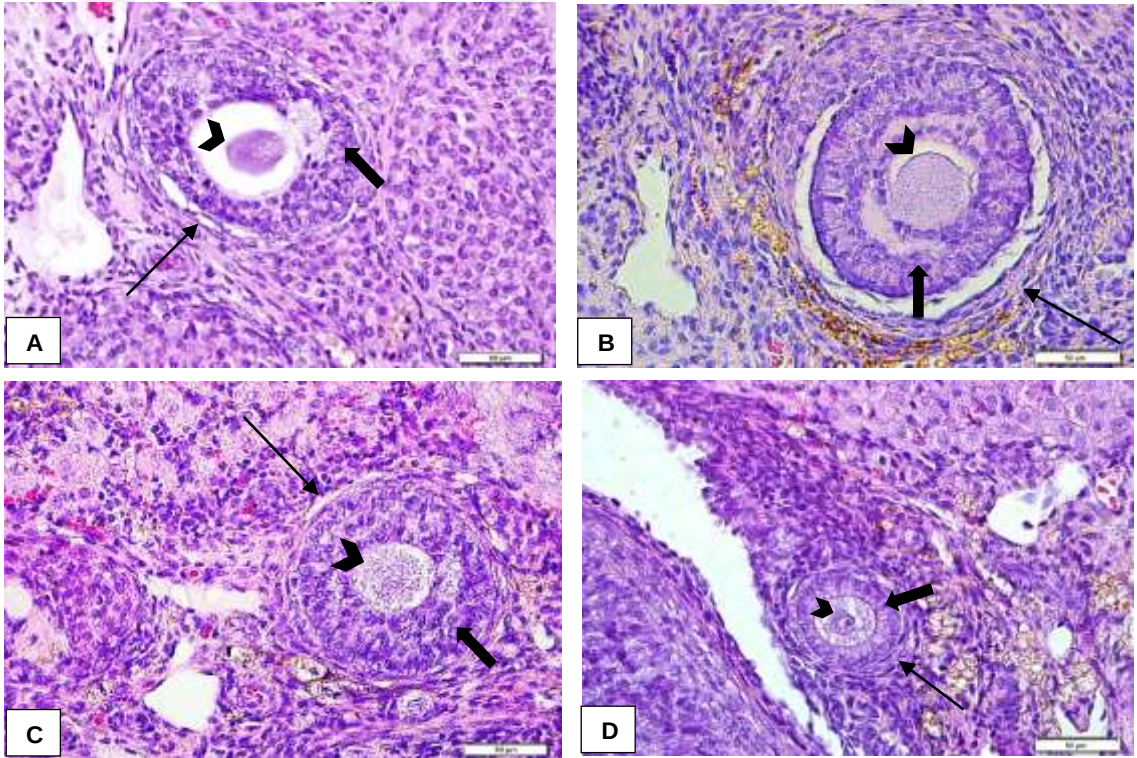
Overyan kaynaklı stromal kök hücre enjekte edilen grubun genel morfolojisinde gözle görülür bir iyileşme izlendi (şekil 4.10; C ve D görseli). Granüloza hücreleri, oosit ve zona pellusidanın normale yakın görünümüne ulaştığı ve dejenerasyonun olmadığı gözlemlendi. Atretik foliküllerin sayısında azalma olduğu ve sağlıklı folikül sayısının kontrol grubundan daha fazla olduğu belirlendi. Stroma dokusunda meydana gelen ayrılmalar büyük oranda düzelse de bazı alanlarda devam ettiği gözlemlendi (şekil 4.11; C ve D, şekil 4.12; C ve D, şekil 4.13 D, E ve F, şekil 4.14; C görselleri).



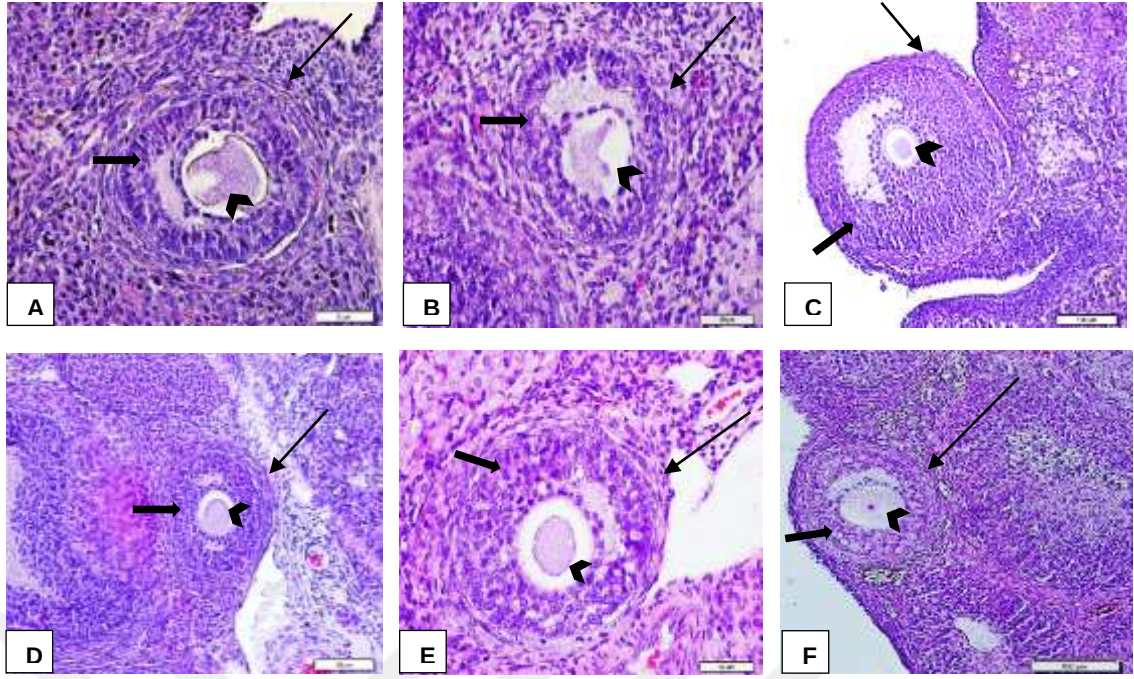
**Şekil 4.5:** Ovaryumların genel histolojik görüntüsü. A-B görseli; kontrol grubu, C-D görseli; stromal kök hücre grubu. H&E boyama. (→; foliküller) (A, B, C ve D görselleri X4 büyütme).



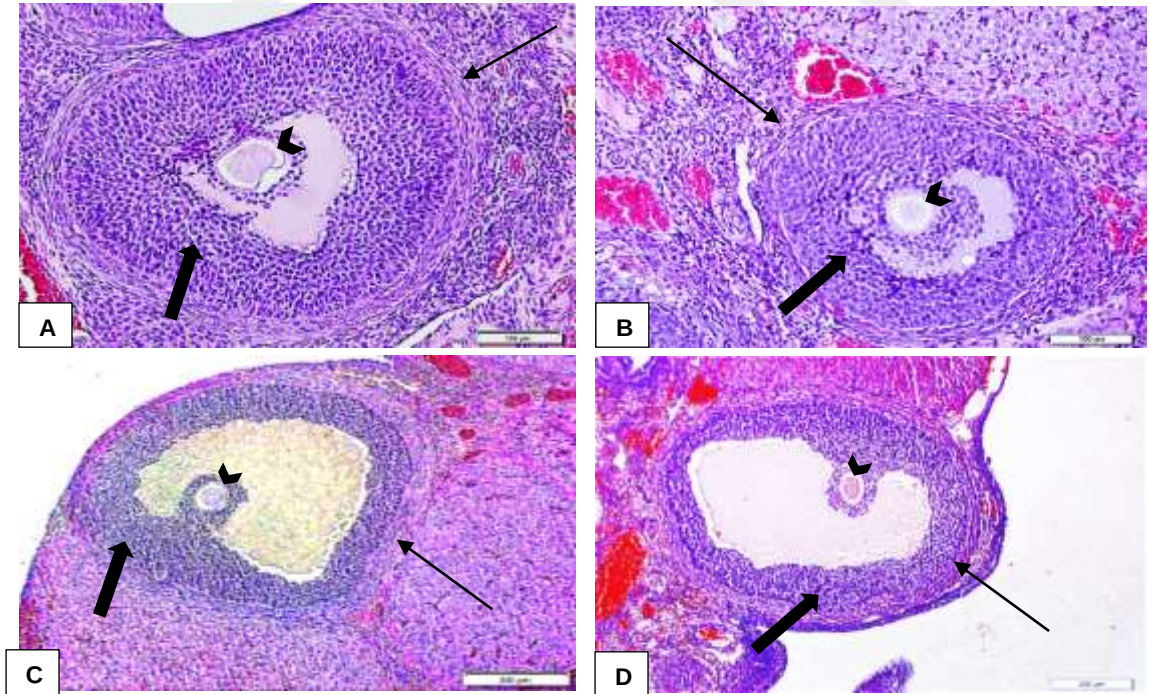
**Şekil 4.6:** Primordiyal foliküllerin histolojik görüntüsü. A-B; kontrol grubu C-D; stromal kök hücre grubu. H&E boyama. (→; primordiyal foliküller) (A ve C görselleri X40, B ve D görselleri X100 büyütme).



**Şekil 4.7:** Primer foliküllerin histolojik görüntüsü. A-B; kontrol grubu, C-D; stromal kök hücre grubu. A görselinde oosit morfolojisinin bozulduğu, B görselinde ise folikülü saran stroma dokusunda ayrılmalar gözlemlendi. H&E boyama. (→; stroma hücreleri ➤; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A, B, C ve D görselleri X40 büyütme).



**Şekil 4.8:** Sekonder foliküllerin histolojik görüntüsü. A-B-C; kontrol grubu, D-E-F; stromal kök hücre grubu. A ve B görsellerinde oosit ve zona pellusida dejenerasyonu gözlemlendi. C görselinde apoptik granüloza hücrelerinin antruma dağıldığı gözlemlendi. H&E boyama. (→; teka hücreleri ➤; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A, B ve E görselleri X40 büyütme, C, D ve F görselleri X20 büyütme).



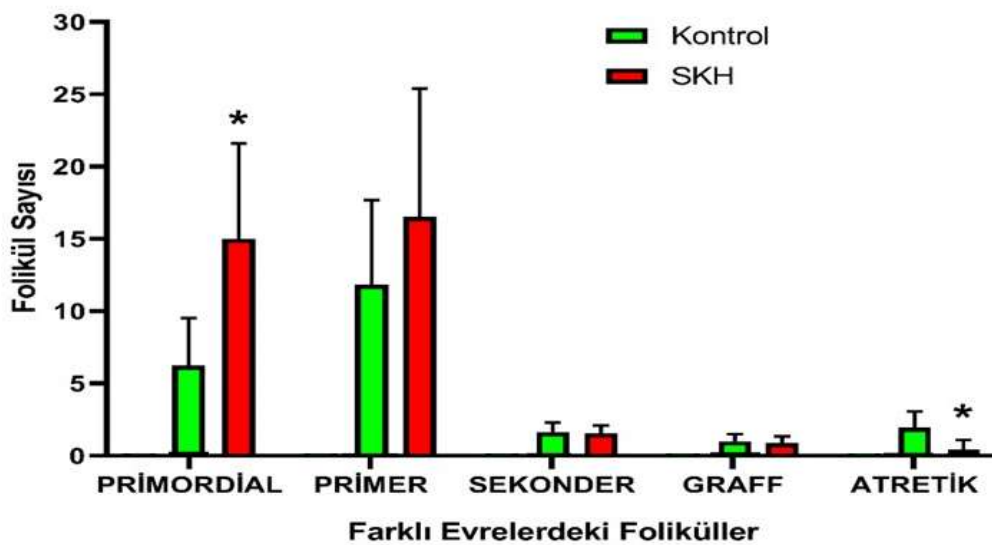
**Şekil 4.9:** Graff foliküllerin histolojik görüntüsü. A-B; kontrol grubu, C-D; stromal kök hücre grubu. A görselinde oosit ve zona pellusida dejenerasyonu, granüloza hücrelerinin yapısında bozulmalar ve antruma yayılan piknotik hücreler izlendi. B görselinde ise granüloza hücrelerinin yapısında bozulma ve antruma yayılan piknotik hücreler izlendi. H&E boyama. (→; teka hücreleri ➤; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A ve B görselleri X20, C ve D görselleri X40 büyütme).

#### 4.3. Folikül Sayımı Sonuçları

Primordiyal folikül sayısı; stromal kök hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttı ( $p<0,008$ ). Stromal kök hücre grubunda primer folikül ve preantral folikül sayısı, kontrol grubuna kıyasla artış göstermesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p<0,3008$ ). Stromal kök hücre grubundaki sekonder foliküllerin ve graff foliküllerin sayıları kontrol grubu ile aynı seviyelerde kaldı ve bu seviyeler istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p<0,227$ ,  $p<0,6326$ ). Stromal kök hücre grubunda atretik folikül sayısı kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldı ( $p<0,036$ ) (Şekil 4.15) (Tablo 4.2).

**Tablo 4. 1:** Folikül sayımının istatistiksel sonuçları.

|                     | P değeri  |
|---------------------|-----------|
| Primordiyal Folikül | $<0,008$  |
| Primer Folikül      | $<0,3008$ |
| Sekonder Folikül    | $<0,227$  |
| Graff Folikül       | $<0,6326$ |
| Atretik Folikül     | $<0,036$  |
| Total Folikül       | $<0,0623$ |



**Şekil 4.10:** Hematoksilen-Eozin boyama sonucu folikül sayımı. SKH; stromal kök hücre. Primer ve preantral foliküller primer folikül grubunda değerlendirildi.

#### 4.4. İmmunohistokimyasal Sonuçlar

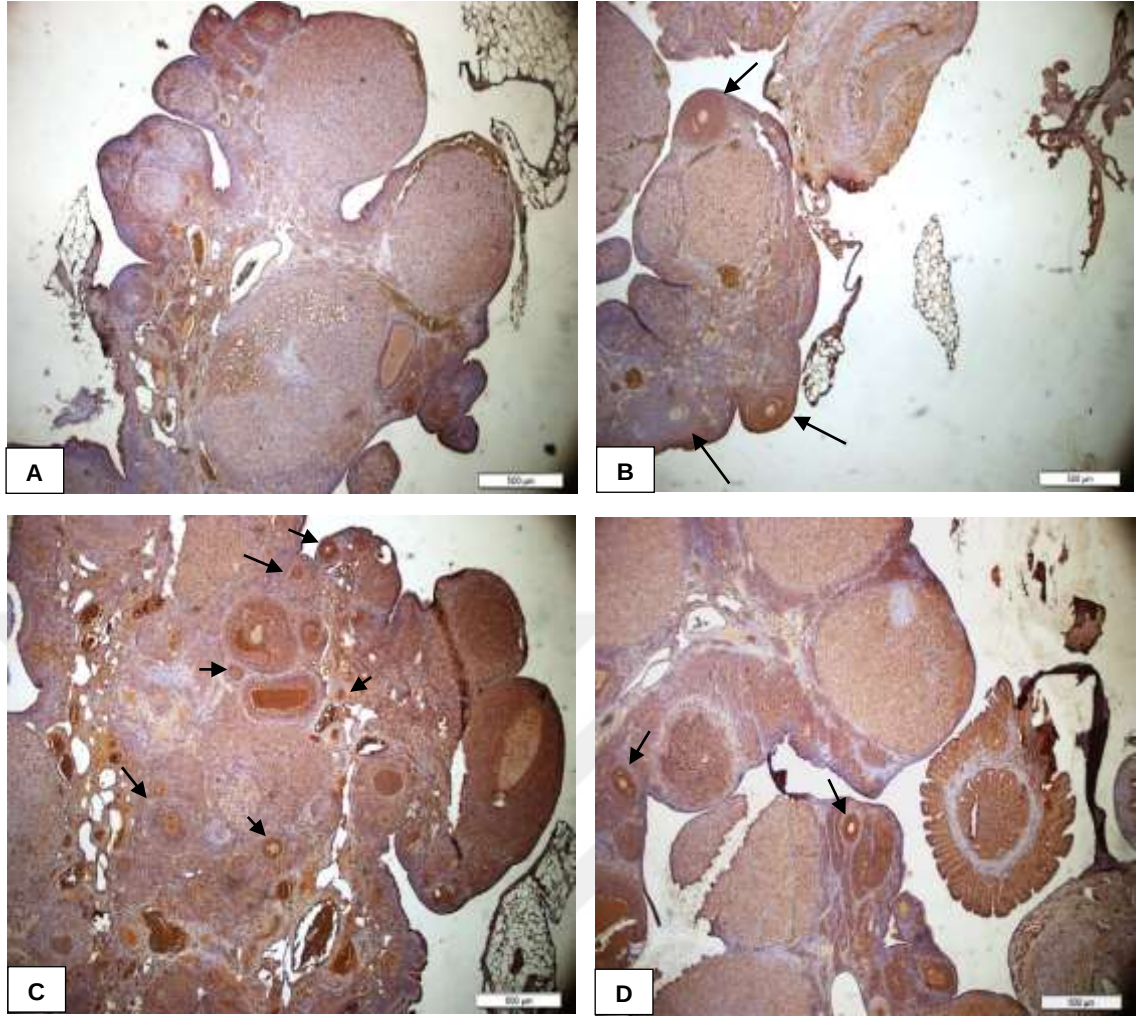
##### 4.4.1. Anti-Mullerian Hormonun Ekspresyonu

Yapılan immünohistokimyasal boyamalar sonucu stromal kök hücre grubundaki primordiyal, primer, sekonder ve graff foliküllerin granüloza hücrelerinde AMH ekspresyonunun kuvvetli olduğu izlendi. Aynı zamanda folikül sıvısı graff folikülde kuvvetli boyanırken sekonder folikülde orta seviyede boyandı. Primer folikülü saran stroma hücrelerindeki AMH ekspresyonunun sekonder ve graff folikülün teka tabakasına kıyasla daha kuvvetli olduğu gözlemlendi. AMH; primer, sekonder ve graff foliküllerin oositlerinde orta şiddetli eksprese edildi. Granüloza hücrelerinde ekspresyon kuvvetli sitoplazmik ve orta derecede nükleer iken oositlerde ise orta derece sitoplazmik ve zayıf nükleer ekspresyon görüldü. Bu durum sekonder ve graff foliküllerin teka hücrelerinde orta derecede sitoplazmik ve orta derece de nükleer olarak izlendi. Ayrıca korpus luteum ile yüzey epitelinde, yaygın ve sitoplazmik AMH aktivasyonu görülürken stroma bölgesinde orta derecede sitoplazmik AMH aktivasyonu gözlemlendi.

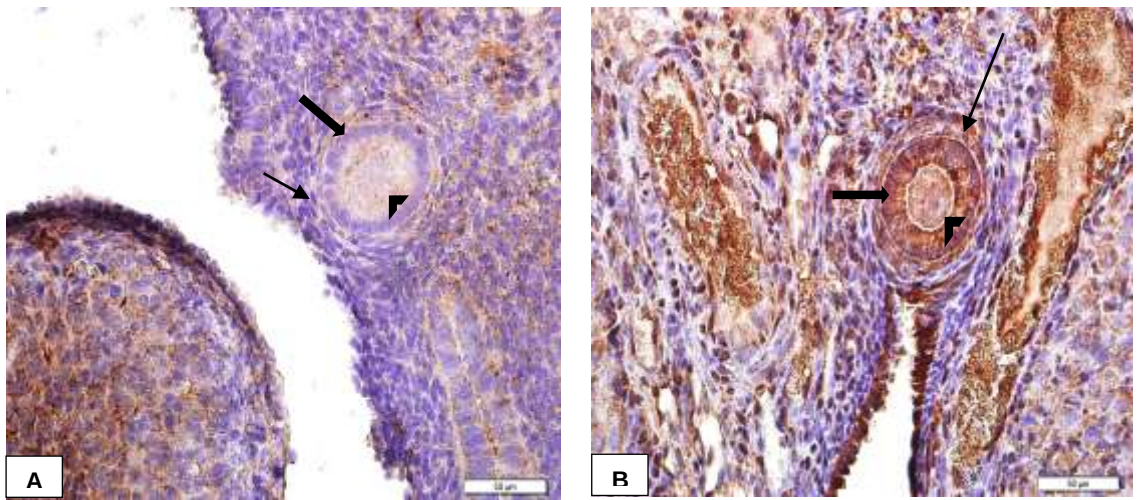
Yapılan H skor analizine göre kontrol grubu ve stromal kök hücre grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p < 0,02$ ). H skor analiz sonuçları tablo 4.3'te verilmiştir.

**Tablo 4.2:** Gruplar arasında AMH ekspresyonunun H skor analiz sonuçları.

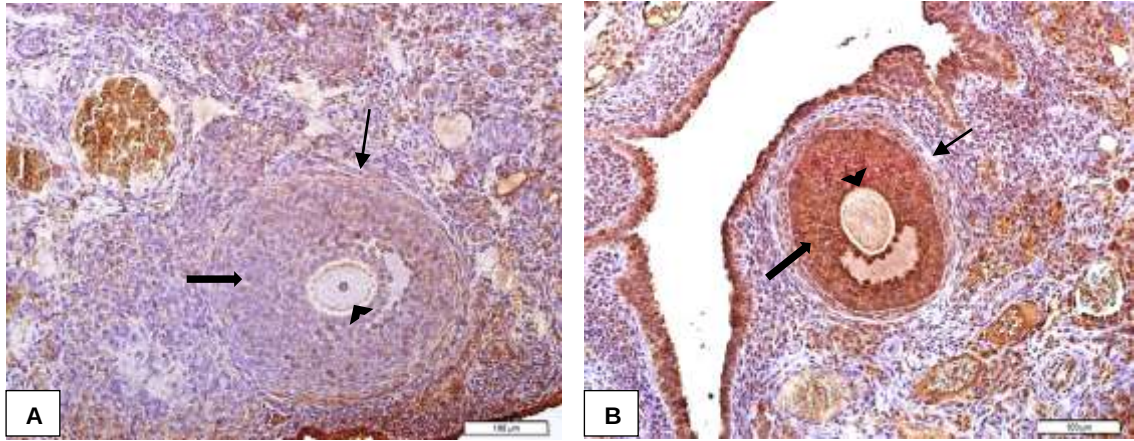
| Gruplar                       | A.O±S.S      | Medyan (Minimum- Maksimum) | P değeri |
|-------------------------------|--------------|----------------------------|----------|
| Kontrol Grubu (n=6)           | 220,31±31,34 | 209,18(192,96-279,66)      | <0,02    |
| Stromal Kök Hücre Grubu (n=6) | 299,64±5,71  | 298,58(294,31-309,87)      |          |



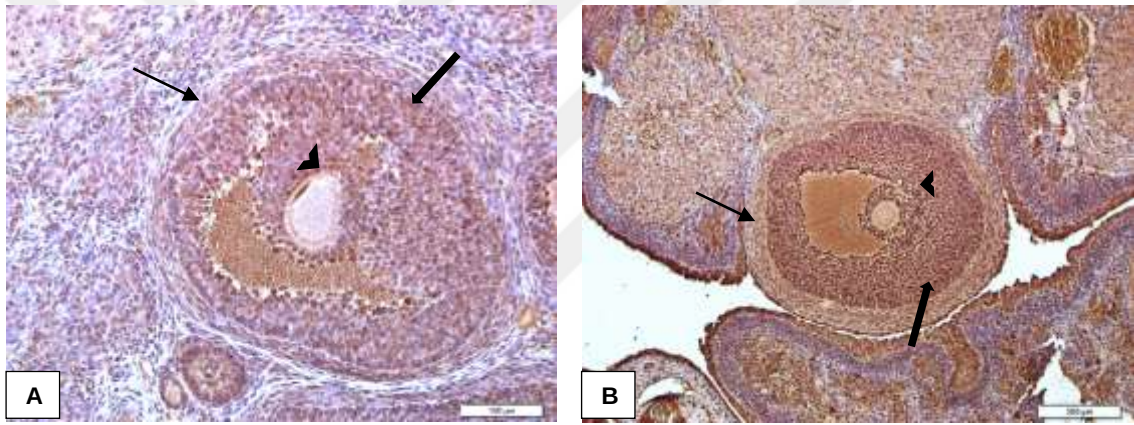
**Şekil 4.11:** Genel ovaryum kesitinde AMH ekspresyonu. A-B; kontrol grubu, C-D; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; foliküller) (A, B, C ve D görselleri X4 büyütme).



**Şekil 4.12:** Primer foliküllerde AMH ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; stroma hücreleri ➔; granuloza hücreleri ➤; oosit) (A ve B görselleri X40 büyütme).



**Şekil 4.13:** Sekonder foliküllerde AMH ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➤; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A ve B görselleri X20 büyütme).



**Şekil 4.14:** Graff foliküllerde AMH ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➤; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A görseli X20, B görseli X10 büyütme).

#### 4.4.2. Folikül Uyarıcı Hormon Reseptörünün Ekspresyonu

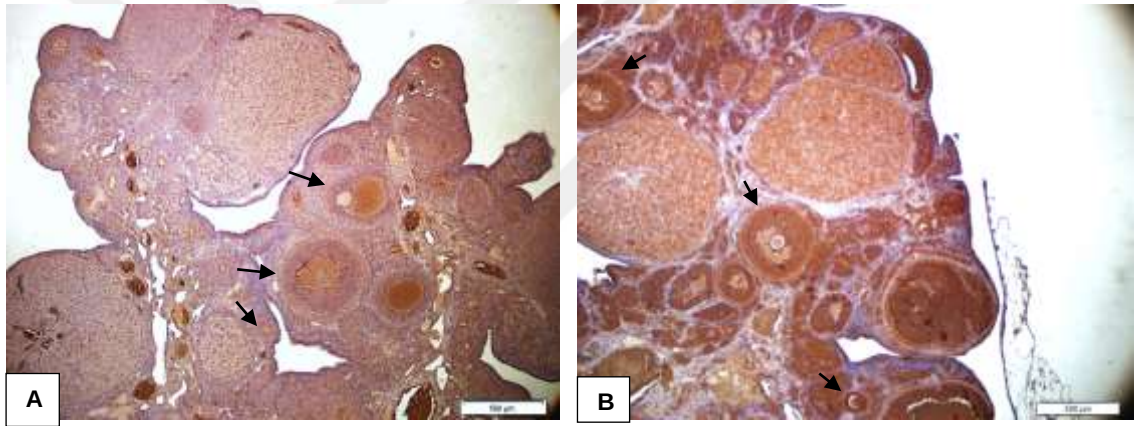
Stromal kök hücre grubundaki primer, sekonder ve graff foliküllerin granüloza hücrelerinde kuvvetli derecede, primordiyal folikül hücrelerinde ise orta derecede FSHR ekspresyonu izlendi. Folikül sıvısı ise graff ve sekonder foliküllerde kuvvetli derecede boyandı. Sekonder ve graff folikülün teka tabakasında ve primer folikülü saran stroma hücrelerinde kuvvetli derecede FSHR ekspresyonu gözlemlendi. Primer, sekonder ve graff foliküllerin oositlerinde kuvvetli derecede, primordiyal foliküllerin oositlerinde ise orta derecede ekspresyon izlendi. Granüloza hücrelerinde, teka hücrelerinde ve oositlerde kuvvetli derecede sitoplazmik ve nükleer ekspresyon izlendi. Ayrıca korpus luteum ile

yüzey epitelinde, yaygın ve sitoplazmik FSHR aktivasyonu görülürken stroma bölgesinde orta derecede sitoplazmik FSHR aktivasyonu gözlemlendi.

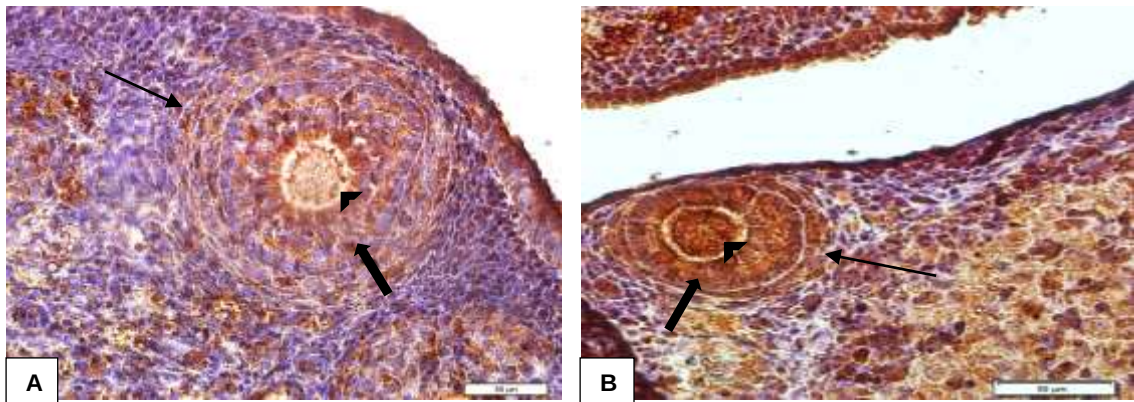
Stromal kök hücre grubunun FSHR ekspresyon seviyelerinde kontrol grubuna kıyasla artış meydana geldi. Bu artış yapılan H skor analizine göre istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $p < 0,09$ ). H skor analiz sonuçları tablo 4.4'te verilmiştir.

**Tablo 4.3:** Gruplar arasında FSHR ekspresyonunun H skor analiz sonuçları.

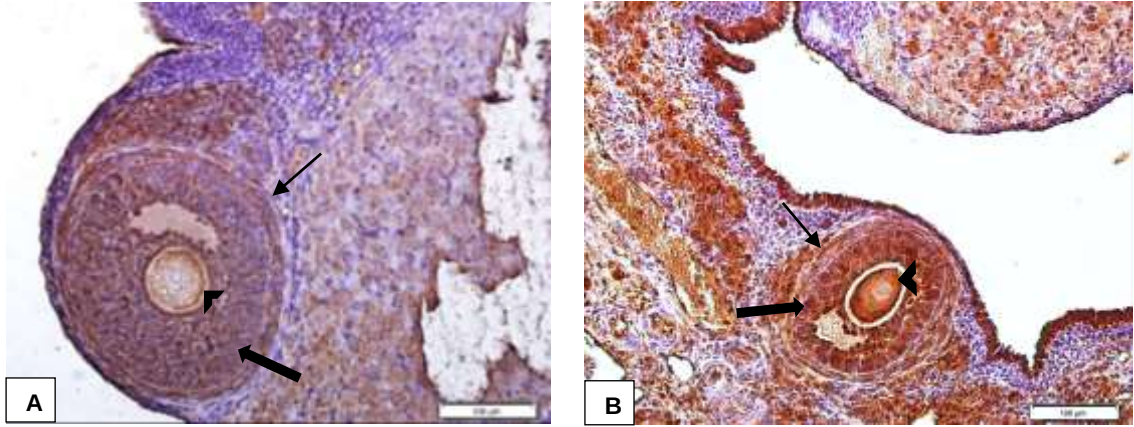
| Gruplar                       | A.O±S.S      | Medyan (Minimum- Maksimum) | P değeri |
|-------------------------------|--------------|----------------------------|----------|
| Kontrol Grubu (n=6)           | 245,88±26,54 | 240,66(220,52-278,42)      | <0,09    |
| Stromal Kök Hücre Grubu (n=6) | 313,57±34,69 | 318,47(261,09-366,26)      |          |



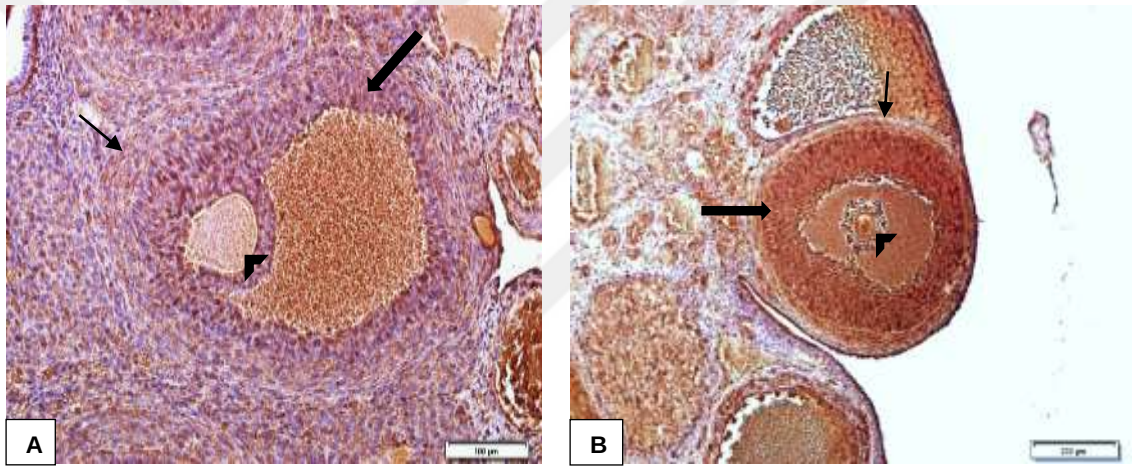
**Şekil 4.15:** Genel ovaryum kesitinde FSHR ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmüno-peroksidaz-hematoksilen boyama. (→; foliküller) (A ve B görselleri X4 büyütme).



**Şekil 4.16:** Primer foliküllerde FSHR ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmüno-peroksidaz-hematoksilen boyama. (→; stroma hücreleri ➤; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A ve B görselleri X40 büyütme).



**Şekil 4.17:** Sekonder foliküllerde FSHR ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➤; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A ve B görselleri X20 büyütme).



**Şekil 4.18:** Graff foliküllerde FSHR ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➤; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A X20 büyütme ve B görselleri X10 büyütme).

#### 4.4.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 'in Ekspresyonu

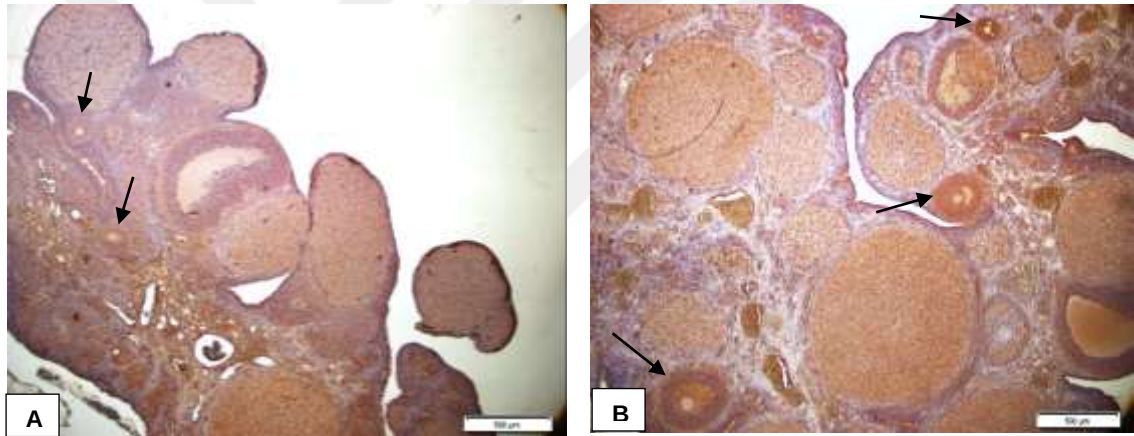
Stromal kök hücre grubundaki primordiyal, primer, sekonder foliküllerin granüloza hücrelerinde IGF-1 ekspresyonu kuvvetli iken graff folikülün granüloza hücrelerinde orta derecede ekspresyon izlendi. Folikül sıvısı sekonder ve graff folikülde orta derecede boyandı. Primer folikülü saran stroma hücrelerindeki ve graff folikülün teka tabakasındaki IGF-1 ekspresyonu orta derece gözlemlendi. Sekonder folikülün teka tabakasında ise kuvvetli ekspresyon gözlemlendi. Granüloza hücrelerinde kuvvetli sitoplazmik ve orta derecede nükleer ekspresyon gözlenirken oositlerde orta derecede sitoplazmik ve zayıf derecede nükleer ekspresyon gözlemlendi. Bu durum teka hücrelerinde orta derecede sitoplazmik ve orta derecede nükleer olarak izlendi. Ayrıca

korpus luteum ile yüzey epitelinde, yaygın ve sitoplazmik IGF-1 aktivasyonu görülürken stroma bölgesinde kuvvetli sitoplazmik IGF-1 aktivasyonu gözlemlendi.

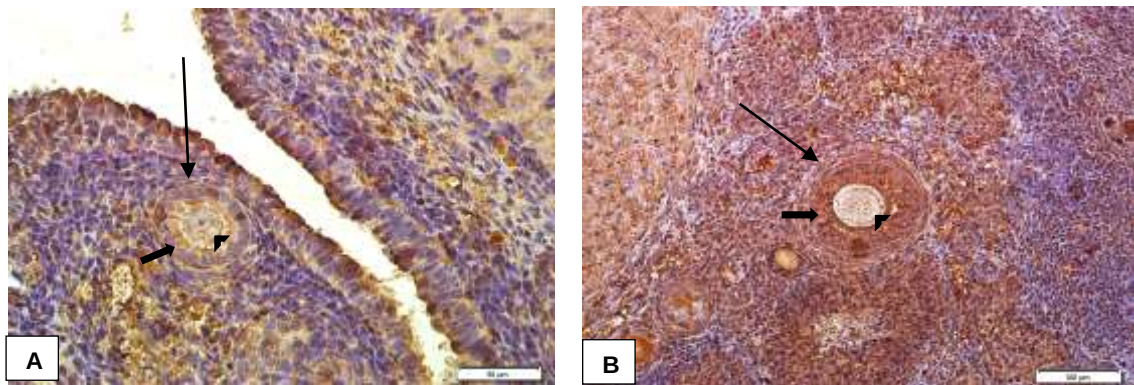
Yapılan H skor analizine göre kontrol grubu ve stromal kök hücre grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ( $p<0,02$ ). H skor analiz sonuçları tablo 4.5'te verilmiştir.

**Tablo 4.4:** Gruplar arasında IGF-1 ekspresyonunun H skor analiz sonuçları.

| Gruplar                       | A.O $\pm$ S.S      | Medyan (Minimum- Maksimum) | P değeri |
|-------------------------------|--------------------|----------------------------|----------|
| Kontrol Grubu (n=6)           | 259,41 $\pm$ 25,22 | 260,48 (228,05-286,46)     | <0,02    |
| Stromal Kök Hücre Grubu (n=6) | 314,08 $\pm$ 16,12 | 310,05 (299,52-344,06)     |          |



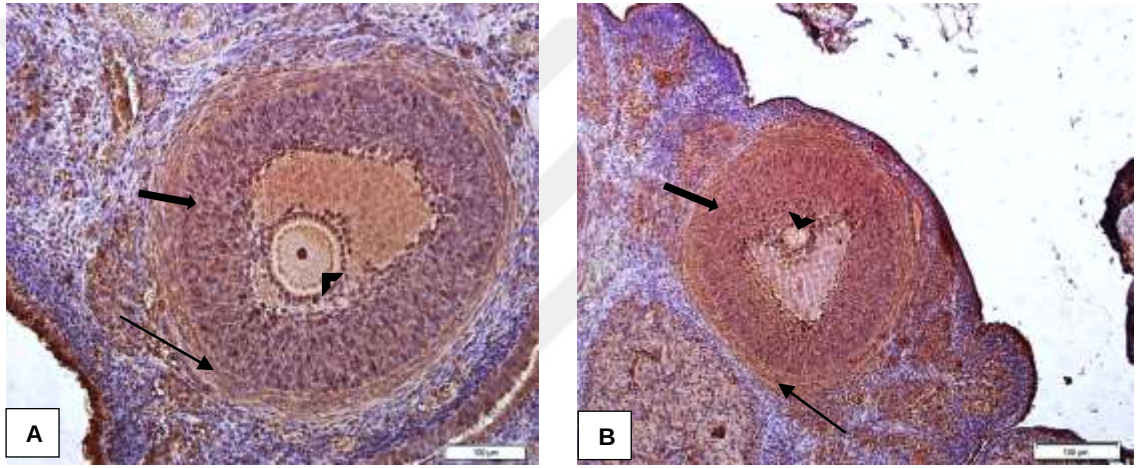
**Şekil 4.19:** Genel ovaryum kesitinde IGF-1 ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; foliküller) (A ve B görseli X4 büyütme).



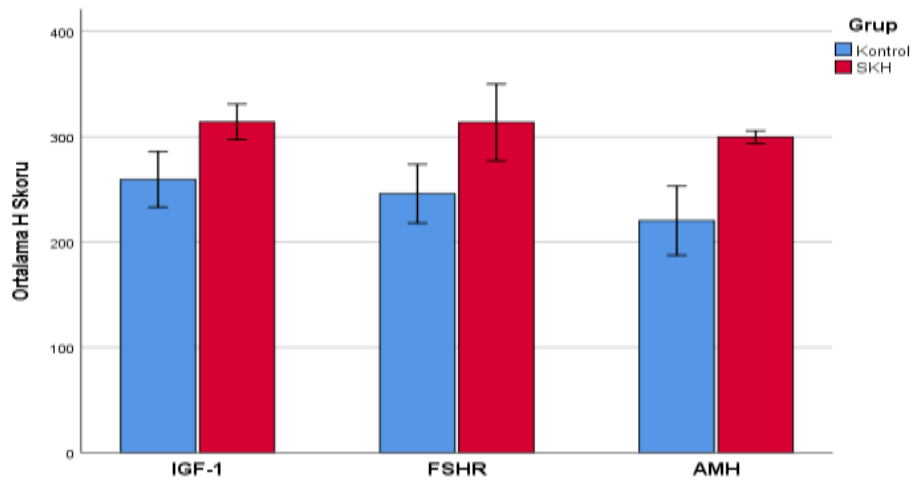
**Şekil 4.20:** Primer foliküllerde IGF-1 ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; stroma hücreleri ➡; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A görseli X40 büyütme, B görseli X20 büyütme).



**Şekil 4.21:** Sekonder foliküllerde IGF-1 ekspresyonu. A; kontrol grubu, B-C; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➤; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A görseli X40, B görseli X20, C görseli X10 büyütme).



**Şekil 4.22:** Graff foliküllerde IGF-1 ekspresyonu. A; kontrol grubu, B; stromal kök hücre grubu. İmmunoperoksidaz-hematoksilen boyama. (→; teka hücreleri ➤; granüloza hücreleri ➤; oosit) (A ve B görselleri X20 büyütme).



**Şekil 4.23:** Gruplardan alınan ovaryum dokusunda IGF-1, FSHR, AMH ekspresyonlarının H skor analiz sonuçlarına göre grafik görüntüsü.

#### 4.5. ELİSA Sonuçları

ELİSA sonuçları incelendiğinde; stromal kök hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla AMH değerlerinin arttığı bulundu. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ( $4,919 \pm 0,18$ ) ( $p < 0,05$ ).

FSH seviyelerindeki azalma stromal kök hücre grubunda istatistiksel olarak anlamlı değildi ve değerler kontrol grubuyla hemen hemen aynı seviyelerde izlendi ( $5,092 \pm 0,25$ ) ( $p < 0,05$ ).

E2 seviyeleri için stromal kök hücre grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlendi ( $5,502 \pm 0,08$ ) ( $p < 0,05$ ). Çalışmadan elde ettiğimiz veriler tablo 4.6, tablo 4.7, tablo 4.8 ve şekil 4.29' da verilmiştir.

**Tablo 4.5:** ELİSA kontrol ve stromal kök hücre grubunun AMH sonuçları.

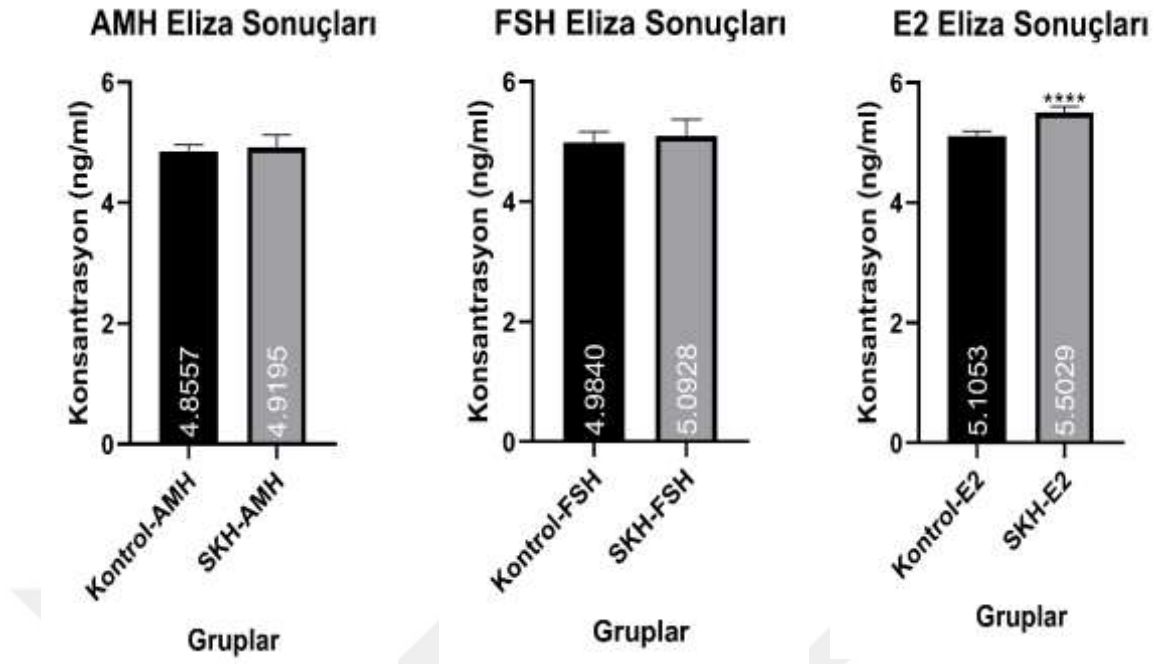
|                                | <b>A.O<math>\pm</math>S.S</b> | <b>Minimum-Maksimum</b> | <b>P değeri</b> |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------|
| <b>Kontrol Grubu</b>           | 4,85 $\pm$ 0,09               | 4,69-5,009              | <0,5129         |
| <b>Stromal Kök Hücre Grubu</b> | 4,91 $\pm$ 0,18               | 4,7-5,2                 |                 |

**Tablo 4.6:** ELİSA kontrol ve stromal kök hücre grubunun FSH sonuçları.

|                                | <b>A.O<math>\pm</math>S.S</b> | <b>Minimum-Maksimum</b> | <b>P değeri</b> |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------|
| <b>Kontrol Grubu</b>           | 4,98 $\pm$ 0,16               | 4,82-5,26               | <0,444          |
| <b>Stromal Kök Hücre Grubu</b> | 5,09 $\pm$ 0,25               | 4,59-5,31               |                 |

**Tablo 4.7:** ELİSA kontrol ve stromal kök hücre grubunun E2 sonuçları.

|                                | <b>A.O<math>\pm</math>S.S</b> | <b>Minimum-Maksimum</b> | <b>P değeri</b> |
|--------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------|
| <b>Kontrol Grubu</b>           | 5,1 $\pm$ 0,07                | 5,02-5,2                | <0,0001         |
| <b>Stromal Kök Hücre Grubu</b> | 5,5 $\pm$ 0,08                | 5,42-5,68               |                 |



Şekil 4.24: Stromal kök hücre grubunda ve kontrol grubunda AMH, FSH, E2 değerleri.

## 5. TARTIŞMA

Bir kadının hayatı boyunca ilk yaşlanma belirtisi gösteren organlardan biri de ovaryumdur. Ovaryum yaşlanması genetik ve çevresel faktörlerden etkilenmektedir. Ayrıca aşırı derece artmış ya da azalmış primordiyal folikül aktivasyonu, folikül atrezisinde artma, mitokondriyal işlev bozuklukları, bağışıklık mikroortamının bozulması ve reaktif oksijen (ROS) türlerinin birikimi gibi dengesizliklere neden olduğu bilinmektedir (Zeng vd 2022). Bununla birlikte zayıf over yanıtı, azalmış over rezervi ve erken ovaryum yetmezliğine de yol açmaktadır. Ovaryum, steroid hormonlarını ve diğer ovaryum işlevlerini kontrol ettiği için yaşlanma sürecine girmesiyle menopoza, infertilite ve osteoporoz gibi sistemlerin de hızlanmasına neden olur. Bütün bu nedenlerden ötürü ovaryum yaşlanmasının erken teşhisi ve tedavisi oldukça önemlidir (Zhang J. vd 2019).

Son yirmi yılda, kadınların fertilitelerini ve sağlığını artırmak, ovaryum yaşlanmasını yavaşlatmak, tersine çevirmek ya da iyileştirmek için bazı terapötik tedavi stratejileri ortaya çıkmıştır. Kadınları menopoza kurtarmaya yardımcı olan hormon replasman tedavisi, ovaryum yaşlanması için evrensel bir tedavi yöntemi olarak görülse de olumsuz yan etkileri nedeniyle uzun yıllar boyu tartışma konusu olmuştur (Lobo 2017). Bununla birlikte, rejeneratif tıp ve yaşlanma alanında biyomalzemeler ile çalışmalar yapan çok sayıda bilim insanları, biyomalzemelerin ovaryum yaşlanması içinde uygulanabileceği düşünmeye başlamışlardır. Yine de bu düşünce şu an için sadece fikir aşamasındadır (Liu F. vd 2019, Brokesh ve Gaharwar 2009). Ayrıca mitokondriyal terapi, antioksidanlar, epigenetik düzenleyiciler, telomeraz aktivatörleri ve geleneksel Çin tıbbı gibi farklı tedavi yöntemleri de kullanılmaktadır fakat çoğu tedavilerin klinik denemeleri henüz yapılmamıştır (Wu vd 2022). Tüm bunların yanı sıra son zamanlarda, ovaryum fonksiyonunun iyileştirilmesinde, over rezervinin korunmasında ve ovaryum yaşlanmasında kök hücrelerin terapötik potansiyelini

araştıran çalışmalar yadsınamaz derecede artmıştır (Volarevic vd 2014). Embriyonik kök hücreler, mezenkimal kök hücreler, ekstraembriyonik kök hücreler, indüklenmiş pluripotent kök hücreler ve ovaryum kök hücreleri gibi çok sayıda kök hücre grubunun ovaryum hasarı üzerinde terapötik bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (Filip vd 2008, Zhang Q. vd 2019).

MKH'ler kendini yenileme ve multipotent farklılaşma yeteneklerine sahip olan stromal kök hücrelerdir. Bu hücrelerin çok potansiyelli özellikleri onları klinik uygulamalar için çekici bir seçim haline getirmektedir (Ding vd 2011). Ayrıca bu hücreler, ISCT tarafından bazı kriterlere göre de tanımlanmaktadır. Fakat bu tanımlamaya göre farklı multipotansiyel özelliklere sahip kök hücreler, kararlı progenitörler ve farklılaşmış heterojen hücreler, klonal olmayan stromal hücre kültürleri gibi çok çeşitli alt türlerde ortaya çıkmaktadır. MKH'lerin doğası ve işlevselliği karmaşıklığını korumaya devam etse de çeşitli dokulardan izole edilen stromal kök hücrelerin tedavilerde etkili olabileceğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu nedenle stromal kök hücreler terapötik amaçlar için MKH kaynağı olarak hizmet etmektedir (Squillaro vd 2016). İnsan amniyotik kaynaklı mezenkimal kök hücreler (iAMKH) tarafından salgılanan HGF (hepatosit büyüme faktörü) ve EGF (epidermal büyüme faktörü) granüloza hücrelerinin proliferasyonunu artırmaktadır (Ding vd 2018). Yapılan bir çalışmada, insan amniyotik sıvısı kaynaklı mezenkimal kök hücreler prematür overyan yetmezlik oluşturulan farelerde kullanılmıştır. Bu hücreler, parakrin etkisiyle mikro ortam koşullarını iyileştirerek foliküllerin gelişimini, granüloza hücrelerinin proliferasyonunu ve büyüme faktörlerinin sekresyonunu sağlamışlardır. (Igboeli vd 2020). Bununla birlikte, kemik iliğinden izole edilen mezenkimal kök hücreler yaşlanmanın moleküler mekanizmasını yavaşlatmış ve ovaryum yaşlanmasını moleküler düzeyde tersine çevirmiştir (Tian vd 2021).

Araştırmacılar, ovaryum dokusunun patolojik değişimlerini ve folikül sayılarını hematoksil-eozin ile boyanmış preparatlarda incelenmiştir. Lai vd (2015) insan endometriyal mezenkimal kök hücrelerin, kemoterapi ile overlerinde hasar oluşturulan farelerin ovaryum dokusunu restore ettiğini bildirmiştir. Salvatore vd (2021) insan adipoz dokusundan izole edilen stromal kök hücrelerin oosit kalitesini, ovaryum işlevselliğini ve üreme kapasitesini artırdığı göstermiştir. Zhang vd (2021) menstrüel kandan izole edilen stromal kök hücrelerin ovaryumun ekstraselüler matrisini düzenlediğini, folikül gelişimini desteklediğini, granüloza hücrelerinin proliferasyonunu artırdığını ve ovaryum morfolojisini iyileştirdiğini bildirmiştir. Biz de çalışmamızda ovaryuma transplante ettiğimiz OSKH'lerin oosit, granüloza ve teka hücrelerinin onarımına katkı sağladığını, bu sayede ovaryum morfolojisini ve fonksiyonlarını

iyileştirdiğini tespit ettik. Bu durum yapılan diğer çalışmalar ile uyumluluk göstermektedir.

Kim vd (2020) insan plasentasından üretilen mezenkimal kök hücrelerin, serumda over rezervini etkileyen miRNA'ların (miR-21-5p, miR-132-3p ve miR-212-3p) seviyesini artırdığını ve folikülogeneze etkisi olan miRNA'ları (miR-16-5p, miR-34a-5p, miR-145-5p ve miR-191-5p) baskıladığını tespit etmişlerdir. Ayrıca miR-145-5p'nin down regülasyonu ise primordiyal folikül gelişimini, primer ve antral folikül sayısını artırdığını bulmuşlardır. Khanmohammadi vd (2018) kemik iliği kaynaklı stromal kök hücrelerin ovaryum granüloza hücrelerinde apoptozu azalttığı ve folikül sayılarını artırdığı bildirilmiştir. Buna rağmen Zafardoust vd (2020), otolog menstrüel kandan izole ettikleri stromal kök hücreleri zayıf overyan yanıt veren hastalara uyguladıklarında, antral folikül ve oosit sayılarının kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar göstermediğini bildirmiştir. Bulgularımızda primordial, primer folikül sayıları artarken atretik folikül sayılarımız azalmıştır. Kim vd'nin primordial ve primer folikül sayıları bizim çalışmamız ile tutarlılık göstermiştir. Antral folikül sayılarımız ise Zafardoust vd'nin çalışmalarındaki bulgular ile benzerlik göstermektedir.

Ovaryumdan izole edilen kök hücreler klinik uygulamalar için kullanılmaktadır. Ayrıca kemoterapi ya da ovaryum yaşlanması nedeniyle azalan over rezervini iyileştirmek için de umut vaat etmektedir (Evron ve Blumenfeld 2013). Buna rağmen in vitro ovaryum kök hücrelerinin varlığı ve etkinliği tartışma konusu olmuştur. Yine de yapılan araştırmalar sonucu bu hücrelerin, folikül havuzunu restore ettiği, ovaryum yaşlanmasını geciktirdiği ve premenopozal semptomları hafiflettiği bilinmektedir. Aynı zamanda ovaryumdan izole edilen kök hücrelerin, oogonial hücre soyuna özgü moleküler belirteçleri ifade eden oosit benzeri hücrelere farklılaştığı tespit edilmiştir (Silvestris vd 2019). Biz de yaptığımız bu çalışmada, ovaryumdan izole ettiğimiz stromal kök hücreleri ovaryum yaşlanması olan sıçanların tedavisinde kullanarak bu tartışmaya katılmış bulunmaktayız.

Yaptığımız bu çalışmada, ovaryum dokusundan izole ettiğimiz stromal kök hücrelerin, MKH yüzey belirteçlerinden olan C90 ile CD54'ü ve HKH yüzey belirteci olarak bilinen CD45'i eksprese ettiği fakat MKH yüzey belirteci olarak kabul edilen CD29 eksprese etmediği tespit edildi. Yine de yapılan araştırmalara göre, MKH'lerin eksprese ettiği CD yüzey molekülleri geniş bir varyasyon göstermektedir. Bu yüzden, MKH fenotipinin moleküler karakterizasyonu belirsiz bir hale gelmektedir. Ayrıca bu CD moleküllerinin sadece MKH'lere özgü olup olmadığı tespit edilememiştir. Bununla birlikte, aynı veya farklı dokulardan izole edilen bazı MKH alt popülasyonları, üniform

olmayan hücre farklılaşma potansiyeli göstermişlerdir (Roson-Burgo vd 2014). MKH yüzey belirteci olarak bilinen CD90, çok sayıda hücre tipinde ekprese edilmesine rağmen işlevi hücre tipine göre değişiklik göstermektedir. Fare modellerinde CD90 ekspresyonunun aktivasyonu iltihaplanma ve yara iyileşmesine katkı sağlamıştır. Bununla birlikte CD90 ekspresyonunun, MKH'nin kendini yenilemesini ve farklılaşmasını desteklediğini gösteren çok sayıda çalışma bulunmaktadır (Moraes vd 2016). Hücreler arası adezyon molekülü olan CD54 ekspresyonunun aktivasyonu MKH'lerin immünosupresyon kabiliyetlerini artırmaktadır (Chen vd 2021). Hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerine aracılık eden CD29 çok sayıda alt birimle etkileşim halindedir. Bu nedenle CD29 bileşimleri hücre tiplerine özgüdür (Fässler ve Meyer 1995). Ayrıca insan mezenkimal kök hücrelerinin karakterizasyonu için pozitif yüzey belirteci olarak kullanılmaktadır ve adiposit progenitörleri tarafından ekprese edilmektedir. Bununla birlikte tavşan MKH'lerinin CD29 ekprese etmediği görülmüştür (Davies vd 2015, Lee vd 2013) Ayrıca CD45 yüzey belirtecini, eritrositler ve trombositler hariç hematopoetik hücrelerin ve progenitörlerinin yüzeylerinde ekprese edildiği bilinmektedir. Bunun yanı sıra, CD45 ekspresyonu sadece hematopoetik kök hücrelere özgü değildir. CD45 ekprese ederken hematopoetik kök hücre özelliği göstermeyen ve kültür kabına yapışma özelliği gösterebilen hücre popülasyonları da bulunmaktadır (Rogers vd 2007).

Ovaryumun yaşlanma sürecine girip girmediğini anlayabilmek için bazı belirteçler bulunmaktadır. Bu çalışmamızda da incelemiş olduğumuz serum AMH, FSH, E2 hormonlarının seviyeleri ve FSHR, IGF-1, AMH gibi genlerin ovaryum dokusundaki ekspresyon seviyeleri bu süreci anlamamıza yardımcı olan belirteçler arasındadır. (Maheshwari vd 2006, Elvin ve Matzuk 1998). AMH'nin ovaryum aktivitesindeki etkisi oldukça karmaşık olsa da gelişmekte olan foliküllerin sayısını ve ovulasyon için folikül seçimlerini düzenlediği kabul edilmektedir. AMH geninin ekspresyonunun durması ya da azalması primordiyal folikül havuzunun tükenmesine yol açar. Serum AMH ise mevcut oosit sayısının yaşa göre durumunu değerlendirerek üreme ömrünün tahmin edilmesine yardımcı olur (Peluso vd 2014). AMH ekspresyonundan yoksun fareler ile yapılan bir çalışmada, normalin üzerinde primordiyal folikül büyüyerek primer foliküle dönüşmüştür. Bunun sonucunda ise over rezervinde ciddi bir azalma meydana gelmiştir (Durlinger vd 1999). Ayrıca AMH'den yoksun foliküllerin in vivo ve in vitro kültürleri sonucu foliküllerin FSH'ye duyarlılığı artmış ve preantral foliküllerin büyümesi engellenmiştir (Durlinger vd 2001). FSH ve E2 sıçan ovaryumunda AMH ve reseptörünü (AMHR) aşağı regüle etmektedir (Baarends vd 1995). İnsan granüloza hücreleri ile AMH'nin kültürlendiği bir çalışmada FSHR geninin ifadesinde azalma

meydana gelmiştir (Pellatt vd 2011). Ayrıca insanların AMH ve tip II reseptör genlerindeki bazı polimorfizmler, ligand-reseptör etkileşiminde azalmaya yol açmıştır ve bu polimorfizmlere sahip kadınların serum E2 seviyeleri oldukça artmıştır (Kevenaar vd 2007).

Üreme sisteminde temel rollere sahip olan FSH ovaryumda preantral foliküllerin hayatta kalması ve büyümesi için gereklidir. FSH ovaryumda granüloza hücrelerine FSHR aracılığıyla bağlanarak işlev görür. Bu nedenle FSHR'nin varlığı FSH sinyali ve aktivitesi için oldukça önemlidir. Ovaryum yaşlanma süreci, yükselmekte olan serum FSH seviyeleri, düşük serum E2 seviyeleri ve ovaryum dokusundaki düşük FSHR ekspresyonu ile ilişkilendirilmiştir (Mehalko vd 2022, Randolph vd 2004). Yapılan bir çalışmada, ovaryum hipo-stimülasyonu sonucu meydana gelen yetersiz FSHR seviyeleri farelerde oosit kaybına neden olmuştur (Danilovich ve Sairam 2002). Bununla birlikte FSHR eksikliği folikül gelişimini engellerken yüksek FSHR seviyelerinin ovaryum yaşlanmasını yavaşlattığı gösterilmiştir (Casarini ve Crépieux 2019). Ayrıca FSHR mutasyonlarının prematür overyan yetmezliğine neden olduğu bildirilmiştir (Liu H. vd 2019). Ayrıca insan, koyun, marmoset, tavşan ve fare ovaryum kök hücrelerinin incelendiği bir çalışmada, koyun ile insana ait ovaryum kök hücrelerinin FSHR ifade ettiği ve bu hücrelerin FSH tarafından aktive edildiği bildirilmiştir (Patel vd 2013, Parte vd 2013) Prematür ovaryum yetmezliği hastalık modelinde serum E2 seviyelerinin artması ve FSH seviyelerini azalması ovaryum fonksiyonlarını iyileştirmiştir (Zhu vd 2015). Ayrıca artan serum E2 seviyelerinin vücutta östrojen biyosentezini artırarak ovaryum fonksiyonlarını iyileştirdiği bildirilmiştir (Rahayu vd 2019).

Yaşam süresini ve uzun ömürlülüğü düzenleyen IGF-1, ovaryumda granüloza hücrelerinin E2 üretimini indükler ve oosit kalitesini artırır. Ayrıca baskın folikül seçimi, büyümesi ve olgunlaşması sistemlerine katılır (Kwintkiewicz vd 2010, Melnik vd 2011). IGF-1'den yoksun farelerin granüloza hücrelerinde, FSHR ekspresyon seviyelerinin azaldığı, ovaryum steroidogenezinin bozulduğu bunun sonucunda ise infertilite gözlemlendiği bildirilmiştir (Baker vd 1996, Nakae vd 2001). İn vitro çalışmalar, ovaryum doku kültürü ortamına eklenen IGF-1'in primordiyal folikül aktivasyonunu desteklediğini ve DNA fragmentasyonunu azalttığını göstermiştir (Louhio vd 2000, Bezerra vd 2018). Bununla birlikte, domuzlar üzerinde yapılan bir çalışmada foliküler atreziyi azaltmıştır ve sıçanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada ise folikül çapını, granüloza hücrelerinin proliferasyonunu ve steroidogenezi artırmıştır (Guthrie vd 1998, Demeestere vd 2005).

Ding vd (2018) İnsan amniyotik kaynaklı mezenkimal kök hücreleri (iAMKH) doğal overyan yaşlanma tedavisinde kullanıldığında, E2, AMH, FSH hormon seviyelerinin normal düzeylerine ulaştığını ve ovaryum dokusunun işlevlerinin düzeldiğini bildirmiştir. Li vd (2017), Menopoza geçiş sürecindeki (premenopozal) sıçanlara insan göbek kordonu kaynaklı mezenkimal kök hücreleri transplante ettiklerinde, HGF, VEGF ve IGF-1 sitokinleri aracılığıyla AMH ve E2 seviyelerini artırırken FSH seviyelerini azaltmışlardır. Bunun sonucunda folikül sayısı artmış, ovaryumun morfolojisi ve overyan fonksiyonlar düzelmiştir. Yan vd (2019), Menstrüel kandan izole edilen endometriyal mezenkimal kök hücreler, Epirubicin ile hasar oluşturulmuş insan granüloza hücrelerinde E2, progesteron, AMH, IGF-1, inhibin A ve inhibin B salgılanmasını artırmıştır. Aynı zamanda bu hücreler, Gadd45b proteinin ekspresyonunu inhibe ederek granüloza hücrelerinin çoğalmasını uyarmış ve apoptozunu baskılamıştır. Bizim bulgularımızda, ovaryum kaynaklı stromal kök hücreleri transplante ettiğimiz grupta AMH, IGF-1 ve FSHR genlerinin ekspresyon seviyeleri artmıştır. Bu artış FSHR geninde istatistiksel olarak anlamlı seviyelere ulaşamamıştır. Ayrıca serum E2 ve AMH seviyeleri artarken serum FSH seviyeleri kontrol grubu ile hemen hemen aynı seviyelerde kalmıştır. Serum AMH seviyelerinde meydana gelen artış istatistiksel olarak anlamlı seviyelere ulaşamamıştır. Yapılan çalışmalardaki bulgular AMH, IGF-1, FSHR ve serum E2 seviyeleri bizim bulgularımız ile benzerlik göstermiştir. Verilen OSKH'lerin 15., 30. ve 45. günlerde serum FSH ve serum AMH hormon seviyelerine etkileri incelenerek tekrar değerlendirilebilir.

## 6. SONUÇ

Çalışmamızda ovaryum dokularındaki AMH ve IGF-1 ekspresyon seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenirken FSHR ekspresyon seviyelerinde meydana gelen artış anlamlı seviyelere ulaşamamıştır. Bununla birlikte granüloza hücrelerindeki piknotik hücreler ve stroma hücrelerindeki ayrılmalar oldukça azalmıştır. Antral folikül sayısında anlamlı bir artış gözlenemese de primordiyal folikül sayıları artmış ve atretik folikül sayısı azalmıştır. Serum E2 seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir artış izlenirken AMH seviyelerinde meydana gelen artış anlamlı seviyelere ulaşamamıştır. Serum FSH seviyelerinde ise artış gözlemlenmiştir. Bütün bunlara bağlı olarak ovaryum kaynaklı stromal kök hücreler foliküllerin gelişimi üzerine olumlu etkiler yapmış ve doku üzerinde iyileştirici etkiler göstermiştir.

## 7. KAYNAKLAR

Amanak K, Karaöz B, Sevil Ü. Modern Yaşamın İnfertilite Üzerine Etkisi. **TAF Prev Med Bull** 2014; 13(4): 345-350.

Amanvermez R ve Tosun M. An Update on Ovarian Aging and Ovarian Reserve Tests. **Int J Fertil Steril** 2016; 9(4): 411–415.

Avcu F. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmunregulatuvar Fonksiyonları. Mezenkimal Kök Hücre (MKH) Kursu. **Türk Hemotoloji Derneği** 2008. 14-16

Baarends WM, Uilenbroek JT, Kramer P, Hoogerbrugge JW, Van Leeuwen EC, Themmen AP, Grootegoed JA. Anti-Mullerian Hormone and Anti-Mullerian Hormone Type II Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Rat Ovaries During Postnatal Development, The Estrous Cycle and Gonadotropin-Induced Follicle Growth. **Endocrinology** 1995; 136(11): 4951-4962.

Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellvé AR, Efstratiadis A. Effects of an IGF-1 Gene-Null Mutation on Mouse Reproduction. **Molecular Endocrinology** 1996; 10(7): 903-918.

Ben-Meir A, Yahalomi S, Moshe B, Shufaro Y, Reubinoff B, Saada A. Coenzyme Q-Dependent Mitochondrial Respiratory Chain Activity in Granulosa Cells is Reduced with Aging. **Fertil Steril** 2015; 104(3):724–727.

Bezerra MÉS, Barberino RS, Menezes VG, Gouveia BB, Macedo TJS, Santos JMS, Monte APO, Barros VRP, Matos MHT. Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) Promotes Primordial Follicle Growth and Reduces DNA Fragmentation through the Phosphatidylinositol 3-Kinase/Protein Kinase B (PI3K/AKT) Signalling Pathway. **Reprod Fertil Dev** 2018; 30: 1503-1514.

Blerkom JV. The Influence of İntrinsic and Extrinsic Factors on the Developmental Potential and Chromosomal Normality of the Human Oocyte. **J Soc Gynecol Investig** 1996; 3(1):3-11.

Bozdoğan Ö. Fizyoloji, 2. Baskı, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2004, s.458-462.

Broekmans FJ, Soules MR, Fauser BC. Ovarian Aging: Mechanisms and Clinical Consequences. **Endocrine Reviews** 2009; 30(5): 465– 493.

Brokesh AM and Gaharwar AK. İnorganic Biomaterials for Regenerative Medicine. **ACS Applied Materials & Interfaces**. 2020; 12: 5319–44.

Cacciottola L, Nguyen T, Chiti M, Camboni A, Amorim C, Donnez J, Dolmans M. Long-Term Advantages of Ovarian Reserve Maintenance and Follicle Development Using Adipose Tissue-Derived Stem Cells in Ovarian Tissue Transplantation. **J. Clin. Med.** 2020; 9(9): 2980.

Can A. Kök Hücre- Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları, **Akademisyen Tıp Kitabevi**, Ankara, 2014, s:39-47.

Can A. Kök Hücre- Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları, **Akademisyen Tıp Kitabevi**, Ankara, 2014, s:363-426.

Can A. Kök Hücre Tanımları. **Türkiye Bilimler Akademisi Raporları**, 20. Ankara, 2009; s. 15-22.

Caplan AI. Mesenchymal Stem Cells: Time to Change the Name! **Stem Cells Translational Medicine** 2017; 6(6):1445-1451.

Casarini L and Crépieux P. Molecular Mechanisms of Action of FSH. **Front. Endocrinol.** 2019; 10: 305.

Chen T, Xu T, Cheng M, Fang H, Shen X, Tang Z, Zhao J. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Regulate CD54 and CD105 in Vascular Endothelial Cells and Suppress Inflammation in Kawasaki Disease. **Experimental Cell Research** 2021; 409(2): 112941.

Cruz G, Fernandois D, Paredes AH. Ovarian Function and reproductive senescence in the rat: role of ovarian sympathetic innervation. **Society for reproduction and fertility** 2017; 153(2): 59-68.

Cui L, Bao H, Liu Z, Man X, Liu H, Hou Y, Luo Q, Wang S, Fu Q, Zhang H. hUMSCs Regulate the Differentiation of Ovarian Stromal Cells via TGF- $\beta$ 1/Smad3 Signaling Pathway to Inhibit Ovarian Fibrosis to Repair Ovarian Function in POI Rats. **Stem Cell Research & Therapy** 2020; 11:386.

Çerçi E ve Erdost H. Kök Hücre. **Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.** 2019; 14(2): 221-228.

Danilovich N and Sairam MR. Haploinsufficiency of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor Accelerates Oocyte Loss Inducing Early Reproductive Senescence and Biological Aging in Mice. **Biology of Reproduction** 2002; 67(2): 361-369.

Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. Isolation of Adipose and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Using CD29 and CD90 Modifies Their Capacity for Osteogenic and Adipogenic Differentiation. **Journal of Tissue Engineering** 2015; 6:1-10.

Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaee A. Impact of Various Endocrine and Paracrine Factors on In Vitro Culture of Preantral Follicles in Rodents. **Reproduction** 2005; 130: 147-156.

Ding C, Li H, Wang Y, Wang F, Wu H, Chen R, Lv J, Wang W, Huang B. Different Therapeutic Effects of Cells Derived from Human Amniotic Membrane on Premature Ovarian Aging Depend on Distinct Cellular Biological Characteristics. **Stem Cell Research & Therapy** 2017; 8:173.

Ding C, Zou Q, Wang F, Wu H, Chen R, Lv J, Ling M, Sun J, Wang W, Li H, Huang B. Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Improve Ovarian Function in Natural Aging through Secreting Hepatocyte Growth Factor and Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor. **Stem Cell Research & Therapy** 2018; 9:55.

Ding C, Zou Q, Wang F, Wu H, Wang W, Li H, Huang B. HGF and BFGF Secretion by Human Adipose-Derived Stem Cells Improves Ovarian Function During Natural Aging via Activation of the SIRT1/FOXO1 Signaling Pathway, **Cell Physiol Biochem.** 2018; 45: 1316-1332.

Ding DC, Shyu WC, Lin SZ. Mesenchymal Stem Cells. **Cell Transplantation** 2011; 20: 5-14.

Doğan Durdağ G ve Berker B. Over Rezervinin Değerlendirilmesi. **J Clin Obstet Gynecol** 2008; 18(4): 254-265.

Drummond AE and Findlay JK. The Role of Estrogen in Folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology** 1999; 151(1-2): 57-64.

Dunlop CE and Anderson RA. The Regulation and Assessment of Follicular Growth. **Scandinavian Journal Of Clinical And Laboratory Investigation** 2014; 74(244): 13-17.

Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, Karels B, Kumae TR, Matzuk MM, Rose UM, De Jong FH, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Anti-Mullerian Hormone Attenuates the Effects of FSH on Follicle Development in the Mouse Ovary. **Endocrinology** 2001; 142(11): 4891-4899.

Durlinger ALL, Kramer P, Karels B, De Jong FH, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Control of Primordial Follicle Recruitment by Anti-Mullerian Hormone in the Mouse Ovary. **Endocrinology** 1999; 140(12): 5789-5796.

Elvin JA and Matzuk MM. Mouse Models of Ovarian Failure. **Reviews of Reproduction** 1998; 3: 183-195.

Eniola OW, Adetola A, Abayomi BT. A Review of Female Infertility; Important Etiological Factors and Management. **J. Microbiol. Biotech. Res.** 2012; 2(3): 379-385.

Erickson GF and Shimasaki S. The Physiology of Folliculogenesis: the Role of Novel Growth Factors. **Fertility and Sterility** 2001; 76(5): 943-949.

Eroschenko VP ve Di Fiore MS. DiFiore'nin Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişkileriyle, 12. Baskıdan Çeviri, Demir R, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2016, s.508-514.

Evron A and Blumenfeld Z. Ovarian Stem Cells- The Prons and Cons. **Clin Med Insights Reprod Health** 2013; 7:43-47.

Fässler R and Meyer M. Consequences of Lack of Integrin Gene Expression in Mice. **Genes & Development**. Germany. 1995, 9:1896-1908.

Filip S, Mokry J, Horacek J, English D. Stem Cells and the Phenomena of Plasticity and Diversity: a Limiting Property of Carcinogenesis. **Stem Cells Dev** 2008; 17:1031-1038.

Gleicher N, Weghofer A, Barad DH. Defining Ovarian Reserve to Better Understand Ovarian Aging. **Reprod Biol Endocrinol** 2011; 9:23.

Guthrie HD, Garrett WM, Cooper BS. Follicle Stimulating Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I Attenuate Apoptosis in Cultured Porcine Granulosa Cells. **Biol Reprod** 1998; 58(2): 390-396.

Gürsoy E, Koptagel E, Ergin K. Hücre Dokular Genel Embriyoloji, **Adnan Menderes Üniversitesi Yayınları**, Aydın, 2009, s.183-84.

Huang B, Ding C, Zou Q, Lu J, Wang W, Li H. Human Amniotic Fluid Mesenchymal Stem Cells Improve Ovarian Function During Physiological Aging by Resisting DNA Damage. **Front. Pharmacol** 2020; 11:272.

Huang B, Lu J, Ding C, Zou Q, Wang W, Li H. Exosomes Derived from Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Improve Ovary Function of Premature Ovarian Insufficiency by Targeting SMAD. **Stem Cell Res. Ther** 2018; 9:216.

Hui H, Tang Y, Hu M, Zhao X. Stem Cells: General Features and Characteristics. **Stem Cells in Clinic and Research** 2011; 3-20.

Igboeli P, Andaloussi A, Sheikh U, Takala H, ElSharoud A, McHugh A, Gavrilova-Jordan L, Levy S, Al-Hendy A. Intraovarian Injection of Autologous Human Mesenchymal Stem Cells Increases Estrogen Production and Reduces Menopausal Symptoms in Women with Premature Ovarian Failure: Two Case Reports and a Review of the Literature. **Journal of Medical Case Reports** 2020; 14:108.

Ipsa E, Cruzat VF, Kagize JN, Yovich JL, Keane KN. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Action in Reproductive Tissues. **Front. Endocrinol** 2019; 10:777.

İnan S ve Özbilgin K. Kök Hücre Biyolojisi. **Sağlıkta Birikim Dergisi** 2011; 5: 11-21.

Junqueira LC ve Carneiro J. Temel Histoloji, 10. Baskıdan Çeviri, Aytekin Y. Solakoğlu S., **Nobel Tıp Kitabevleri**, İstanbul, 2006, s.450-453.

Kahyaoğlu S. Over Rezerv Testleri. Y. Üstün (Ed.), Her Yönüyle İn Vitro Fertilizasyon. **Ankara: Sağlık Bilimleri Üniversitesi** 2019; 26-31.

Kang SK, Shin IS, Ko MS, Jo JY, Ra JC. Journey of Mesenchymal Stem Cells for Homing: Strategies to Enhance and Safety of Stem Cell Therapy. **Stem Cells International** 2012; 11.

Karaöz E. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu. **Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma Merkezi**. Kocaeli. 2010.

Kevenaar ME, Themmen APN, Laven JSE, Sonntag B, Fong SL, Uitterlinden AG, De Jong FH, Pols HAP, Simoni M, Visser JA. Anti-Mullerian Hormone and Anti-Mullerian Hormone Type II Receptor Polymorphisms are Associated with Follicular Phase Estradiol Levels in Normo-Ovulatory Women. **Hum Reprod** 2007; 22(6): 1547-1554.

Khanmohammadi N, Sameni HR, Mohammadi M, Pakdel A, Mirmohammadkhani M, Parsaie H, Zarbakhsh S. Effect of Transplantation of Bone Marrow Stromal Cell-Conditioned Medium on Ovarian Function, Morphology and Cell Death in Cyclophosphamide-Treated Rats. **Cell J**. 2018; 20(1): 10-18.

Kim K, Kim E, Kim G, Ko J, Cha K, Koong M, Lee K. Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells Stimulate Ovarian Function via miR-145 and Bone Morphogenetic Protein Signaling in Aged Rats. **Stem Cell Res Ther**. 2020; 11(1):472.

Kinugawa C, Murakami T, Okamura K, Yajima A. Telomerase Activity in Normal Ovaries and Premature Ovarian Failure. **Tohoku J. Exp. Med**. 2000; 190:231-238.

Kolios G and Moodley Y. Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. **Respiration** 2013; 85: 3-10.

Kwintkiewicz J, Nishi Y, Yanase T, Giudice LC. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  Mediates Bisphenol A Inhibition of FSH-Simulated IGF-1, Aromatase and Estradiol in Human Granulosa Cells. **Environmental Health Perspectives**. 2010; 118: 3.

Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human Endometrial Mesenchymal Stem Cells Restore Ovarian Function through Improving the Renewal of Germline Stem Cells in a Mouse Model of Premature Ovarian Failure. **Journal of Translational Medicine** 2015; 13:155.

Lee TH, Huang YH, Chang NK, Lin WC, Chien PWC, Su TM, Hsieh DJ, Lee TC. Characterization and Spinal Fusion Effect of Rabbit Mesenchymal Stem Cells. **BMC Research Notes** 2013; 6:528.

Li J, Mao Q, He J, She H, Zhang Z, Yin C. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve the Reserve Function of Perimenopausal Ovary via a Paracrine Mechanism. **Stem Cell Research & Therapy** 2017; 8:55.

Liu F, Hu S, Wang S, Cheng K. Rahim Rejenerasyonuna Hücre ve Biyomateryal Tabanlı Yaklaşımlar. **Regen Biyomater** 2019; 6:141–148.

Liu H, Guo T, Gong Z, Yu Y, Zhang Y, Zhao S, Qin Y. Novel FSHR Mutations in Han Chinese Women with Sporadic Premature Ovarian Insufficiency. **Molecular and Cellular Endocrinology** 2019 492: 110446

Liu R, Zhang X, Fan Z, Wang Y, Yao G, Wan X, Liu Z, Yang B, Yu L. Human Amniotic Mesenchymal Stem Cells Improve the Follicular Microenvironment to Recover Ovarian Function in Premature Ovarian Failure Mice. **Stem Cell Research & Therapy** 2019; 10:299.

Lobo RA. Hormone-Replacement Therapy: Current Thinking. **Nat Rev Endocrinol.** 2017; 13: 220–231.

Louhio H, Hovatta O, Sjöberg J, Tuuri T. The Effects of Insulin-Like Growth Factors I and II on Human Ovarian Follicles in Long-Term Culture. **Mol Hum Reprod** 2000 6: 694-698.

Machado CV, Telles PDS, Nascimento ÍLO. Immunological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2013; 35(1): 62-7.

Maheshwari A, Fowler P, Bhattacharya S. Assessment of Ovarian Reserve- Should We Perform Tests of Ovarian Reserve Routinely? **Human Reproduction** 2006; 21(11): 2729-2735.

McLaughlin D, Stamford J, White D. İnsan Fizyolojisi, 2. Baskı, Aktümsek A, **Nobel Akademik Yayıncılık**, Ankara, 2014, s.387-390.

Meczekalski B, Czyzyk A, Kunicki M, Podfigurna-Stopa A, Plociennik L, Jakiel G, Maciejewska- Jeske M, Lukaszuk K. Fertility in Women of Late Reproductive Age: the Role of Serum Anti-Müllerian Hormone (AMH) Levels in Its Assessment. **J Endocrinol Invest** 2016; 39: 1259–1265.

Mehalko K, Kim M, Paye S, Koh K, Lu RJ, Benayoun BA. Lack of Accelerated Ovarian Aging in a Follicle-Stimulating Hormone Receptor Haploinsufficiency Model. **Biorxiv** 2022.

Melnik BC, John SW, Schmitz G. Over Stimulation of Insulin/IGF-1 Signaling by Western Diet May Promote Diseases of Civilization: Lessons Learnt from Laron Syndrome. **Nutrition & Metabolism** 2011; 8: 41.

Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG. Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi, 10. Baskı, Dalçık H, **Nobel Tıp Kitabevleri**, İstanbul, 2016, s.17-22, s.260-262.

Moraes DA, Sibov TT, Pavon LF, Alvim PQ, Bonadio RS, Da Silva JR, Pic-Taylor A, Toledo OA, Marti LC, Azevedo RB, Oliveira DM. A Reduction in CD90 (THY-1) Expression Results in Increased Differentiation of Mesenchymal Stromal Cells. **Stem Cell Research & Therapy** 2016; 7:97.

Nakae J, Kido Y, Accili D. Distinct and Overlapping Functions of Insulin and IGF-1 Receptors. **Endocrine Reviews** 2001; 22(6): 818-835.

Nelson SM, Telfer EE, Anderson RA. The Ageing Ovary and Uterus: New Biological Insights. **Human Reproduction Update** 2013; 19(1): 67–83.

Niyaz M, Gürpınar ÖA, Günaydın S, Onur MA. Isolation, Culturing and Characterization of Rat Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells: A Simple Technique. **Turk J Biol** 2012; 36: 658-664.

Olovnikov AM. Telomeres, Telomerase, and Aging: Origin of the Theory. **Experimental Gerontology** 1996; 31(4):443-448.

Öktem Ö ve Urman B. Reprodüktif Yaşam Siklusu: Folikülogenez ve Menstruasyon. **J Turk Soc Obstet Gynecol** 2012; 9(1): 1- 24.

Ören H. Kök Hücreler. **DEU Tıp Derg.** 2019; 33(3): 271-280.

Parte S, Bhartiya D, Manjramkar DD, Chauhan A, Joshi A. Stimulation of Ovarian Stem Cells by Follicle Stimulating Hormone and Basic Fibroblast Growth Factor During Cortical Tissue Culture. **J Ovarian Res.** 2013; 6(1): 20.

Patel H, Bhartiya D, Parte S, Gunjal P, Yedurkar S, Bhatt M. Follicle Stimulating Hormone Modulates Ovarian Stem Cells Through Alternately Spliced Receptor Variant FSH-R3. **J Ovarian Res.** 2013; 20(6): 52.

Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, Brown K, Simpson ER, Mason HD. Anti-Mullerian Hormone Reduces Follicle Sensitivity to Follicle-Stimulating Hormone in Human Granulosa Cells. **Fertility and Sterility** 2011; 96(5): 1246-1251.

Peluso C, Fonseca FLA, Rodart IF, Cavalcanti V, Gastaldo G, Christofolini DM, Barbosa Cp, Bianco B. AMH: An Ovarian Reserve Biomarker in Assisted Reproduction. **Clinica Chimica Acta** 2014; 437: 175-182.

Rahayu S, Widhaningrum SK, Saadah M, Soewondo A, Marhendha APW, Djati MS, Ciptadi G. The Effects of Powder of Ocimum Canum Sims. Leaves on Ovary LHR Expression and Serum Estradiol Levels in Premenopausal Rats (Rattus norvegicus). **The 9th International Conference on Global Resource Conservation (ICGRC) and AJI from Ritsumeikan University**, Indonesia, 2019, s.060011: 1-5.

Randolph JF, Sowers M, Bondarenko IV, Harlow SD, Luborsky JL, Little RJ. Change in Estradiol and Follicle-Stimulating Hormone across the Early Menopausal Transition: Effects of Ethnicity and Age. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism** 2004; 89(4): 1555-1561.

Rastegar F, Shenaq D, Huang J, Zhang W, Zhang BQ, He BC, Chen L, Zuo GW, Luo Q, Shi Q, Wagner ER, Huang E, Gao Y, Li J, Kim SH, Zhou JZ, Bi Y, Su Y, Zhu G, Luo J, Luo X, Qin J, Reid RR, Luu HH, Haydon RC, Deng ZL, He TC. Mesenchymal Stem Cells: Molecular Characteristics and Clinical Applications. **Word J Stem Cells** 2010; 2(4): 67-80.

Rheinländer A, Schraven B, Bommhardt U. CD45 in Human Physiology and Clinical Medicine. **Immunology Letters** 196. 2018; 22–32.

Rhyu MS. Telomeres, Telomerase, and Immortality. **Journal of the National Cancer Institute.** 1995; 87(12): 884–894.

Rigas B, Tsioulas GJ, Allan C, Wali RK, Brasitus TA. The Effect of Bile Acids and Piroxicam on MHC Antigen Expression in Rat Colonocytes During Colon Cancer Development. **Immunology** 1994; 83: 319-323.

Rogers I, Yamanaka N, Bielecki R, Wong CJ, Chua S, Yuen S, Casper RF. Identification and Analysis of In Vitro Cultured CD-45 Positive Cells Capable of Multi-Lineage Differentiation. **Experimental Cell Research** 313 2007; 1839-1852.

Roson-Burgo B, Sanchez-Guijo F, Del Canizo C, De La Rivas J. Transcriptomic Portrait of Human Mesenchymal Stromal/Stem Cells Isolated from Bone Marrow and Placenta. **BMC Genomics** 2014; 15: 910.

Ross MH ve Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas İlişkili Hücre Biyolojisi ve Moleküler Biyoloji ile, 6. Baskıdan Çeviri, Baykal B, **Palme Yayıncılık**, Ankara, 2017, s.830-839.

Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. A Human Intercellular Adhesion Molecule (ICAM-1) Distinct from LFA-1. **Journal of Immunology**. 1986; 137 (4): 1270–4.

Roudebush WE, Kivens WJ, Mattke JM. Biomarkers of Ovarian Reserve. **Biomarker Insights** 2008; 3: 259-268.

Sadler TW. Langman's Medical Embryology, 12th ed. **Lippincott Williams & Wilkins**, China, 2012, s. 243-245.

Sağsöz H ve Ketani MA. Kök Hücreler. **Dicle Üniv Vet Fak Derg**. 2008; 1(2): 29-33.

Salvatore G, De Felici M, Dolci S, Tudisco C, Cicconi R, Campagnolo L, Camaioni A, Klinger FG. Human Adipose-Derived Stromal Cells Transplantation Prolongs Reproductive Lifespan on Mouse Models of Mild and Severe Premature Ovarian Insufficiency. **Stem Cell Research & Therapy** 2021; 12: 537.

Silvestris E, D'Oronzo S, Cafforio P, Dellino M, Cormio G. In Vitro Generation of Oocytes from Ovarian Stem Cells (OSCs): In Search of Major Evidence. **Int J. Mol. Sci**. 2019; 20(24): 6225.

Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials with Mesenchymal Stem Cells: An Update. **Cell Transplantation**. 2016; 25: 829-848.

Sun Q, Zhou C, Ma R, Guo Q, Huang H, Hao J, Liu H, Shi R, Liu B. Prognostic Value of Increased Integrin-Beta 1 Expression in Solid Cancers: A Meta-Analysis. **Onco Targets Ther**. 2018; 11: 1787-1799.

Şükür YE, Kıvançlı İB, Özmen B. Ovarian Aging and Premature Ovarian Failure. **J Turk Ger Gynecol Assoc**. 2014; 15: 190-6.

Tatone C and Amicarelli E. The Aging Ovary-the Poor Granulosa Cells. **Fertil Steril**. 2013; 99(1): 12–17.

Tekeli S, Arısu Naghavi E, Gökçe B, Sır G, Yiğittürk G, Çavuşoğlu T, Uyanıkgil Y. Kök Hücreler; Mezenkimal Kök Hücreler ve Güncel Klinik Uygulamaları. **FNG& Bilim Transplantasyon Dergisi** 2016; 1(2): 72-83.

Tian C, He J, An Y, Yang Z, Yan D, Asmak P, Lv G, Li Y, Wang Y, Yang Y, Zhu G, He Z, Zhu X, Pan X. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Derived from Juvenile Macaques Reversed Ovarian Ageing in Elderly Macaques. **Stem Cell Research & Therapy** 2021; 12: 460.

Uçkan Çetinkaya D. Mezenkimal Kök Hücreler: Nerde? Ne Zaman? **4. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi**, Bursa, 2007, s:8-14.

Ural AU. Kök Hücreler. **TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi**. 2006; 5: 3-4.

Ural AU. Mezenkimal Kök Hücre Biyolojisi. **8. Ulusal Kemik İliği Transplantasyonu ve Kök Hücre Tedavileri Kongresi**, Antalya, 2014, s:4-5.

Vercesi AE, Kowaltowski AJ, Oliveira CF, Castilho RF. Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> Transport, Permeability Transition and Oxidative Stress in Cell Death: Implications in Cardiotoxicity, Neurodegeneration and Dyslipidemias. **Front Biosci**. 2006; 1(11): 2554-2564.

Visser JA and Themmen APN. Anti-Müllerian Hormone and Folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology** 2005; 234(1-2): 81-86.

Volarevic V, Bojic S, Nurkovic J, Volarevic A, Ljubic B, Arsenijevic N, Lako M, Stojkovic M. Stem Cells as New Agents for the Treatment of Infertility: Current and Future Perspectives and Challenges. **Biomed Res Int**. 2014; 2014: 507234.

Wiesmann A, Bühring HJ, Mentrup C, Wiesmann HP. Decreased CD90 Expression in Human Mesenchymal Stem Cells by Applying Mechanical Stimulation. **Head & Face Medicine** 2006; 2(1): 1–6.

Wu M, Guo Y, Wei S, Xue L, Tang W, Chen D, Xiong J, Huang Y, Fu F, Wu C, Chen Y, Zhou S, Zhang J, Li Y, Wang W, Dai J, Wang S. Biomaterials and Advanced Technologies for the Evaluation and Treatment of Ovarian Aging. **Journal of Nanobiotechnology** 2022; 20: 374.

Wu YG, Barad DH, Kushnir VA, Lazzaroni E, Wang Q, Albertini DF, Gleicher N. Aging-Related Premature Luteinization of Granulosa Cells is Avoided by Early Oocyte Retrieval. **J Endocrinol**. 2015; 226(3): 167–80.

Yalçın B. Major Doku Uygunluk Kompleksi (MHC) Molekülleri: Genel Özellikleri ve Hastalıklarla İlişkisi. **Türkderm**. 2013; 47(1): 7-12.

Yan Z, Guo F, Yuan Q, Shao Y, Zhang Y, Wang H, Hao S, Du X. Endometrial Mesenchymal Stem Cells Isolated from Menstrual Blood Repaired Epirubicin-Induced Damage to Human Ovarian Granulosa Cells by Inhibiting the Expression of Gadd45b in Cell Cycle Pathway. **Stem Cell Research & Therapy**. 2019; 10:4.

Yang Z, Du X, Wang C, Zhang J, Liu C, Li Y, Jiang H. Therapeutic Effects of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles on Premature Ovarian Insufficiency in Mice. **Stem Cell Research & Therapy**. 2019; 10: 250.

Yazır Y. 25. Kök Hücre ve Doku Mühendisliği Kursu: Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları. **Kou-Kögem** Kocaeli, 2018, s:3-16.

Zafardoust S, Kazemnejad S, Darzi M, Fathi-Kazerooni M, Rastegari H, Mohammadzadeh A. Improvement of Pregnancy Rate and Live Birth Rate in Poor Ovarian Responders by Intraovarian Administration of Autologous Menstrual Blood Derived- Mesenchymal Stromal Cells: Phase I/II Clinical Trial. **Stem Cell Reviews and Reports**. 2020; 16: 755-763.

Zeng L, Ye J, Zhang Z, Liang Y, Li J, Zeng L, Cao L, Zhu L, Luo S. Zuogui Pills Maintain the Stemness of Oogonial Stem Cells and Alleviate Cyclophosphamide-

Induced Ovarian Aging through Notch Signaling Pathway. **Phytomedicine**. 2022; 99: 153975.

Zhang J, Chen Q, Du D, Wu T, Wen J, Wu M, Zhang Y, Yan W, Zhou S, Li Y, Jin Y, Luo A, Wang S. Can Ovarian Aging be Delayed by Pharmacological Strategies? **Aging**. 2019; 11: 2.

Zhang Q, Sun J, Huang Y, Bu S, Guo Y, Gu T, Li B, Wang C, Lai D. Human Amniotic Epithelial Cell-Derived Exosomes Restore Ovarian Function by Transferring MicroRNAs Against Apoptosis. **Mol Ther Nucleic Acids**. 2019; 16: 407–18.

Zhang S, Huang B, Su P, Chang Q, Li P, Song A, Zhao X, Yuan Z, Tan J. Concentrated Exosomes from Menstrual Blood-Derived Stromal Cells Improves Ovarian Activity in a Rat Model of Premature Ovarian Insufficiency. **Stem Cell Research & Therapy**. 2021; 12: 178.

Zhang Y, Xia X, Yan J, Yan L, Lu C, Zhu X, Wang T, Yin T, Li R, Chang H, Qiao J. Mesenchymal Stem Cell-Derived Angiogenin Promotes Primordial Follicle Survival and Angiogenesis in Transplanted Human Ovarian Tissue. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 2017; 15: 18.

Zhou P, Baumgarten SC, Wu Y, Bennett J, Winston N, Hirshfeld-Cytron J, Stocco C. IGF-I Signaling is Essential for FSH Stimulation of AKT and Steroidogenic Genes in Granulosa Cells. **Mol Endocrinol**. 2013; 27(3): 511–523.

Zhu L, Li J, Xing N, Han D, Kuang H, Ge P. American Ginseng Regulates Gene Expression to Protect against Premature Ovarian Failure in Rats. **Biomed Res Int**. 2015; 2015:767124.

## 9. EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 04.02.2021-E.14281



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-14281  
Konu : Başvurunuz Hk.

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL

İlgi : 22/01/2021 tarihli dilekçeniz. *10.20.1.171*  
*2564*

*1.04.2021*  
"Overyan Yaşlanma Sürecinde Over Dokusundan Elde Edilen Stromal Kök Hücrelerin Ovaryum Dokusuna Terapötik Etkisi" konulu çalışmanız (PAUHDEK-2021/04) 03.02.2021 tarih ve 2021/01 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın **Hayvan Deneyleri Etiği** açısından uygun olduğuna ve **15 adet sıçan kullanılarak yapılmasına** oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Gülçin METE  
Başkan

