



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



**SIÇAN İN VİVO PREMATÜR OVARYAN YETMEZLİĞİ
MODELİNDE İNTRAOVARYAN PLATELETTEN ZENGİN
PLAZMA UYGULAMASININ OVARYAN FOLİKÜLLERİN
GELİŞİMİNE ETKİSİ**

GÖKTAN KUŞPINAR

DOKTORA TEZİ

BURSA-2023

GÖKTAN KUŞPINAR

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2023



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



**SIÇAN İN VİVO PREMATÜR OVARYAN YETMEZLİĞİ MODELİNDE
İNTRAOVARYAN PLATELETEN ZENGİN PLAZMA
UYGULAMASININ OVARYAN FOLİKÜLLERİN GELİŞİMİNE
ETKİSİ**

Göktan KUŞPINAR

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Berrin AVCI

Proje no:1108 – B.U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

BURSA-2023

**T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ETİK BEYAN

Doktora tezi olarak sunduğum “Sıçan İn Vivo Prematür Ovaryan Yetmezliği Modelinde İntraovaryan Plateletten Zengin Plazma Uygulamasının Ovaryan Foliküllerin Gelişimine Etkisi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Göktan KUŞPINAR

25/01/2023

TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

25/01/2023

Adı Soyadı : Gökten KUŞPINAR

Anabilim Dalı : Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu : Sıçan İn Vivo Prematür Ovaryan Yetmezliği Modelinde İntraovaryan Plateletten Zengin Plazma Uygulamasının Ovaryan Foliküllerin Gelişimine Etkisi

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	☒	☐	
Dış Kapak Sayfası	☒	☐	
İç Kapak Sayfası	☒	☐	
Kabul Onay Sayfası	☒	☐	
Sayfa Düzeni	☒	☐	
İçindekiler Sayfası	☒	☐	
Yazı Karakteri	☒	☐	
Satır Aralıkları	☒	☐	
Başlıklar	☒	☐	
Sayfa Numaraları	☒	☐	
Eklerin Yerleştirilmesi	☒	☐	
Tabloların Yerleştirilmesi	☒	☐	
Kaynaklar	☒	☐	

DANIŞMAN ONAYI

Ünvanı Adı Soyadı: Prof. Dr. Berrin AVCI

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYAN	II
KABUL ONAY SAYFASI	II
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VII
İNGİLİZCE ÖZET	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Dişi Üreme Sistemi	3
2.1.1. Ovaryum Anatomisi	3
2.1.2. Ovaryum Embriyolojisi	4
2.1.3. Ovaryum Histolojisi	6
2.1.3.1. Primordiyal Foliküller	7
2.1.3.2. Gelişimin Farklı Basamaklarındaki Foliküller	7
2.1.3.2.1. Primer Foliküller	7
2.1.3.2.2. Sekonder (Antral) Foliküller	9
2.1.3.2.3. Matür (Graaf) Foliküller	10
2.1.3.2.4. Atretik Foliküller	11
2.2. Sıçan Dişi Üreme Sistemi	11
2.2.1. Sıçan Ovaryum Anatomisi	11
2.2.2. Sıçan Ovaryum Embriyolojisi ve Foliküler Gelişim	12
2.2.3. Sıçan Östrus Döngüsü	13
2.3. Prematür Ovaryan Yetmezlik (POI)	15
2.4. 4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD)	17
2.5. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon	18
2.6. Prematür Ovaryan Yetmezlik ve Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon	19
2.7. Plateletten Zengin Plazma (PRP)	21
2.8. Primordiyal Folikül Aktivasyonunun Moleküler Mekanizmaları	23
2.9. Çalışmanın Amacı	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM	26
3.1. Deney Hayvanları	26
3.2. Deney Grupları	26
3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulama Yöntemi	28
3.5. Deneysel Prematür Ovaryan Yetmezliği (POI) Modeli Oluşturulması	30
3.6. Vajinal Smear ile Östrus Döngüsünün Evrelerinin Tayini	30
3.7. Plateletten Zengin Plazma (PRP) İzolasyonu ve İntraovaryan PRP Enjeksiyonu	32
3.8. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon Protokolü (KOH)	33
3.9. Çiftleştirme Protokolü	34
3.10. Deneklerin Sakrifikasyonu	34
3.11. Doku Takibi	34
3.12. Kesit Alma	35
3.13. Hematoksilen – Eozin (H&E) Boyama	35
3.16. ELISA	38

3.17. İstatistiksel Değerlendirme	38
4. BULGULAR.....	40
4.1. Denek Vücut ve Ovaryum Ağırlıkları Ölçümü.....	40
4.1.1. Vücut Ağırlıkları Ölçümü	40
4.1.2. Ovaryum Ağırlıkları Ölçümü.....	44
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular	47
4.2.1. Histomorfolojik Bulgular.....	47
4.2.2. Morfometrik Bulgular	58
4.2.3. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	64
4.3. Biyokimyasal Bulgular	67
4.4. Çiftleştirme Bulguları	69
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	72
6. KAYNAKLAR	88
7. SİMGELER VE KISALTMALAR.....	98
8. TEŞEKKÜR	100
9. ÖZGEÇMİŞ	101

TÜRKÇE ÖZET

Tez çalışmasının amacı prematür ovaryan yetmezliği (POI) olgularında, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolü öncesinde intraovaryan plateletten zengin plazma (PRP) uygulamasının foliküler gelişim ve klinik sonuç üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesidir.

Prematür ovaryan yetmezliği modeli deney gruplarında intraovaryan PRP enjeksiyonunun tek başına ve KOH protokolü öncesinde uygulanması durumunda etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 50 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan 10 gruba ayrıldı. Deneklerde POI modeli 15 gün süreyle günde tek doz 160mg/kg subkütan 4-Vinilsikloheksen Diapoksit (VCD) enjeksiyonu ile oluşturuldu. VCD enjeksiyonları sonrasında intraovaryan PRP veya salin enjeksiyonu yapıldı. Ardından deneklere KOH protokolü uygulandı. Sakrifiye edilen deneklerden elde edilen ovaryum doku örneklerinde, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay yöntemi ile PTEN ve pAKT konsantrasyonu, hematoksilen-eozin boyaması ile morfolojik değerlendirme ve gelişimin farklı basamaklarındaki ovaryan foliküllerin sayımı gerçekleştirildi. Çiftleştirme protokolü uygulanan deneklerde ise canlı doğum başına düşen yavru sayısı ve ağırlığı değerlendirildi.

VCD enjeksiyonları sonrasında primordiyal ve primer folikül sayısında azalma, atretik folikül sayısında artış ve pAKT konsantrasyonunda artış ile PTEN konsantrasyonunda azalma görüldü. İntraovaryan PRP veya salin enjeksiyonu yapılan POI grubuyla herhangi bir uygulama yapılmayan POI grubu karşılaştırıldığında; primer folikül sayısının artışı, PTEN konsantrasyonunda artış ve pAKT konsantrasyonunda azalma görüldü. İntraovaryan PRP ve salin enjeksiyonu uygulanan POI grupları birbirleriyle karşılaştırıldığında; folikül sayısı ile PTEN ve pAKT konsantrasyonlarının benzer olduğu saptandı. Çiftleştirme protokolü uygulanan deneklerde canlı doğum başına düşen yavru sayısı kısıtlı örneklem boyutundan dolayı karşılaştırılamadı.

Bu çalışmada prematür ovaryan yetmezliği modelinde, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokolü öncesinde intraovaryan plateletten zengin plazma (PRP) uygulamasının foliküler gelişim ve canlı doğum üzerinde etkinliğinin olmadığı gösterildi.

Anahtar kelimeler: POI, VCD, PRP, KOH, PTEN/pAKT

İNGİLİZCE ÖZET

The Effect of Intraovarian Platelet-Rich Plasma Injection on the Development of Ovarian Follicles in the Rat In Vivo Model of Premature Ovarian Failure

This study aims to evaluate the efficacy of intraovarian platelet-rich plasma (PRP) administration on follicular development and clinical outcome in premature ovarian failure (POI) before the controlled ovarian hyperstimulation (COH) protocol.

In order to assess the efficacy of intraovarian PRP injection both alone and prior to the COH treatment in the experimental groups of the premature ovarian failure model, 50 female Sprague-Dawley rats were divided into ten groups. In our study, a subcutaneous 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) injections at a single dose of 160 mg/kg each day for 15 days was performed to compose the POI model. Intraovarian PRP or saline injections were conducted after VCD injections. After that, the animals underwent the COH protocol. In ovarian tissue, PTEN and pAKT concentrations were measured using the Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay. Morphological assessment was also performed by hematoxylin-eosin staining and counting the number of ovarian follicles at various developmental stages. The number and weight of the offspring per live birth were assessed in the animals which the mating protocol was applied.

After receiving VCD injections, it was determined that there were fewer primordial and primary follicles, more atretic follicles, and lower PTEN concentrations with higher pAKT concentrations. In comparison to POI animals, an increase in the number of primary follicles, an increase in PTEN concentration, and a decrease in pAKT concentration were detected after intraovarian PRP or Saline injection. After intraovarian PRP and Saline injection, it was revealed that the subjects' follicle counts, PTEN and pAKT concentrations were comparable with each other. Due to the small sample size of live birth in mating protocol, it was not possible to determine the number of offspring per live birth.

The results of the our study demonstrated that intraovarian platelet-rich plasma treatment prior to the controlled ovarian hyperstimulation protocol had no effect on follicular development or live birth in the premature ovarian failure model.

Key words: POI, VCD, PRP, KOH, PTEN/pAKT

1. GİRİŞ

Prematür ovaryan yetmezliği (POI), kadın yaşının 35 ve altında olmasına rağmen over rezervinde ciddi bir azalma ile karakterizedir ve düşük over rezervinin yaşa özgü formudur. POI olguları üremeye yardımcı tedavi (ART) kliniklerinde başarı eldesinin en zor olduğu hasta gruplarından biridir. POI tedavisinde; ovaryumda kalan primordiyal foliküllerin harekete geçirilmesi ve üreme fonksiyonunu yerine getirecek olgun foliküllerin sayısının, kalitesinin ve yeterliliğinin artırılması amacıyla kontrollü ovaryan hiperstimulasyon (KOH) protokollerine ek olarak adjuvan tedavilere ihtiyaç duyulmaktadır.

POI olgularında uygulanan adjuvan tedavi yaklaşımları tartışmalı olup, henüz deneysel olmasına karşın bu uygulanan tedavilerden biri de intraovaryan plateletten zengin plazma uygulamasıdır. Plateletten zengin plazma (PRP), kan plazma fraksiyonunda yüksek konsantrasyonlu trombositler olarak tanımlanır. PRP'nin folikül olgunlaşmasını uyarabilen proanjiyogenik, proliferatif ve proinflamatuvar faktörleri içeren, kolayca erişilebilir, bireyselleştirilmiş, maliyet etkin bir uygulama olduğu hipotezi mevcuttur. Yapılan çalışmalarda, intraovaryan PRP uygulanması sonrasında, ovaryumda over rezervi belirteci olarak kabul edilen Anti-Müllerian Hormon (AMH) seviyesinin artışı ve folikül stimüle edici hormon (FSH) düzeylerinin düşüşü bildirilmiş, folikülogenez artışına ve önemli düzeyde oosit toplanmasına neden olduğu, az sayıda vakada spontan gebelik elde edildiği raporlanmıştır (Farimani, Heshmati, Poorolajal, & Bahmanzadeh, 2019; Hsu, Hsu, Hsu, Chiu, & Dorjee, 2020; Pantos ve ark., 2019; Sfakianoudis ve ark., 2019). Yapılan bu vaka çalışmalarında intraovaryan PRP uygulanması cesaret verici görünse de folikülogenez ve gebelik eldesinde etkinliği henüz netlik kazanmamıştır.

Folikülogenezin ilk basamağı olan primordiyal folikül aktivasyonu dinamik bir süreç olup moleküler mekanizması kısmen aydınlığa kavuşmuştur. Folikül aktivasyonu, normal fizyolojik koşullar altında, karmaşık aktivatör ve baskılayıcı yollar tarafından sıkı kontrol edilir. Hücre bölünmesi ve apoptoz gibi hücre sel süreçlerde rol oynayan “Fosfataz ve tensin homolog / fosfotidilinositol-3-kinaz” (PTEN/PI3K) sinyal yolağı folikül aktivasyonunu indüklerken, gelişmekte olan foliküller tarafından salgılanan inhibitör parakrin hormon AMH yoluyla folikül

aktivasyonu inhibe edilir. Folikül aktivasyonunun bu otokrin/parakrin sinyallerle dengede tutulması sağlanır (Hsueh, Kawamura, Cheng, & Fauser, 2015).

Plateletlerin fizyolojik etkilerini nasıl başlattığının kesin ayrıntıları belirsizliğini korumaktadır. Bununla birlikte, plateletlerin aktivasyona yanıt olarak bir dizi sitokin saldığı iyi bilinmektedir (Roh, Kim, Park, & Oh, 2016). Sitokin sinyallemesinin oosit, granüloza ve teka hücreleri arasındaki karşılıklı ilişkide yer aldığı ve folikül olgunlaşması, ovulasyon ve luteinizasyonda önemli roller aldığı gösterilmiştir (Field, Dasgupta, Cummings, & Orsi, 2014; Orisaka ve ark., 2006). Folikül gelişimini düzenleyen bir dizi sitokinin aynı zamanda platelet aktivasyonu sırasında alfa ve yoğun granül içeriklerinin salgılanması yoluyla plateletler tarafından da salındığı gösterilmiştir (Atkinson, Martin, & Sturmey, 2021).

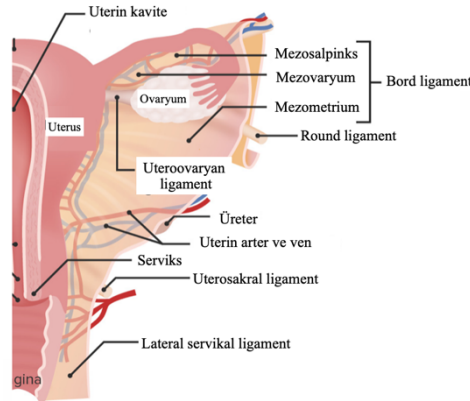
Bu kapsamda, ‘POI olgularında, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokolü öncesinde intraovaryan PRP uygulaması ovaryan foliküllerin aktivasyonunu sağlar ve doğum başına düşen yavru sayısını arttırır’ hipotezinden yola çıkarak, sıçanlarda POI modeli üzerinde KOH öncesi intraovaryan PRP uygulamasının; PTEN/PI3K yolağı üzerinden foliküler aktivasyon ve doğum başına düşen yavru sayısı üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Sistemi

2.1.1. Ovaryum Anatomisi

İnsan ovaryumları yassı ve oval gövdeye sahip olup pelvik girişin hemen altında, lateral pelvik duvara bitişik yerleşimlidir. Yaklaşık 3–5 cm uzunluğunda, 2 cm genişliğinde ve 2–3,5 g ağırlığındadır. Ovaryan siklusun aşamasına bağlı olarak düz veya büzgülü/nodüler, pürüzlü bir yüzeye sahip olabilir. Ovaryum hem lateral hem de medial yüzeylere, üst (tubal) ve alt (uterin) kutuplara ve ön (mezovaryan) ile arka (serbest) sınırlara sahiptir. Nullipar kadınlarda, ovaryum uterusun bord ligamentinin arka tarafından iki taraflı uzanan, kendi mezenteri olan mezovaryum tarafından ovaryan fossada (lateral pelvik duvarda yüzeyel bir çöküntü) askıya alınır. Bu anatomik konum değişkendir, çünkü ilk gebelik sırasında ovaryumlar sıklıkla ovaryan fossanın dışına çıkar ve bu değişiklik kalıcı olabilir. Ovaryum intraperitoneal olan tek pelvik yapı olması bakımından sıra dışıdır ve yüzey germinal epitelinin çevreleyen visseral periton mezotelyumu (modifiye bir periton) ile kaplıdır. Germinal epitel, sırayla kortikal ovaryum stroması ve gelişimin çeşitli aşamalarında yerleşik folikülleri kaplayan sıkı bağ dokusu yapısında olan tunika albuginea tabakasının üzerinde bulunur. Kortikal stroma; fibroblastlar, düz kas hücreleri ve kapiller ağlar dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerini içeren bir matrikstir. Buna karşılık, medullar stroma vasküler, lenfatik ve sinir beslemesini içeren düzensiz bağ dokusundan oluşur (Moore ve ark., 2018).

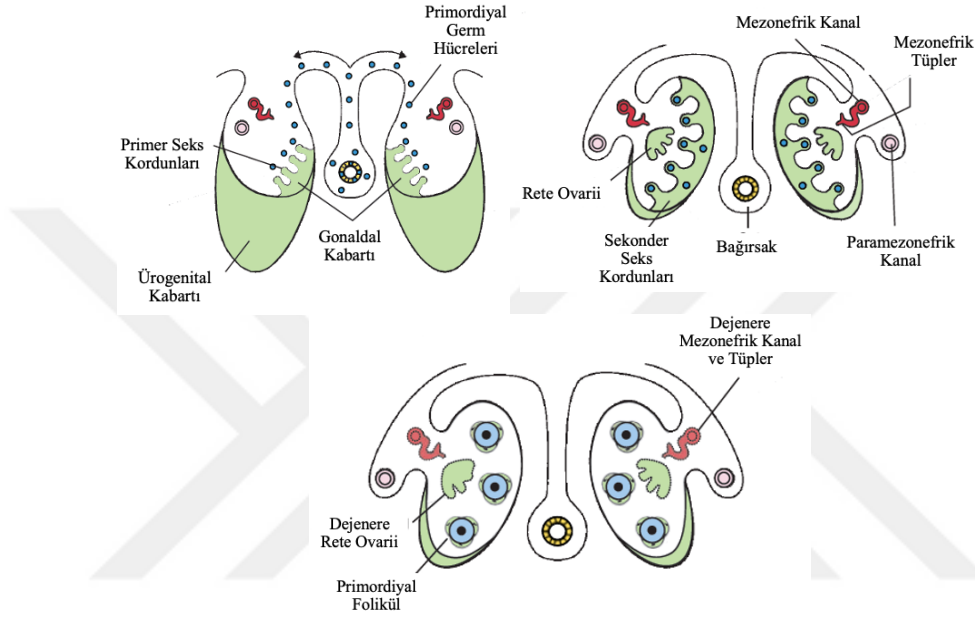


Şekil 1. Ovaryum anatomisi (Moore ve ark., 2018)

2.1.2. Ovaryum Embriyolojisi

Ovaryum gelişimi, primordiyal germ hücrelerinin (PGC) implantasyon sonrasında erken gelişimi ile birlikte gastrulasyon aşamasında başlar. Primordiyal germ hücreleri ilk olarak embriyonik diskin posteriorunda, daha sonra intermediyat mezoderm, visseral mezoderm, yolk kesesi ve allantoiste gözlemlenir (Sadler, 2012). Embriyonik gelişimin 5. haftasında, PGC'ler; amoeboid hareket ile yolk kesesinden göç etmeye başlar. Dorsal mezenter yoluyla kaudale ve gelişmekte olan mezonefrik böbreğin medial ve ventraline ilerleyerek, 10. torasik seviyeye yakın vücut arka duvarının mezenkimal ürogenital kabartısına ulaşır. Bu ilerleme, genital kabartıları oluşturmak üzere sölomik epitelin ve mezodermin proliferasyonunu uyarır. Bu bölgeler, germinal epitelin altında yer alan mezoderm içinde gelişim gösteren primer seks kordonlarının orjini ve rete ovarii'yi oluşturur. Gelişimin 6. haftasında, sölomik epitel hücreleri, PGC'leri aşamalı olarak saran somatik destekleyici hücre kümelerini oluşturur. Buna paralel olarak, Müllerian (paramezonefrik) kanallar, lateralde yoğunlaşmış sölomik epitelden oluşan bir hücre kümesinin kranioyokaudal invajinasyonu ile kaudalde ürogenital sinüsün arka duvarına ulaşır. Bu gelişmeler 6. haftanın sonunda tamamlanır. Bu aşamada hem erkek hem de dişi gonadlar birbirinden ayırt edilemez. Gonadal farklılaşma 7. haftadan itibaren belirginleşir ve Y kromozomunun SRY (Y kromozomundaki seks belirleyici bölge) gen ekspresyonunun yokluğu durumunda embriyonun gonadları ve genital organları dişi yönünde gelişir. PGC'leri oogonia'ya diferansiye olurken, sölomik epitelden ayrılan somatik hücreler, folikül yapılarını geliştirmek üzere pregranüloza ve teka hücrelerine farklılaşır. Gelişimin 4. ayı boyunca gonadal kordonların histolojik yapısı giderek bozulur. Germ hücre çekirdeklerinin eksik sitokinez ile mitotik bölünmesi, germ hücre yuvaları olarak bilinen çok çekirdekli sinsityumu oluşturur. Germ hücre apoptozunun ve somatik hücre göçünün bir kombinasyonu yoluyla germ hücre çekirdekleri, ilk primordiyal folikül havuzunu oluşturmak için pregranüloza hücreleri ile çevrelenir (Coticchio, Albertini, & De Santis, 2013). Oogoniyaların proliferasyonu aktivin, kemik morfojenik proteinler (BMP'ler) ve TGF- β 1 dahil olmak üzere transformatör büyüme faktörü (TGF- β) ailesi proteinleri tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. Bu proteinler, gonadal kord hücresinden köken alan somatik destek hücrelerinin granüloza hücrelerine

farklılaşmasını tetikler ve oositleri çevreleyen yassılaştırmış tek hücre tabakasını oluşturarak ilk ilkel (primordiyal) folikülleri meydana getirirler. Primordiyal foliküller, gelişimin 5. ayında kortikal/ perimedüller bölgede açıkça görülebilir. Buna karşılık, ovaryum medullası neoanjiyojenik, nöral ve destekleyici bağ dokusu gelişiminin odağı haline gelir (Dudek, 2014).



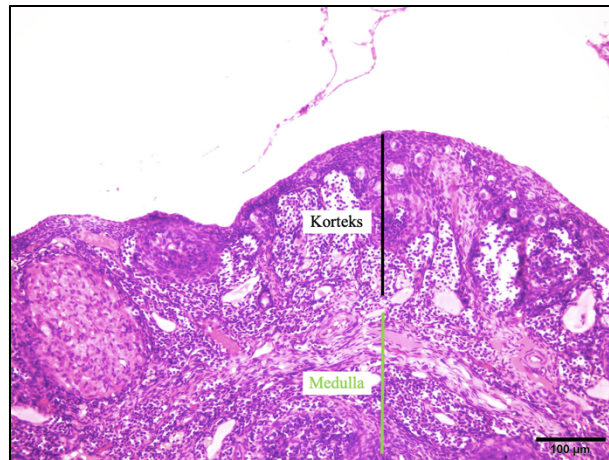
Şekil 2. Ovaryum embriyolojisi (Dudek, 2014)

Primordiyal foliküller ovaryum rezervini oluşturur, ancak reproduktif dönemdeki kadınlardan ovaryan oogonyal kök hücrelerin izolasyonu ile ilgili son bulgular bu köklü görüşe karşı verilerdir. Primordiyal folikül sayılarına ilişkin veriler değişiklik göstermekle birlikte, germ hücre apoptozuna bağlı olarak oosit sayısı fetal ovaryumda yaklaşık 6 milyondan doğuma kadar 300.000-2 milyona düşmektedir. Doğum sonrasında puberte başlangıcına kadar foliküllerin büyük bölümünün atreziye uğraması sonucunda ovaryumlarda yaklaşık 300-500 bin folikül kalır ve bu foliküller kadının reproduktif dönemindeki ovaryum rezervini oluşturur (Dudek, 2014; Sadler, 2012).

2.1.3. Ovaryum Histolojisi

Ovaryum dıştan peritoneum ile çevrilidir. Periton örtü puberte ile birlikte değişikliğe uğrar ve tek katlı yassı epitelden, tek katlı kübik epitele kadar değişiklik gösterir. Bu tabakanın hemen altında yoğun kollagen liflerin oluşturduğu tunika albuginea tabakası bulunur. Ovaryumun esas dokusu tunika albuginea'nın altında dışta korteks ve içte medulla olmak üzere sınırları net ayırt edilemeyen iki kısma ayrılır. Korteks içerisinde farklı gelişim basamaklarında foliküller ve aralarında yer alan bağ dokusu bulunur. Medulla hilustan ovaryuma giren, gevşek bağ dokusu, interstisiyel hücreler, sinirler, kan ve lenf damarlarından oluşmuştur (de la Fuente, Santiago, Román, Dumitrache, & Casasanto, 2014).

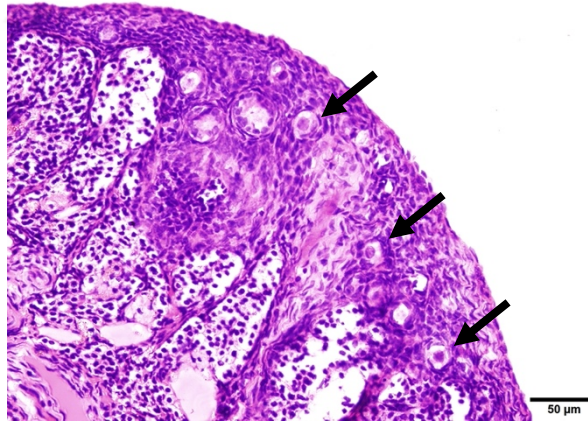
Foliküler gelişim (folikülogenez) ovaryum korteksinde gerçekleşir. Bir folikülün basamak basamak gelişimine devam ederek folikül havuzuna alınmasıyla başlar ve folikülün ovulasyonu veya atrezisi ile sonuçlanır. Folikülogenez iki evreye ayrılır. Pre-antral veya gonadotropinlerden bağımsız faz olarak adlandırılan birinci faz, oositin büyümesi ve farklılaşması ile karakterizedir. Esas olarak otokrin/ parakrin mekanizmalar yoluyla lokal olarak üretilen büyüme faktörleri tarafından kontrol edilir. Buna karşılık, ikinci fazda (antral) foliküler gelişme hipofizer gonadotropinlere yanıt olarak devam etmektedir. Bu kapsamda kortikal alanda yer alan foliküller, ovaryan rezervi oluşturan ve foliküler gelişimin ilk basamağında olan primordiyal foliküller ile foliküler gelişimin farklı basamaklarında olan foliküller olmak üzere sınıflandırılırlar (Dash, 2003; de la Fuente ve ark., 2014).



Şekil 3. Ovaryum histolojik genel görünümü

2.1.3.1. Primordiyal Foliküller

Foliküler gelişimin ilk basamağı olan primordiyal foliküller fetal gelişimin 3. ayında gözlemlenir. Primordiyal foliküller puberte başlangıcına kadar ovaryumda bulunan tek folikül tipi olup, ovaryan rezervi oluştururlar. Ovaryan korteks stromasında bağ dokusu tabaka olan tunika albuginea'nın altında yerleşim gösterirler. Bir primordiyal folikül I. mayozun profaz evresinin diptoten alt evresinde duraksayan primer oosit (~25 µm çapında), tek katlı yassı pregranüloza hücre katmanı ve her iki hücreyi de çevreleyen ince bir bazal laminadan oluşur (Picton, Harris, Muruvi, & Chambers, 2008). Ooplazmada golgi kompleksi, mitokondri, endoplazmik retikulum ve lizozom organelleri nükleusa yakın kümelenmeler (Balbiani Cismi) oluşturur. Ayrıca, nüklear zarf kesitlerine ait diziler (Anüler Lameller) ile küre şekilli küçük mitokondrionlar ve veziküller sitoplazmada dağınık halde bulunur (de la Fuente ve ark., 2014). Primordiyal foliküllerin kendi vasküler kaynağı olmadığından ve endokrin desteğe sınırlı erişime sahip olduklarından dolayı parakrin sinyal etkileşimi difüzyonla meydana gelir (Dash, 2003).



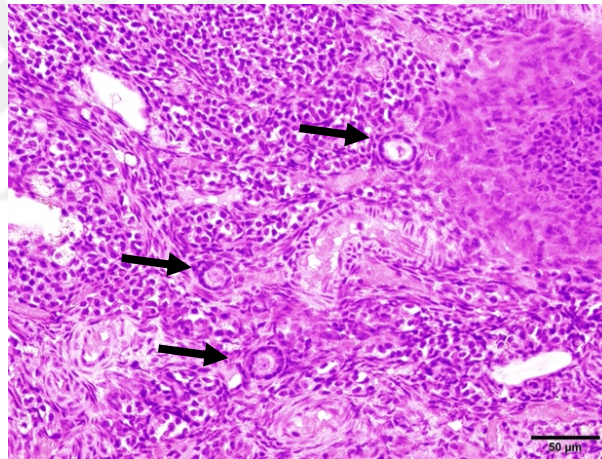
Şekil 4. Primordial folikül (Siyah ok)

2.1.3.2. Gelişimin Farklı Basamaklarındaki Foliküller

2.1.3.2.1. Primer Foliküller

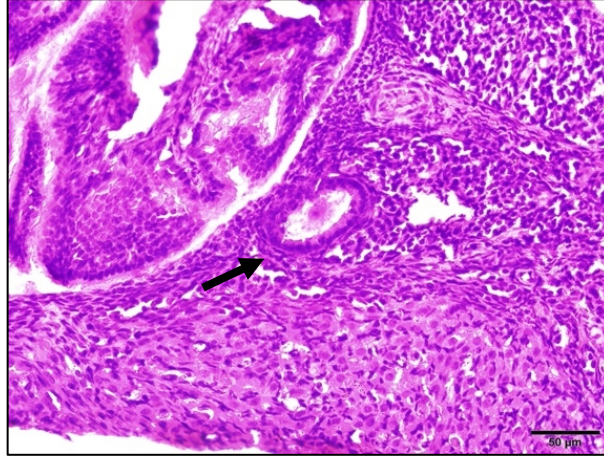
Parakrin sinyallerin etkisi ile, primordiyal folikül gelişmekte olan foliküle dönüşürken, oositte ve oositi çevreleyen folikül hücreleri ile stromal hücrelerde bazı değişiklikler meydana gelir. Primer folikülde kübik hücre katmanı halini alan

granüloza hücrelerinde folikül stimüle edici hormon reseptörlerinin (FSHR) ekspresyonu, oosit ve granüloza hücreleri arasında oluklu (gap) bağlantıların oluşumu, oosit çapı artışı (~40-45 µm) ve oositi çevreleyen glikoprotein tabaka olan zona pellusidanın birikimi dahil olmak üzere birçok temel ve önemli olay meydana gelir (Picton ve ark., 2008). Granüloza hücrelerinde FSHR ekspresyonu ile foliküler gelişim hipofizer gonadotropinlere yanıt olarak devam etmektedir. Primer foliküller granüloza hücrelerinin proliferasyon oranına bağlı olarak oluşturdukları hücre katmanı sayısına göre unilaminar ve multilaminar primer olmak üzere sınıflandırılır. Unilaminar primer follikül: Folikül içinde bulunan oositi çevreleyen tek katlı yassı folikül hücreleri (pre-granüloza) tek tabakalı kübik hücrelere dönüşür. Gelişimin bu basamağında, oosit ve oositi çevreleyen granüloza hücreleri arasında glikoproteinden zengin olan zona pellusida (ZP) tabakası oluşmaya başlar.



Şekil 5. Unilaminar primer folikül (Siyah oklar)

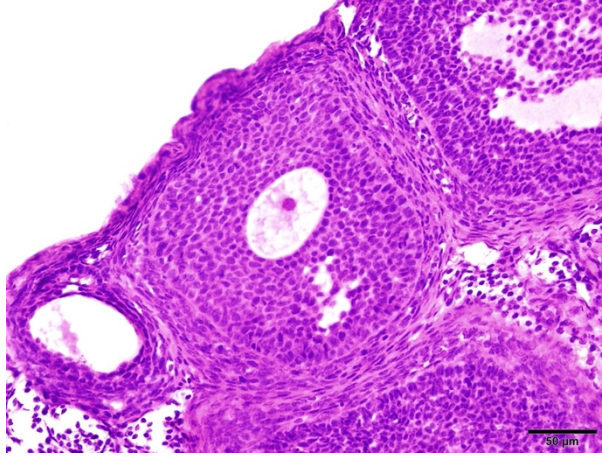
Multilaminar primer follikül: Folikül, içerisinde bulunan oositin etrafını çevreleyen granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile birlikte 3-5 tabakalı kübik hücrelerden oluşan granüloza tabakası ile çevrilidir. Zona pellusida glikoprotein birikiminin artışı ile kalınlaşır, folikülü çevreleyen stromal hücreler farklılaşarak teka folikülü adı verilen, folikülü çevreleyen kılıf yapısı halini alır.



Şekil 6. Multilaminar primer folikül (Siyah ok)

2.1.3.2.2. Sekonder (Antral) Foliküller

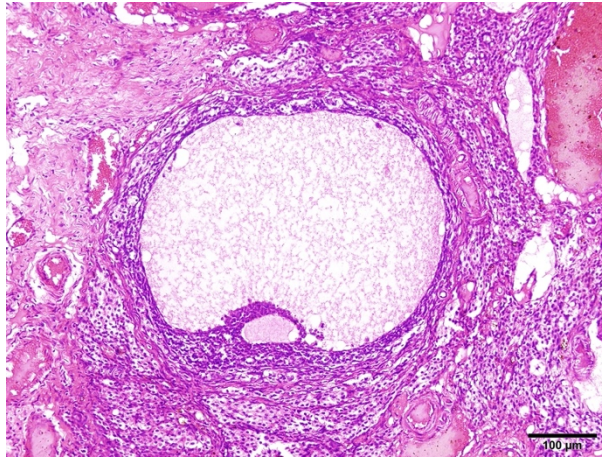
Multilaminar primer follikül gelişimine devam ederken, granüloza tabakası aktif granüloza hücre proliferasyonu ile 6-8 tabakalı kübik hücrelere dönüşür ve folikül çapı yaklaşık olarak 200 μm 'nin üzerine ulaşır (Picton ve ark., 2008). Folikül çapının hızlı artışı ile granüloza hücreleri arasında oluşan boşluklar “Call-Exner cisimleri” olarak adlandırılır ve bu boşluklar “liquor folliculi” adı verilen sıvı ile dolmaya başlar (de la Fuente ve ark., 2014). Hyalüronandan zengin liquor folliculi granüloza hücreleri arasında birikmeye devam eder ve folikül sıvısını oluşturur. Granüloza hücreleri arasında yer alan boşluklar birleşerek antrum adı verilen yarım ay şeklinde tek bir kaviteye dönüşür. Gelişimin bu basamağındaki folikül sekonder ya da antral folikül olarak adlandırılır. Folikül içerisinde yer alan asentrik çekirdekli oositin çapı yaklaşık olarak 125 -130 μm 'ye ulaşır (Picton ve ark., 2008). Folikülün etrafını çevreleyen stromal hücrelerden oluşan teka folikülü tabakasının diferansiye olması ile teka interna ve teka eksterna tabakaları oluşur. Teka interna tabakası iç kısımda yer alır. Agranüler endoplazmik retikulum içeren ve steroid sentezleyen kübik hücrelerden oluşur. Dış kısımdaki tabaka olan teka eksterna vasküler bağ dokusundan oluşur.



Şekil 7. Sekonder folikül

2.1.3.2.3. Matür (Graaf) Foliküller

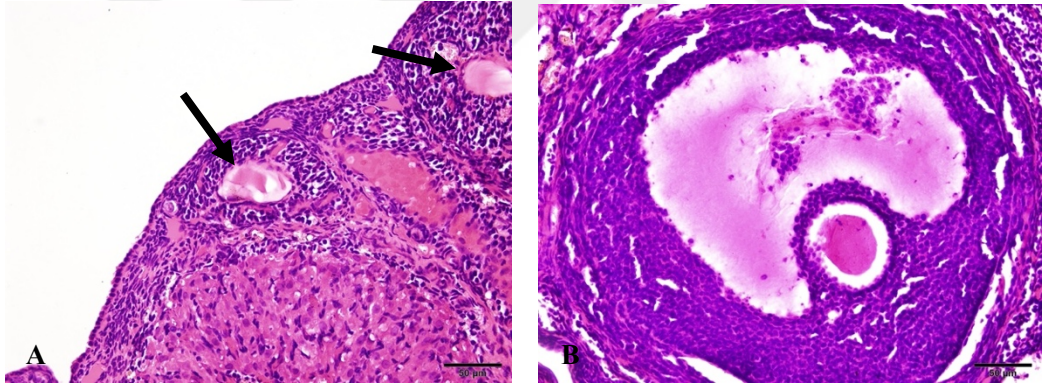
Foliküler gelişimin son basamağındaki matür (graaf) folikül artan boyutu (yaklaşık 10 mm ve üzeri çapında) ile sekonder folikülden ayırt edilir. Sekonder folikülde yer alan antrum genişler ve oosit folikülün bir tarafına doğru çekilir. Oositin etrafını çevreleyen ve antrum ile ilişkili birkaç sıra granüloza hücresine korona radiata adı verilirken, folikül duvarında yer alana granüloza hücrelerinden antruma doğru uzanan tepeciğe kumulus ooforus adı verilir (de la Fuente ve ark., 2014).



Şekil 8. Matür (Graaf) folikül

2.1.3.2.4. Atretik Foliküller

Her menstrüel siklusta birkaç dalga şeklinde primordiyal folikül havuzundan foliküller aktive olarak gelişimlerine devam ederler, ancak tek bir folikül gelişimini tamamlar ve ovulasyona uğrar. Aktive olan foliküllerin büyük bir kısmı gelişimin farklı basamaklarında atreziye uğrar. Foliküler atrezi süresinde ilk olarak oosit daha sonra granüloza hücreleri dejenere olur. Primordiyal foliküllerin atrezisi sonucunda oluşan boşluğun stroma hücreleri tarafından hızlıca doldurulması nedeniyle, atretik primordiyal foliküller doku kesitlerinde görülmez. Primer, sekonder ve matür (Graaf) foliküllerin atrezisi sonrasındaki kalıntılar ise makrofajlar tarafından ortadan kaldırılırlar ve stromal hücreler tarafından kollajenöz skar dokusu oluşturulur. Skar dokusu zamanla kaybolur ve yerini stromal doku alır. Atretik folikülde teka hücreleri kalabilir ve steroid salgılayan interstisyel hücrelere dönüşürler (Dash, 2003; de la Fuente ve ark., 2014; Spanel-Borowski, 2012).



Şekil 9. (A) ve (B) Atretik foliküller

2.2. Sıçan Dişi Üreme Sistemi

2.2.1. Sıçan Ovaryum Anatomisi

Sıçan ovaryumları, böbreklerin kaudal kutuplarında bulunur. Mezovaryum tarafından dorsal vücut duvarına bağlanır ve şeffaf bir elastik bursa (mezovaryum ve mezosalpinks tarafından çevrelenmiş küçük bir periton boşluğu) ile çevrilidir. Kan damarlarının ve sinirlerin ovaryum hilusuna girip çıktığı küçük bir kanal dışında, periovaryan kavite ovaryan bursa aracılığı ile abdominal kaviteden izoledir. Bilateral

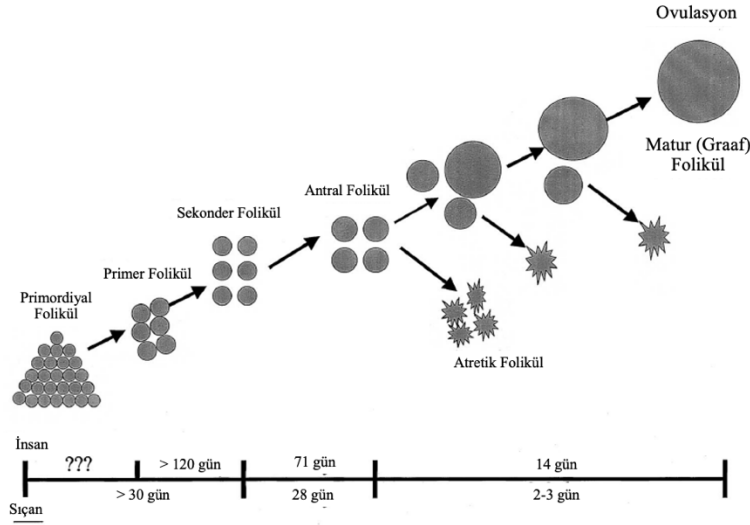
olarak yerleşim gösteren erişkin sıçan ovaryumları yaklaşık 5 mm çapında olup ortalama 60-100 mg ağırlığındadır (Treuting, Dintzis, & Montine, 2018).

2.2.2. Sıçan Ovaryum Embriyolojisi ve Foliküler Gelişim

Sıçanlarda ovaryum gelişiminin önemli aşamaları insandakine benzerdir; ancak, zamanlama büyük ölçüde dar bir süreç aralığında gerçekleşir. Farklılaşmamış gonadlar, her bir mezonefrozun ventrolateral yüzeyinde sölomik epitelin kalınlaşması olarak ortaya çıkar. Sıçanlarda hem germ hücrelerinin hem de somatik hücrelerin çoğalması ile birlikte genital kabartı yaklaşık olarak prenatal 10. günde (10,5) belirginleşir. Primordiyal germ hücreleri prenatal 12-13. günlerde genital kabartıya göç eder. Gelişmekte olan germ hücreleri (oogonia) ve epitelyal (pregranüloza) hücreler, ovaryum kordonları olarak adlandırılan ovaryum yüzey epiteli ile devam eden epitelyal yapılar halinde progresif olarak organize olurlar. Yaklaşık olarak prenatal 15. günde (15,5), oogonia ilk mayotik bölünmenin profazına girer. Partumda sıçan ovaryumu kordonlardan ve oogoniadan oluşur (McGee & Hsueh, 2000).

Primordiyal foliküller postnatal 3. günde oluşur ve ilk foliküler gelişim dalgası sonraki 3 hafta içinde gerçekleşir (Gelety & Magoffin, 1997; McGee, Perlas, LaPolt, Tsafiriri, & Hsueh, 1997; Rajah, Glaser, & Hirshfield, 1992). Doğum sonrası 7. günde sekonder foliküller gözlemlenir. Ovaryan hücre apoptozu postnatal 18. güne kadar minimal seviyede olsa da erken antral foliküller ovaryumda mevcuttur (McGee, Hsu, Kaipia, & J.w. Hsueh, 1998; McGee ve ark., 1997). Puberte başlangıcı yaklaşık 34. günde gerçekleşir. Düzenli östrus döngüleri, döngülerin uzayıp düzensizleştiği yaklaşık 10-12. aya kadar devam eder (McPherson, Costoff, & Mahesh, 1977; Wise, 1982). Sıçanlar 12-15 aylıkken kalıcı östrusa girer ve bunu kalıcı diöstrus ve nihayetinde anöstrus takip eder (Dudley, 1982; H. H. Huang, Steger, Bruni, & Meites, 1978). Erişkin sıçanlarda folikül gelişiminin zamanlaması insandakine benzer; ancak, embriyoner gelişimde de olduğu gibi süreç kısadır (Hirshfield, 1991). Folikülün çapı yaklaşık 25 mm'den (primordiyal foliküller) 500-800 mm çapa (preovulatuvar foliküller) 60 gün içinde (veya yaklaşık 15 östrus döngüsü) ulaşır. Primordiyal foliküllerin sekonder folikül aşamasına gelme süresi 30 günden fazla olabilir, sekonder foliküllerin antral folikül aşamasına gelmesi de 28

günü bulur. Antral folikül, graaf folikül aşamasına 2-3 gün içerisinde geçer ve ovulasyon gerçekleşir (Şekil 10) (McGee & Hsueh, 2000).



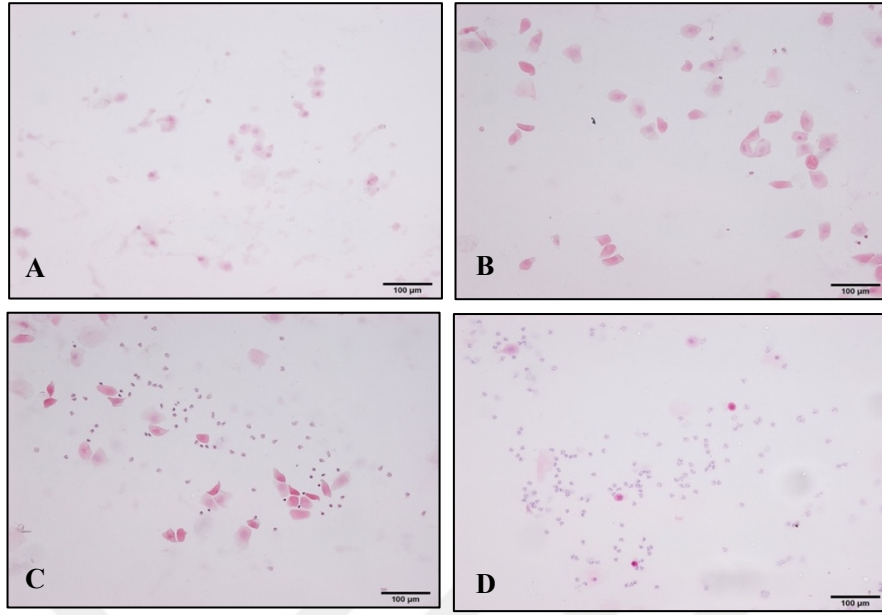
Şekil 10. Sıçanlarda ovaryum gelişiminin önemli aşamaları ve zaman dilimleri (gün) (McGee & Hsueh, 2000)

2.2.3. Sıçan Östrus Döngüsü

Östrus döngüsü, kemirgenlerde üreme döngüsünü ifade eder ve insan üreme döngüsüne benzer. Östrus döngüsü proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere dört evreden oluşur ve 4-5 gün sürer (Tablo 1) (Auta & Hassan, 2016). Dişi sıçanlarda puberte yaklaşık postnatal 4. haftadan (30. gün) sonra pulsatil lüteinizan hormon (LH) salınımı ile başlar (Ekambaram, Kumar, & Joseph, 2017). İlk proöstrus evresinden önce yaklaşık 8-9 günlük anöstrus evresini takiben diğer aşamalar gözlemlenir. Proöstrus evresi, dolaşımdaki estradiol konsantrasyonlarında bir artış ve prolaktinde küçük bir dalgalanma ile LH ve FSH salınımında bir artışa yol açar ve bu aşama insan foliküler fazına karşılık gelir. FSH konsantrasyonundaki pik seviye, östradiol seviyelerinde hızlı bir düşüşle sonuçlanır ve bu periyod ovulasyon ve östrus aşamalarını kapsar. Metöstrus ve diöstrus evreleri yüksek düzeyde progesteron seviyesi ile insanda üreme döngüsünün sırasıyla erken ve geç luteal fazı ile homologtur (Ajayi & Akhigbe, 2020).

Östrus döngüsünün evrelerini belirlemek için kullanılan en yaygın teknik vajinal sitoloji olarak kabul görmektedir. Non-invaziv bir uygulamadır ve nispeten

ucuzdur. Bu yöntem vajinal salgı hücrelerinin mikroskopik incelemesi için biraz beceri gerektirse de doğru ve güvenilirdir. Ancak bu yöntemin zahmetli ve zaman alıcı olduğu da bildirilmiştir (Sahoo, Nandy, Senapati, Sarangi, & Sahoo, 2014). Vajinal sekresyon üç tip hücreden oluşur. Lökositler, keratinize epitel hücreleri ve çekirdekli epitel hücrelerini içerir. Östrus döngüsünün evre tahmini, bu hücrelerin vajinal sekresyondaki oranına dayanır (Tablo 1) (Ajayi & Akhigbe, 2020). Büyüklük ve görünüm olarak aynı olan çok sayıda yuvarlak çekirdekli epitel hücresi proöstrus evresine özgüdür. Bu hücreler kümeler halinde veya ayrı ayrı görünürler. Ayrıca birkaç çekirdeksiz keratinize epitel hücresi ve bazı beyaz kan hücreleri erken proöstrusta bulunabilir. Östrus evresinde bol miktarda çekirdeksiz keratinize epitel hücreleri gözlemlenir. Hücre sitoplazmaları granülerdir ve hücrelerin şekli düzensizdir. Ayrıca çok sayıda bakteri ve nadiren çekirdekli epitel hücreleri de gözlenir. Metöstrusta çok sayıda lökosit ve az sayıda büyük, non-granüler ve çekirdeksiz keratinize epitel hücreleri görülür. Progesteron eksikliği nedeniyle tam olarak lüteinize olamayan korpus luteum oluşumu vajinal sürüntülerde bulunan keratinize epitel hücreleri ve polimorfonükleer lökositlerden sorumludur. Geç metöstrusta bazı çekirdekli epitel hücreleri de bulunabilir. Diöstrus, belirgin polimorfonükleer lökositler, birkaç epitelyal ve keratinize hücre gösterir. Lökositler hücre kalıntıları ortadan kaldıran baskın hücre tipi olmaya devam etmektedir (Şekil 11) (Auta & Hassan, 2016; McLean, Valenzuela, Fai, & Bennett, 2012).



Şekil 11. (A) Proöstrus evresi, (B) Östrus evresi, (C) Metöstrus evresi, (D) Diöstrus evresi

Tablo 1. Östrus döngüsü evreleri ve vajinal sekresyondaki hücre oranlarına göre tayini (Ajayi & Akhigbe, 2020)

Östrus Döngüsü Evresi	Döngü Zamanı (saat)	Lökosit Hücre Yoğunluğu	Çekirdekli Epitel Hücre Yoğunluğu	Çekirdeksiz Keratinize Epitel Hücre Yoğunluğu	Göreceli Hücre Yoğunluğu
Proöstrus	14	0/+	++/+++	0/+	+/++
Östrus	24-48	0/+	0/++	++/+++	++/+++
Metöstrus	6-8	+/+++	+/++	+/+++	++/+++
Diöstrus	48-72	++/+++	+/++	0/+	+/++

*(0) negatif, (+) zayıf pozitif, (++) orta derece pozitif, (+++) şiddetli pozitif

2.3. Prematür Ovaryan Yetmezlik (POI)

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yıl sürecinde gebeliğin gerçekleşmemesi şeklinde tanımlanan infertilite, reproduktif periyotta olan çiftlerin %15'inde görülmektedir (Thoma ve ark., 2013). İnfertilitenin hem erkek hem de kadın faktörlere bağlı birçok nedeni bulunmakla birlikte, ovaryan rezervi oluşturan primordiyal folikül sayısında azalma ve oosit kalitesinde azalmayı ifade eden düşük over rezervi (DOR) olguları ülkemizde tedavi edilen infertil çiftlerin % 32,1– % 36.1 gibi büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (Yakin, Urman, & Balaban, 2022). Düşük over rezervinin yaşa özgü formu olan prematür ovaryan yetmezliği (POI), over rezervinde ve ovaryan seks hormonlarında

ciddi bir azalma ile karakterize olup, 35 yaşın altında 250 kadından 1'inde ve 35-40 yaş arasında 100 kadından 1'inde görülmektedir (Ulin ve ark., 2021). İatrojenik faktörlere (cerrahi, kemoterapi veya radyasyon tedavisi) ek olarak, spontan POI'nin etiyolojileri arasında Turner sendromu veya Turner mozaiginin varyantları, Frajl X sendromu ve otoimmün bozukluklar bulunur. Ancak çoğu durumda etiyoloji bilinmemektedir (Maclaran & Panay, 2015). Klinik olarak teşhisinde; 40 yaş altında amenore görülmesi ve buna ek olarak düşük östrojen seviyesi (E2) ile yüksek FSH seviyelerinin tayinidir (Pal, Torrealday, & Kodaman, 2017). Ancak spontan POI olgularında over rezervinde ciddi azalma olmasına karşın, ovaryum korteksinde ovaryum rezervini oluşturan primordiyal foliklerin az sayıda da olsa yer aldığı ve buna bağlı gebelik eldesi şansı olduğu bilinmektedir (Mduri ve ark., 2007).

Prematür ovaryan yetmezliği olgularında ovaryum morfolojisi ve histolojisi sağlıklı kadınlara kıyasla farklılıklar göstermektedir. Gonadal disgenezi'de ovaryan foliküller, embriyonik gelişim sürecinde veya postpartum ilk bir yıl içinde tükenir. Ovaryumda folikül kalmaz sadece fibröz çizgiler olarak görünen stroma vardır (Fritz & Speroff, 2011). POI olgularında ise ovaryumda, yüksek doz gonadotropinlere dirençli olmalarına rağmen folikül bulunur. Ovaryum histolojisi POI'nin fenotiplerine göre değişir. Ancak çoğu antral folikül histolojik olarak anormal morfolojili ve atretiktir (Mduri ve ark., 2007). POI olgularında ovaryan rezerv ve foliküllerin değerlendirilmesi bakımından histolojik analiz önemlidir (Massin ve ark., 2004). Ovaryumdaki morfolojik değişiklikleri incelemek, foliküler rezervinin azalmasının nedenlerini anlamaya ek olarak, POI tipini tanımlamaya ve gerçek etiyolojiyi belirlemeye yardımcı olabilir (Massin ve ark., 2004). Histolojik çalışmalara göre foliküllerden yoksun ve küçük boyutlara sahip ovaryum tipi ve kısmen foliklere sahip normal boyutlara sahip ovaryum tipi olmak üzere iki tip POI bulunabilir. Atretik foliküller ve aktif primordiyal foliküllerin olmadığı tipte, kolajen açısından zengin bir bağ dokusu kapsül ile çevrili eozinofilik bir kütleden oluşan stroma ve korpus albicans bulunur. Primordiyal foliküller bulunan tipte ise foliküler gelişim görülmezken, primordiyal foliküllerin çevresinde lenfatik infiltrasyona rastlanabilir.

Fare ve sıçan POI modelleri; genetik ve moleküler mekanizmaların tanımlanabilmesine ek olarak yeni terapötiklerin geliştirilmesine olanak tanır. Her iki

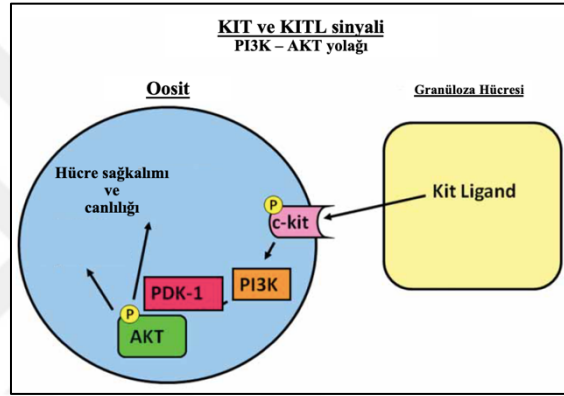
denekte ovaryum embriyonik gelişim süreçleri ve fonksiyonu bakımından insanlarla yüksek derecede benzerliğe sahiptir. Ovulasyon zamanı ve mono-poliovülasyon dahil olmak üzere bazı varyasyonlar ve fiziksel farklılıklar dışında POI'den sorumlu benzer bir genetik yol düzenlenimi sergiler (Na & Kim, 2020). POI'nin en yaygın hayvan modelleri intraperitoneal (ip), subkütan (sc) veya intravenöz (iv) enjeksiyon yoluyla uygulanabilen 4-vinilsikloheksen diepoksit (VCD), siklofosfamid, busulfan, cisplatin ve murin ZP3 330-342 peptitleri ile kimyasal indüksiyon tarafından oluşturulmuştur (Na & Kim, 2020). Buna ek olarak, ovaryan fonksiyonun erken sonlanma mekanizmalarını incelemek için doğal yaşlı bir model (NOA- 12-14 aylık fareler veya sıçanlar) de kullanılmıştır (J. Li ve ark., 2017). Ovaryumların cerrahi yaralanması ovaryum fonksiyonunun erken sonlanmasına neden olduğundan, ovaryumları alınmış (OVX) modeller de kullanılmıştır (Bucher, Huff, & Kluwe, 1986).

2.4. 4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD)

Bazı çevresel etmenler ile maruz kalınan kimyasal maddelerin primordiyal folikül hasarı oluşturarak prematür ovaryan yetmezlik etmeni olduğu çeşitli hayvan çalışmaları ile gösterilmiştir. Bu kimyasallardan biri de 4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD) olarak tanımlanmıştır (Kappeler & Hoyer, 2012). Amerikan Toksikoloji Programı tarafından yönetilen projede VCD uygulamasının hem sıçan hem de fare için potansiyel karsinojenik etkileri olduğu tanımlanmış, ek olarak uzun süreli maruziyetlerde (13 hafta) ovaryan ve uterin atrofiye neden olduğu raporlanmıştır. Ovaryumda folikül ve korpus luteum görülmediği de bildirilmiştir (Frech, 1989). Bu veriler VCD'nin direkt olarak ovaryan foliküller üzerinden etkisini gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır (Hoyer & Sipes, 2007). Günlük tekrarlayan dozlarda VCD'nin ovaryan foliküller üzerinde etkisinin incelendiği çalışmada, özellikle primordiyal ve primer foliküllerde toksik hasara yanıt olarak hücre ölüm seçeneği nekroz yerine programlı hücre ölümü-apoptoz (foliküler atrezi) oranının daha yüksek olduğu raporlanmıştır (Springer ve ark., 1996).

Moleküler düzeyde VCD'nin foliküller üzerinde etkileri incelendiğinde, oosit ve oositi çevreleyen granüloza hücreleri arasındaki hücresel iletişimden sorumlu "Proto-oncogene receptor tyrosine kinase" (KIT) ve ligantı (KITL) sinyal yolağının

inhibisyonunda etkin olduğu in vitro kültür ortamında gösterilmiştir (Fernandez ve ark., 2008). KIT ve KITL sinyal yolağı primordiyal ve primer foliküllerin sağkalımı ve oosit canlılığında rol oynar, yolağın aktive olması ile PI3K yolağı aktive olur (Reddy ve ark., 2005). PI3K yolağının aktivasyonu ile fosforile AKT (pAKT) nükleusa geçerek primordiyal folikülden primer foliküle geçiş aşamasını tetikler (Liu ve ark., 2006; Reddy ve ark., 2005). Prematür ovaryan yetmezlik primordiyal folikül havuzunun kontrolsüz tükenmesine bağlı olarak gözlemlenmektedir. Bu nedenle, VCD, ksenobiyotiklerin primordiyal ve primer foliküller üzerindeki seçici etkilerini incelemek için ideal bir kimyasal model olarak belirlenmiştir (Reddy ve ark., 2005).



Sekil 12. 4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD) uygulamasının foliküler aktivasyonda moleküler mekanizması (Kappeler & Hoyer, 2012)

POI'nin hayvan modelinin oluşturulmasında VCD enjeksiyonunun bazı avantajları mevcuttur. VCD enjeksiyonlarından sonra zaman aralıkları hesaplanarak menapozal evreleri (pre-, peri-, post) kapsayan uzun süreli çalışmalar yapılabilir olması (Mayer, Devine, Dyer, & Hoyer, 2004), çevresel dokularda hasar yaratmaması (Muhammad ve ark., 2009), model oluşumunda cerrahi bir işlem veya genetik değişim uygulanmaması (Van Kempen, Milner, & Waters, 2011) ile in vivo ve in vitro olarak etkinliğinin test edilmiş olması (Mayer ve ark., 2002) mevcut olan avantajlarıdır.

2.5. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon ART tedavisinin önemli bir basamağıdır. Bu kapsamda mümkün olan en güvenli şekilde, optimum sayı ve kalitede oosit eldesi

amaçlanmaktadır. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon gonadotropin salgılayan hormon analoglarının (GnRH agonisti veya antagonisti) kullanıldığı hipofiz baskılama ile başlar. GnRH analogları hipofiz fonksiyonunu inhibe ederek, erken endojen luteinizan hormon seviyesindeki artışı engeller. Hipofizer baskılama olmadığında döngülerin %35'inde erken ovulasyon meydana gelir (Howie & Kay, 2018). GnRH agonistleri standart, kısa veya ultra uzun bir protokol kullanılarak uygulanabilir (Macklon, Stouffer, Giudice, & Fauser, 2006). Hipofizer regülasyonun ardından multifoliküler gelişimi sağlamak için eksojen gonadotropinlerin (FSH ve LH) uygulanmasına başlanır (Macklon ve ark., 2006). Hasta karakteristik özellikleri dikkate alınarak uygulanacak gonadotropinlerin dozu belirlenir. Siklus monitörizasyonu ile foliküler gelişim takip edilir ve final oosit matürasyonu ile ovulasyonun tetiklenmesi tek doz insan koryonik gonadotropini (hCG), GnRH agonisti veya her ikisinin uygulanmasıyla gerçekleştirilir (Bosch, Labarta, Kolibianakis, Rosen, & Meldrum, 2016; Fleming, Seifer, Frattarelli, & Ruman, 2015).

2.6. Prematür Ovaryan Yetmezlik ve Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon

Prematür ovaryan yetmezliği olguları ART kliniklerinde başarı eldesinin en zor olduğu hasta gruplarından biridir. Bu nedenle, bu hasta grubunda gebelik sonuçlarını iyileştirmek için çeşitli stimülasyon rejimleri ve bu rejimlere çeşitli eklentiler önerilmiştir. Bu stratejiler arasında hipofiz baskılaması için farklı rejimler, artan gonadotropin dozajları, ovaryan stimülasyon sırasında adjuvan ajanların eklenmesi ve modifiye doğal siklus uygulanması yer alır (Orvieto ve ark., 2008; Pandian, McTavish, Aucott, Hamilton, & Bhattacharya, 2010; Polyzos ve ark., 2009; Schoolcraft, Surrey, Minjarez, Stevens, & Gardner, 2008). Hipofiz baskılaması için farklı rejimler olan GnRH agonistlerinin standart, kısa veya ultra uzun bir protokol olarak kullanıldığı sikluslarda elde edilen embriyo sayısı ve transfer edilen embriyo sayısı birbiri ile benzerdir (Pandian ve ark., 2010). Yüksek dozlarda gonadotropin içeren, agresif kontrollü ovaryan stimülasyon sıklıkla çeşitli yan etkiler ve daha yüksek maliyetlerle ilişkilendirilir (Cheung ve ark., 2005; Kailasam, Keay, Wilson, Ford, & Jenkins, 2004). Buna ek olarak POI olgularında, artan gonadotropin dozunun gebelik sonuçlarını etkilemediği gösterilmiştir (Pandian ve ark., 2010). Öte

yandan, sınırlı sayıda toplanan oosit eldesine bağılı olarak siklus iptal oranlarındaki artış POI için doğıal siklus uygulanmasının etkinliğini düşürür. Bu nedenle, ART sonuçlarını iyileştirmek için POI olgularında kontrollü ovaryan stimölasyon sırasında ek adjuvan tedavi uygulanması önerilmektedir. Adjuvan veya tamamlayıcı tedavi, kontrollü ovaryan stimölasyonda GnRH analogları ve gonadotropinler dışında kullanılan herhangi bir ek tedavi olarak tanımlanmaktadır. Etki mekanizmalarının geniş çeşitliliğı göz önüne alındığında, foliküler gelişimi, oosit matürasyonu ve embriyo kalitesini iyileştirerek veya endometrial reseptiviteyi artırarak gebelik sonuçlarını iyileştirmek için birçok adjuvan tedavi önerilmiştir. Güncel olarak kontrollü ovaryan stimölasyona eklenmesi önerilen adjuvan tedaviler, androjen takviyesi (testosteron ve dehidroepiandrosteron) (Bosdou ve ark., 2012; Kotb, Hassan, & AwadAllah, 2016; Narkwichean ve ark., 2017; Saharkhiz ve ark., 2018) veya androjen düzenleyici ajanlar (letrozol- aromataz inhibitörü) (Bastu ve ark., 2016; Ebrahimi, Akbari-Asbagh, & Ghalandarpour, 2017; Yu, Jin, Huang, Lin, & Wang, 2018), steroid hormonları (östradiol ve progesteron) (Davar, Neghab, & Naghshineh, 2018; Davar, Rahsepar, & Rahmani, 2013), rekombinant LH (rLH) (Ferraretti ve ark., 2014; Humaidan ve ark., 2017; Younis, Izhaki, & Ben-Ami, 2016), klomifen sitrat (Karimzadeh, Mashayekhy, Mohammadian, & Moghaddam, 2011; Pilehvari ve ark., 2016; Schimberni ve ark., 2016; Siristatidis ve ark., 2017), büyüme hormonu (GH) (Bassiouny, Dakhly, Bayoumi, & Hashish, 2016; Choe ve ark., 2018; Dakhly ve ark., 2018) ve koenzim Q10 (CoQ10) (Y. Xu ve ark., 2018) uygulamalarını kapsamaktadır. Bu uygulamalar yüksek maliyetli ve henüz gelişme aşamasındadır. En önemlisi güvenlik ve etkililik konusunda açık klinik kanıtlardan yoksundur. Kontrollü ovaryan stimölasyona eklenen adjuvan tedavi olarak önerilen non-invazif bir eklentinin invazif uygulamalara kıyasla rutin uygulamaya girişı daha kolay olsa da randomize çalışmaların verilerine göre etkisiz olduğı ve hatta bazı durumlarda zararlı olmasının mümkün olduğı düşünülmektedir. POI olgularında foliküler gelişimi, oosit matürasyonu ve embriyo kalitesini iyileştirmek amacıyla invazif ve deneysel tedavi modaliteleri de kullanılmaktadır. Bu kapsamda; intraovaryan kök hücre enjeksiyonu ve plateletten zengin plazma enjeksiyonu üzerinde yapılan deneysel çalışmalar mevcuttur.

2.7. Plateletten Zengin Plazma (PRP)

Trombositler (plateletler), kan elemanlarının (fibrin, eritrosit, lökosit) damar iç yüzüne kitle (pıhtı) halinde yapışmasının başlamasından sorumlu küçük, çekirdeksiz hücrelerdir. Pıhtı kitlesi (trombüs) oluşumundaki birincil adım trombosit aktivasyonudur. Trombositlerin aktivasyonu trombin, kollajen, adenosin difosfat (ADP), tromboksanlar, serotonin, oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) ve hücre dışı katyonlar dahil ve bunlarla sınırlı olmayıp sonsuz sayıda agonist tarafından sayısız mekanizma yoluyla meydana gelebilir (Z. Li, Delaney, O'Brien, & Du, 2010; Lopez-Vilchez, Diaz-Ricart, White, Escolar, & Galan, 2009; Shen ve ark., 2017; Wraith ve ark., 2013). Aktivasyona trombositin yanıtı, intrasitoplazmik granül içeriğinin salınmasıdır. Trombosit granülleri, her ikisi de vasküler hasara etkili bir trombosit yanıtı için kritik faktörlerle dolu olan, alfa ve yoğun lizozomal granüller olarak ayrılmaktadır. Sayıca en çok olan alfa granülleri 300'den fazla sayıda farklı protein içerir. Büyük bir kısmı ana megakaryositlerden sentezlenir. Alfa granüllerinde zimojen formda yer alan büyüme faktörlerinin doku iyileşmesi ve hemostazdaki rolü önemlidir. Az sayıda olan yoğun granüller; serotonin, ADP, adenosin trifosfat (ATP), guanozin difosfat (GDP), guanozin trifosfat (GTP), histamin, kalsiyum, magnezyum, polifosfat gibi sadece birkaç küçük molekülü içerir. Trombosit lizozomlarının trombosit özel fonksiyonu olup olmadığı tam olarak bilinmemekle birlikte pıhtı lizisinde görev aldığı düşünülmektedir. Plateletten zengin plazma (PRP), kan plazma fraksiyonunda yüksek konsantrasyonlu trombositler olarak tanımlanır. Tipik olarak flebotomi (venden kan alma işlemi) ile sitrat veya EDTA bazlı bir antikoagülan içeren tüpe alınan kandan izole edilir. Kan örneği santrifüjlemeye tabi tutulur ve kırmızı kan hücreleri ile bağışıklık hücrelerinin uzaklaştırılması sonucunda plazma içinde yüksek konsantrasyonda trombosit elde edilir. Elde edilen yüksek konsantrasyonlu trombositlerin değişkenlik gösteren aktivatörler (trombin, kalsiyum, ADP, kollajen) ile aktive edilmesi sonrasında plateletten zengin plazma elde edilmiş olur. Bu genel yöntemin dışında, belirlenmiş bir trombosit konsantrasyonu sağlayabilen ticari PRP kitleri mevcuttur. Son yıllarda, özellikle rejeneratif tıpta otolog kandan hızlı ve basit olarak elde edilip kısa sürede uygulanabilmesi ve immün cevabı tetiklememesi nedeniyle PRP uygulamaları geniş kullanım alanına sahiptir. Kas-iskelet sistemi uygulamaları (Scully ve ark., 2019,

2020), oral-maksillofasiyal uygulamaları (J. Xu, Gou, Zhang, Li, & Qiu, 2020) ve osteoartrit (Evans ve ark., 2020) üzerinde PRP'nin pozitif etkisi gösterilmiştir. Bu nedenle; PRP uygulamaları önemli bir ilgi odağı olmuştur.

Literatürde yardımcı üreme tekniklerinde PRP uygulamaları kapsamında yapılan çalışmalar mevcuttur. İlk olarak raporlanan çalışmada dondurulmuş ovaryum dokusunun çözülerek periton içerisine verilmesi sırasında PRP jel formunda ovaryum dış yüzeyine pro-anjiyojenik ve proliferatif bir ajan olarak uygulanmıştır. Yardımlı üreme tekniklerinin kullanıldığı bir siklus sonucunda oosit ve embriyo elde edilmiştir. Yapılan embriyo transferi ile canlı doğum raporlanmıştır (Callejo ve ark., 2013). Güncel yaklaşımlar arasında PRP'nin doğrudan ovaryum dokusu içerisinde enjeksiyonunu raporlayan birçok çalışma mevcuttur. Pantos ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışma, sadece sekiz perimenopozal dönemde kadını içermesine karşın, intraovaryan PRP uygulanması sonrasında ovaryan fonksiyonların geri kazanıldığını ve foliküler gelişim döngüsünün yeniden başladığını gösteren ilk bildiridir (Pantos ve ark., 2016). Bu çalışmayı takiben, Sills ve ark. (2018) infertilite öyküsü olan hastalarda intraovaryan PRP uygulanması sonrasında matür oosit eldesi ve embriyo transferini raporlamıştır (Sills, Rickers, Li, & Palermo, 2018). Diğer çalışmalarda da benzer vakalar bildirilmiştir. İntraovaryan PRP uygulanması sonrasında, ovaryumda yumurtalık rezervi belirteci olarak kabul edilen Anti-Müllerian Hormon seviyesinin artışı ve FSH düzeylerinin düşmesini sağlayarak folikülogenez, önemli düzeyde oosit toplanması ve az sayıda vakada spontan gebelik elde edilmiştir (Farimani ve ark., 2019; Hsu ve ark., 2020; Pantos ve ark., 2019; Sfakianoudis ve ark., 2019). Yapılan bu vaka çalışmalarında intraovaryan PRP uygulanması cesaret verici görünse de deneysel tasarımlar bakımından çalışmaların ortak özelliği sahte enjeksiyon grubunun (sham) olmamasıdır. Ovaryumlarda prosedürden kaynaklanan mekanik gerilme ve/veya hafif yaralanmanın, ovaryum fonksiyonunun geçici olarak yeniden başlamasına yol açan bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkarmak için yeterli olduğu düşünülebilir ve ovaryumların enjeksiyon sırasında yaralanması, PRP tedavisinin başarısında nedensel bir faktör olabilir. Sıçan düşük ovaryan rezervi modelinde intraovaryan PRP uygulanması yapılan bir çalışmada; sham enjeksiyon (salin) grubu ve enjeksiyon yapılmayan grupta normal morfolojili folikül tespit edilememiştir. Bu

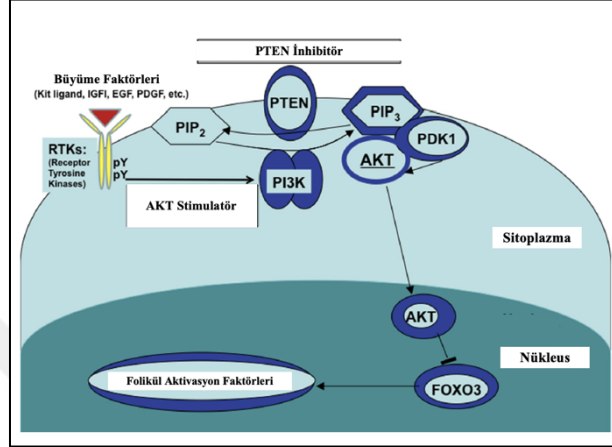
çalışma, salin enjeksiyonunun bu hayvan modelinde ovaryan yetmezliğinin etkilerini tersine çevirmek için yeterli olmadığını göstermiştir (Ahmadian ve ark., 2020).

Trombosit aktivasyonunun karmaşıklığı göz önüne alındığında, trombositlerin tüm fizyolojik etkilerini nasıl başlattığının kesin ayrıntıları belirsizliğini korumaktadır. Bununla birlikte, trombositlerin aktivasyona yanıt olarak bir dizi sitokin saldığı iyi bilinmektedir (Roh ve ark., 2016). Sitokin sinyallemesinin oosit, granüloza ve teka hücreleri arasındaki karşılıklı ilişkide yer aldığı ve folikül olgunlaşması, ovulasyon ve luteinizasyonda önemli roller aldığı gösterilmiştir (Field ve ark., 2014; Orisaka ve ark., 2006). Folikül gelişimini düzenleyen bir dizi sitokin, aynı zamanda trombosit aktivasyonu sırasında alfa ve yoğun granül içeriklerinin salgılanması yoluyla trombositler tarafından da salındığı gösterilmiştir (Atkinson ve ark., 2021). Bu nedenle, PRP'nin içerdiği folikül olgunlaşmasını uyaraabilen proanjyogenik, proliferatif ve proinflatuar faktörler nedeniyle bireyselleştirilmiş, maliyet etkin bir uygulama olduğu hipotezi mevcuttur.

2.8. Primordiyal Folikül Aktivasyonunun Moleküler Mekanizmaları

Primordiyal folikül aktivasyonu dinamik bir süreç olup moleküler mekanizması kısmen aydınlığa kavuşmuştur. Folikül aktivasyonu normal fizyolojik koşullar altında karmaşık aktivatör ve baskılayıcı yollar tarafından sıkı kontrol edilir. Hücre bölünmesi ve apoptoz gibi hücre sel süreçlerde rol oynayan “Fosfataz ve tensin homolog / fosfotidilinositol-3-kinaz” (PTEN/PI3K) sinyal yolağı folikül aktivasyonunu indüklerken, gelişmekte olan foliküller tarafından salgılanan inhibitör parakrin hormon AMH yoluyla folikül aktivasyonu inhibe edilir. Folikül aktivasyonunun bu sinyallerle dengede tutulması sağlanır (Hsueh ve ark., 2015). Primordiyal ve primer foliküllerde PTEN/PI3K sinyal yolağı fonksiyoneldir ve folikül aktivasyonunu indükler (Reddy ve ark., 2005). PTEN/PI3K yolağının aktivasyonunu takiben serin/threonin protein kinazı olan “protein kinaz B” (AKT) fosforilasyon ile aktive olur. Bu aktivasyon ile hücre proliferasyonu ve sağ kalımı indüklenir. Bu yolda PTEN, PI3K aktivasyonunu baskılayan regülatördür. PTEN ekspresyonu yokluğunda PI3K aktivasyonu sonucu oositlerde fosforile AKT (pAKT) ve “Forkhead box O3” (FOXO3a) ekspresyonu artar. FOXO3a apoptozun inhibisyonu ile hücre döngüsünün duraksamasını başlatan kilit transkripsiyon

faktörüdür. Fosforillenerek aktive olan AKT (pAKT), direkt olarak FOXO3a'yı baskılar. Hücre döngüsü baskılanmasının ortadan kalkmasını takiben foliküler aktivasyon gerçekleşir. İn vitro primordiyal folikül aktivasyonu ve pre-ovulatuvar foliküllerin gelişimi; PTEN/PI3K sinyal yolağının manipülasyonu (PTEN inhibitörü ve AKT stimülatörü uygulanması) ile gerçekleştirilir (Hsueh ve ark., 2015).



Şekil 13. PTEN inhibitörü ve AKT stimülatörü uygulanması ile foliküler aktivasyon sinyal yolağı (Hsueh ve ark., 2015)

Primordiyal foliküllerin gelişimsel duraksamasını kontrol eden diğer bir sinyal yolağı “the tumor suppressor tuberous sclerosis complex 1” ve “the tumor suppressor tuberous sclerosis complex 2” (Tsc1 ve Tsc2)’dir. Tsc1 ve Tsc2 mutasyonu hayvan modellerinde primordiyal foliküllerin kontrolsüz aktivasyonu sonucu prematür ovaryan yetmezlik ile sonuçlanır (Adhikari & Liu, 2009). Bu komplekslerin aktivasyonu sonrasında “memeli rapamycin complex 1 (mTORC1)” yolağı aktive olur. “Proto-oncogene receptor tyrosine kinase” (KIT) ve ligantı (KITL) erken dönemde öncelikle somatik hücrelerden ve daha sonra oositte eksprese edilir. Teka hücrelerinin diferansiyasyonu, granüloza hücre proliferasyonu ve oosit matürasyonunu düzenleyerek foliküler aktivasyonun başlamasından sorumludur (Adhikari & Liu, 2009). İn vitro olarak, PI3K/AKT yolağının düzenlenmesinin diğer bir yolu da KIT ligand uygulanması sonrasında AKT aktivasyonunun gerçekleşmesi ve takiben FOXO2 transkripsiyonunun baskılanması ile sağlanır (Reddy ve ark., 2005).

Primordiyal folikül aktivasyonunda etkin bir diğer yolak olarak Hippo sinyal yolağı tanımlanmıştır (Hsueh ve ark., 2015). Hippo sinyal yolağı; hücre yoğunluğunun fazla olduğu dokularda hücre membran etkileşim ve bağlantıları ile

aktive olabilen ve türler arasında yüksek oranda korunmuş bir kinaz kaskadıdır. Bu yolağın aktivasyonu hücre proliferasyonunu indükleyen “yes associated protein” (YAP)’in fosforile olarak inaktivasyonu ile sonuçlanır. Bu fonksiyonel yolak ile hücrelerin yoğun olduğu dokularda hücre gelişimi ve proliferasyonu inhibe edilirken, hücre yoğunluğunun daha az olduğu alanlarda yolak inaktivasyonu ile hücre proliferasyonu ve büyümesi desteklenir.

2.9. Çalışmanın Amacı

“İnfertilite sebeplerinden biri olan prematür ovaryan yetmezliği olgularında, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokolü öncesinde intraovaryan plateletten zengin plazma uygulaması ovaryan foliküllerin aktivasyonunu sağlar ve doğum başına düşen yavru sayısını artırır” hipotezinden yola çıkarak, sıçanlarda prematür ovaryan yetmezliği modelinde KOH öncesi intraovaryan PRP uygulamasının; PTEN/PI3K yolağı üzerinden foliküler aktivasyon ve doğum başına düşen yavru sayısı üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

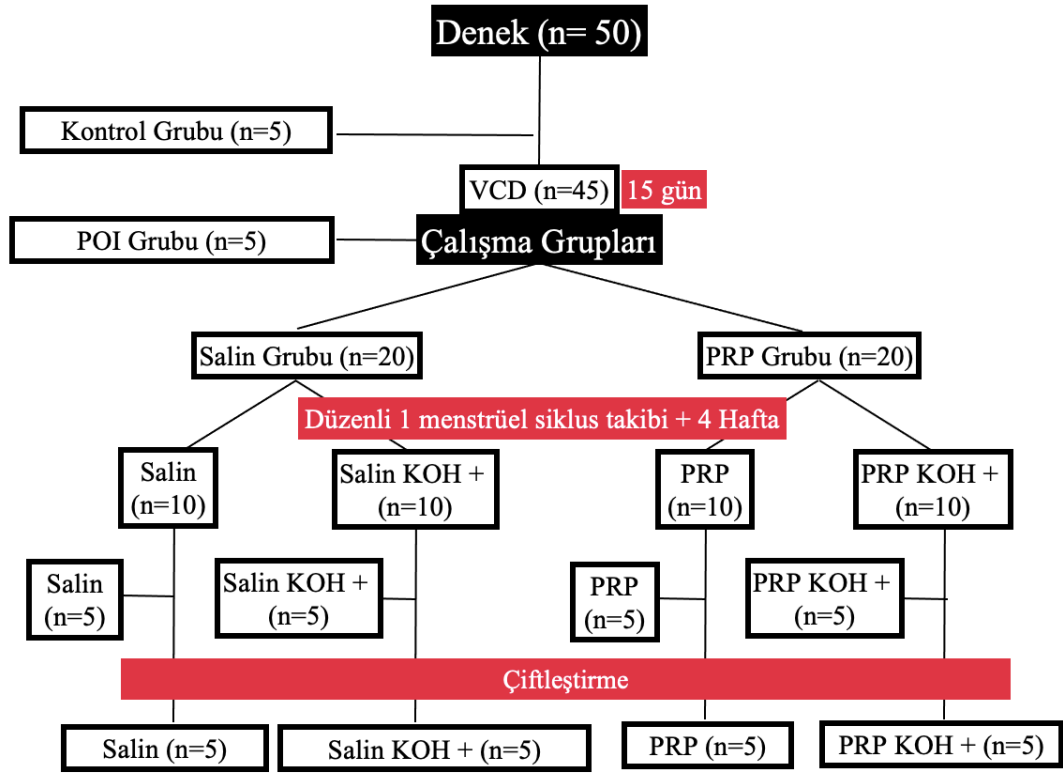
3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamıza Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu 05.04.2022 tarih ve 22-05/08 karar no ile etik kurul onayı sonrasında başlandı. Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi (DEHYUAM)’nden çalışmada kullanılmak üzere 50 adet, yaklaşık 60 günlük, ortalama 150-200g ağırlığında Spraque-Dawley cinsi dişi sıçan temini gerçekleştirildi. Denekler su ve besin kısıtlaması olmaksızın, ışık periyodu 12 saat aydınlık ve karanlık olmak üzere, en fazla 5 denek aynı kafeste olacak şekilde DEHYUAM’de takip edildi. Denekler üzerinde yapılan tüm işlemler DEHYUAM cerrahi girişim alanı ve Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2. Deney Grupları

Çalışma başlangıcında tüm deneklerin ağırlıkları ve serum Anti-Müllerian Hormon düzeyleri, homojen dağılım gösteren ağırlık ve ovaryan rezerve sahip deneklerin çalışmaya dahil edilebilmesi için belirlendi. Birinci ve üçüncü çeyrek (%25 ile %75’lik) dilimler arasında tespit edilen ağırlık ve serum AMH değerlerine sahip denekler çalışmaya dahil edildi.

Çalışma kapsamında denekler; temel olarak prematür ovaryan yetmezliği (POI) grubu ve kontrol grubu olarak 2 ana klinik gruba ayrıldı. Bu ana gruplardan kontrol grubuna ait 2 alt grup ve prematür ovaryan yetmezliği (POI) grubuna ait 4 alt grup oluşturuldu. Her bir alt grupta 5’er denek bulunmaktadır. Çalışma grupları Şekil 14’de şema olarak sunulmuştur.



Şekil 14. Çalışma grupları ve alt grupları

Normal ovaryan rezerv grubu (n=5):

- **Kontrol Grubu (n=5):** Deneyin 1. günü kan örneği alınıp sakrifiye edilen denekler

Prematür ovaryan yetmezliği (POI) grubu (n=45)

- **POI Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonları sonrası kan örneği alınıp sakrifiye edilen denekler
- **Grup-3 (n=20): VCD enjeksiyonu sonrası intraovaryan salin uygulanan denekler (Sham grubu)**
 - **POI+Salin Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonlarını takiben intraovaryan salin enjeksiyonu sonrası sakrifiye edilen denekler
 - **POI+Salin+KOH Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonlarını takiben intraovaryan salin enjeksiyonu ve KOH protokolü sonrası sakrifiye edilen denekler

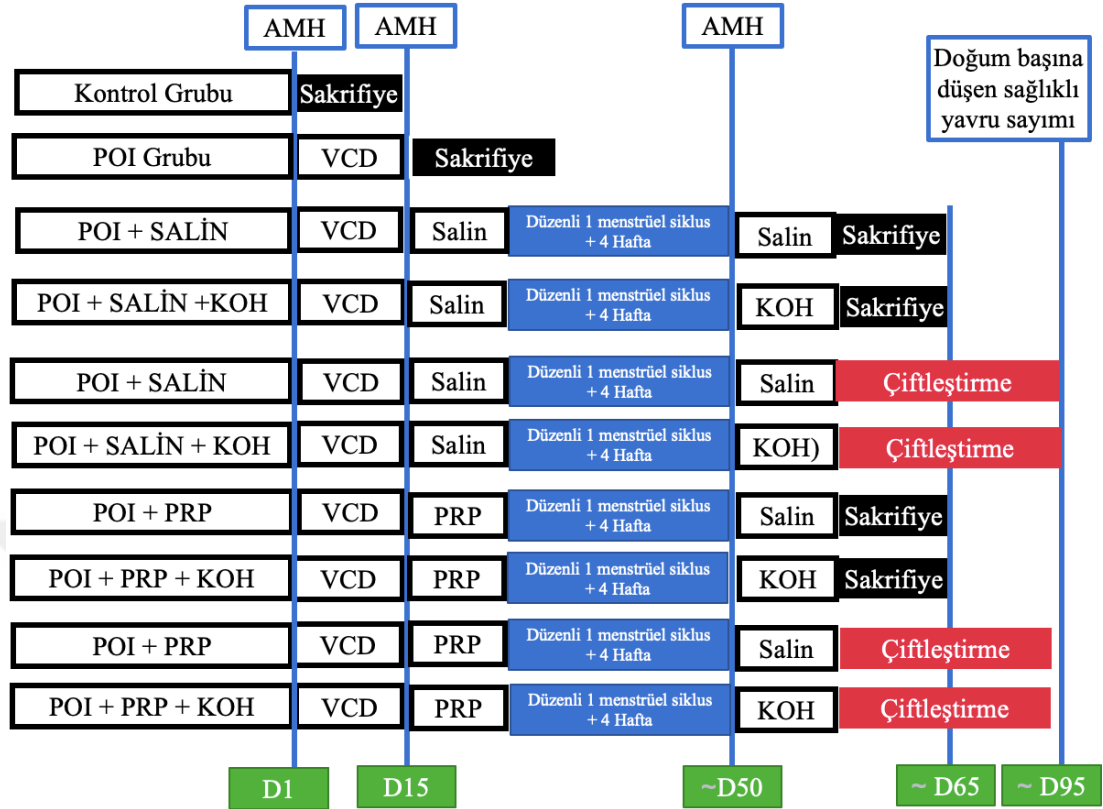
- **POI+Salin+Çiftleştirme Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonlarını takiben intraovaryan salin enjeksiyonu sonrası çiftleşmeye bırakılan denekler
- **POI+Salin+KOH+Çiftleştirme Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonlarını takiben intraovaryan salin enjeksiyonu ve KOH protokolü sonrası çiftleşmeye bırakılan denekler
- **Grup-4 (n=20): VCD enjeksiyonu sonrası intraovaryan PRP uygulanan denekler**
 - **POI+PRP Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonlarını takiben intraovaryan PRP enjeksiyonu sonrası sakrifiye edilen denekler
 - **POI+PRP+KOH Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonlarını takiben intraovaryan PRP enjeksiyonu ve KOH protokolü sonrası sakrifiye edilen denekler
 - **POI+PRP+Çiftleştirme Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonlarını takiben intraovaryan PRP enjeksiyonu sonrası çiftleşmeye bırakılan denekler
 - **POI+PRP+KOH+Çiftleştirme Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonlarını takiben intraovaryan PRP enjeksiyonu ve KOH protokolü sonrası çiftleşmeye bırakılan denekler

3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulama Yöntemi

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve uygulama yöntemi her gün aynı saatte literatürde belirtildiği şekilde uygulandı (Tablo 2). Çalışma grupları ve kimyasal madde enjeksiyonları Şekil 15’te şema olarak sunulmuştur.

Tablo 2. Uygulanan kimyasal maddeler ve uygulama yöntemi

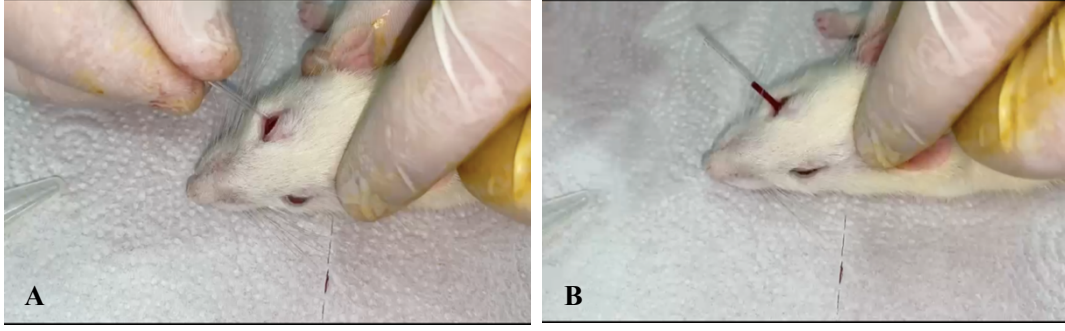
Etken madde	Doz	Süre	Uygulama yöntemi
4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD) / DMSO (1ml/kg) çözölmüş	160mg/kg/gün (Frye ve ark., 2012)	15 gün	Subkütan
Plateletten Zengin Plazma (PRP)	1 doz (Ahmadian ve ark., 2020)	1 gün	İntraovaryan
Serum Fizyolojik (SF) (PRP sham)	PRP ile eşit volüm (Ahmadian ve ark., 2020)	1 gün	İntraovaryan
Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) Agonisti	1,5µg/100g/gün (Gong ve ark., 2015)	7 gün	İntraperitoneal
Gebe Kısarak Serum Gonadotropini (PMSG)	5IU/100g/gün (Gong ve ark., 2015)	1 gün	İntraperitoneal
İnsan Koryonik Hormon (hCG)	10IU/100g/gün (Gong ve ark., 2015)	1 gün	İntraperitoneal
Serum Fizyolojik (SF) (KOH sham)	KOH protokolü ile eşit volüm (Gong ve ark., 2015)	7 gün	İntraperitoneal



Şekil 15. Çalışma gruplarında uygulanan kimyasal maddeler ve uygulama periyodları

3.4. Kan Örneklerinin Alınması

Vajinal smear ile östrus evresinde olduğu tespit edilen deneklerden, sevofluran inhalasyon anestezisi altında, retro-orbital olarak kan örnekleri alındı. Anestezi altındaki deneklerin başı tutularak sabitlendi. Göz kapağı geri çekilip, mid-dorsal olarak orbital ven plexusları mikrokapillar tüp yardımıyla yırtılarak yaklaşık 500 mikrolitre kanın steril tüpe dolması sağlandı. Elde edilen kan örnekleri Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile serum Anti-Müllerian Hormon seviyesini değerlendirmek amacıyla -20°C’de saklandı.



Sekil 16. (A) ve (B) Orbital ven pleksuslarının mikrokapillar tüp yardımıyla yırtılarak kan örneklerinin elde edilmesi

3.5. Deneysel Prematür Ovaryan Yetmezliği (POI) Modeli Oluşturulması

Homojen dağılım gösteren ovaryan rezerve sahip deneklerin çalışmaya dahil edilebilmesi için, çalışmanın 1. günü tüm deneklerin serum AMH düzeyleri belirlendi. Birinci ve üçüncü çeyrek (%25 ile %75'lik) dilimler arasında tespit edilen serum AMH değerlerine sahip denekler çalışmaya dahil edildi. Prematür ovaryan yetmezliği modeli oluşturulması amacıyla deneklere 15 gün süreyle günde tek doz 160mg/kg subkütan 4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD) (128.5mg/ml olacak şekilde DMSO içinde çözülmüş) enjeksiyonu yapıldı (Frye ve ark., 2012). Serum AMH değerleri dikkate alınarak POI modelinin doğrulanması yapıldı. Çalışmanın 1. günü elde edilen serum örneklerindeki AMH düzeyleri gruplar arasında kıyaslandığında, uygulama öncesi AMH değerleri homojen dağılan denekler çalışmaya dahil edildiği için, anlamlı fark bulunmadı. Tüm gruplarda çalışmanın 15. gününde elde edilen serum örneklerindeki AMH düzeyi çalışmanın 1. günü elde edilen serum örneklerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu ($p=0.001$) ve oluşturulan prematür ovaryan yetmezliği modeli bu şekilde doğrulandı.

3.6. Vajinal Smear ile Östrus Döngüsünün Evrelerinin Tayini

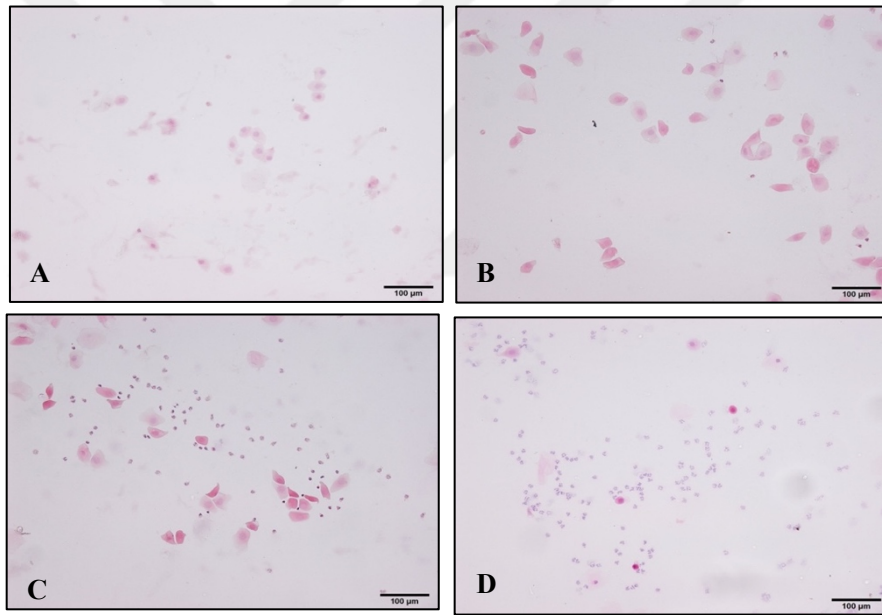
Deneyin, farklı kimyasalların enjeksiyon ve denek sakrifikasyon aşamalarında deneklerde östrus döngüsünün evrelerinin saptanması için vajinal smear incelemesi yapıldı. Tüm sakrifikasyonlar deneklerin östrus evrelerinde yapıldı. Deneklerden vajinal smear incelemesi için yayma fırçaları kullanılarak vajinal sürüntü örneği alındı ve lama düzenli bir şekilde yayıldı. Sürüntü örneklerinin

fiksasyonu metanol içinde 5 dakika oda sıcaklığında bekletilerek gerçekleştirildi. Fiksasyonu takiben yayma preparatlar hematoxilen-eozin boyama protokolü ile boyandı ve lamel ile kapatıldı. Işık mikroskobu ile 40x büyütmede incelenerek, östrus evreleri Tablo 1’de tanımlandığı şekilde belirlendi (Ajayi & Akhigbe, 2020).

Tablo 1. Östrus döngüsü evreleri ve vajinal sekresyondaki hücre oranlarına göre tayini (Ajayi & Akhigbe, 2020)

Östrus Döngüsü Evresi	Lökosit Hücre Yoğunluğu	Çekirdekli Epitel Hücre Yoğunluğu	Çekirdeksiz Keratinize Epitel Hücre Yoğunluğu	Göreceli Hücre Yoğunluğu
Proöstrus	0/+	++/+++	0/+	+/++
Östrus	0/+	0/++	++/+++	++/+++
Metöstrus	+/+++	+/++	+/+++	++/+++
Diöstrus	++/+++	+/++	0/+	+/++

*(0) negatif, (+) zayıf pozitif, (++) orta derece pozitif, (+++) şiddetli pozitif



Şekil 17. (A) Proöstrus evresi, (B) Östrus evresi, (C) Metöstrus evresi, (D) Diöstrus evresi

3.7. Plateletten Zengin Plazma (PRP) İzolasyonu ve İntraovaryan PRP Enjeksiyonu

Sevofluran inhalasyon anestezisi altında tek erkek denekten elde edilen intrakardiak kan örneği sitrat bazlı antikoagülan içeren tüpe alındı. Belirlenmiş bir platelet konsantrasyonu sağlayabilen ticari kit aracılığı (T-Biyoteknoloji Laboratuvarı, Bursa, TÜRKİYE) ile plateletten zengin plazma (PRP) elde edildi. Üretici firmanın kullanım talimatlarına göre tüpler 830 g'de 4 dakika santrifüj edildi. Daha sonra 5 ml'lik bir tüpe bağlanan 16 G'lik bir enjektör buffy coat tabakasına kadar ilerletildi. PRP enjektör ucu döndürülerek aspire edildi ve steril süspansiyon tüpüne aktarıldı (Cakiroglu ve ark., 2020). Enjekte edilecek platelet sayısının tüm enjeksiyonlarda sabit tutulması ve saflık oranı tespiti amacıyla, hücre sayım cihazı (Celltac ES, Nihon Kohden, Tokyo, JAPONYA) kullanılarak, kan örneği ve taze elde edilen PRP süspansiyonunda platelet hücre sayısı ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen ölçümde, kan örneğinde $2,5 \times 10^5$ platelet/ul tespit edilirken, PRP süspansiyonunda %86,26 oranında saflıkta plateletlerin izole edildiği analiz edildi. Son VCD uygulamasından bir gün sonra sevofluran inhalasyon anestezisi altında deneğin dorsalinde gerçekleştirilen 0,5-1 cm'lik bilateral insizyon ile her iki ovaryum içerisine micro-fine plus 31G (T-Biyoteknoloji Laboratuvarı, Bursa, TÜRKİYE) enjektörü ile yaklaşık $21,5 \times 10^5$ platelet/10 µl konsantrasyonunda PRP enjeksiyonu yapıldı ve insizyon sütüre edilerek kapatıldı. Salin gruplarını oluşturan deneklere PRP yerine aynı volümde intraovaryan salin enjeksiyonu yapıldı.

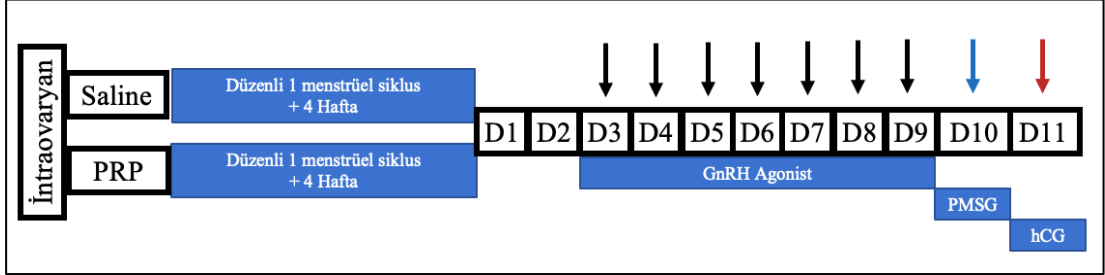


Sekil 18. (A), (B) ve (C) Sevofluran inhalasyon anestezisi altındaki deneğe dorsal alandan bilateral insizyon ile ovaryum içerisine PRP enjeksiyonu

3.8. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon Protokolü (KOH)

İntraovaryan PRP ya da salin enjeksiyonları sonrasında düzenli östrus döngüsüne sahip olan denekler, primordiyal folikül aktivasyonunun gerçekleştiği 30 günlük zaman dilimini (4 hafta) takiben, kontrollü ovaryan stimülasyon protokolüne alındı. Vaginal smear sonuçlarına göre östrus döngüsünün proöstrus evresindeki deneklere GnRH long agonist protokol uygulanarak KOH protokolü gerçekleştirildi. Östrus döngüsünün 3. ve 9. günleri arasında her gün 1,5µg/100g dozunda intraperitoneal GnRH agonist (Cetrotide; Merck, USA) enjeksiyonu yapıldı. Östrus döngüsünün 9. gününde 5IU/100g tek doz PMSG (Chrono-Gest PMSG, MSD, ALMANYA) intraperitoneal olarak uygulandı. Son enjeksiyon saatinden 28 saat sonra olacak şekilde 10IU/100g intraperitoneal hCG (Ovitrelle; Serono, USA) enjeksiyonu yapılarak ovulasyon tetiklendi (Gong ve ark., 2015) (Şekil 19).

KOH sham gruplarında; intraovaryan PRP ve salin enjeksiyonları sonrasında vaginal smear sonuçlarına göre östrus döngüsünün proöstrus evresinden başlayarak KOH protokolünde uygulanan ajanların yerine aynı volümde salin enjeksiyonu yapıldı.



Şekil 19. Kontrollü ovaryan stimülasyon protokolü (GnRH long protokol)

3.9. Çiftleştirme Protokolü

Sıçanların doğurganlık durumunu değerlendirmek için dişi sıçanlar on gün boyunca 1:2 oranında doğurganlığı kanıtlanmış erkek sıçanlarla aynı kafeslerde takip edildi. Daha sonra her sıçan ayrı ayrı kafeslendi ve elde edilen gebeliklerden doğum başına düşen sağlıklı yavru sayısı ve yavru ağırlıkları kaydedildi (Ahmadian ve ark., 2020).

3.10. Deneklerin Sakrifikasyonu

Denekler, enjeksiyonlarının bitiminin ardından östrus döngüsünün östrus evresinde sakrifiye edildi. Sevofluran inhalasyon anestezisi sonrasında denekler servikal dislokasyon ile ötenazi edildi. Deneklerin batin boşluğunun açılmasının ardından, ooferektomi uygulanarak bir ovaryum Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) tekniğinde kullanılmak üzere -80°C de saklandı. Diğer ovaryum dokusunun hassas terazi ile ağırlığı tartıldıktan sonra, %10'luk formalin solüsyonunda 1 hafta immersiyon fiksasyonu gerçekleştirildi.

3.11. Doku Takibi

Fiksasyon sonrası ovaryum dokularının histomorfolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeleri için doku takibi Tablo 3'te belirtildiği

şekilde gerçekleştirildi. Doku takibinin ardından ovaryum dokuları parafin bloklara gömüldü (Tablo 3).

Tablo 3. Doku takip protokolü

Doku Takip Protokolü					
Sıra No	1.Gün		Sıra No	2.Gün	
1	%50'lik alkol	2 saat	6	Ksilen-I	1,5 saat
2	%70'lik alkol	2 saat	7	Ksilen-II	1,5 saat
3	%90'lik alkol	2 saat	8	Parafin-I	1,5 saat
4	%96'lik alkol-I	2 saat	9	Parafin-II	1,5 saat
5	%96'lik alkol-II	Gece boyu	10	Parafin-III	1 saat
			11	Parafine Gömme	

3.12. Kesit Alma

Parafin bloklara gömülen ovaryum dokularından mikrotom (Leica RM2245) kullanılarak 5 µm kalınlığında sıralı kesitler alındı. Tüm ovaryum dokusundan 4'er kesit atlanarak kesitler lamlara alındı. Kesit içerisinde en az 1 sekonder folikülün bulunduğu kesit başlangıç kesiti olarak belirlendi ve devam eden 5 farklı seviyeden alınan kesitte hematoksilen-eozin (H&E) boyaması gerçekleştirildi. İmmünohistokimyasal değerlendirmeler için en az bir sekonder folikülün tespit edildiği kesit başlangıç kesiti olarak belirlendi ve 3 farklı seviyeden alınan kesitte boyama gerçekleştirildi.

3.13. Hematoksilen – Eozin (H&E) Boyama

Parafin kesitlerin 60°C'lik etüvde 40 dakika bekletilmesini takiben, oda sıcaklığında 40 dakika ksilen ile deparafinize edildi ve daha sonra H&E boyaması Tablo 4'te belirtilen protokol ile gerçekleştirildi.

Tablo 4. Hematoksilen- Eozin boyama protokolü

1	%96'lık alkol	3 dk
2	%90'lık alkol	3 dk
3	%70'lık alkol	3 dk
4	Akan su	3 dk
5	Harris'in Hematoksileni	10 dk
6	Akan su	Suyun rengi şeffaf olana kadar
7	Asit alkol	1-2 dips
8	Akan su	3 dk
9	Amonyaklı su	1-2 dips
11	Akan su	3 dk
11	Eozin-2-5 dk	2-5 dk
12	Akan su	Suyun rengi şeffaf olana kadar
13	%70'lık alkol	7 dips
14	%90'lık alkol	7 dips
15	%96'lık alkol	7 dips
16	Ksilen-I	20 dk
17	Ksilen-II	20 dk
18	Kapatma	

3.14. Ovaryan Folikül Sayımı

H&E ile boyanan ovaryum doku kesitlerinde ışık mikroskobu ile folikül sınıflandırması ve sayımı gerçekleştirildi. Folikül sayımı için alınan kesitlerde başlangıç kesiti olarak en az 1 sekonder folikülün bulunduğu kesit belirlendi. Başlangıç kesitinden itibaren, 4'er kesit atlanarak 5 farklı seviyeden lamlara alınan kesitlerde folikül sınıflandırması ve sayımı Tablo 5'te belirtildiği şekilde gerçekleştirildi (Yan ve ark., 2018).

Tablo 5. Ovaryan folikül sınıflandırma kriterleri (Yan ve ark., 2018)

Ovaryan Folikül Sınıflandırması	
Primordiyal Folikül	Oosit, tek katlı yassı folliküler hücre
Unilaminar Primer Folikül	Oosit, tek katlı kübik granüloza hücreleri
Multilaminar Primer Folikül	Oosit, ≥ 2 sıralı katlı kübik granüloza hücreleri, antral boşluk gözlenmeyen
Sekonder Folikül	Oosit, ≥ 5 sıralı katlı kübik granüloza hücreleri, multi fokal antrum, belirgin teka tabakalı
Graaf Folikül	Oosit, kumulus-oosit kompleksi, antral boşluk ve belirgin teka tabakalı
Atretik Folikül	Stratum granüloza / teka hücre bütünlük kaybı

3.15. İmmünohistokimyasal Boyama (IHC)

Ovaryum dokusunda Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) ekspresyonlarını değerlendirmek için işaretlenmiş Horse-radish-peroksidaz prensibine dayalı immunohistokimya sekonder-DAB kiti (Ultra Vision Detection System HRP Polymer/DAB, Waltham, MA, Amerika) kullanılarak üreticinin önerilerine göre immunohistokimyasal boyama gerçekleştirildi. Antijen açığa çıkarma işlemi için kesitler sodyum sitrat (pH 6,0) çözeltisi içerisinde 98 °C'de 30 dakika inkübe edildi. Oda sıcaklığına gelen kesitler yıkanarak immunohistokimyasal boyamanın ön işlemi tamamlandı. Kesitlerde endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için kesitler Hydrogen Peroxide Block (Thermofisher Scientific, USA) solüsyonunda 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Kesitler yıkanarak, non-spesifik bağlanmayı önlemek için protein bloklama solüsyonunda (Ultra V Block, Thermofisher Scientific, USA) 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Yıkama sonrası primer antikor fare anti-PCNA ile (mouse monoclonal, P10, 1:150, Santa Cruz Biotechnology) +4 °C'de gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün oda ısısına getirilen kesitler Primer Antikor Enhancer (Thermofisher Scientific, USA) solüsyonu ile 10 dakika inkübe edildi. Kesitler yıkanarak HRP Polymer (Thermofisher Scientific, USA) solüsyonu ile 15 dakika inkübe edildi. Yıkama işlemi sonrası kesitler kromojen madde olan diaminobenzidin (DAB) ile görünür hale getirildi. Protokol içerisindeki tüm aşamalar öncesi ve sonrasında PBS tampon ile yıkamalar gerçekleştirildi. Kesitler üzerinde hematoksilen ile zıt çekirdek boyaması gerçekleştirildi. Son olarak dehidrate edilen kesitler ksilen ile şeffaflaştırıldı ve DPX kapatma mediumu ile kapatıldı. Değerlendirmeler için en az bir sekonder folikülün tespit edildiği kesit başlangıç kesiti olarak belirlendi ve 3 farklı seviyeden kesitte boyama gerçekleştirildi. Her bir kesitte ovaryan foliküller preantral (primordiyal foliküller, unilaminar ve multilaminar primer foliküller) ve antral (sekonder ve graaf foliküller) foliküller olmak üzere iki gruba ayrıldı ve foliküllerde yer alan granüloza hücrelerinin sayımı gerçekleştirildi. Granüloza hücrelerinde pozitif boyanan hücrelerin yüzde değeri gruplar arasında kıyaslandı.

Tablo 6. Protokolde kullanılan antikorun dilüsyon oranı ve inkübasyon süresi

Kullanılacak Olan Antikorlar		
Primer Antikor	Dilüsyon	İnkübasyon Süresi
Anti- Proliferating cell nuclear antigens (PCNA)	1:150	Tüm gece

3.16. ELISA

Serum sıvısında AMH (katalog no: ELK4910, ELK Biotechnology, Wuhan, ÇİN) seviyeleri ve ovaryum doku homojenatlarında PTEN (katalog ELK4264, ELK Biotechnology, Wuhan, ÇİN) ve pAKT (katalog no: E1201Ra, BT LAB, Sangay) seviyeleri “enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)” yöntemi ile ticari kit kullanılarak, üretici firmanın önerileri dikkate alınarak ölçüldü. Bu prosedürde, örnekler ve standartlar antikorlar ile kaplanmış ELISA plak kuyularına mikropipet aracılığı ile yüklendi. Tüm plak kuyularına biyotin işaretli antikor solüsyonu yüklemesi yapıldı ve 1 saat 37 °C’de karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kit içerisindeki yıkama solüsyonu ile 3 defa tüm örnekler yıkandı. Streptavidin-HRP yüklemesi yapılarak 1 saat 37 °C’de karanlık ortamda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında yıkama solüsyonu ile 5 defa tüm örnekler yıkandı. Kromojen substrat solüsyonunun eklenmesinin ardından 20 dakika 37 °C’de karanlık ortamda inkübe edildi. Son olarak, enzim reaksiyonunun sonlandırılması için eklenen solüsyonu takiben 5 dakika içerisinde örneklerin 450 nm dalga boyu ile optik dansiteleri ölçüldü. Örneklerdeki analit konsantrasyonu standart eğriye göre hesaplandı. AMH, PTEN ve pAKT ELISA kitlerinin sırasıyla sensitivitesi 25,4 pg/ml, 0.054 ng/mL, 4.06ng/L; ölçüm aralığı 78,13-5000 pg/ml, 0.16-10 ng/mL, 0.2ng/ml, 7-1500ng/L; çalışma içi CV <%8, <%8, <%7,4; çalışmalar arası CV <%10, <%10, <%10 idi.

3.17. İstatistiksel Değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmede SPSS v.28 (IBM) programı kullanıldı. Verilerin parametrik veya non-parametrik dağılımının tayini için Shapiro Wilk testi uygulandı.

Parametrik dağılım gösteren verilerde ikili grup karşılaştırmalarında Student T testi, non-parametrik dağılım gösteren verilerde ise Mann Whitney U testi uygulandı. Parametrik dağılım gösteren ikiden fazla grup karşılaştırmalarında One-Way Anova testi, non-parametrik dağılım göstermesi durumunda ise Kruskal Wallis-H Testi kullanıldı. Tekrarlanan ölçümlerin analizinde Repeated Measures Anova Testi kullanıldı. Kategorik verilerin kıyaslanmasında Ki-Kare Testi kullanıldı. Kıyaslamaların sonucunda p değeri 0,05'den küçük olması durumunda istatistiksel olarak anlamlı fark kabul edildi.



4. BULGULAR

4.1. Denek Vücut ve Ovaryum Ağırlıkları Ölçümü

4.1.1. Vücut Ağırlıkları Ölçümü

Çalışmanın başlangıcında tüm deneklerin vücut ağırlık ölçümleri gerçekleştirildi. Birinci ve üçüncü çeyrek (%25 ile %75'lik) dilimler arasında tespit edilen vücut ağırlık değerlerine sahip denekler çalışmaya dahil edildi. Çalışma kapsamında gerçekleştirilen enjeksiyonların başlangıç ve bitiş günü vücut ağırlık ölçümlerinin tekrarı gerçekleştirildi ve gruplar arasında karşılaştırıldı.

Normal ovaryan rezerv grubunda (Kontrol Grubu) çalışmanın başlangıcında vücut ağırlık ölçümleri gerçekleştirildi ve enjeksiyon yapılmadan östrus döngüsünün östrus evresinde sakrifiye edildi. Prematür ovaryan yetmezliği grubunda (POI grubu) enjeksiyonlar başlamadan önce ve 15 gün süre ile gerçekleştirilen VCD enjeksiyonunun ardından vücut ağırlık ölçümleri gerçekleştirildi ve denekler sakrifiye edildi. Kontrol grubu ve POI grubu için sırasıyla enjeksiyonlar öncesinde vücut ağırlıkları $173,1 \pm 3,36$ gr ve $172,16 \pm 3,03$ gr olarak tespit edildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,65$).

Tablo 7. Normal ovaryan rezerv grubu (Kontrol grubu) ve Prematür ovaryan yetmezliği grubunu (POI grubu) oluşturan deneklerin vücut ağırlık ölçüm sonuçları

	Normal ovaryan rezerv grubu (Kontrol Grubu)	Prematür ovaryan yetmezliği grubu (POI Grubu)	<i>p değeri</i>
Enjeksiyonların başlangıç günü vücut ağırlıkları (gr)	$173,1 \pm 3,36$	$172,16 \pm 3,03$	0,65
Enjeksiyonların bitiş günü vücut ağırlıkları (gr)	-	$175,88 \pm 3,13$	-

*Veriler ortalama ağırlık $\pm$ SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Student T testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonunun ardından intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen denekler (POI+Salin grubu) ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen deneklerin (POI+PRP grubu) çalışma

başlangıcında ve sakrifikasyon öncesi vücut ağırlık ölçümleri gerçekleştirildi ve karşılaştırıldı. POI+Salin grubu ve POI+PRP grubu için sırasıyla enjeksiyonlar öncesi vücut ağırlıkları $172,10 \pm 3,59$ gr ve $173 \pm 4,31$ gr olarak tespit edildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,36$). Enjeksiyonlar sonrasında vücut ağırlıkları, POI+Salin grubu ve POI+PRP grubu için sırasıyla $175,82 \pm 3,57$ gr ve $176,72 \pm 4,73$ gr olarak tespit edildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,73$).

Tablo 8. POI+Salin grubu ve POI+PRP grubu deneklerinin vücut ağırlık ölçüm sonuçları

	POI+Salin Grubu	POI+PRP Grubu	<i>p değeri</i>
Enjeksiyonların başlangıç günü vücut ağırlıkları (gr)	$172,10 \pm 3,59$	$173 \pm 4,31$	0,36
Enjeksiyonların bitiş günü vücut ağırlıkları (gr)	$175,82 \pm 3,57$	$176,72 \pm 4,73$	0,73

*Veriler ortalama ağırlık $\pm$ SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Student T testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun KOH uygulanan alt grupları değerlendirildiğinde; VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulanan ve sonrasında sakrifiye edilen denekler (POI+Salin+KOH grubu) ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta kontrollü ovaryan stimülasyon uygulanan ve sonrasında sakrifiye edilen denekler (POI+PRP+KOH grubu) çalışma başlangıcında ve sakrifikasyon öncesi vücut ağırlık ölçümleri gerçekleştirildi ve karşılaştırıldı. POI+Salin+KOH grubu ve POI+PRP+KOH grubu için sırasıyla enjeksiyonlar öncesi vücut ağırlıkları $173,04 \pm 3,88$ gr ve $172,74 \pm 4,29$ gr olarak tespit edildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,45$). Enjeksiyonlar sonrasında vücut ağırlıkları, POI+Salin+KOH grubu ve POI+PRP+KOH grubu için sırasıyla $176,75 \pm 3,73$ gr ve $176,46 \pm 4,90$ gr olarak tespit edildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi ($p=0,91$).

Tablo 9. POI+Salin+KOH grubu ve POI+PRP+KOH grubu deneklerinin vücut ağırlık ölçüm sonuçları

	POI+Salin+KOH Grubu	POI+PRP+KOH Grubu	<i>p değeri</i>
Enjeksiyonların başlangıç günü vücut ağırlıkları (gr)	173,04 ± 3,88	172,74 ± 4,29	0,45
Enjeksiyonların bitiş günü vücut ağırlıkları (gr)	176,75 ± 3,73	176,46 ± 4,90	0,91

*Veriler ortalama ağırlık ± SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Student T testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonunun ardından sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulanmadan çiftleştirme protokolü uygulanan (POI+Salin+Çiftleştirme grubu) ve prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulanmadan çiftleştirme protokolü uygulanan (POI+PRP+Çiftleştirme grubu) deneklerin enjeksiyonlar öncesi vücut ağırlıkları Tablo 10'da verildi. POI+Salin+Çiftleştirme grubu ve POI+PRP+Çiftleştirme grubu için sırasıyla enjeksiyonlar öncesi vücut ağırlıkları $171,22 \pm 2,57$ gr ve $172,08 \pm 3,02$ gr olarak tespit edildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,27$). Enjeksiyonlar sonrasında vücut ağırlıkları, POI+Salin+Çiftleştirme grubu ve POI+PRP+Çiftleştirme grubu için sırasıyla $175,9 \pm 2,15$ gr ve $176,76 \pm 2,97$ gr olarak ölçüldü ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0,59$).

Tablo 10. POI+Salin+Çiftleştirme grubu ve POI+PRP+Çiftleştirme grubu deneklerinin vücut ağırlık ölçüm sonuçları

	POI+Salin+Çiftleştirme Grubu	POI+PRP+Çiftleştirme Grubu	<i>p değeri</i>
Enjeksiyonların başlangıç günü vücut ağırlıkları (gr)	171,22 ± 2,57	172,08 ± 3,02	0,27
Enjeksiyonların bitiş günü vücut ağırlıkları (gr)	175,9 ± 2,15	176,76 ± 2,97	0,59

*Veriler ortalama ağırlık ± SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Student T testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun KOH uygulanan alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonunun ardından intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve

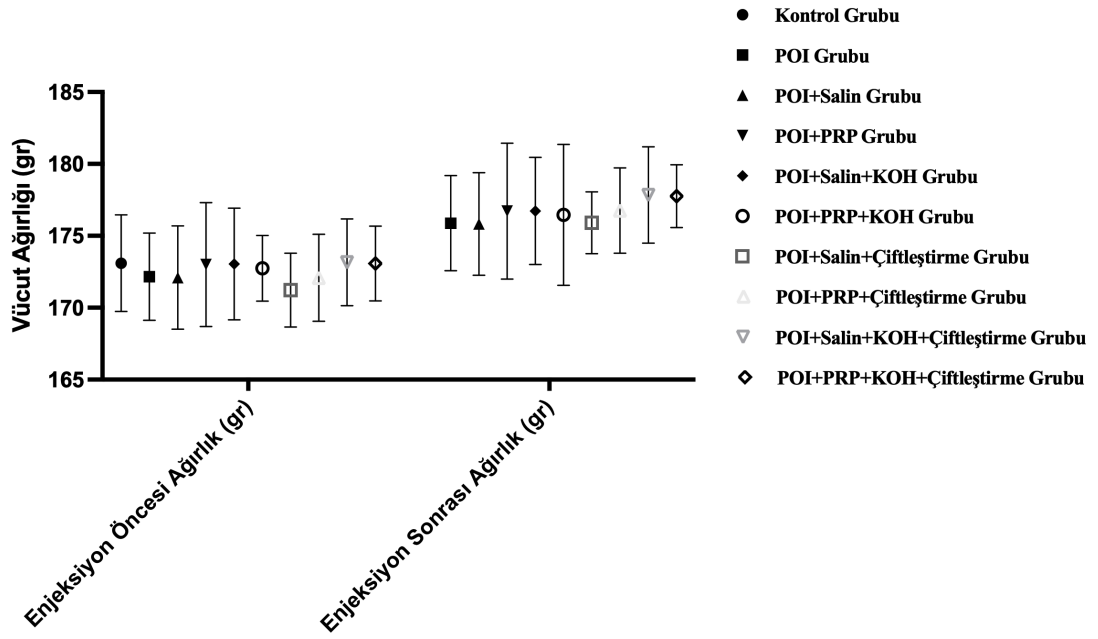
düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimulasyonu takiben çiftleştirme protokolü uygulanan (POI+Salin+KOH+Çiftleştirme grubu) ve prematür ovaryan yetmezliği grubunun KOH uygulanan alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimulasyonu takiben çiftleştirme protokolü uygulanan (POI+PRP+KOH+Çiftleştirme grubu) deneklerin enjeksiyonlar öncesi vücut ağırlıkları Tablo 11’de verildi. POI+Salin+KOH+Çiftleştirme grubu ve POI+PRP+KOH+Çiftleştirme grubu için sırasıyla enjeksiyonlar öncesi vücut ağırlıkları $173,16 \pm 3,02$ gr ve $173,08 \pm 2,66$ gr olarak tespit edildi ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,48$). Enjeksiyonlar sonrasında vücut ağırlıkları, POI+Salin+KOH+Çiftleştirme grubu ve POI+PRP+KOH+Çiftleştirme grubu için sırasıyla $177,84 \pm 3,35$ gr ve $177,76 \pm 2,19$ gr olarak tespit edildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0,97$).

Tablo 11. POI+Salin+KOH+Çiftleştirme grubu ve POI+PRP+KOH+Çiftleştirme grubu deneklerinin vücut ağırlık ölçüm sonuçları

	POI+Salin+KOH+Çiftleştirme Grubu	POI+PRP+KOH+Çiftleştirme Grubu	<i>p değeri</i>
Enjeksiyonların başlangıç günü vücut ağırlıkları (gr)	$173,16 \pm 3,02$	$173,08 \pm 2,66$	0,48
Enjeksiyonların bitiş günü vücut ağırlıkları (gr)	$177,84 \pm 3,35$	$177,76 \pm 2,19$	0,97

*Veriler ortalama ağırlık $\pm$ SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Student T testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Sekil 20. Enjeksiyon öncesi ve enjeksiyon sonrası deneklerin vücut ağırlık ölçümlerinin tüm gruplar arasında kıyaslaması

4.1.2. Ovaryum Ağırlıkları Ölçümü

Normal ovaryan rezerv grubunda (Kontrol grubu) çalışmanın başlangıcında enjeksiyon yapılmadan östrus döngüsünün östrus evresinde sakrifiye edildikten sonra ovaryum ağırlık ölçümü gerçekleştirildi. Prematür ovaryan yetmezliği grubunda (POI grubu), 15 gün süre ile VCD enjeksiyonu sonrasında sakrifiye edildikten sonra ovaryum ağırlık ölçümü gerçekleştirildi. Kontrol grubu ve POI grubu için sırasıyla ovaryum ağırlıkları $0,99 \pm 0,04$ ve $0,94 \pm 0,06$ olarak tespit edildi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0,023$).

Tablo 12. Normal ovaryan rezerv grubu (Kontrol grubu) ve Prematür ovaryan yetmezliği grubu (POI grubu) deneklerinin ovaryum ağırlık ölçüm sonuçları

	Normal ovaryan rezerv grubu (Kontrol Grubu)	Prematür ovaryan yetmezliği grubu (POI Grubu)	<i>p değeri</i>
Toplam ovaryum ağırlığı (gr)	$0,99 \pm 0,04$	$0,94 \pm 0,06$	0,023

*Veriler ortalama ağırlık $\pm$ SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Student T testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus

döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen denekler (POI+Salin grubu) ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen deneklerin (POI+PRP grubu) ovaryum ağırlık ölçümü gerçekleştirildi. POI+Salin grubu ve POI+PRP grubu için sırasıyla ovaryum ağırlıkları $0,93 \pm 0,03$ ve $0,92 \pm 0,02$ olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,36$).

Tablo 13. POI+Salin grubu ve POI+PRP grubu deneklerinin ovaryum ağırlık ölçüm sonuçları

	POI+Salin Grubu	POI+PRP Grubu	<i>p değeri</i>
Toplam ovaryum ağırlığı (gr)	$0,93 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,02$	0,36

*Veriler ortalama ağırlık $\pm$ SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Student T testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun KOH uygulanan alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyonu takiben sakrifiye edilen denekler (POI+Salin+KOH grubu) ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta kontrollü ovaryan stimülasyonu takiben sakrifiye edilen deneklerin (POI+PRP+KOH grubu) ovaryum ağırlık ölçümü gerçekleştirildi. POI+Salin+KOH grubu ve POI+PRP+KOH grubu için sırasıyla ovaryum ağırlıkları $0,95 \pm 0,02$ ve $0,94 \pm 0,01$ olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,78$).

Tablo 14. POI+Salin+KOH grubu ve POI+PRP+KOH grubu deneklerinin vücut ağırlık ölçüm sonuçları

	POI+Salin+KOH Grubu	POI+PRP+KOH Grubu	<i>p değeri</i>
Toplam ovaryum ağırlığı (gr)	$0,95 \pm 0,02$	$0,94 \pm 0,01$	0,78

*Veriler ortalama ağırlık $\pm$ SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Student T testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Sakrifiye edilen deneklerin ovaryum ağırlık ölçümlerinin tüm gruplar arasında kıyaslaması Tablo 15'te verilmiştir.

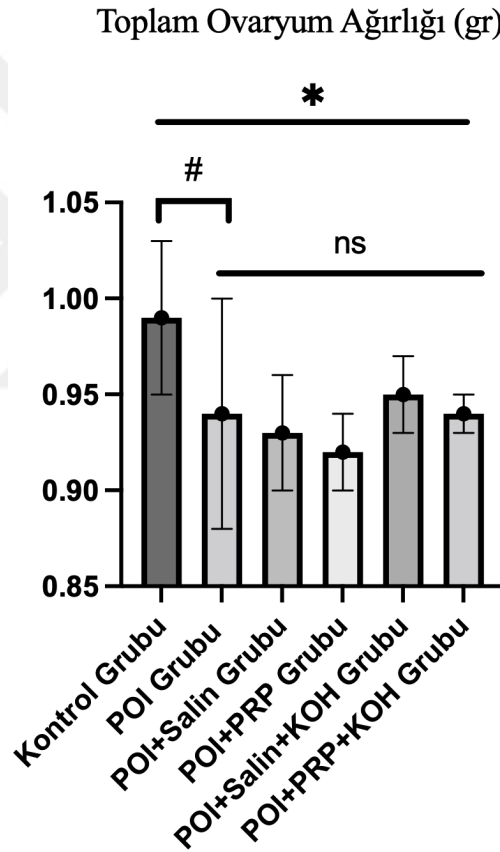
Tablo 15. Sakrifiye edilen deneklerin ovaryum ağırlık ölçümlerinin tüm gruplar arasında kıyaslaması

	Kontrol Grubu	POI Grubu	POI + Salin Grubu	POI + PRP Grubu	POI + Salin + KOH Grubu	POI + PRP + KOH Grubu	<i>p değeri</i>
Toplam ovaryum ağırlığı (gr)	0,99 ± 0,04 ^a	0,94 ± 0,06 ^b	0,93 ± 0,03 ^b	0,92 ± 0,02 ^b	0,95 ± 0,02 ^b	0,94 ± 0,01 ^b	0,001

*Veriler ortalama ağırlık ± SD olarak verildi.

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

^{a,b} Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Sekil 21. Sakrifiye edilen deneklerin ovaryum ağırlık ölçümlerinin tüm gruplar arasında kıyaslaması

4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

4.2.1. Histomorfolojik Bulgular

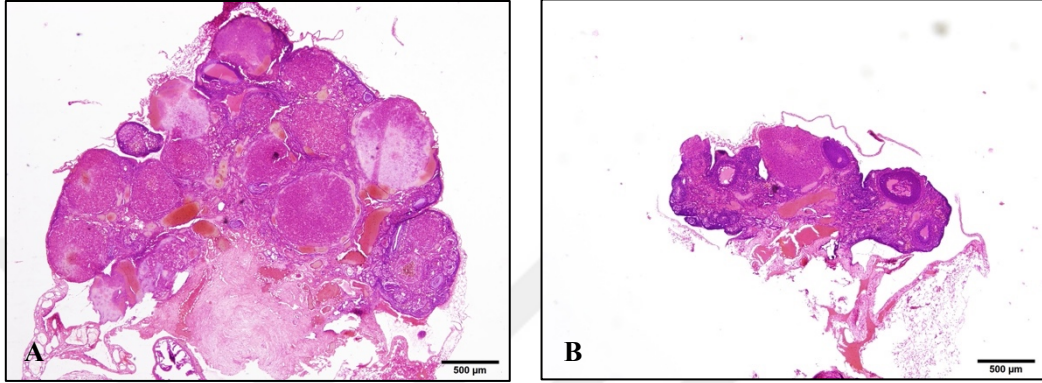
Çalışmada yer alan, çiftleştirme protokolü uygulanan denekler haricindeki tüm denekler enjeksiyonlarının bitiminin ardından östrus döngülerinin östrus evresinde sakrifiye edildi. Denekler sevofluran inhalasyon anestezi sonrasında servikal dislokasyon ile ötenazi edildi. Deneklerin batin boşluğunun açılmasının ardından ovaryumları eksize edildi. Sakrifiye edilen tüm deneklerden elde edilen doku örneklerinden 5 µm kalınlığında sıralı kesitler alındı. Doku kesitlerinin H&E boyaması ardından histomorfolojik olarak değerlendirildi.

Normal ovaryan rezerv grubu (Kontrol grubu) ve prematür ovaryan yetmezliği grubu (POI grubu) deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitleri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi. Normal ovaryan rezerv grubu (Kontrol grubu) doku kesitlerinde, ovaryum yüzeyini çevreleyen germinal epitelin yassı epitelden kübik epitele değişkenlik gösterdiği gözlemlendi (Şekil 23). Germinal epitel altında yer alan tunika albuginea tabakasının sınırları net tanımlanamazken, gelişimin farklı basamaklarında foliküllerin bulunduğu korteks ile yoğunlukla kan damarları, lenf damarları ve sinir liflerinin yer aldığı medulla sınırları net tanımlandı. Kortekste gelişimin farklı basamaklarında normal morfolojili foliküller, düzenli yerleşim gösteren bağ dokusu ve düz kas hücreleri ile az sayıda kapiller gözlemlendi. Germinal epitel altında yer alan tunika albuginea tabakasına yakın yerleşimli yassı folikül hücreleri (pre-granüloza) ile çevrelenmiş büyük ökromatik nukleusa sahip oosit içeren normal morfolojili primordiyal foliküller görüldü. Kortekste gelişimin farklı basamaklarında foliküller arasında da primordiyal foliküller gözlemlendi (Şekil 24). Korteks stromasında tek tabakalı kübik granüloza hücreleri ile çevrili oosit içeren unilaminar primer foliküler görülürken (Şekil 25), bu foliküllerde granüloza hücreleri ile oosit arasında yer alan glikoproteinden zengin zona pellisuda tabakası net olarak ayırt edilemedi. Granüloza hücrelerinin sitoplazmalarının asidofilik olarak boyandığı, nükleuslarının yoğun kromatin içerikleri ile bazofilik boyandığı görüldü. Korteks stromasında oositin etrafını çevreleyen birkaç katlı granüloza hücreleri ile zona pellisuda tabakası net olarak ayırt edilen normal morfolojili multilaminar primer foliküller gözlemlendi (Şekil 26). Korteksin medullaya yakın bölgelerinde

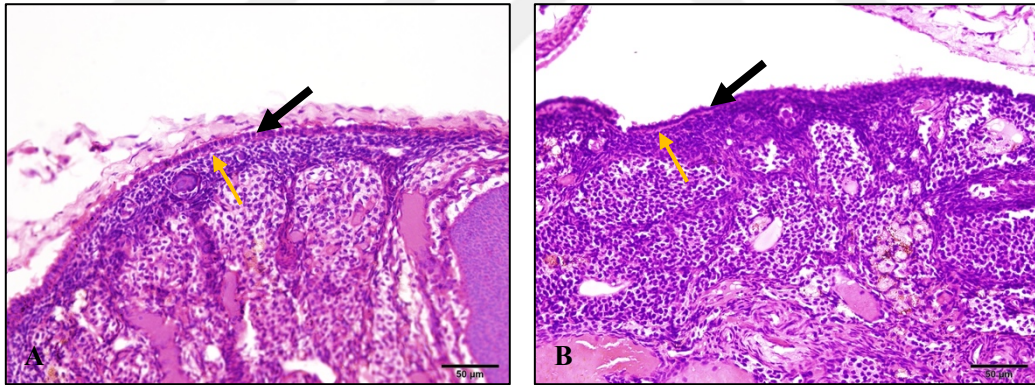
oositin etrafını çevreleyen çok katlı granüloza hücreleri ile asidofik boyanma gösteren “liquor folliculi” ile dolu antrumların gözlemlendiği sekonder foliküller tespit edildi (Şekil 27). Sekonder folikülün etrafını çevreleyen stromal hücrelerden oluşan teka folikülü tabakasının teka interna tabakası net sınırları ile tanımlanabilirken, teka eksterna tabakasının sınırları net olarak tanımlanamadı. Foliküler gelişimin son basamağındaki matür (graaf) folikül, artan folikül çapı, tek büyük bir atruma sahip olması ve oositin antrumun bir tarafına doğru çekilmiş olması ile sekonder folikülden ayırt edildi (Şekil 28). Matür (graaf) folikül duvarını oluşturan granüloza hücrelerinin ve oositi çevreleyen kumulus ooforus hücrelerinin düzenli yerleşimi ile normal morfolojiye sahip oldukları görüldü. Gelişimin farklı basamaklarında normal morfolojili foliküllerin yanısıra az sayıda da olsa dejenere oosit, granüloza hücrelerinin yerleşiminin düzensizleşmesi ve camsı membran olarak tanımlanan dalgalı hyalin tabaka olarak gözlemlenen atretik foliküller gözlemlendi. Multifoliküler ovulasyona bağlı olarak, birden çok sayıda korpus luteum yapısı korteks stromasında görüldü (Şekil 29). Granüloza lutein hücreleri soluk boyanan sitoplazmaları ve teka lutein hücrelerine kıyasla daha büyük nükleusları ile tanımlandı.

Prematür ovaryan yetmezliği grubu (POI grubu) deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitleri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi. Ovaryum yüzeyini çevreleyen germinal epitelin alçak kübik epitelden yüksek kübik epitele değişkenlik gösterdiği görüldü (Şekil 23). Germinal epitel altında yer alan tunika albuginea tabakasının sınırları net tanımlanamazken, kortekste gelişimin farklı basamaklarında foliküllerin normal ovaryan rezerv grubuna (Kontrol grubu) kıyasla sayıca azaldığı ve normal morfolojiye sahip foliküllerin yerini atretik foliküllerin aldığı tespit edildi (Şekil 30). Primordiyal, unilamilar ve multilaminar folikül sayılarının azaldığı belirgin şekilde görüldü (Şekil 24, 25, 26). Atretik foliküllerde oosit-granüloza hücre bağlantı bütünlüğünün bozulduğu, piknotik nükleuslu granüloza hücrelerinin varlığı, oositlerin asidofili gösterdiği, oositin yapısal bozulmasına dair bulgular olan fragmentasyon ve vakuolizasyon artışı tespit edildi. Normal ovaryan rezerv grubuna (Kontrol Grubu) kıyasla sekonder folikül ve matür (graaf) folikül sayıları benzer olsa da atretik karakterde sekonder ve matür (graaf) foliküllerin artışı görüldü. Normal histolojik yapının matür (graaf) foliküllerde korunmadığı görülürken; bu foliküllerde

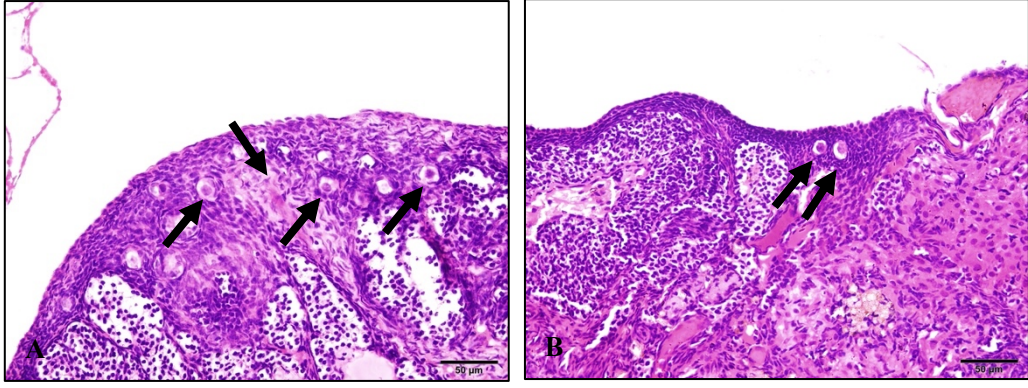
oosit-granüloza hücre bağlantı bütünlüğünün bozulduğu, piknotik nükleuslu granüloza hücreleri ve asidofilik sitoplazmaya sahip oosit içeren atretik matür (graaf) foliküller tespit edildi. Korpus luteum yapılarında normal ovaryan rezerv grubuna (Kontrol grubu) kıyasla benzer sayıda görülmekle birlikte dejenerasyon bulgularına sahip hücreler içerdiği gözlemlendi (Şekil 29).



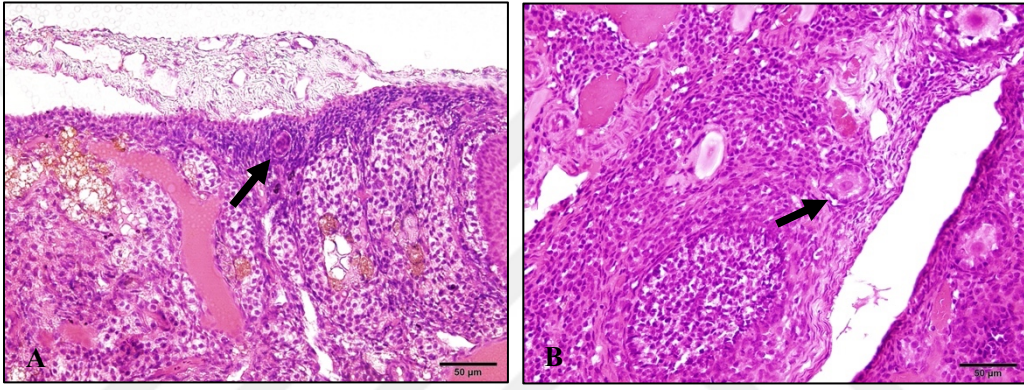
Şekil 22. (A) Normal ovaryan rezerv grubu (Kontrol grubu) ve (B) prematür ovaryan yetmezliği grubu (POI grubu) deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinin ışık mikroskopik genel görünümü.



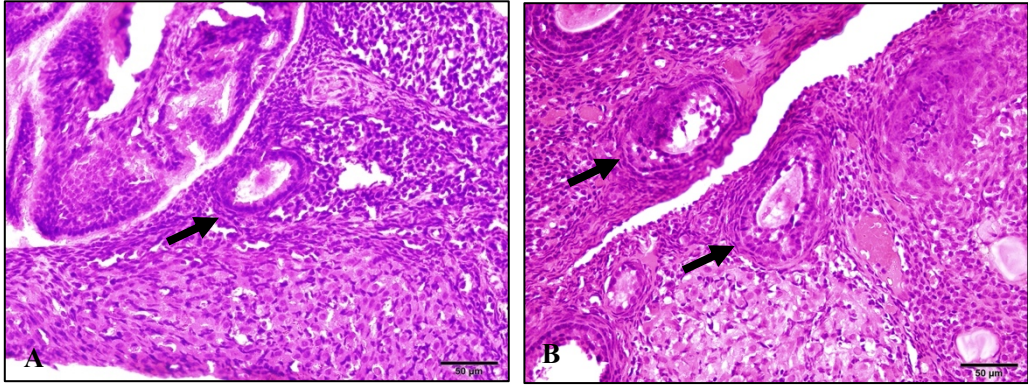
Şekil 23. (A) Kontrol grubu ve (B) POI grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde germinal epitel (siyah ok) ve tunika albuginea (sarı ok).



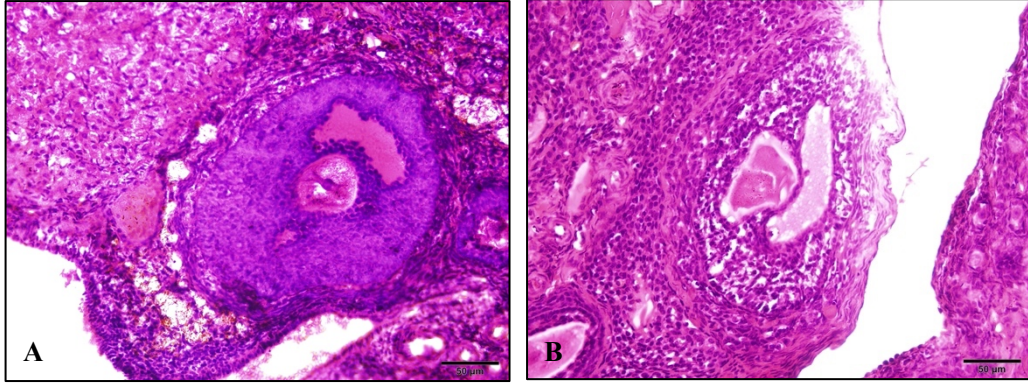
Şekil 24. (A) Kontrol grubu ve (B) POI grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde primordiyal folikül (siyah ok).



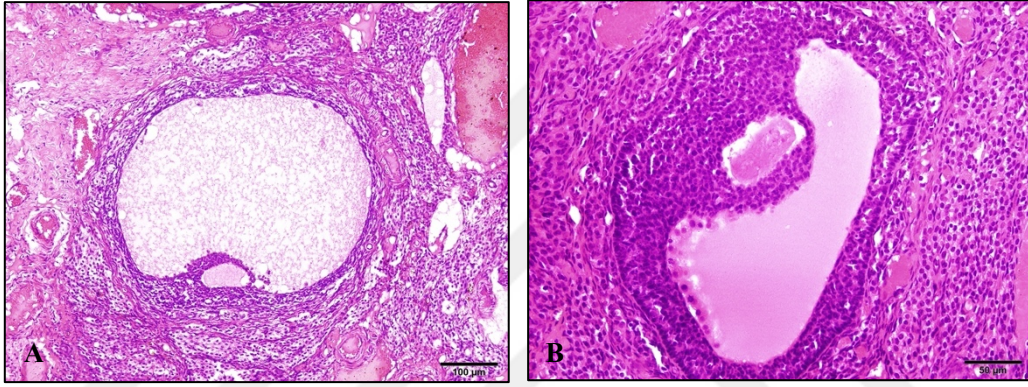
Şekil 25. (A) Kontrol grubu ve (B) POI grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde unilaminar primer folikül (siyah ok).



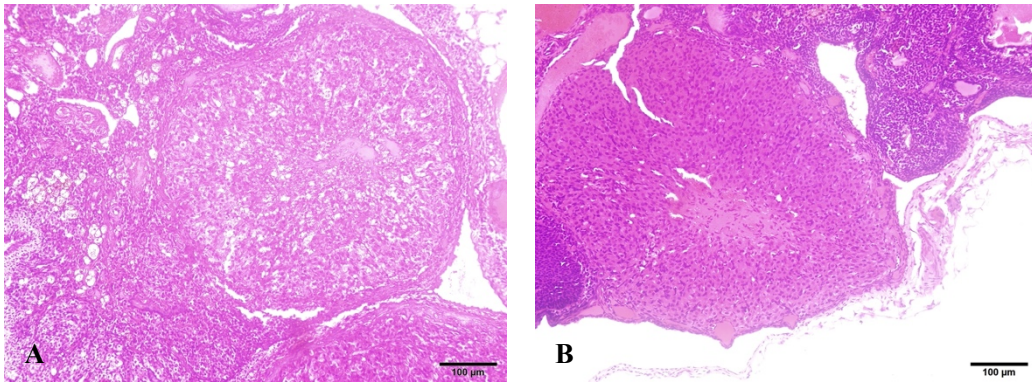
Şekil 26. (A) Kontrol grubu ve (B) POI grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde multilaminar primer folikül (siyah ok).



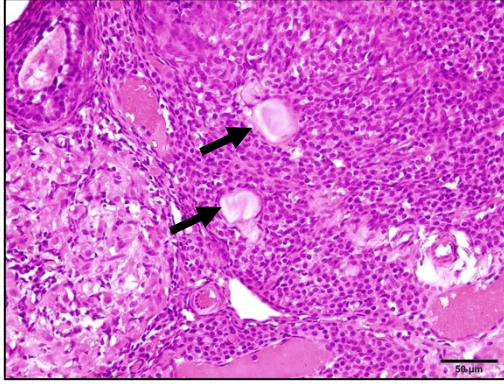
Şekil 27. (A) Kontrol grubu ve (B) POI grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde sekonder folikül.



Şekil 28. (A) Kontrol grubu ve (B) POI grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde matür (graaf) folikül.



Şekil 29. (A) Kontrol grubu ve (B) POI grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde korpus luteum



Şekil 30. POI grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde atretik folikül (siyah ok).

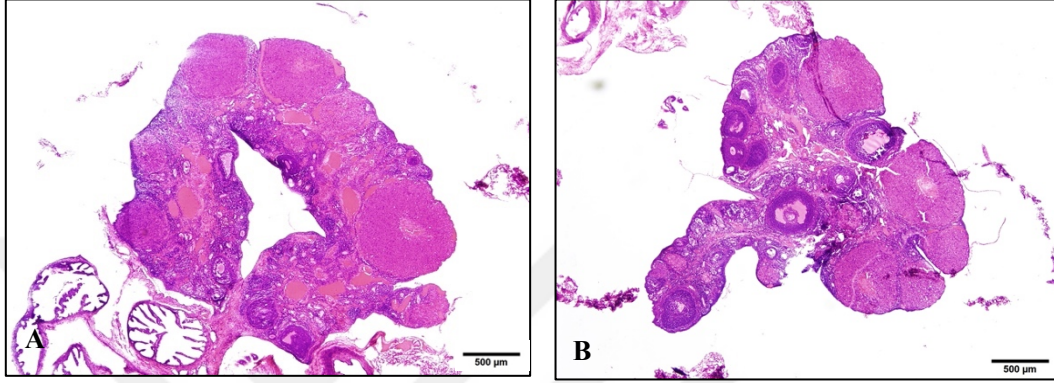
Prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen denekler (POI+Salin grubu) ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen deneklerden (POI+PRP grubu) elde edilen ovaryum doku kesitleri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi.

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen deneklerde (POI+Salin grubu) genel morfolojik doku bütünlüğünün korunamadığı ve ovaryum yüzeyini çevreleyen germinal epitelin alçak kübik epitelden yüksek kübik epitele değişkenlik gösterdiği görüldü. Normal ovaryan rezerv grubuna (Kontrol grubu) kıyasla primordiyal foliküllerin sayıca azaldığı tespit edildi. POI grubu deneklerine kıyasla atretik foliküllerin sayıca azaldığı görüldü.

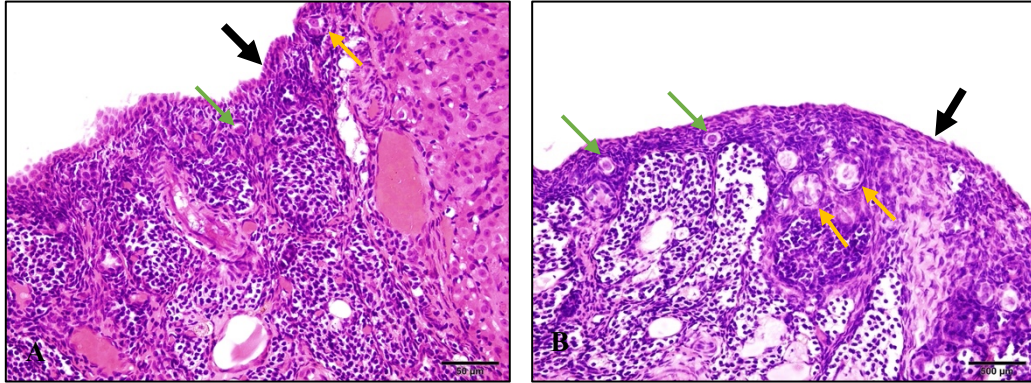
Prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen deneklerden (POI+PRP grubu) elde edilen ovaryum doku kesitlerin yüzeyini çevreleyen germinal epitelin alçak kübik epitelden yüksek kübik epitele değişkenlik gösterdiği görüldü. Normal ovaryan rezerv grubuna (Kontrol grubu) kıyasla primordiyal foliküllerin sayıca azaldığı tespit edildi. POI grubu deneklerine kıyasla atretik foliküllerin sayıca azaldığı gözlemlendi.

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus

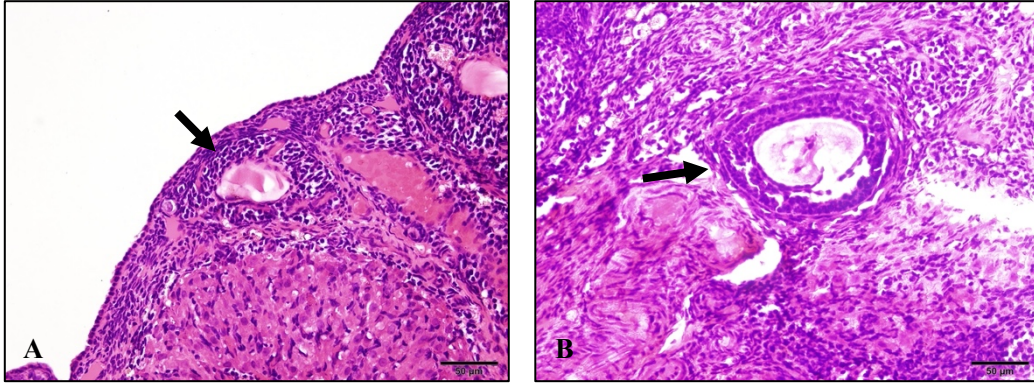
döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen denekler (POI+Salin grubu) ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen deneklerden (POI+PRP grubu) elde edilen ovaryum doku kesitleri karşılaştırıldığında, POI+PRP grubunda primordiyal folikül ve korpus luteumun sayıca arttığı tespit edildi.



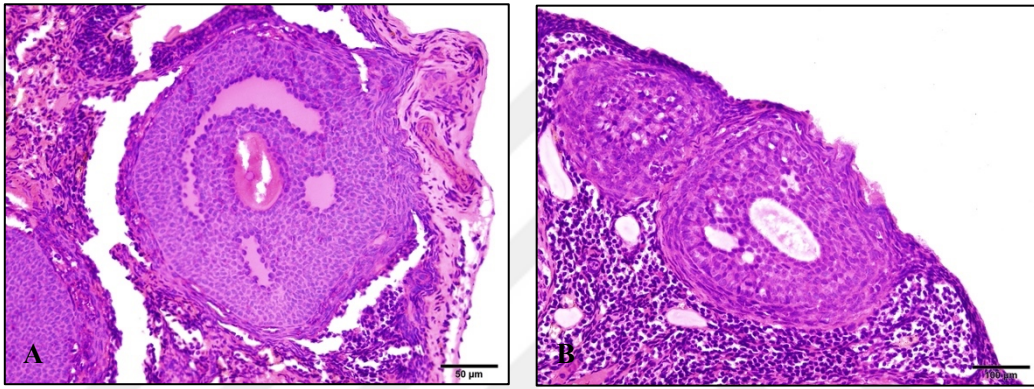
Şekil 31. (A) Prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen denekler (POI+Salin grubu) ile (B) VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen deneklerden (POI+PRP grubu) ovaryum doku kesitlerinin ışık mikroskopik genel görünümü



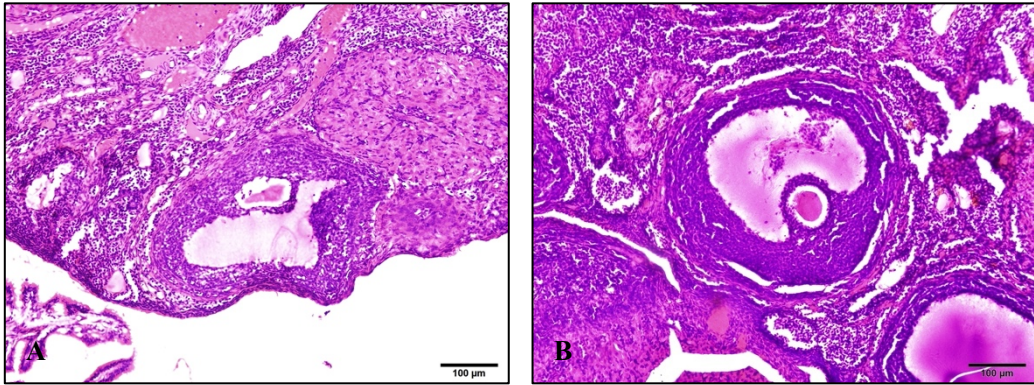
Şekil 32. (A) POI+Salin grubu ve (B) POI+PRP grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde germinal epitel (siyah ok), primordiyal folikül (yeşil ok) ve unilaminar primer folikül (sarı ok).



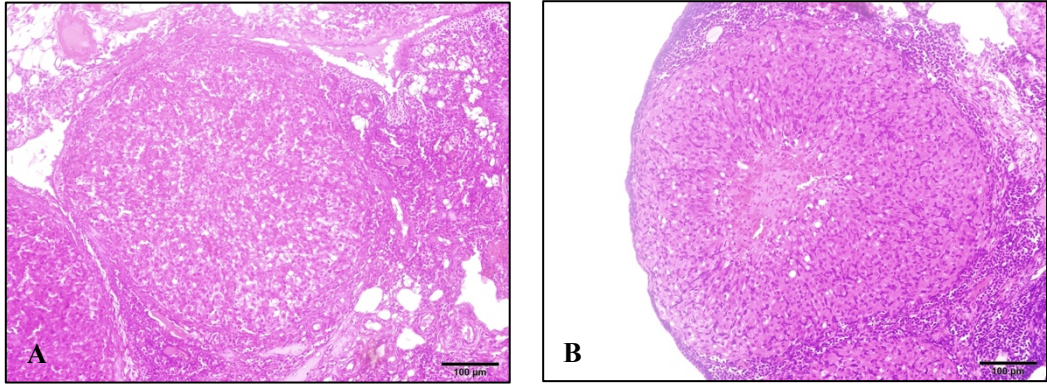
Şekil 33. (A) POI+Salin grubu ve (B) POI+PRP grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde multilaminar primer folikül (siyah ok).



Şekil 34. (A) POI+Salin grubu ve (B) POI+PRP grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde sekonder folikül.



Şekil 35. (A) POI+Salin grubu ve (B) POI+PRP grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde matür (graaf) folikül.



Şekil 36. (A) POI+Salin grubu ve (B) POI+PRP grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde korpus luteum

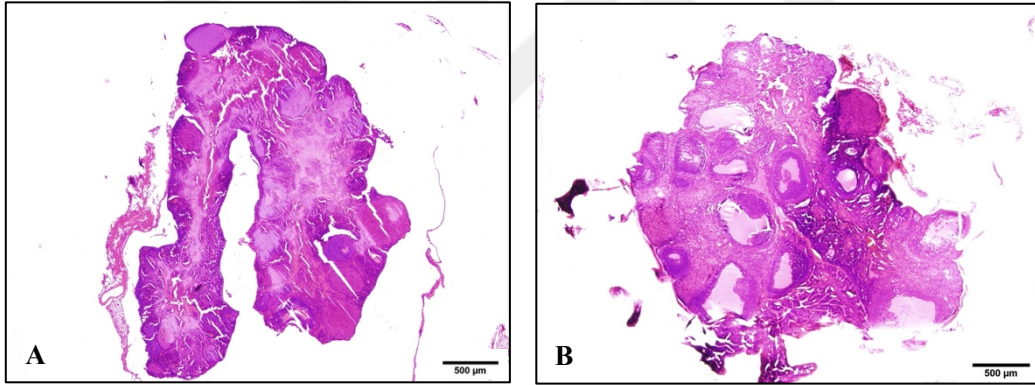
Prematür ovaryan yetmezliği grubunun KOH uygulanan alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulamasının ardından kurban edilmiş denekler (POI+Salin+KOH grubu) ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulamasının ardından kurban edilmiş deneklerden (POI+PRP+KOH grubu) elde edilen ovaryum doku kesitleri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi.

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun KOH uygulanan alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulamasının ardından kurban edilmiş deneklerde (POI+Salin+KOH grubu) genel morfolojik doku bütünlüğünün korunamadığı ve ovaryum yüzeyini çevreleyen germinal epitelin alçak kübik epitelden yüksek kübik epitele değişkenlik gösterdiği görüldü. Normal ovaryan rezerv grubuna (Kontrol grubu) kıyasla primordiyal, unilamilar ve multilaminar primer folikül sayılarının azaldığı ve matür (graaf) folikül ile atretik foliküllerin artışı tespit edildi. POI grubu deneklerine kıyasla primordiyal foliküllerin sayısının azaldığı ve atretik foliküllerin arttığı gözlemlendi.

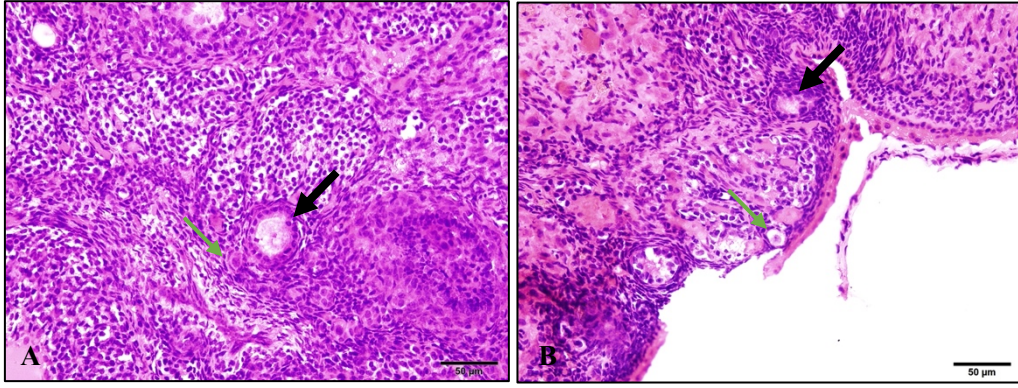
Prematür ovaryan yetmezliği grubunun KOH uygulanan alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulamasının ardından kurban edilmiş deneklerde (POI+PRP+KOH grubu) ovaryum yüzeyini çevreleyen germinal epitelin alçak kübik epitelden yüksek kübik epitele değişkenlik

gösterdiği görüldü. Normal ovaryan rezerv grubuna (Kontrol grubu) kıyasla primordiyal folikül sayılarının azaldığı ve matür (graaf) folikül ile atretik foliküllerin arttığı tespit edildi. POI grubu deneklerine kıyasla atretik foliküllerin sayıca arttığı görüldü.

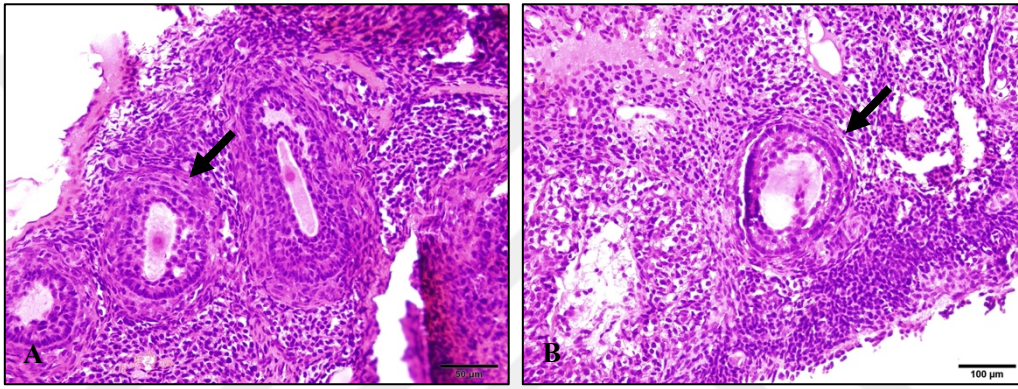
Prematür ovaryan yetmezliği grubunun KOH uygulanan alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulamasının ardından sakrifiye edilen denekler (POI+Salin+KOH grubu) ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta kontrollü ovaryan stimülasyon uygulamasının ardından sakrifiye edilen deneklerden (POI+PRP+KOH grubu) elde edilen ovaryum doku kesitleri kıyaslandığında, POI+PRP+KOH grubu primordiyal ve unilamilar primer folikül ve korpus luteum sayılarının arttığı, buna ek olarak atretik foliküllerin sayıca azaldığı tespit edildi.



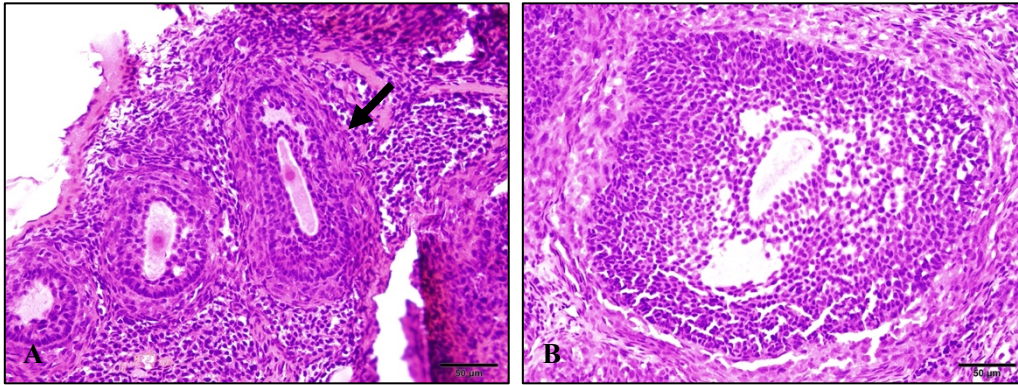
Şekil 37. (A) Prematür ovaryan yetmezliği grubunun KOH uygulanan alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulamasının ardından sakrifiye edilen denekler (POI+Salin+KOH grubu) ile (B) VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta kontrollü ovaryan stimülasyon uygulamasının ardından sakrifiye edilen deneklerden (POI+PRP+KOH grubu) elde edilen ovaryum doku kesitlerinin ışık mikroskopik genel görünümü.



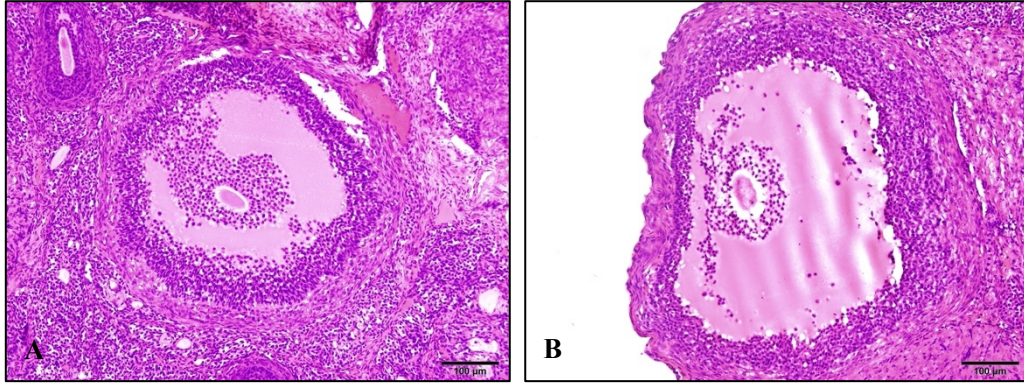
Şekil 38. (A) POI+Salin+KOH grubu ve (B) POI+PRP+KOH grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde primordiyal folikül (yeşil ok) ve unilaminar primer folikül (siyah ok).



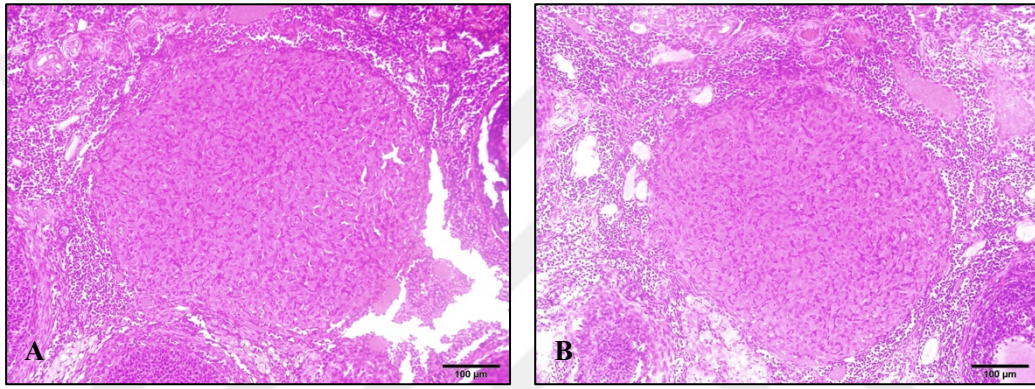
Şekil 39. (A) POI+Salin+KOH grubu ve (B) POI+PRP+KOH grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde multilaminar primer folikül (siyah ok).



Şekil 40. (A) POI+Salin+KOH grubu ve (B) POI+PRP+KOH grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde sekonder folikül (siyah ok).



Şekil 41. (A) POI+Salin+KOH Grubu ve (B) POI+PRP+KOH Grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde matür (graaf) folikül.



Şekil 42. (A) POI+Salin+KOH Grubu ve (B) POI+PRP+KOH Grubu deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde korpus luteum.

4.2.2. Morfometrik Bulgular

Çalışmada yer alan ve çiftleştirme protokolü uygulanan denekler haricindeki tüm denekler enjeksiyonlarının bitiminin ardından östrus döngülerinin östrus periyodunda sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen tüm deneklerden elde edilen doku örneklerinden 5 µm kalınlığında sıralı kesitler alındı. Doku kesitlerinde H&E boyamasının ardından primordiyal, unilaminar ve multilaminar primer, sekonder, matür (graaf), atretik folikül ve korpus luteum sayımı gerçekleştirildi.

Normal ovaryan rezerv grubu (Kontrol grubu) ile prematür ovaryan yetmezliği grubunun (POI grubu) doku kesitlerinde gelişimin farklı basamaklarında foliküller ve korpus luteum sayımları gerçekleştirildi. Sayısal parametrelerin ortalama değerleri (%25 - %75 persentil) Tablo 16 ve Şekil 43’de verildi.

POI grubu doku kesitlerinde kontrol grubuna kıyasla primordiyal (3 [3-4]- 9 [8-19]), unilaminar primer (3 [2-3,5]- 4 [4-7]) ve multilaminar primer folikül (3 [2,5-

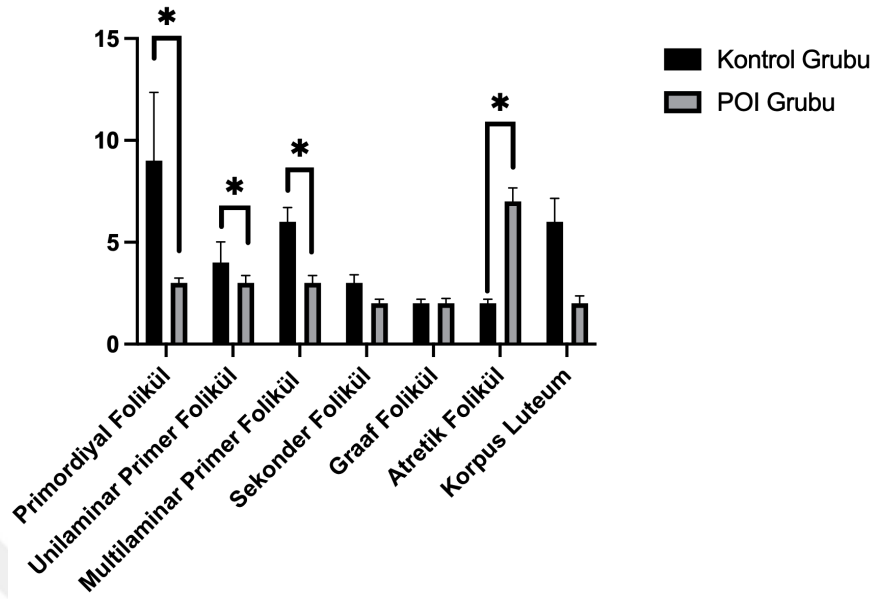
4]- 6 [4,5 – 7,5]) sayılarının istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı (sırasıyla $p=0,008$, $p=0,01$ ve $p=0,01$) belirlendi. POI grubu doku kesitlerinde kontrol grubuna kıyasla normal morfolojiye sahip foliküllerin yerini atretik foliküllerin aldığı ve atretik folikül sayılarının arttığı tespit (7 [5-7,5]- 2 [2-2,5]) edildi ($p=0,008$). Gelişimin diğer basamaklarındaki foliküllerin sayısının kontrol grubu ve POI grubu arasında yapılan karşılaştırmada benzer oldukları tespit edildi. POI grubunda kontrol grubuna kıyasla korpus luteum sayısının (2 [1,5-3]- 6 [2-7]) anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p=0,02$).

Tablo 16. Gelişimin tüm basamaklarındaki foliküller ve korpus luteum sayılarının Kontrol grubu ve POI grubu arasındaki karşılaştırması

Ovaryan Folikül Sınıflandırması	Normal ovaryan rezerv grubu (Kontrol Grubu)	Prematür ovaryan yetmezliği (POI) grubu (POI Grubu)	<i>p değeri</i>
Primordiyal Folikül	9 (8-19)	3 (3-4)	0,008
Unilaminar Primer Folikül	4 (4-7)	3 (2-3,5)	0,01
Multilaminar Primer Folikül	6 (4,5 – 7,5)	3 (2,5- 4)	0,01
Sekonder Folikül	3 (2-3)	2 (2-2,5)	0,3
Graaf Folikül	2 (1,5 -2)	2 (1-2)	0,69
Atretik Folikül	2 (2-2,5)	7 (5-7,5)	0,008
Korpus Luteum	6 (2-7)	2 (1,5-3)	0,02

*Veriler ortalama folikül sayısı (%25-%75 percentile) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 43. Kontrol Grubu ve POI Grubunda gelişimin tüm basamaklarındaki foliküller ve korpus luteum sayıları

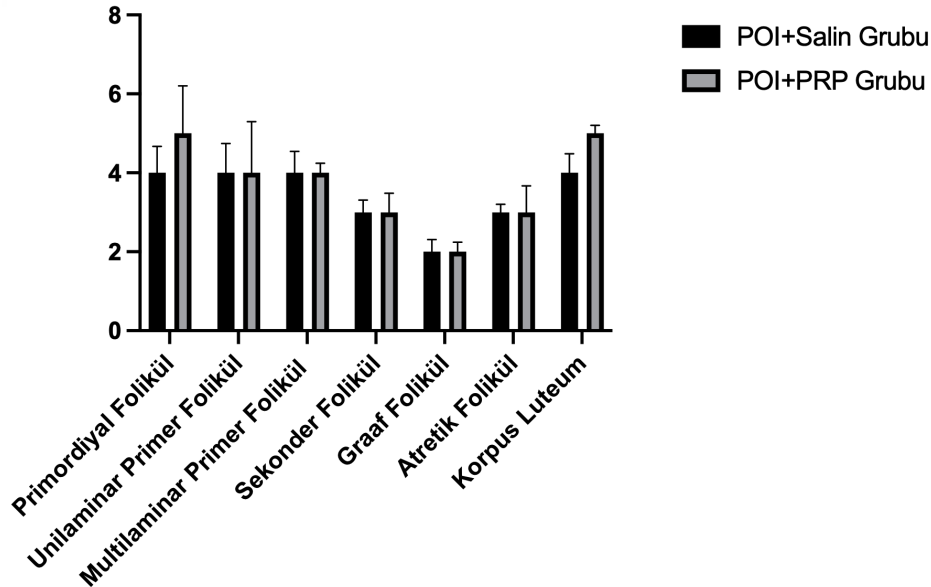
Prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen denekler (POI+Salin grubu) ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra sakrifiye edilen deneklerden (POI+PRP grubu) elde edilen ovaryum doku kesitlerinde gelişimin farklı basamaklarında foliküller ve korpus luteum sayımları gerçekleştirildi. Sayısal parametrelerin ortalama değerleri Tablo 17 ve Şekil 44’de verildi. Gelişimin tüm basamaklarındaki foliküllerin sayısı ve korpus luteum sayısı POI+Salin grubu ve POI+PRP grubu arasında karşılaştırıldığında benzer oldukları tespit edildi.

Tablo 17. Gelişimin tüm basamaklarındaki foliküller ve korpus luteum sayılarının POI+Salin grubu ve POI+PRP grubu arasında karşılaştırması

Ovaryan Folikül Sınıflandırması	POI+Salin Grubu	POI+PRP Grubu	<i>p</i> değeri
Primordiyal Folikül	4 (2,5 -4,5)	5 (3,5 – 7,5)	0,31
Unilaminar Primer Folikül	4 (2-5)	4 (3-7,5)	0,69
Multilaminar Primer Folikül	4 (3-5)	4 (3-4)	0,42
Sekonder Folikül	3 (2,5-3,5)	3 (2,5-4)	0,99
Graaf Folikül	2 (1,5-2,5)	2 (1-2)	0,22
Atretik Folikül	3 (2,5 -3)	3 (2,5-4)	0,15
Korpus Luteum	4 (3-4,5)	5 (4,5-5)	0,95

*Veriler ortalama folikül sayısı (%25-%75 percentile) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 44. POI+Salin grubu ve POI+PRP grubu gelişimin tüm basamaklarındaki foliküllerin ve korpus luteum sayıları

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun KOH uygulanan alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon uygulamasının ardından sakrifiye edilen denekler (POI+Salin+KOH grubu) ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta kontrollü ovaryan stimülasyon uygulamasının ardından sakrifiye edilen deneklerden (POI+PRP+KOH grubu) elde edilen ovaryum doku kesitlerinde gelişimin farklı basamaklarında foliküller ve korpus luteum sayımları

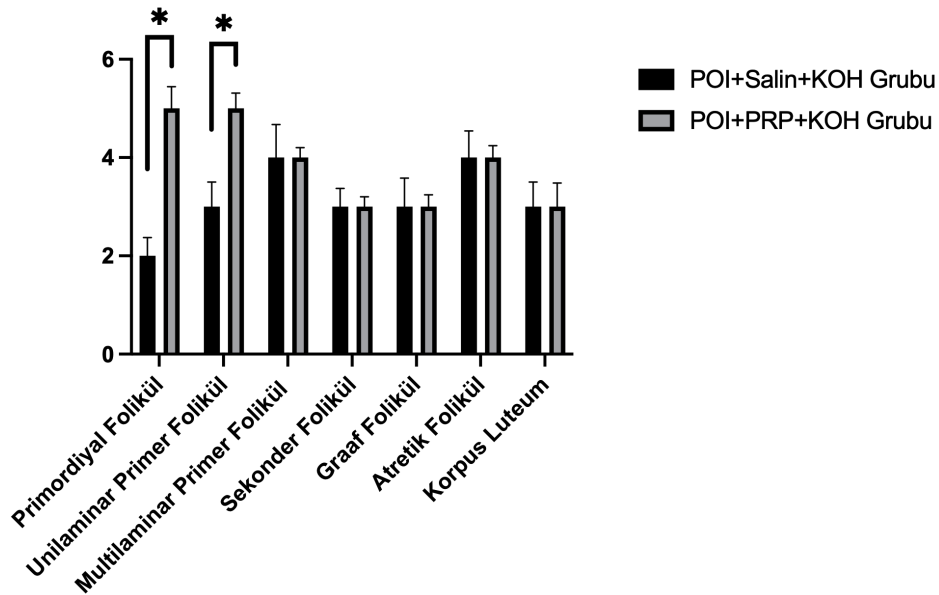
gerçekleştirildi. Sayısal parametrelerin ortalama değerleri Tablo 18 ve Şekil 45’de verildi. POI+Salin+KOH grubu doku kesitlerinde POI+PRP+KOH grubuna kıyasla primordiyal folikül (2 [1,5 -3]- 5 [4-6]) ve unilamilar primer folikül (3 [1,5-3,5]- 5 [4,5-5,5]) sayılarının istatistiksel olarak anlamlı olarak azaldığı (sırasıyla $p=0,008$ ve $p=0,01$) belirlendi. Gelişimin diğer basamaklarındaki foliküller ve korpus luteum sayısı POI+Salin+KOH grubu ve POI+PRP+KOH grubu doku kesitlerin arasında karşılaştırıldığında benzer oldukları tespit edildi.

Tablo 18. Gelişimin tüm basamaklarındaki foliküllerin ve korpus luteum sayılarının POI+Salin+KOH grubu ve POI+PRP+KOH grubu arasında karşılaştırması

Ovaryan Folikül Sınıflandırması	POI+Salin+KOH Grubu	POI+PRP+KOH Grubu	<i>p</i> değeri
Primordiyal Folikül	2 (1,5 -3)	5 (4-6)	0,008
Unilaminar Primer Folikül	3 (1,5-3,5)	5 (4,5-5,5)	0,008
Multilaminar Primer Folikül	4 (2,5-4,5)	4 (3,5-4)	0,84
Sekonder Folikül	3 (2-3,5)	3 (3-3,5)	0,42
Graaf Folikül	3 (2-4,5)	3 (3-4)	0,69
Atretik Folikül	4 (5-7)	4 (4-5)	0,56
Korpus Luteum	3 (1,5-3,5)	3 (3-5)	0,22

*Veriler ortalama folikül sayısı (%25-%75 percentile) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Şekil 45. Gelişimin tüm basamaklarındaki foliküllerin ve korpus luteum sayılarının POI+Salin+KOH grubu ve POI+PRP+KOH grubu arasında karşılaştırması

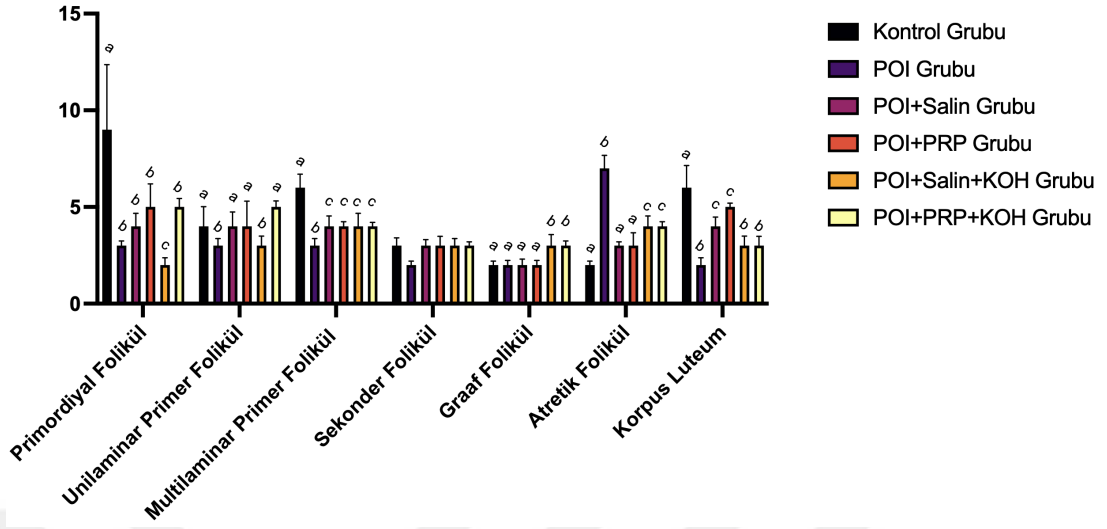
Tablo 19. Gelişimin tüm basamaklarındaki foliküllerin ve korpus luteum sayılarının gruplar arasında karşılaştırması

Ovaryan Folikül Sınıflandırması	Kontrol Grubu	POI Grubu	POI + Salin Grubu	POI + PRP Grubu	POI + Salin + KOH Grubu	POI + PRP + KOH Grubu	<i>p değeri</i>
Primordiyal Folikül	9 (8-19) ^a	3 (3-4) ^b	4 (2,5 -4,5) ^b	5 (3,5-7,5) ^b	2 (1,5 -3) ^c	5 (4-6) ^b	0,001
Unilaminar Primer Folikül	4 (4-7) ^a	3 (2-3,5) ^b	4 (2-5) ^a	4 (3-7,5) ^a	3 (1,5-3,5) ^b	5 (4,5-5,5) ^a	0.021
Multilaminar Primer Folikül	6 (4,5 – 7,5) ^a	3 (2,5- 4) ^b	4 (3-5) ^c	4 (3-4) ^c	4 (2,5-4,5) ^c	4 (3,5-4) ^c	0,037
Sekonder Folikül	3 (2-3)	2 (2-2,5)	3 (2,5-3,5)	3 (2,5-4)	3 (2-3,5)	3 (3-3,5)	0.21
Graaf Folikül	2 (1,5 -2) ^a	2 (1-2) ^a	2 (1,5-2,5) ^a	2 (1-2) ^a	3 (2-4,5) ^b	3 (3-4) ^b	0.004
Atretik Folikül	2 (2-2,5) ^a	7 (5-7,5) ^b	3 (2,5 -3) ^a	3 (2,5-4) ^a	4 (5-7) ^c	4 (4-5) ^c	0.001
Korpus Luteum	6 (2-7) ^a	2 (1,5-3) ^b	4 (3-4,5) ^c	5 (4,5-5) ^c	3 (1,5-3,5) ^b	3 (3-5) ^b	0,04

*Veriler ortalama folikül sayısı (%25-%75 percentile) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis testi, ikili grup karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

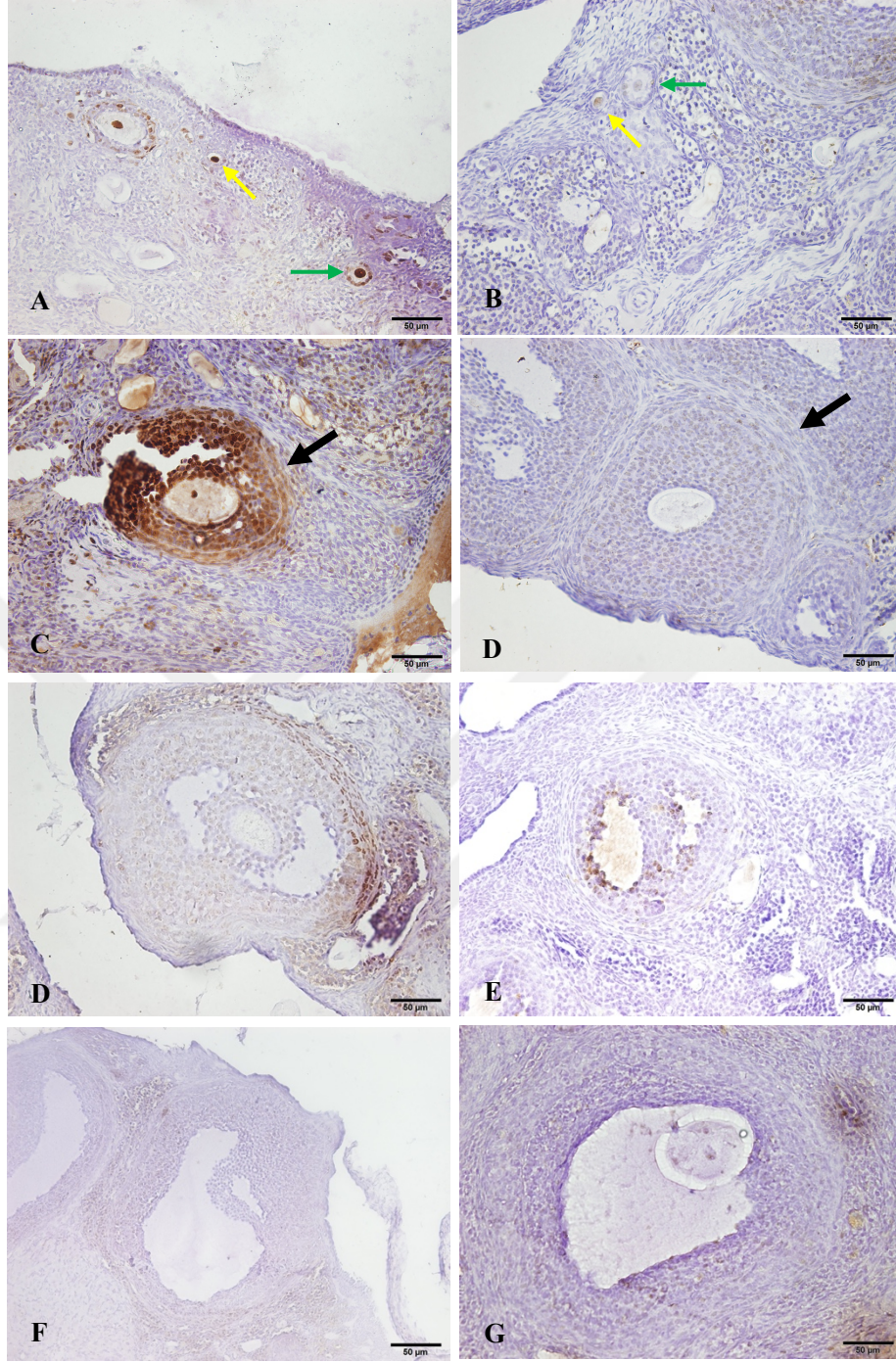
^{a,b} Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil 46. Gelişimin tüm basamaklarındaki foliküllerin ve korpus luteum sayılarının gruplar arasında karşılaştırması

4.2.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

Çalışmada yer alan ve çiftleştirme protokolü uygulanan denekler haricindeki tüm denekler, enjeksiyonlarının bitiminin ardından östrus döngülerinin östrus evresinde sakrifiye edildikten sonra, deneklerden elde edilen doku örneklerinden 5 µm kalınlığında sıralı kesitler alındı. Doku kesitlerinin proliferasyon belirteci olan PCNA immünohistokimyasal boyaması için en az bir sekonder folikülün tespit edildiği kesit başlangıç kesiti olarak belirlendi ve 3 farklı seviyeden kesitte boyama gerçekleştirildi. Her bir kesitte ovaryan foliküller preantral (primordiyal foliküller, unilaminar ve multilaminar primer) ve antral (sekonder ve graaf) foliküller olmak üzere iki gruba ayrıldı ve foliküllerde yer alan granüloza hücrelerinin sayımı gerçekleştirildi. Granüloza hücrelerinde pozitif ekspresyon gösteren hücrelerin yüzde değeri gruplar arasında karşılaştırıldı.



Şekil 47. Deneklerinden elde edilen ovaryum doku kesitlerinde PCNA immünohistokimya boyaması. (A) PCNA ekspresyonu pozitif primordiyal folikül (sarı ok) ve unilaminar primer folikül (yeşil ok). (B) PCNA ekspresyonu negatif primordiyal folikül (sarı ok) ve unilaminar primer folikül (yeşil ok). (C) PCNA ekspresyonu pozitif multilaminar primer folikül (siyah ok). (D) PCNA ekspresyonu negatif multilaminar primer folikül (siyah ok). (E) PCNA ekspresyonu pozitif sekonder folikül. (F) PCNA ekspresyonu pozitif graaf folikül. (G) PCNA ekspresyonu negatif graaf folikül.

Preantral (primordiyal foliküller, unilaminar ve multilaminar primer) foliküllerde PCNA ekspresyonu pozitif granüloza hücre yüzdesi gruplar arasında karşılaştırıldığında; kontrol grubunun diğer gruplara kıyasla en yüksek değere sahip olduğu ($p=0,006$), diğer grupların birbirleri ile benzer ekspresyon gösterdiği tespit edildi. Gruplar arasında antral foliküllerde PCNA ekspresyonu pozitif granüloza hücre yüzdesi değerlendirildiğinde; grupların birbirleri ile benzer ekspresyon gösterdiği saptandı ($p=0.069$).

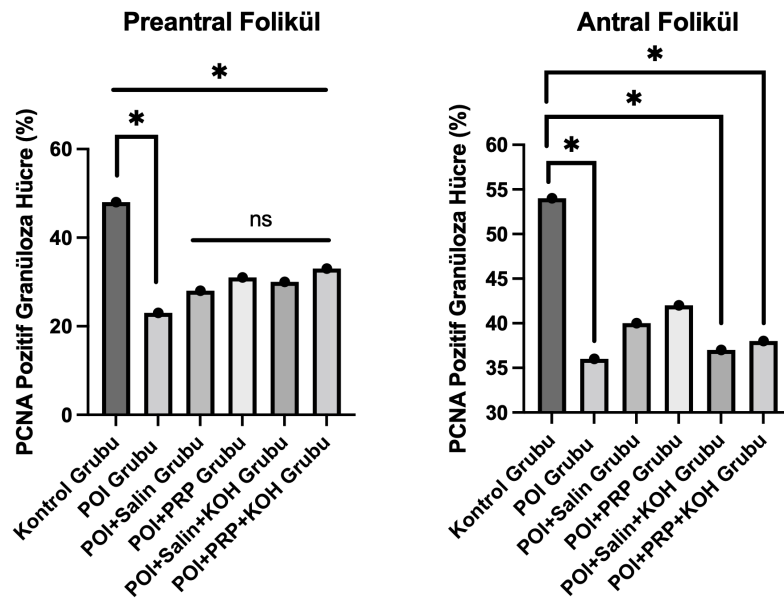
Tablo 20. Preantral (primordiyal foliküller, unilaminar ve multilaminar primer) ve antral (sekonder ve graaf) foliküllerde PCNA ekspresyonu pozitif granüloza hücre yüzdesi

Ovaryan Folikül Sınıflandırması	Kontrol Grubu	POI Grubu	POI + Salin Grubu	POI + PRP Grubu	POI + Salin + KOH Grubu	POI + PRP + KOH Grubu	<i>p</i> değeri
Preantral Folikül	48,4 ^a	23,7 ^b	28,4 ^b	31,2 ^b	30,4 ^b	33,1 ^b	0,006
Antral Folikül	54,5 ^a	36,3 ^b	40,2 ^{a,b}	42,5 ^{a,b}	37,2 ^b	38,4 ^b	0.069

*Veriler pozitif hücre yüzdesi (%) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Ki-kare testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

^{a,b} Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil 48. Preantral (primordiyal foliküller, unilaminar ve multilaminar primer) ve antral (sekonder ve graaf) foliküllerde PCNA ekspresyonu pozitif granüloza hücre yüzdesi ve gruplar arası karşılaştırması

4.3. Biyokimyasal Bulgular

Çalışmaya dahil edilen tüm deneklerden elde edilen serum sıvılarında Anti-Müllerian Hormon konsantrasyonu ve ovaryum doku homojenatlarında PTEN ve pAKT konsantrasyonları “enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)” yöntemi ile ölçüldü.

Normal ovaryan rezerv grubundan (Kontrol grubu) çalışmanın 1. günü elde edilen serum örneklerinde, prematür ovaryan yetmezliği grubunun (POI grubu) çalışmanın 1. ve 15. günü elde edilen serum örneği, prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan gruplarda (POI+Salin grubu ve POI+Salin+KOH grubu) çalışmanın 1., 15. ve ~50. günü elde edilen serum örneklerinde, prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan gruplarda (POI+PRP grubu ve POI+PRP+KOH grubu) çalışmanın 1., 15. ve ~50. günü elde edilen serum örneklerinde ovaryan rezerv belirteci olan AMH konsantrasyonlarının ölçümünün ardından gruplar arası ve grup içi sıralı örneklemeler karşılaştırıldı.

Çalışmanın 1. günü tüm deneklerin serum AMH konsantrasyonları, homojen dağılım gösteren ovaryan rezerve sahip deneklerin çalışmaya dahil edilebilmesi için belirlendi. Birinci ve üçüncü çeyrek (%25 ile %75’lik) dilimler arasında tespit edilen serum AMH konsantrasyonuna sahip denekler çalışmaya dahil edildi. Bu nedenle çalışmanın 1. günü elde edilen serum örneklerindeki AMH konsantrasyonları gruplar arasında kıyaslandığında benzer oldukları tespit edildi. Tüm gruplarda çalışmanın 15. gününde elde edilen serum örneklerinde, çalışmanın 1. günü elde edilen serum örneklerine kıyasla istatistiksel olarak düşük AMH konsantrasyonuna sahip olduğu belirlendi ($p=0.001$). Çalışmanın ~50. gününde elde edilen serum örneklerinde çalışmanın 15. günü elde edilen serum örnekleri ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak benzer serum AMH konsantrasyonları görüldü (Tablo 21 ve Şekil 49).

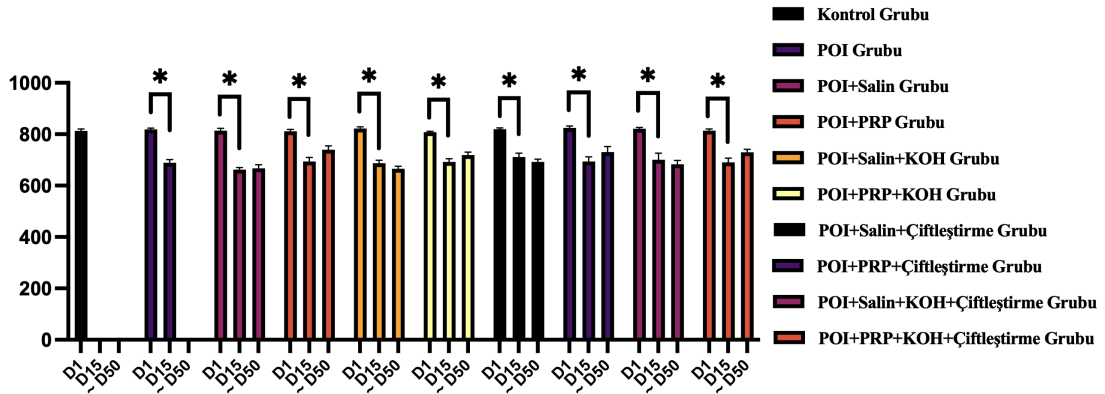
Tablo 21. Çalışmanın 1. 15. ve ~50 günü elde edilen serum örneklerinde Anti-Müllerian Hormon konsantrasyonları ve tüm gruplar arasında karşılaştırması

Çalışma Grubu	Çalışmanın 1. günü	Çalışmanın 15. günü	Çalışmanın ~50. günü	p değeri ^{##}
Kontrol Grubu	813,2 ± 7,32	-	-	
POI Grubu	818,4 ± 5,36 ^a	689 ± 12,48 ^b	-	0,001
POI+Salin Grubu	813,5 ± 9,5 ^a	661 ± 8,2 ^b	667,25 ± 14,19 ^b	0,74
POI+PRP Grubu	811,5 ± 7,2 ^a	693,5 ± 16,02 ^b	739,75 ± 15,23 ^b	0,19
POI+Salin+KOH Grubu	822 ± 6,4 ^a	687,25 ± 11,23 ^b	665,5 ± 10,17 ^b	0,1
POI+PRP+KOH Grubu	808,25 ± 2,9 ^a	692,25 ± 12,17 ^b	718,5 ± 12,11 ^b	0,16
POI+Salin+Çiftleştirme Grubu	819,5 ± 4,79 ^a	711 ± 15,46 ^b	692 ± 10,65 ^b	0,37
POI+PRP+Çiftleştirme Grubu	824,5 ± 7,85 ^a	694,0 ± 18,4 ^b	730,25 ± 21,98 ^b	0,31
POI+Salin+KOH+Çiftleştirme Grubu	821,3 ± 5,13 ^a	700 ± 26,1 ^b	682,66 ± 15,59 ^b	0,28
POI+PRP+KOH+Çiftleştirme Grubu	813,75 ± 6,63 ^a	690,25 ± 16,97 ^b	729,50 ± 11,67 ^b	0,2
p değeri [#]	0,08	0,3	0,058	

*Veriler ortalama AMH konsantrasyonu ± SD (pg/ml) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada One- Way ANOVA testi ($p^{\#}$) kullanıldı. Grup içi bağımlı değişkenlerin karşılaştırmada Paired t-testi ($p^{##}$) kullanıldı. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

^{a,b} Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil 49. Çalışmanın 1. 15. ve ~50 günü elde edilen serum örneklerinde Anti-Müllerian Hormon konsantrasyonları (pg/ml) ve tüm gruplar arasında karşılaştırması

Normal ovaryan rezerv grubundan (Kontrol grubu) çalışmanın 1. günü elde edilen ovaryum dokusu homojenatı, prematür ovaryan yetmezliği grubunun (POI grubu) çalışmanın 15. günü elde edilen ovaryum dokusu homojenatı, prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan POI+Salin grubunda çalışmanın ~50. günü ve POI+Salin+KOH grubunda çalışmanın ~65. günü elde edilen ovaryum dokusu homojenatı, prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan POI+PRP grubunda çalışmanın ~50. günü ve POI+PRP+KOH grubunda çalışmanın ~65. günü elde edilen ovaryum dokusu homojenatı foliküler aktivasyon belirteci olan

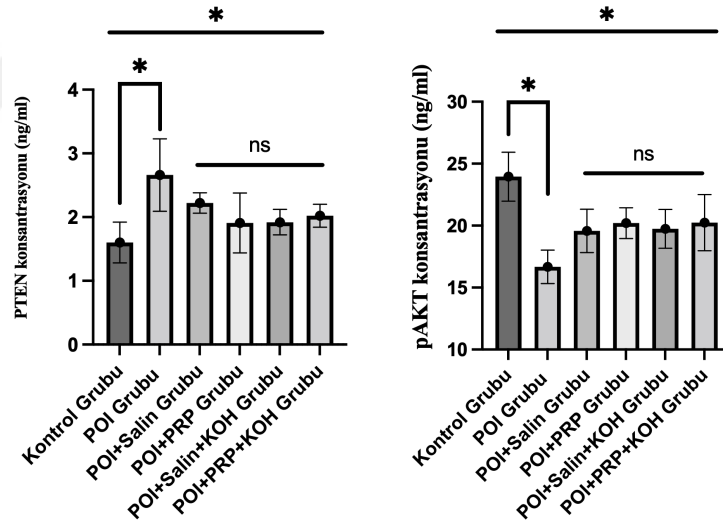
PTEN ve pAKT konsantrasyonu açısından gruplar arasında karşılaştırıldı. POI grubunda, diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük pAKT konsantrasyonu ($p=0,016$) ve yüksek PTEN konsantrasyonu ($p=0,001$) tespit edildi.

Tablo 22. Ovaryum doku örneklerinde PTEN ve pAKT konsantrasyonunun (ng/ml) gruplar arasında karşılaştırması

Çalışma Grubu	PTEN konsantrasyonu (ng/ml)	pAKT konsantrasyonu (ng/ml)
Kontrol Grubu	$1,6 \pm 0,32^a$	$23,95 \pm 1,98^a$
POI Grubu	$2,66 \pm 0,57^b$	$16,68 \pm 1,35^b$
POI+Salin Grubu	$2,22 \pm 0,16^c$	$19,58 \pm 1,75^c$
POI+PRP Grubu	$1,91 \pm 0,47^c$	$20,02 \pm 1,24^c$
POI+Salin+KOH Grubu	$1,92 \pm 0,2^c$	$19,74 \pm 1,57^c$
POI+PRP+KOH Grubu	$2,02 \pm 0,18^c$	$20,24 \pm 2,27^c$
<i>p değeri</i>	0.001	0.033

*Veriler ortalama PTEN ve pAKT düzeyi $\pm$ SD olarak verildi.

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



Şekil 50. Ovaryum doku örneklerinde PTEN ve pAKT konsantrasyonunun gruplar arasında karşılaştırması

4.4. Çiftleştirme Bulguları

Prematür ovaryan yetmezliği grubunun alt gruplarından olan, VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimulasyon yapılmasının ardından çiftleştirme protokolü uygulanan POI+Salin+Çiftleştirme grubu ve kontrollü ovaryan

stimulasyon yapılmasının ardından çiftleştirme protokolü uygulanan POI+Salin+KOH+Çiftleştirme grubu ile 15 VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu yapılan ve düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimulasyon yapılmadan çiftleştirme protokolü uygulanan POI+PRP+Çiftleştirme grubu ve kontrollü ovaryan stimulasyon yapılmasının ardından çiftleştirme protokolü uygulanan POI+PRP+KOH+Çiftleştirme grubu doğurganlık durumunu ve doğum başına düşen sağlıklı yavru sayısı ve yavru ağırlıkları Tablo 23 ve Şekil 51’de verildi.

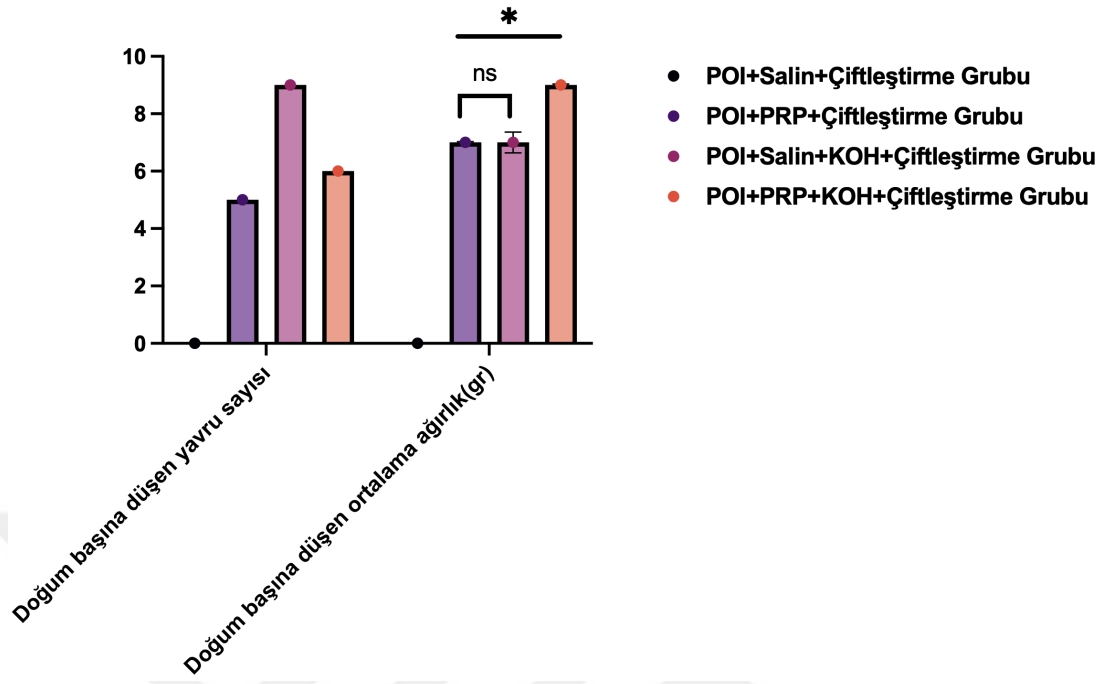
Tablo 23. Gruplar arasında doğurganlık durumu ve doğum başına düşen sağlıklı yavru sayısı ve yavru ağırlıkları

	POI + Salin + Çiftleştirme Grubu	POI + PRP + Çiftleştirme Grubu	POI + Salin + KOH + Çiftleştirme Grubu	POI + PRP + KOH + Çiftleştirme Grubu	<i>p değeri</i>
Doğurganlık Durumu (gebelik sayısı)	0	2	1	1	-
Doğum başına düşen yavru sayısı	0	5	9	6	-
Doğum başına düşen ortalama ağırlık (gr)	0	7 (7-8,5) ^a	7 (6-7) ^a	9 (8-10) ^b	0,046

*Veriler ortalama ağırlık (%25-%75 percentile) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmada Kruskal Wallis-H testi kullanıldı, $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

^{a,b} Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Şekil 51. Gruplar arasında doğum başına düşen sağlıklı yavru sayısı ve yavru ağırlıkları kıyaslaması

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada, ‘prematür ovaryan yetmezliği olgularında, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokolü öncesinde intraovaryan plateletten zengin plazma uygulaması ovaryan foliküllerin aktivasyonunu sağlar ve doğum başına düşen yavru sayısını artırır’ hipotezinden yola çıkarak, sıçanlarda prematür ovaryan yetmezliği modeli oluşturulmuş ve KOH öncesi intraovaryan PRP uygulamasının PTEN/PI3K yolağı üzerinden foliküler aktivasyon ve doğum başına düşen yavru sayısı üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir.

Hayvan modellerini kullanan çalışmalar deneklerin mevcudiyeti, invaziv testleri gerçekleştirme yeteneği, kapsamlı örneklem boyutları ve tüm uygulamaların kontrolü ile standardizasyon gibi avantajlara sahiptir. Yapılan araştırmalara göre hayvan seçimi tartışmalı olsa da yaygın olarak kullanılan deney hayvanları arasında fare, sıçan ve tavşan bulunur. Fare ve sıçan gibi küçük kemirgenler, tavşan, köpek, kedi, domuz ve maymun gibi daha büyük hayvanlara göre daha çok tercih edilmektedir. Üreme fonksiyonları araştırmalarında, özellikle dişi farelerin ve sıçanların tercih edilmesinin nedeni iyi karakterize edilmiş östrus döngüleri (kisa süreli ve zaman sınırları tanımlanmış) ve güvenli kullanımlarıdır (Ajayi & Akhigbe, 2020). Mevcut bu avantajlar dikkate alınarak çalışmamızda yaklaşık 60 günlük, ortalama 150-200gr ağırlığında Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan denekler tercih edilmiştir.

Prematür ovaryan yetmezliği hayvan modelleri intraperitoneal (ip), subkütan (sc) veya intravenöz (iv) enjeksiyon yoluyla uygulanabilen farklı doz ve sürelerde, 4-vinilsikloheksen diepoksit (VCD), siklofosamid, busulfan, sisplatin, murin ZP3 330-342 peptitleri (ZP3) ile kimyasal indüksiyon aracılığıyla veya %35 galaktoz gıda peletle beslenme ile oluşturulabilmektedir (Na & Kim, 2020). POI hayvan model başarısı için etken maddenin, uygun dozun ve etki süresinin seçilmesi çok önemlidir. Siklofosamid, sisplatin, VCD ve %35 galaktoz gıda peleti farklı mekanizma ve sinyal yolağına dayanarak POI’yi tetikleyen etkili indükleyiciler olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, terapötik yöntemin araştırılması için uygun POI hayvan modelinin seçilmesi, önleyici yöntemi daha makul ve etkili hale getirebilen bu indükleyicilerin ilgili özelliklerine ve etki mekanizmasına dayanmalıdır (Zhang ve

ark., 2016). POI hayvan modeli oluşturmak amacıyla tekrarlayan dozlarla belirli bir süre VCD uygulanmasının selektif olarak sıçan ve fare primordiyal ve primer foliküllerinin sayısını, fosfataz ve tensin homolog / fosfotidilinositol-3-kinaz (PTEN/PI3K) sinyal yolağı ile apoptoz sürecini başlatarak, azalttığı gösterilmiştir (Bhattacharya, Sen, Hoyer, & Keating, 2012; Keating ve ark., 2011). Çalışmada prematür ovaryan yetmezliği modeli oluşturulması ve intraovaryan PRP uygulamasının PTEN/PI3K yolağı üzerinden foliküler aktivasyona etkisinin değerlendirilmesinin amaçlanması nedeniyle; aynı yolak üzerinden prematür foliküler aktivasyon ve apoptoz sürecini başlatan VCD uygulanarak intraovaryan PRP uygulamasının etkinliği değerlendirildi. Çalışmada VCD uygulanmasının PTEN/PI3K yolağı üzerindeki etki mekanizmasından dolayı, PTEN/PI3K yolağı inhibitör uygulaması gereksinimi kalmamış olup, az sayıda sayıda denek kullanımı ile çalışma gerçekleştirilmiştir.

Çalışma kapsamında gerçekleştirilen enjeksiyonların başlangıç ve bitiş günü vücut ağırlık ölçümleri gerçekleştirildi ve gruplar arasında karşılaştırıldı. Bu kapsamda literatürde yer alan Muhammad ve ark. (2009) tarafından yapılan çalışmada, VCD uyguladıkları Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda tedavi sırasında doza bağımlı bir şekilde (80 mg/kg ile yaklaşık %5 ila %8 kayıp, 160 mg/kg ile yaklaşık %18 kayıp) ve gıda alımı azalmasına bağlı kilo kaybı ve 4 deneğin 160 mg/kg'da VCD' yi tolere edemediği ve peritonit nedeni ile çalışmadan çıkarıldığı raporlanmıştır. Deney grubunda, VCD uygulamalarının tamamlandığı 28. gününden 58. gününe kadar kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir kilo kaybı görülme de daha düşük bir kilo alma oranı tespit edilmiştir. Bu verilerle VCD uygulanan deneklerin daha yavaş kilo alımının, VCD uygulaması durdurulduktan kısa bir süre sonra normale dönmesine bağlı olarak, VCD uygulanırken oluşan iştah kaybından kaynaklandığı şeklinde yorumlanmıştır. Benzer şekilde; Haas ve ark. (2007) yaptıkları çalışmada, 160 mg/kg VCD uyguladıkları C57Bl/6 farelerinin tedavileri sırasında kilo alımında azalma görülmüştür. Bu etki VCD dozunun iştah üzerindeki etkisine bağlanmıştır, çünkü uygulama kesildikten kısa bir süre sonra ağırlık başlangıç seviyelerine geri dönmüştür (Muhammad ve ark., 2009). Sahambi ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 5 gün süreyle 240mg/kg VCD uyguladıkları C57BL6/J cinsi farelerde ve kontrol grubunda 1-5 gün, 16., 37.,

57. ve 100. günlerde vücut ağırlıklarını değerlendirdiklerinde, gruplar arasında tüm ölçüm günlerinde vücut ağırlıkları bakımından anlamlı fark olmadığını, ancak 4. günden itibaren deneklerin vücut ağırlığı artışının anlamlı olduğunu bildirmiştir (Sahambi, Visser, Themmen, Mayer, & Devine, 2008). Zhang ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 10 gün susam yağında çözünmüş 160 mg/kg VCD uyguladıkları Krushinsky- Molodkina cinsi farelerde ve kontrol grupları olan sadece susam yağı veya salin uygulanan deneklerde vücut ağırlıklarını değerlendirdiklerinde, VCD uyguladıkları grupta diğer gruplara kıyasla uygulama sonrası 3. hafta vücut ağırlık artışları anlamlı olarak bulunmuş, fakat 4. haftada diğer gruplar ile benzer olduğu bildirilmiştir. Kontrol gruplarından susam yağı uygulanan deneklerde vücut ağırlıklarının artışının, diğer tüm deneklere kıyasla 6. ve 9. hafta arasında anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir (Zhang ve ark., 2016). Çalışmamızda, enjeksiyonların başlangıç ve bitiş günü vücut ağırlık ölçümleri gruplar arasında kıyaslandığında benzer olduğu tespit edilmiş olup, literatürde yer alan çalışmalar arasında VCD uygulamasının vücut ağırlığı üzerine etkisinin olmadığını gösteren çalışmaları destekler niteliktedir. Buna ek olarak çalışmamız kapsamında, Muhammad ve ark. (2009)'nın çalışmalarında (Muhammad ve ark., 2009) olduğu gibi 5 denek 160 mg/kg'da VCD etkilerini tolere edememesi nedeni ile çalışmadan çıkartılmak zorunda kalmıştır.

Çalışmamız kapsamında sakrifikasyon günü ovaryum ağırlık ölçümleri gerçekleştirildi ve gruplar arasında karşılaştırıldı. POI modeli ve denek hayvan seçimi çalışmamıza benzer olan Battiston ve ark. (2017) tarafından yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 14 gün 160 mg/kg VCD uyguladıkları Sprague-Dawley cinsi sıçanların 14. günde kontrol grubu deneklere göre anlamlı şekilde ovaryum ağırlıklarının düştüğünü bildirmiştir. VCD uyguladıkları denekler ve kontrol grupları vücut ağırlıkları ve besin alımı bakımından karşılaştırıldığında VCD uygulaması sonrasındaki 7 hafta boyunca verilerin benzer olduğu tespit edilmiştir. Bu veriler ovaryan fonksiyon kayıplarının genel vücut ağırlığı üzerine etkisinin olmadığı şeklinde yorumlanmıştır (Battiston ve ark., 2017). Sahambi ve ark. (2008) intraperitoneal olarak 5 gün 240mg/kg VCD uyguladıkları C57BL6/J cinsi farelerde 1-5 gün, 16., 37., 57. ve 100. günlerde ovaryum ağırlıklarını değerlendirdikleri çalışmalarında 57. gün ölçümünde VCD grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı

azalma olduğu, ancak 37. ve 100. gün ölçümlerinde benzer olduğu tespit edilmiştir. Ancak ovaryum ağırlıklarını vücut ağırlıklarına göre normalize ettiklerinde, 37., 57. ve 100. gün ölçümlerinde VCD uyguladıkları grupta ovaryum ağırlıklarının kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak düşük olduğu bildirilmiştir (Sahambi ve ark., 2008). Çalışmamız kapsamında 14 gün 160 mg/kg VCD uygulanan tüm gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak ovaryum ağırlıklarında azalma tespit edilmiştir. Sonuçlarımız literatürde yer alan çalışmalar arasında VCD uygulamasının ovaryum ağırlığı üzerine negatif etkisinin olduğunu gösteren çalışmaları destekler niteliktedir. VCD uygulamasının ovaryum ağırlıkları üzerindeki etkisi, gelişimin tüm basamaklarında folikül sayısında azalma ve dolayısıyla ovaryan doku hacmi ve ağırlığında azalmaya neden olduğu şeklinde düşünülmektedir.

Çalışmamızda çiftleştirme protokolü uygulanan denekler haricindeki tüm denekler, östrus döngülerinin östrus evresinde sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen deneklerden elde edilen doku örneklerinden 5 µm kalınlığında sıralı kesitler alındı. Doku kesitleri H&E boyaması ardından histomorfolojik ve morfometrik olarak değerlendirildi. Çalışma kapsamında, özellikle VCD uygulanan tüm gruplarda ovaryum yüzeyini çevreleyen germinal epitelin alçak kübik epitelden yüksek kübik epitele değişkenlik gösterdiği gözlemlendi. Bu veri, Gaytan ve ark. (2005)'nın yaptıkları çalışmada da raporlanmış ve germinal epitel morfolojisinin östrus döngüsü evrelerinde lokal farklılıklar gösterdiği, epitelin altında yer olan ovaryan kortekste epitelin çevrelediği folikülün gelişim basamağından ya da korpus luteumdan kaynaklanan morfolojik farklılıklar şeklinde yorumlanmıştır. Germinal epitelin çevrelediği ovaryan kortekste lokal olarak foliküllerin bulunmaması veya regrese olmuş korpus luteum varlığında epitel morfolojisinin kübik epitelden silindirik epitele doğru değişim gösterdiği bildirilmiştir (Gaytán ve ark., 2005). Çalışmamız kapsamında, normal histomorfolojik değerlendirmede germinal epitelin altında yer alan primordiyal foliküllerin VCD uygulaması yapılan gruplarında sayıca azaldığı verisine paralel olarak, germinal epitelin çevrelediği folikül sayısında azalma ile epitel morfolojisinde değişim gözlemlendiği şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmamızda gelişimin farklı basamaklarındaki foliküllerin prematür ovaryan yetmezliği grubunda normal ovaryan rezerv grubuna kıyasla sayıca azaldığı ve normal morfolojiye sahip foliküllerin yerini atretik foliküllerin aldığı tespit edilmiştir. Primordiyal, unilamilar ve multilaminar primer folikül sayılarının azaldığı belirgin şekilde gözlemlenmiştir. Atretik foliküllerde oosit-granüloza hücre bağlantı bütünlüğünün bozulduğu, piknotik nükleuslu granüloza hücreleri, ooplazmanın asidofili gösterdiği, oositin yapısal bozulma göstergesi olarak fragmentasyon ve vakuolizasyon artışı tespit edilmiştir. Battiston ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 14 gün 160 mg/kg VCD uyguladıkları Sprague-Dawley cinsi sıçanların ovaryum histomorfolojisinde, preantral folikül ve korpus luteum sayı ve hacimlerinde kontrol gruplarına kıyasla azalma gözlemlenmiştir. Benzer ovaryan hipotrofi bulgularını doğal yaşlanma grubu olarak çalışmaya dahil ettikleri erişkin kontrol deneklerinde (yaklaşık 173 günlük) de saptamaları nedeniyle ovaryan fonksiyon kaybının VCD ve doğal yaşlanma grubunda benzer olduğu şeklinde yorumlamışlardır (Battiston ve ark., 2017). Sahambi ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 5 gün 240mg/kg VCD uyguladıkları C57BL6/J cinsi farelerde ve kontrol gruplarında 16., 37., 57. ve 100. günlerde ovaryum histomorfolojisi değerlendirmesi sonucunda 16. günde VCD uyguladıkları grupta primordiyal, primer ve total folikül sayısında kontrol grubuna kıyasla anlamlı oranda azalma tespit edilmiştir. VCD uyguladıkları grupta 37. ve 57. günlerde gelişiminin tüm basamaklarındaki foliküllerin sayıca azaldığı, ancak 100. günde antral folikül sayısının kontrol grubu ile benzer olduğu gösterilmiştir (Sahambi ve ark., 2008). Bu verilere benzer şekilde, Cao ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 15 gün 160 mg/kg VCD uyguladıkları 10-12 haftalık C57BL6/J cinsi farelerde VCD uygulaması sonrası 20. günde gelişimin tüm basamaklarındaki foliküllerin sayıca azaldığı bildirilmiştir (Cao ve ark., 2020). Tüm bu veriler değerlendirildiğinde çalışmamızda VCD uygulaması sonrasında kontrol grubuna kıyasla histomorfolojik ve morfometrik olarak farklılıklar tespit edilmiş olup, literatürde yer alan POI modeli oluşturulan çalışmaların verileri ile paralel olarak çalışmamızda POI modelini oluşturduğumuzu doğrulamaktadır.

Çalışmamızda ovaryan rezervi değerlendirmek amacıyla kontrol ve deney gruplarında bakılan AMH düzeyleri deneyin 1. gününde gruplar arasında kıyaslandığında, AMH değerlerinin benzer olduğu ve 15 gün süre ile 160 mg/kg VCD enjeksiyonu sonrasında 15. gününde elde edilen serum örnekleri tüm gruplarda, çalışmanın 1. günü elde edilen serum örneklerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük olduğu tespit edildi. Duo ve ark. (2022) tarafından yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 15 gün süreyle 80 mg/kg VCD uyguladıkları grup ve kontrol grubu olarak intraperitoneal olarak 2,5 mL/kg susam yağı uyguladıkları Sprague-Dawley cinsi sıçanların serum E2, FSH, LH ve AMH konsantrasyonunu değerlendirilmiştir. VCD uyguladıkları grupta kontrol grubuna kıyasla serum E2 ve AMH konsantrasyonunun anlamlı olarak düştüğü, serum FSH ve LH konsantrasyonunun anlamlı olarak yükseldiği tespit edilmiştir. Bu veriler, VCD uygulaması ile sayıca azalan primordiyal foliküller, artan FSH ve LH konsantrasyonun ve azalan E2 ve AMH konsantrasyonun yanı sıra AKT sinyalinin inhibisyonu ve yüksek apoptotik indeks ile POI sıçan modelinin tam olarak klinik karakteristik özellik yansıttığı şeklinde yorumlanmıştır (Dou ve ark., 2022). Çalışmamız, literatürde yer alan POI modeli oluşturulan çalışmaların serum AMH konsantrasyon verileri ve primordiyal ve primer folikül sayısı verileri ile paralel olmasının yanısıra oluşturulan POI modelinin klinik karakteristikleri de yansıttığını doğrulamaktadır.

Çalışmamız kapsamında VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu sonrası sakrifiye edilen denekler ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu sonrası sakrifiye edilen deneklerden elde edilen ovaryum doku kesitleri ve serum AMH konsantrasyonu kıyaslanmıştır. Gruplar arasında gelişimin farklı basamaklarındaki foliküllerin sayıca birbirine benzer olduğu ve serum AMH konsantrasyonlarının deneyin 15 ve 50. günlerinde istatistiksel olarak benzer olduğu tespit edildi. Çalışmamızda PRP enjeksiyonu otolog gerçekleştirilmedi. PRP süspansiyonu erkek sıçanlardan elde edilerek tek basamaklı santrifüj sonrasında $2,5 \times 10^5$ platelet/ul konsantrasyonda total hacim 10 µl olacak şekilde, aktivatör uygulaması yapılmadan intraovaryan enjeksiyonu yapıldı. PRP eldesinde kullanılacak serum örneği, dişi sıçanlardaki hormon parametrelerinden etkilenmemesi amacıyla erkek sıçandan elde edildi.

Ahmadian ve ark. (2020), çalışmamıza benzer şekilde, intraperitoneal olarak 14 gün 160 mg/kg VCD enjeksiyonu ile oluşturdıkları POI sıçan modelinde, PRP'nin intraovaryan enjeksiyonu sonrasında foliküler gelişim ve anjiyogenez üzerinde etkisini değerlendirmiştir. Otolog olmayan dişi sıçanlardan elde edilen PRP, $8.5 \times 10^5/\mu\text{l}$ ve $21.6 \times 10^5/\mu\text{l}$ platelet olacak şekilde iki farklı konsantrasyonda total hacimi 10 μl olarak aktivatör uygulaması yapılmadan intraovaryan enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. İntraovaryan PRP enjeksiyonu sonrasında, VCD enjeksiyonuna bağlı olarak artan atretik folikül sayısının azaldığını ve normal morfolojiye sahip folikül sayısında artışı tespit etmişlerdir. Çalışmamızda da mevcut olan POI+Salin grubu Ahmadian ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada da PRP sham grubu olarak tanımlanmıştır ve tüm bulgular VCD enjeksiyonu grubu ile benzerdir (Ahmadian ve ark., 2020). Çalışmamızda, Ahmadian ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmadan farklı olarak PRP sham grubu olarak oluşturduğumuz POI+Salin grubunda, POI grubuna kıyasla unilaminar ve multilaminar foliküllerin sayıca artışı görüldü. Bu artış, intraovaryan salin enjeksiyonu sonrasında sıçan foliküler gelişiminde primordiyal folikül aktivasyon süreci olan 30 gün ve üzeri sürenin (McGee & Hsueh, 2000) çalışmamızda da enjeksiyonlar sonrasında dikkate alınıp, deneyin ~65. gününde sakrifiye edilen deneklerden değerlendirmelerin yapılmasıyla foliküler aktivasyonun enjeksiyon kaynaklı Hippo sinyal yolağı üzerinden olma olasılığını düşündürmüştür. POI+Salin ve POI+PRP gruplarında gelişimin farklı basamaklarındaki foliküllerin benzer çıkmasına ek olarak, PTEN ve pAKT konsantrasyonunun da benzer olması, intraovaryan PRP enjeksiyonunun PTEN/PI3K sinyal yolağına etkisinin olmadığını, ancak enjeksiyona bağlı Hippo sinyal yolağı üzerinden olma olasılığını destekler niteliktedir.

Diğer bir çalışmada ise, Vural ve ark. (2019), siklofosfamid enjeksiyonu ile oluşturdıkları POI sıçan modelinde, adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücreler (MSC) ile PRP'nin birlikte intraovaryan enjeksiyonunun foliküler gelişim, serum hormon seviyeleri (E2 ve AMH) ile ovaryan hücre rejenerasyonu üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Otolog olmayan dişi sıçanlardan iki basamaklı santrifüj sonrası elde edilen PRP, intraovaryan enjeksiyon öncesinde kalsiyum klorür ile aktive edilmiştir ve süspansiyon 6.2×10^5 platelet/ μl konsantrasyondadır. Çalışmada kontrol grubu, POI+SF grubu, POI+PRP grubu, POI+MSC ve POI+MSC+PRP

grupları olmak üzere beş grup mevcuttur ve tüm denekler çalışmanın 8. haftasında sakrifiye edilerek değerlendirilmiştir. Toplam folikül sayısının, POI+MSC+PRP, POI+MSC ve POI+PRP gruplarında; POI grubuna kıyasla anlamlı olarak yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Ancak POI+MSC+PRP grubunda toplam folikül sayısının POI+PRP grubundan sayıca fazla olduğu ve serum E2 seviyesinin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Serum AMH seviyesinin POI grubunda diğer gruplardan anlamlı seviyede düşük olduğu, diğer grupların ise kendi arasında benzer olduğu bildirilmiştir. Gelişimin farklı basamaklarında olan foliküller (primordiyal, primer, sekonder, pre-antral, antral folikül) sayıca değerlendirildiğinde; tüm gruplarda gelişimin farklı basamaklarındaki folikül sayıları benzer olarak bulunmuştur (Vural, Duruksu, Vural, Gorguc, & Karaoz, 2019). Vural ve ark. (2019) tarafından yapılan çalışmada tüm denekler çalışmanın 8. haftasında sakrifiye edilerek değerlendirilmiştir. Çalışmamızda, POI+PRP ve POI+Salin gruplarında sakrifikasyonların deneyin ~65. gününde gerçekleştirildiği ve POI grubunda sakrifikasyonların deneyin 15. gününde gerçekleştirildiği göz önüne alındığında, sakrifikasyonların deneyin ~65. gününde gerçekleştirildiği ek bir POI grubumuzun olmaması çalışmamızın bir limitasyonu olarak değerlendirilebilir. Ancak literatürde yer alan veriler göz önüne alındığında, VCD uygulamasının etkilerinin uzun süreli olarak gelişimin farklı basamaklarındaki foliküllerde sayıca azalma olarak gösterdiği ve deneyin ~65. gününde sakrifikasyonların gerçekleştirildiği ek bir POI grubuna kıyasla POI+PRP ve POI+Salin gruplarında folikül sayılarında daha anlamlı sonuçlar elde edilebileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, elde edilebilecek bu sonuçların, intraovaryan PRP veya intraovaryan salin enjeksiyonlarının foliküler gelişim ve ovaryum hasarına karşı koruyucu etkisi olarak yorumlamak yerine, VCD uygulamasının tamamlanmasına rağmen folikül sayılarında azalma yönündeki etkinliğini devam ettirmesinden dolayı olacağı düşünülmektedir.

Diğer bir çalışmada; Huang ve ark. (2019), siklofosamid enjeksiyonu ile oluşturdıkları POI sıçan modelinde, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) mobilize periferik kan mononükleer hücreleri (PMBCs) ile PRP'nin birlikte intraovaryan enjeksiyonunun foliküler gelişim, serum hormon seviyeleri (E2, FSH ve AMH), folikülogenez ve anjiyogenez üzerine etkilerini değerlendirmiştir. Otolog olmayan erkek sıçanlardan iki basamaklı santrifüj sonrası elde edilen PRP,

intraovaryan enjeksiyon öncesinde 4×10^7 platelet/ 30µl konsantrasyonundadır. Çalışmada, kontrol grubu, POI+PBS (sham) grubu, POI+PRP grubu, POI+ PMBCs ve POI+ PMBCs +PRP grupları olmak üzere beş grup mevcuttur ve denekler VCD enjeksiyonları sonrasında 10. günde sakrifiye edilerek değerlendirilmiştir. POI+PBS grubunda ovaryan volüm, serum E2 ve AMH seviyesinin kontrol grubuna oranla anlamlı olarak azalma, buna ek olarak serum FSH seviyesinde artış ve foliküler gelişimde duraksamalar tespit edilmiştir. POI+PRP grubunda, POI+PBS grubuna kıyasla gelişimin farklı basamaklarındaki foliküller (primordiyal, primer, sekonder, antral folikül) sayıca değerlendirildiğinde, sadece primer folikül sayısında artış gözlemlenmiştir (Huang ve ark., 2019). Bu veriler POI+PBS grubunda, enjeksiyonların foliküler gelişim ve ovaryum hasarına karşı koruyucu etkisinin olmadığı, ancak POI+PRP grubunda foliküler aktivasyonu başlatarak primordiyal foliküllerden primer folikül aşamasına geçişi indüklediği şeklinde yorumlanabilir. Ancak çalışmada deneklerin VCD enjeksiyonundan sonra 10. günde sakrifiye edilip değerlendirilmesi ve primordiyal folikül aktivasyon süreci olan 30 gün ve üzeri sürenin (McGee & Hsueh, 2000) geçmemiş olması nedeniyle PRP enjeksiyonunun bu etkinliği oluşturmaya güçtür. Çalışmamızda, Huang ve ark. (2019) tarafından elde edilen verilere paralel şekilde, antral foliküllerin (sekonder ve graaf foliküller) sayısı POI grubu, POI+Salin ve POI+PRP grubunda benzer olarak tespit edilmiştir. Bu veriler, intraovaryan PRP veya intraovaryan salin enjeksiyonlarının antral foliküllerin gelişimine etkisi olmadığını göstermektedir. Buna ek olarak, çalışmamızın POI+Salin+KOH ve POI+PRP+KOH gruplarında benzer sayıda ve diğer gruplara kıyasla anlamlı yüksek graaf folikül sayılarının olması, PRP enjeksiyonunun antral folikül gelişimini desteklemediğini, ancak KOH uygulamasına bağlı antral folikül sayısını artışına neden olduğunu göstermektedir.

Çalışmamız kapsamında VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan salin enjeksiyonu sonrası düzenli östrus döngüsünden 4 hafta sonra kontrollü ovaryan stimülasyon sonrasında sakrifiye edilen denekler ile VCD enjeksiyonu sonrasında intraovaryan PRP enjeksiyonu sonrası düzenli östrus döngüsünden 4 hafta kontrollü ovaryan stimülasyon sonrasında sakrifiye edilen deneklerin elde edilen ovaryum doku kesitleri kıyaslanmıştır. Velez ve ark. (2022) tarafından yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 25 IU at koryonik gonadotropini (eCG) uyguladıkları grup ve

kontrol grubu olarak intraperitoneal olarak susam yağı uyguladıkları Sprague-Dawley cinsi sıçanların süperovulasyonunun foliküler gelişim üzerine etkisini değerlendirmiştir. eCG uyguladıkları grupta, kontrol grubuna kıyasla daha fazla sayıda primordiyal folikül olduğunu, ancak diğer basamaklardaki folikül sayılarının benzer olduğunu bildirmiştir (Velez ve ark., 2015). Buna ek olarak, eCG uyguladıkları grupta, kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda atretik folikül tespit edilmiştir. Ancak, Paixão ve ark. (2016), intraperitoneal olarak 25 IU at koryonik gonadotropini (eCG) uyguladıkları grup ve kontrol grubu olarak intraperitoneal olarak ayçiçek yağı uyguladıkları Sprague-Dawley cinsi sıçanların süperovulasyonunun foliküler gelişim üzerine etkisini değerlendirdiği çalışmalarında gelişimin tüm basamaklarındaki foliküllerin sayısının gruplar arasında benzer olduğunu raporlamıştır (Paixão ve ark., 2016). Çalışmamızda; POI+PRP+KOH grubunda, POI+Salin+KOH grubuna kıyasla primordiyal ve unilamilar primer folikül sayısının arttığı tespit edilmiştir. Bu verilere dayanarak, intraovaryan PRP enjeksiyonu sonrasında KOH protokolü uygulamasında, intraovaryan PRP enjeksiyonunun foliküler gelişim hızını azalttığı yorumu yapılabilir. Cremonesi ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada, doğurgan Holstein-Friesian cinsi ineğin süperovulasyondan önce otolog PRP'nin intraovaryan enjeksiyonunun gonadotropin tedavisine yanıt olarak gelişen foliküllerin sayısını ve elde edilen embriyo sayısını artırıp arttıramayacağı değerlendirilmiştir. Her ineğin sağ ovaryumu kontrol olarak kullanılırken, sol ovaryuma iki basamaklı santrifüj sonrası elde edilen, enjeksiyon öncesinde 1×10^9 platelet/ml konsantrasyonunda 5 ml PRP enjekte edilmiştir. PRP uygulamasını takiben siklusun 9. gününde süperovülasyon ve ardından suni tohumlama yapılmış ve ardından sol ve sağ uterus boynuzları yıkanarak embriyolar ayrı ayrı toplanmıştır. Transrektal ultrason taraması ile değerlendirilen ortalama folikül sayısı, PRP tedavisinden önce sağ (kontrol) ve sol (tedavi edilen) ovaryum arasında (sırasıyla $9,18 \pm 1,35$ vs $7,32 \pm 1,67$; $p = 0,28$) ve ayrıca PRP enjeksiyonu sonrası 48. saatte (sırasıyla $7,67 \pm 2,52$ vs $8,00 \pm 2,00$; $p = 0,73$) istatistiksel olarak benzer olduğu tespit edilmiştir. Kontrol (sağ) ve PRP enjeksiyonu yapılan (sağ) ovaryum arasında son gonadotropin enjeksiyonundaki ortalama folikül sayısı (sırasıyla 11.33 ± 2.89 vs 20.00 ± 9.17 ; $p = 0.023$) bakımından istatistiksel anlamlı bir fark bulunmuştur. Elde edilen embriyo sayısı karşılaştırıldığında, PRP ile tedavi

edilen ovaryum tarafındaki boynuzda, kontrol ovaryumu tarafındaki boynuzla kıyasla (14.75 ± 5.92 vs 6.63 ± 2.92 ; $p < 0.05$) anlamlı oranda daha fazla sayıda embriyo gözlemlenmiştir. Bu veriler, intraovaryan PRP enjeksiyonunun, süperovülasyonu takiben büyük boyutlu folikül sayısını ve oluşan embriyo sayısını artırabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Cremonesi, Bonfanti, Idda, & Anna, 2020). Çalışmamızda, POI+Salin+KOH ve POI+PRP+KOH gruplarında benzer sayıda ve diğer gruplara kıyasla anlamlı yüksek graaf folikül sayılarının olması, PRP enjeksiyonunun antral folikül gelişimini desteklemediğini, ancak KOH uygulamasına bağlı antral folikül sayısını artırdığını göstermektedir. Cremonesi ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmadan farklı olarak, POI+Salin+KOH ve POI+PRP+KOH gruplarında VCD uygulamasının tamamlanmasını takiben intraovaryan PRP veya intraovaryan salin enjeksiyonu yapılmış olup, arkasından ~ 35 gün sonrasında (deneyin ~50. günü) KOH uygulaması gerçekleştirilmiştir. Buna ek olarak, Cremonesi ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışma prematür ovaryan yetmezliği olan denekleri içermediğinden, çalışmamızla doğrudan kıyaslamak güçtür. Cremonesi ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada, PRP'nin etkisi aynı döngü içinde ölçülmüştür ve bu kısa vadeli etki belki de matürasyonu için daha fazla zamana ihtiyaç duyan preantral foliküllerden ziyade antral foliküller üzerinde daha fazla etkiye sahip olduğunun göstergesi olabilir. PRP'nin antral foliküller üzerindeki etkisi, FSH ve LH'ye duyarlılığı artıran büyüme faktörü ve sitokin iletimini hızlandırması yoluyla olabilir.

Çalışmamızda deneklerden elde edilen ovaryum doku homojenatları foliküler aktivasyon belirteci PTEN ve pAKT konsantrasyonu bakımından gruplar arasında kıyaslandı. VCD enjeksiyonu sonrasında (POI grubu) kontrol grubuna kıyasla yüksek pAKT konsantrasyonu ve anlamlı düşük PTEN konsantrasyonu tespit edildi. Diğer gruplarda ise pAKT konsantrasyonu ve PTEN konsantrasyonunun benzer olduğu belirlendi. Zhao ve ark. (2020) tarafından yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 20 gün 80 mg/kg VCD uyguladıkları grup ve kontrol grubu olarak intraperitoneal olarak VCD uygulaması ile aynı volüm susam yağı uyguladıkları Sprague-Dawley cinsi sıçanların, ovaryum doku homojenatlarında PI3K-AKT sinyal yolağı aktivasyonu değerlendirilmiştir. VCD uyguladıkları gruptaki denekler ve susam yağı uyguladıkları denekler arasında PTEN ekspresyonunda anlamlı

farklılıklar tespit edilmezken, VCD uyguladıkları grupta kontrol grubuna kıyasla pAKT ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş tespit edilmiştir. Buna ek olarak, VCD uygulamasının pAKT ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe etmesi ile FOXO3a seviyesini düşürdüğü ve ovaryan proapoptotik moleküllerden BAX, klivaj kaspaz-3 ve PARP ekspresyonunu arttırdığını raporlamışlardır (Zhao & Wang, 2020). Benzer şekilde, Jiao ve ark. (2022) çalışmalarında, intraperitoneal olarak 10 gün 80 mg/kg VCD uyguladıkları grup ve intraperitoneal olarak 10 gün salin uyguladıkları kontrol grubu C57BL/6 J cinsi farelerde ovaryum doku homojenatlarında PI3K/AKT sinyal yolağı aktivasyonunu değerlendirmiştir. VCD uyguladıkları grupta kontrol grubuna kıyasla, cKit ve pAKT ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş ve ovaryan proapoptotik moleküllerden PARP, BAX ve BAD ekspresyonunda artış tespit edilmiştir (Jiao ve ark., 2022). Bu verilere ek olarak, Duo ve ark. (2022) çalışmalarında, intraperitoneal olarak 15 gün 80 mg/kg VCD uyguladıkları grup ve kontrol grubu olarak intraperitoneal olarak 2,5 mL/kg susam yağı uyguladıkları Sprague-Dawley cinsi sıçanların, ovaryum doku homojenatlarında PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı aktivasyonunu değerlendirmiştir. VCD uyguladıkları grupta kontrol grubuna kıyasla pAKT ekspresyonunda ve ovaryan antipoptotik molekül Bcl-2 ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı düşüş ve ovaryan proapoptotik molekül klivaj kaspaz-3 ekspresyonunda artış tespit edilmiştir. Buna ek olarak, VCD uyguladıkları grupta granüloza hücrelerinin ultrastrüktürel değerlendirmesinde otofagozom sayısının arttığı ve otofaji ile ilişkili ATG7 ekspresyonunda artış gözlemlenmiştir. Bu veriler, VCD uygulamasının PI3K/AKT/mTOR sinyal yolağı aktivasyonuna bağlı granüloza hücrelerinde otofaji artışı nedeniyle foliküler atrezi ile sonuçlandığı şeklinde yorumlanmıştır (Dou ve ark., 2022) . Çalışmamızda, POI+Salin grubu, POI+PRP grubu, POI+Salin+KOH grubu ve POI+PRP+KOH grubunda, pAKT konsantrasyonlarının benzer olduğu, kontrol grubuna kıyasla anlamlı düşük ancak POI grubuna kıyasla anlamlı yüksek seviyede olduğu tespit edildi. Bu gruplarda, POI grubuna kıyasla pAKT konsantrasyon artışının intraovaryan PRP ve Salin uygulaması sonrasında benzer olması, pAKT konsantrasyonunun intraovaryan PRP uygulamasından bağımsız olduğunu, ancak tüm gruplarda intraovaryan enjeksiyon yapılmasından dolayı enjeksiyona bağlı Hippo sinyal yolağı etkileşiminden olabileceğini düşündürmüştür.

Hsueh ve ark. (2015) tarafından yapılan çalışmada foliküler in vitro aktivasyon için kültür ortamına PTEN inhibitörü ve PI3K aktivatörü kullanımı ve ek olarak ovaryan fragmentler oluşturulması ile Hippo yolu üzerinden pAKT konsantrasyonunun artışı ve sonucunda preantral foliküllerin gelişiminin indüklendiği bildirilmiştir (Hsueh, Kawamura, Cheng, & Fauser, 2015). Çalışmamızda, bu verilere paralel POI+Salin grubu ve POI+PRP grubunda, POI grubuna kıyasla primer foliküllerin sayıca artışı tespit edilmiş olup, enjeksiyonlara bağlı Hippo yolu üzerinden foliküler gelişimin indüklendiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda intraperitoneal olarak 14 gün 160 mg/kg VCD enjeksiyonu ile oluşturduğumuz POI sıçan modelinde, PRP'nin intraovaryan enjeksiyonu sonrasında denekler çiftleştirmeye bırakılmış ve doğum başına düşen yavru sayısı değerlendirilmiştir. POI+Salin grubunda canlı doğum elde edilemezken, POI+PRP, POI+Salin+KOH ve POI+PRP+KOH gruplarında gebelik elde edilmesine karşın, sonuçların istatistiksel olarak kıyaslaması örneklem boyutları kısıtlı olmasından dolayı gerçekleştirilemedi. Haas ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmada, intraperitoneal olarak 160 mg/kg VCD uyguladıkları C57Bl/6 farelerinin; VCD uygulamasının tamamlandığı (17. gün) ilk proöstrus evresi ile VCD uygulanmasını takiben en az 20 gün sonrasında ilk proöstrus evresinde çiftleştirme protokolü uygulayarak gebelik sonuçlarını değerlendirmiştir. Kontrol grubu olarak uygulama yapılmayan 14 denek ilk çiftleştirme denemesinde gebe kalırken, VCD uygulamasının tamamlandığı (17. gün) ilk proöstrus evresi çiftleştirme protokolü uygulanan 14 denegin tamamında vajinal tıkaç gözlemlenmiş, 4 denegin gebe kalmadığı, 10 denegin 5'inin ilk çiftleştirme protokolünde, geri kalan 5'inin ise ikinci çiftleştirme protokolünde gebe kaldığı tespit edilmiştir. VCD uygulanmasını takiben en az 20 gün sonrasında ilk proöstrus evresinde çiftleştirme protokolü uygulanan deneklerin ise tamamında vajinal tıkaç gözlemlenirken, 8 denegin gebe kalmadığı, sadece 1 denegin gebe kaldığı raporlanmıştır. Bununla birlikte, VCD uygulanmasını takiben en az 20 gün sonrasında ilk proöstrus evresinde çiftleştirme protokolü uygulanan deneklerde, kontrol ve VCD uygulamasının tamamlandığı (17.gün) ilk proöstrus evresi çiftleştirme protokolü uygulanan deneklere kıyasla, uygulanan çiftleştirme protokolü sayısına oranla gebelik yüzdesinde, vajinal tıkaç sayısına oranla gebelikte ve genel gebelik oranında azalma tespit edilmiştir. VCD

uygulanmasını takiben en az 20 gün sonrasında ilk proöstrus evresinde çiftleştirme protokolü uygulanan deneklerde diğer deneklere oranla daha fazla sayıda fetal rezorpsiyon gözlemlenmeler de fetal ağırlıkların tüm deneklerde benzer olduğunu bildirmişlerdir. Bu veriler, VCD uygulamasının tamamlandığı (17. gün) ilk proöstrus evresi çiftleştirme protokolü uygulanan deneklerin klinik olarak perimenapozal geçiş dönemini temsil ettiği ve 10 deneğin 5'inin ilk çiftleştirme protokolünde, geri kalan 5'inin ise ikinci çiftleştirme protokolünde gebe kalmasını perimenapozal geçiş döneminde gebelik eldesi için gerekli sürenin arttığı şeklinde yorumlamışlardır. Buna ek olarak, VCD uygulamasının tamamlandığı (17. gün) ilk proöstrus evresi çiftleştirme protokolü uygulanan 4 denekte vajinal tıkaç gözlemlenmesine rağmen gebelik eldesi gerçekleşmemesi ile uzun ve düzensiz östrus evresine sahip olmaları verilerini ise diğer deneklerden daha hızlı primordiyal folikül kayıplarının yaşanması ve perimenapozal geçiş döneminin insanlardaki varyasyonlarının deneklerde de gözlemlendiği şeklinde yorumlanmıştır. Kontrol ve VCD uygulanan gruplarda gebe kalan denekler ile VCD uygulanan gruplarda gebe kalmayan hayvanları karşılaştırmak için ovaryumları histolojik olarak değerlendirdiklerinde; tüm kontrol deneklerinde her boyutta çok sayıda folikül bulunurken, VCD uygulanan ve gebelik elde edilen deneklerde yalnızca birkaç antral folikül görüldüğü, VCD uygulanan ve gebelik elde edilmeyen deneklerde antral folikül görülmediği bildirilmiştir. Bu sonucu destekler şekilde ve gebelik elde edilmeyen deneklerde ovaryum ağırlıklarının diğer deneklerden düşük olduğu ve ovaryum atrofisi gözlemlenmiştir. İmplantasyon ve fetal gelişimin desteklenmesinde önemli olan korpus luteum formasyonu denekler arasında değerlendirildiğinde, gebe olan kontrol grubu ve VCD uygulanan deneklerde benzer olduğu, ancak VCD uygulanan ve gebe kalmayan deneklerde korpus luteum gözlenmediği bildirilmiştir (Haas, Christian, & Hoyer, 2007). Ahmadian ve ark. (2020), intraperitoneal olarak 14 gün 160 mg/kg VCD enjeksiyonu ile oluşturdukları POI sıçan modelinde, PRP'nin intraovaryan enjeksiyonu sonrasında denekler çiftleştirmeye bırakılmış ve doğum başına düşen yavru sayısı değerlendirilmiştir. PRP enjeksiyonu sonrası kontrol grupları ile benzer sayıda doğum başına düşen yavru elde edilirken, VCD enjeksiyonu sonrasında anlamlı olarak az sayıda doğum başına düşen yavru sayısı raporlanmıştır. PRP sham grubunda ise canlı doğum elde edilememiştir. Klinik olarak bakıldığında, POI sıçan

modelinde intraovaryan PRP enjeksiyonu sonrasında doğum oranlarının arttığı şeklinde yorumlanmıştır (Ahmadian ve ark., 2020). Çalışmamız POI+Salin grubunda gebelik elde edilmemesi bakımından Ahmadian ve ark. (2020) tarafında yapılan çalışma ile benzer niteliktedir. POI+PRP, POI+Salin+KOH ve POI+PRP+KOH gruplarında gebelik elde edilmesine karşın istatistiksel olarak kıyaslaması örneklem boyutları kısıtlı olmasından dolayı gerçekleştirilemedi. Ancak çalışmamız, Haas ve ark. (2007)'nin gerçekleştirdiği VCD uygulamasının gebelik ve canlı doğum üzerine negatif etkisini gösterdiği çalışmanın verilerine paralel olarak sonuçlandı. Bu verilere ek olarak, Auwera ve ark. (2001)'nin CBAXC57B1 cinsi farelerde intraperitoneal olarak 5IU PMSG uygulaması sonrasında 5IU hCG ile ovulasyonu tetikledikleri süperovulasyon grubu ile kontrol grubunu embriyo gelişimi ve implantasyon oranları yönünden kıyasladıkları çalışmada, süperovulasyon grubunda embriyo gelişim oranı ve hızının yavaşladığı ve implantasyon oranlarının düştüğü bildirilmiştir. Ayrıca kontrol grubuna kıyasla süperovulasyon grubunda daha fazla sayıda fetal rezorpsiyon ve doğum başına düşen yavru sayısında azalmayı tespit etmişlerdir (Van Der Auwera & D'Hooghe, 2001). Çalışmamızda, POI+Salin+KOH ve POI+PRP+KOH gruplarında gebelik oranlarında örneklem boyutlarındaki kısıtlamaların sebeplerinden biri de Auwera ve ark. (2001) yaptıkları çalışma verilerine paralel süperovulasyona bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Plateletten zengin plazma (PRP) elde etmek için tam kanı işlemenin birkaç farklı yolu olduğu ve ek olarak santrifüjlemenin hızı ve süresi ile ayırma tekniğinin (mekanik veya elde tutulan pipetler kullanılarak) bir çalışmadan diğerine değiştiği yapılan çalışmalarda gözlemlenmektedir. Ayrıca PRP hazırlanma aşamasında santrifüjün mekanik stresle ya da sonra kimyasal olarak kalsiyum glukonat, kalsiyum klorür veya bir antikoagülan ile aktive edilmesi çalışmalar arasındaki farklılıklar arasındadır. Çalışmalarda elde edilen veriler, intraovaryan PRP enjeksiyonunun etkinlik süresi ve etkisinin potansiyelize edilebileceği ideal zamanlaması hakkında daha fazla kanıt gerektirdiğinden, sorgulanmaya devam etmektedir. Yapılan çalışmaların hiçbirinin ele almadığı bir konu, tekrarlayan intraovaryan PRP enjeksiyonun, tek bir enjeksiyona kıyasla daha iyi bir sonuca sahip olup olamayacağıdır. Plateletler tarafından salınan büyüme faktörlerinin dokuda çok uzun süre kalma eğiliminde olmadığını ve bu nedenle hücre üzerindeki etkiyi

optimize etmek için başka bir PRP dozu gerekebileceğini konusunda şüpheler mevcuttur. Ancak bu yaklaşımda da ikinci hatta üçüncü doz intraovaryan PRP enjeksiyonunun zamanı henüz belirlenmemiştir. İntraovaryan PRP enjeksiyonu ile ilgili önceki çalışmalarda açıkça değerlendirilmeyen diğer bir konu ise bu prosedürlerin olası yan etkileri ve riskleridir. İntraovaryan PRP enjeksiyonu prosedürünün kendisinde minimal riskler vardır; ancak bu riskler literatürde bildirilmemiştir. Vasküler yaralanmadan organ perforasyonuna, enfeksiyona, apse oluşumuna ve oosit dokusu nekrozuna kadar hepsi komplikasyonlar arasında ön görülebilir, ancak herhangi bir tedavi ile doğrudan ilişkili olarak ortaya çıktıklarına dair somut kanıtlar mevcut değildir. Dikkate alınması gereken bir diğer önemli teorik endişe, intraovaryan enjeksiyondan sonra ovaryumda yoğun hücre proliferasyonu ve farklılaşması ortamındaki malignite potansiyelidir.

Çalışmamız “İnfertilite sebeplerinden biri olan prematür ovaryan yetmezliği olgularında, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokolü öncesinde intraovaryan plateletten zengin plazma uygulaması ovaryan foliküllerin aktivasyonunu sağlar ve doğum başına düşen yavru sayısını artırır” hipotezinden yola çıkarak, sıçanlarda prematür ovaryan yetmezliği modelinde KOH öncesi intraovaryan PRP uygulamasının; PTEN/PI3K yolağı üzerinden foliküler aktivasyon ve doğum başına düşen yavru sayısı üzerindeki etkinliğinin değerlendirildiği ilk çalışmadır.

Sonuç olarak çalışmamızda, in vitro prematür ovaryan yetmezliği sıçan modelinde, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokolü öncesinde intraovaryan plateletten zengin plazma uygulamasının ovaryan foliküllerin aktivasyonunu PTEN/PI3K yolağı üzerinden sağlamadığı ve gebelik üzerine etkisi olmadığı tespit edilmiştir.

6. KAYNAKLAR

- Adhikari, D., & Liu, K. (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*, Vol. 30, pp. 438–464. <https://doi.org/10.1210/er.2008-0048>
- Ahmadian, S., Sheshpari, S., Pazhang, M., Bedate, A. M., Beheshti, R., Abbasi, M. M., ... Mahdipour, M. (2020). Intra-ovarian injection of platelet-rich plasma into ovarian tissue promoted rejuvenation in the rat model of premature ovarian insufficiency and restored ovulation rate via angiogenesis modulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00638-4>
- Ajayi, A. F., & Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>
- Atkinson, L., Martin, F., & Sturmey, R. G. (2021). Intraovarian injection of platelet-rich plasma in assisted reproduction: Too much too soon? *Human Reproduction*, 36(7), 1737–1750. <https://doi.org/10.1093/humrep/deab106>
- Auta, T., & Hassan, A. T. (2016). Alteration in oestrus cycle and implantation in *Mus musculus* administered aqueous wood ash extract of *Azadirachta indica* (neem). *Asian Pacific Journal of Reproduction*, 5(3), 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.03.003>
- Bassiouny, Y. A., Dakhly, D. M. R., Bayoumi, Y. A., & Hashish, N. M. (2016). Does the addition of growth hormone to the in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection antagonist protocol improve outcomes in poor responders? A randomized, controlled trial. *Fertility and Sterility*, 105(3), 697–702. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.11.026>
- Bastu, E., Buyru, F., Ozsurmeli, M., Demiral, I., Dogan, M., & Yeh, J. (2016). A randomized, single-blind, prospective trial comparing three different gonadotropin doses with or without addition of letrozole during ovulation stimulation in patients with poor ovarian response. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 203, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.05.027>
- Battiston, F. G., dos Santos, C., Barbosa, A. M., Sehnem, S., Leonel, E. C. R., Taboga, S. R., ... Rafacho, A. (2017). Glucose homeostasis in rats treated with 4-vinylcyclohexene diepoxide is not worsened by dexamethasone treatment. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 165. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.06.001>
- Bhattacharya, P., Sen, N., Hoyer, P. B., & Keating, A. F. (2012). Ovarian expressed microsomal epoxide hydrolase: Role in detoxification of 4-vinylcyclohexene diepoxide and regulation by phosphatidylinositol-3 kinase signaling. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 258(1). <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.10.014>
- Bosch, E., Labarta, E., Kolibianakis, E., Rosen, M., & Meldrum, D. (2016). Regimen of ovarian stimulation affects oocyte and therefore embryo quality. *Fertility and Sterility*, Vol. 105, pp. 560–570. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.01.022>
- Bosdou, J. K., Venetis, C. A., Kolibianakis, E. M., Toulis, K. A., Goulis, D. G., Zepiridis, L., & Tarlatzis, B. C. (2012). The use of androgens or androgen-modulating agents in poor responders undergoing in vitro fertilization: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 18(2), 127–

145. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr051>
- Bucher, J. R., Huff, J., & Kluwe, W. M. (1986). Toxicology and carcinogenesis studies of isophorone in F344 rats and B6C3F1 mice. *Toxicology*, 39(2), 207–219. [https://doi.org/10.1016/0300-483X\(86\)90137-X](https://doi.org/10.1016/0300-483X(86)90137-X)
- Cakiroglu, Y., Saltik, A., Yuceturk, A., Karaosmanoglu, O., Kopuk, S. Y., Scott, R. T., ... Seli, E. (2020). Effects of intraovarian injection of autologous platelet rich plasma on ovarian reserve and IVF outcome parameters in women with primary ovarian insufficiency. *Aging*, 12(11), 10211–10222. <https://doi.org/10.18632/aging.103403>
- Callejo, J., Salvador, C., González-Núñez, S., Almeida, L., Rodriguez, L., Marqués, L., ... Lailla, J. M. (2013). Live birth in a woman without ovaries after autograft of frozen-thawed ovarian tissue combined with growth factors. *Journal of Ovarian Research*, 6(1). <https://doi.org/10.1186/1757-2215-6-33>
- Cao, L. B., Leung, C. K., Law, P. W. N., Lv, Y., Ng, C. H., Liu, H. Bin, ... Chan, W. Y. (2020). Systemic changes in a mouse model of VCD-induced premature ovarian failure. *Life Sciences*, 262. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118543>
- Cheung, L. P., Lam, P. M., Lok, I. H., Chiu, T. T. Y., Yeung, S. Y., Tjer, C. C., & Haines, C. J. (2005). GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF: A randomized controlled trial. *Human Reproduction*, 20(3), 616–621. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh668>
- Choe, S. A., Kim, M. J., Lee, H. J., Kim, J., Chang, E. M., Kim, J. W., ... Kim, Y. S. (2018). Increased proportion of mature oocytes with sustained-release growth hormone treatment in poor responders: a prospective randomized controlled study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 297(3), 791–796. <https://doi.org/10.1007/s00404-017-4613-4>
- Coticchio, G., Albertini, D. F., & De Santis, L. (2013). Oogenesis. In *Oogenesis*. <https://doi.org/10.1007/978-0-85729-826-3>
- Cremonesi, F., Bonfanti, S., Idda, A., & Anna, L. C. (2020). Improvement of embryo recovery in holstein cows treated by intra-ovarian platelet rich plasma before superovulation. *Veterinary Sciences*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/vetsci7010016>
- Dakhly, D. M. R., Bassiouny, Y. A., Bayoumi, Y. A., Hassan, M. A., Gouda, H. M., & Hassan, A. A. (2018). The addition of growth hormone adjuvant therapy to the long down regulation protocol in poor responders undergoing in vitro fertilization: Randomized control trial. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 228, 161–165. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2018.06.035>
- Dash, R. C. (2003). Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 127(7), 896–897. <https://doi.org/10.5858/2003-127-896-hacbai>
- Davar, R., Neghab, N., & Naghshineh, E. (2018). Pregnancy outcome in delayed start antagonist versus microdose flare GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF/ICSI: An RCT. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 16(4), 255–260. <https://doi.org/10.29252/ijrm.16.4.260>
- Davar, R., Rahsepar, M., & Rahmani, E. (2013). A comparative study of luteal estradiol pre-treatment in GnRH antagonist protocols and in micro dose flare protocols for poor-responding patients. *Archives of Gynecology and Obstetrics*,

- 287(1), 149–153. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2522-0>
- de la Fuente, J., Santiago, J., Román, A., Dumitrache, C., & Casasanto, D. (2014). When You Think About It, Your Past Is in Front of You: How Culture Shapes Spatial Conceptions of Time. *Psychological Science*, 25(9), 1682–1690. <https://doi.org/10.1177/0956797614534695>
- Dou, X., Jin, X., Chen, X., Zhou, Q., Chen, H., Wen, M., & Chen, W. (2022). Bu-Shen-Ning-Xin decoction alleviates premature ovarian insufficiency (POI) by regulating autophagy of granule cells through activating PI3K/AKT/mTOR pathway. *Gynecological Endocrinology*, 38(9), 754–764. <https://doi.org/10.1080/09513590.2022.2112941>
- Dudek, R. W. (2014). Embryology Sixth Edition. (Vol. 4).
- Dudley, S. D. (1982). Responsiveness to estradiol in central nervous system of aging female rats. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 6(1), 39–45. [https://doi.org/10.1016/0149-7634\(82\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0149-7634(82)90005-7)
- Ebrahimi, M., Akbari-Asbagh, F., & Ghalandarpour, S. M. (2017). Letrozole+ GnRH antagonist stimulation protocol in poor ovarian responders undergoing intracytoplasmic sperm injection cycles: An RCT. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 15(2), 101–108. <https://doi.org/10.29252/ijrm.15.2.101>
- Ekambaram, G., Kumar, S. K. S., & Joseph, L. D. (2017). Comparative study on the estimation of estrous cycle in mice by visual and vaginal lavage method. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 11(1), AC05–AC07. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23977.9148>
- Evans, A., Ibrahim, M., Pope, R., Mwangi, J., Botros, M., Johnson, S. P., & Al Kassis, S. (2020). Treating hand and foot osteoarthritis using a patient's own blood: A systematic review and meta-analysis of platelet-rich plasma: PRP for Small Joint Osteoarthritis. *Journal of Orthopaedics*, Vol. 18, pp. 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2020.01.037>
- Farimani, M., Heshmati, S., Poorolajal, J., & Bahmanzadeh, M. (2019). A report on three live births in women with poor ovarian response following intra-ovarian injection of platelet-rich plasma (PRP). *Molecular Biology Reports*, 46(2), 1611–1616. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04609-w>
- Fernandez, S. M., Keating, A. F., Christian, P. J., Sen, N., Hoying, J. B., Brooks, H. L., & Hoyer, P. B. (2008). Involvement of the KIT/KITL signaling pathway in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss in rats. *Biology of Reproduction*, 79(2), 318–327. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.067744>
- Ferraretti, A. P., Gianaroli, L., Motrenko, T., Feliciani, E., Tabanelli, C., & Magli, M. C. (2014). LH pretreatment as a novel strategy for poor responders. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/926172>
- Field, S. L., Dasgupta, T., Cummings, M., & Orsi, N. M. (2014). Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Molecular Reproduction and Development*, Vol. 81, pp. 284–314. <https://doi.org/10.1002/mrd.22285>
- Fleming, R., Seifer, D. B., Frattarelli, J. L., & Ruman, J. (2015). Assessing ovarian response: antral follicle count versus anti-Müllerian hormone. *Reproductive BioMedicine Online*, Vol. 31, pp. 486–496. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.06.015>
- Frech, J. E. (1989). Toxicology And Carcinogenesis Studies Of In F344 / N Rats

- And B6c3f1 Mice. National Toxicology Program technical report series, 352, 1–204.
- Fritz, M. A., & Speroff, L. (2011). Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility (Eighth Edition). In *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility (Eighth Edition)* (Vol. 4).
- Frye, J. B., Lukefahr, A. L., Wright, L. E., Marion, S. L., Hoyer, P. B., & Funk, J. L. (2012). Modeling perimenopause in sprague-dawley rats by chemical manipulation of the transition to ovarian failure. *Comparative Medicine*, 62(3), 193–202.
- Gaytán, M., Sánchez, M. A., Morales, C., Bellido, C., Millán, Y., Martín de las Mulas, J., ... Gaytán, F. (2005). Cyclic changes of the ovarian surface epithelium in the rat. *Reproduction*, 129(3), 311–321. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00401>
- Gelety, T. J., & Magoffin, D. A. (1997). Ontogeny of steroidogenic enzyme gene expression in ovarian theca- interstitial cells in the rat: Regulation by a paracrine theca- differentiating factor prior to achieving luteinizing hormone responsiveness. *Biology of Reproduction*, 56(4), 938–945. <https://doi.org/10.1095/biolreprod56.4.938>
- Gong, X., Tong, Q., Chen, Z., Zhang, Y., Xu, C., & Jin, Z. (2015). Microvascular density and vascular endothelial growth factor and osteopontin expression during the implantation window in a controlled ovarian hyperstimulation rat model. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(3), 773–779. <https://doi.org/10.3892/etm.2015.2181>
- Haas, J. R., Christian, P. J., & Hoyer, P. B. (2007). Effects of impending ovarian failure induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide on fertility in C57BL/6 female mice. *Comparative Medicine*, 57(5), 443–449.
- Hirshfield, A. N. (1991). Development of Follicles in the Mammalian Ovary. *International Review of Cytology*, 124(C), 43–101. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7)
- Howie, R., & Kay, V. (2018). Controlled ovarian stimulation for in-vitro fertilization. *British Journal of Hospital Medicine*, 79(4), 194–199. <https://doi.org/10.12968/hmed.2018.79.4.194>
- Hoyer, P. B., & Sipes, I. G. (2007). Development of an animal model for ototoxicity using 4-vinylcyclohexene: A case study. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, Vol. 80, pp. 113–125. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20103>
- Hsu, C. C., Hsu, L., Hsu, I., Chiu, Y. J., & Dorjee, S. (2020). Live Birth in Woman With Premature Ovarian Insufficiency Receiving Ovarian Administration of Platelet-Rich Plasma (PRP) in Combination With Gonadotropin: A Case Report. *Frontiers in Endocrinology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00050>
- Hsueh, A. J. W., Kawamura, K., Cheng, Y., & Fauser, B. C. J. M. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, 36(1), 1–24. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1020>
- Huang, H. H., Steger, R. W., Bruni, J. F., & Meites, J. (1978). Patterns of Sex Steroid and Gonadotropin Secretion in Aging Female Rats. *Endocrinology*, 103(5), 1855–1859. <https://doi.org/10.1210/endo-103-5-1855>
- Huang, Q., Liu, B., Jiang, R., Liao, S., Wei, Z., Bi, Y., ... Qin, A. (2019). G-CSF-

- mobilized peripheral blood mononuclear cells combined with platelet-rich plasma accelerate restoration of ovarian function in cyclophosphamide-induced POI rats. *Biology of Reproduction*, 101(1), 91–101. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioz077>
- Humaidan, P., Chin, W., Rogoff, D., D’Hooghe, T., Longobardi, S., Hubbard, J., & Schertz, J. (2017). Efficacy and safety of follitropin alfa/lutropin alfa in ART: A randomized controlled trial in poor ovarian responders. *Human Reproduction*, 32(3), 544–555. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew360>
- Jiao, W., Mi, X., Yang, Y., Liu, R., Liu, Q., Yan, T., ... Zhao, S. (2022). Mesenchymal stem cells combined with autocrosslinked hyaluronic acid improve mouse ovarian function by activating the PI3K-AKT pathway in a paracrine manner. *Stem Cell Research and Therapy*, 13(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02724-3>
- Kailasam, C., Keay, S. D., Wilson, P., Ford, W. C. L., & Jenkins, J. M. (2004). Defining poor ovarian response during IVF cycles, in women aged <40 years, and its relationship with treatment outcome. *Human Reproduction*, 19(7), 1544–1547. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh273>
- Kappeler, C. J., & Hoyer, P. B. (2012). 4-vinylcyclohexene diepoxide: A model chemical for ovotoxicity. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(1), 57–62. <https://doi.org/10.3109/19396368.2011.648820>
- Karimzadeh, M. A., Mashayekhy, M., Mohammadian, F., & Moghaddam, F. M. (2011). Comparison of mild and microdose GnRH agonist flare protocols on IVF outcome in poor responders. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, Vol. 283, pp. 1159–1164. <https://doi.org/10.1007/s00404-010-1828-z>
- Keating, A. F., Fernandez, S. M., Mark-Kappeler, C. J., Sen, N., Sipes, I. G., & Hoyer, P. B. (2011). Inhibition of PIK3 signaling pathway members by the ovotoxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats. *Biology of Reproduction*, 84(4). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087650>
- Kotb, M. M. M., Hassan, A. G. M. A., & AwadAllah, A. M. A. (2016). Does dehydroepiandrosterone improve pregnancy rate in women undergoing IVF/ICSI with expected poor ovarian response according to the Bologna criteria? A randomized controlled trial. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 200, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.02.009>
- Li, J., Mao, Q. X., He, J. J., She, H. Q., Zhang, Z., & Yin, C. Y. (2017). Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem Cell Research and Therapy*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0514-5>
- Li, Z., Delaney, M. K., O’Brien, K. A., & Du, X. (2010). Signaling during platelet adhesion and activation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(12), 2341–2349. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207522>
- Liu, K., Rajareddy, S., Liu, L., Jagarlamudi, K., Boman, K., Selstam, G., & Reddy, P. (2006). Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for an old timer. *Developmental Biology*, Vol. 299, pp. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.07.038>
- Lopez-Vilchez, I., Diaz-Ricart, M., White, J. G., Escolar, G., & Galan, A. M. (2009). Serotonin enhances platelet procoagulant properties and their activation induced

- during platelet tissue factor uptake. *Cardiovascular Research*, 84(2), 309–316. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp205>
- Macklon, N. S., Stouffer, R. L., Giudice, L. C., & Fauser, B. C. J. M. (2006). The science behind 25 years of ovarian stimulation for in vitro fertilization. *Endocrine Reviews*, Vol. 27, pp. 170–207. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0015>
- Maclaran, K., & Panay, N. (2015). Current concepts in premature ovarian insufficiency. *Women's Health*, Vol. 11, pp. 169–182. <https://doi.org/10.2217/whe.14.82>
- Massin, N., Gougeon, A., Meduri, G., Thibaud, E., Laborde, K., Matuchansky, C., ... Touraine, P. (2004). Significance of ovarian histology in the management of patients presenting a premature ovarian failure. *Human Reproduction*, 19(11), 2555–2560. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh461>
- Mayer, L. P., Devine, P. J., Dyer, C. A., & Hoyer, P. B. (2004). The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biology of Reproduction*, 71(1), 130–138. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016113>
- Mayer, L. P., Pearsall, N. A., Christian, P. J., Devine, P. J., Payne, C. M., McCuskey, M. K., ... Hoyer, P. B. (2002). Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology*, 16(6), 775–781. [https://doi.org/10.1016/S0890-6238\(02\)00048-5](https://doi.org/10.1016/S0890-6238(02)00048-5)
- McGee, E. A., Hsu, S. Y., Kaipia, A., & J.w. Hsueh, A. (1998). Cell death and survival during ovarian follicle development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 140(1–2), 15–18. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(98\)00023-9](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(98)00023-9)
- McGee, E. A., & Hsueh, A. J. W. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200–214. <https://doi.org/10.1210/er.21.2.200>
- McGee, E. A., Perlas, E., LaPolt, P. S., Tsafiriri, A., & Hsueh, A. J. W. (1997). Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biology of Reproduction*, 57(5), 990–998. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.990>
- Mcgee, E., Spears, N., Minami, S., Hsu, S. Y., Chun, S. Y., Billig, H., & Hsueh, A. J. W. (1997). Preantral ovarian follicles in serum-free culture: Suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 138(6), 2417–2424. <https://doi.org/10.1210/endo.138.6.5164>
- McLean, A. C., Valenzuela, N., Fai, S., & Bennett, S. A. L. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments*, (67). <https://doi.org/10.3791/4389>
- McPherson, J. C., Costoff, A., & Mahesh, V. B. (1977). Effects of aging on the hypothalamic-hypophyseal-gonadal axis in female rats. *Fertility and Sterility*, 28(12), 1365–1370. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)42986-9](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)42986-9)
- Méduri, G., Massin, N., Guibourdenche, J., Bachelot, A., Fiori, O., Kuttenn, F., ... Touraine, P. (2007). Serum anti-Müllerian hormone expression in women with premature ovarian failure. *Human Reproduction*, 22(1), 117–123. <https://doi.org/10.1093/humrep/del346>
- Moore et al. (2018). Moore Clinically Oriented Anatomy 8th Edition. In *Wolters Kluwer* (Vol. 282).

- Muhammad, F. S., Goode, A. K., Kock, N. D., Arifin, E. A., Cline, J. M., Adams, M. R., ... Appt, S. E. (2009). Effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on peripubertal and adult sprague-dawley Rats: Ovarian, clinical, and pathologic outcomes. *Comparative Medicine*, 59(1), 46–59.
- Na, J., & Kim, G. J. (2020). Recent trends in stem cell therapy for premature ovarian insufficiency and its therapeutic potential: a review. *Journal of Ovarian Research*, Vol. 13. <https://doi.org/10.1186/s13048-020-00671-2>
- Narkwichean, A., Maalouf, W., Baumgarten, M., Polanski, L., Raine-Fenning, N., Campbell, B., & Jayaprakasan, K. (2017). Efficacy of Dehydroepiandrosterone (DHEA) to overcome the effect of ovarian ageing (DITTO): A proof of principle double blinded randomized placebo controlled trial. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology*, 218, 39–48. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2017.09.006>
- Orisaka, M., Mizutani, T., Tajima, K., Orisaka, S., Shukunami, K. I., Miyamoto, K., & Kotsuji, F. (2006). Effects of ovarian theca cells on granulosa cell differentiation during gonadotropin-independent follicular growth in cattle. *Molecular Reproduction and Development*, 73(6), 737–744. <https://doi.org/10.1002/mrd.20246>
- Orvieto, R., Kruchkovich, J., Rabinson, J., Zohav, E., Anteby, E. Y., & Meltzer, S. (2008). Ultrashort gonadotropin-releasing hormone agonist combined with flexible multidose gonadotropin-releasing hormone antagonist for poor responders in in vitro fertilization/embryo transfer programs. *Fertility and Sterility*, 90(1), 228–230. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.022>
- Paixão, L., Velez, L. M., Santos, B. R., Tusset, C., Lecke, S. B., Motta, A. B., & Spritzer, P. M. (2016). Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 7(4), 384–390. <https://doi.org/10.1017/S2040174416000222>
- Pal, L., Torrealday, S., & Kodaman, P. (2017). Premature Ovarian Insufficiency - an update on recent advances in understanding and management. *F1000Research*, Vol. 6. <https://doi.org/10.12688/f1000research.11948.1>
- Pandian, Z., McTavish, A. R., Aucott, L., Hamilton, M. P., & Bhattacharya, S. (2010). Interventions for “poor responders” to controlled ovarian hyper stimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF). *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd004379.pub3>
- Pantos, K., Simopoulou, M., Pantou, A., Rapani, A., Tsioulou, P., Nitsos, N., ... Sfakianoudis, K. (2019). A Case Series on Natural Conceptions Resulting in Ongoing Pregnancies in Menopausal and Prematurely Menopausal Women Following Platelet-Rich Plasma Treatment. *Cell Transplantation*, 28(9–10), 1333–1340. <https://doi.org/10.1177/0963689719859539>
- Pantos, N., N., G., K., T., V., C., M., A., P., ... K., S. (2016). Ovarian rejuvenation and folliculogenesis reactivation in peri-menopausal women after autologous platelet-rich plasma treatment. *Human Reproduction*, 31, i301.
- Picton, H. M., Harris, S. E., Muruvi, W., & Chambers, E. L. (2008). The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*, 136(6), 703–715. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0290>
- Pilehvari, S., Shahrokh Tehraninejad, E., Hosseinrashidi, B., Keikhah, F., Haghollahi, F., & Azimineko, E. (2016). Comparison pregnancy outcomes

- between minimal stimulation protocol and conventional GnRH antagonist protocols in poor ovarian responders. *Journal of Family and Reproductive Health*, 10(1), 35–42.
- Polyzos, N., Tzioras, S., Badawy, A. M., Valachis, A., Dritsas, C., & Mauri, D. (2009). Aromatase inhibitors for female infertility: A systematic review of the literature. *Reproductive BioMedicine Online*, Vol. 19, pp. 456–471. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2009.06.008>
- Rajah, R., Glaser, E. M., & Hirshfield, A. N. (1992). The changing architecture of the neonatal rat ovary during histogenesis. *Developmental Dynamics*, 194(3), 177–192. <https://doi.org/10.1002/aja.1001940303>
- Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E., Ottander, U., ... Liu, K. (2005). Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHRL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology*, 281(2), 160–170. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.02.013>
- Roh, Y. H., Kim, W., Park, K. U., & Oh, J. H. (2016). Cytokine-release kinetics of platelet-rich plasma according to various activation protocols. *Bone and Joint Research*, 5(2), 37–45. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.52.2000540>
- Sadler, T. W. (2012). Langman's Essential Medical Embryology. In *Langmans Essential Medical Embryology*.
- Sahambi, S. K., Visser, J. A., Themmen, A. P. N., Mayer, L. P., & Devine, P. J. (2008). Correlation of serum anti-Müllerian hormone with accelerated follicle loss following 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced follicle loss in mice. *Reproductive Toxicology*, 26(2), 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.07.005>
- Saharkhiz, N., Zademodares, S., Salehpour, S., Hosseini, S., Nazari, L., & Tehrani, H. (2018). The effect of testosterone gel on fertility outcomes in women with a poor response in in vitro fertilization cycles: A pilot randomized clinical trial. *Journal of Research in Medical Sciences*, 23(1). https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_864_17
- Sahoo, H. B., Nandy, S., Senapati, A. K., Sarangi, S. P., & Sahoo, S. K. (2014). Aphrodisiac activity of polyherbal formulation in experimental models on male rats. *Pharmacognosy Research*, 6(2), 120–126. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.129029>
- Schimberni, M., Ciardo, F., Schimberni, M., Giallonardo, A., De Pratti, V., & Sbracia, M. (2016). Short gonadotropin-releasing hormone agonist versus flexible antagonist versus clomiphene citrate regimens in poor responders undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 20(20), 4354–4361.
- Schoolcraft, W. B., Surrey, E. S., Minjarez, D. A., Stevens, J. M., & Gardner, D. K. (2008). Management of poor responders: can outcomes be improved with a novel gonadotropin-releasing hormone antagonist/letrozole protocol? *Fertility and Sterility*, 89(1), 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.013>
- Scully, D., Sfyri, P., Verpoorten, S., Papadopoulos, P., Muñoz-Turrillas, M. C., Mitchell, R., ... Matsakas, A. (2019). Platelet releasate promotes skeletal myogenesis by increasing muscle stem cell commitment to differentiation and accelerates muscle regeneration following acute injury. *Acta Physiologica*, 225(3). <https://doi.org/10.1111/apha.13207>
- Scully, D., Sfyri, P., Wilkinson, H. N., Acebes-Huerta, A., Verpoorten, S., Muñoz-

- Turrillas, M. C., ... Matsakas, A. (2020). Optimising platelet secretomes to deliver robust tissue-specific regeneration. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14(1), 82–98. <https://doi.org/10.1002/term.2965>
- Sfakianoudis, K., Simopoulou, M., Nitsos, N., Rapani, A., Pappas, A., Pantou, A., ... Pantos, K. (2019). Autologous platelet-rich plasma treatment enables pregnancy for a woman in premature menopause. *Journal of Clinical Medicine*, 8(1). <https://doi.org/10.3390/jcm8010001>
- Shen, J., Sampietro, S., Wu, J., Tang, J., Gupta, S., Matzko, C. N., ... Stalker, T. J. (2017). Coordination of platelet agonist signaling during the hemostatic response in vivo. *Blood Advances*, 1(27), 2767–2775. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017009498>
- Sills, E. S., Rickers, N. S., Li, X., & Palermo, G. D. (2018). First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate-activated autologous platelet rich plasma. *Gynecological Endocrinology*, 34(9), 756–760. <https://doi.org/10.1080/09513590.2018.1445219>
- Siristatidis, C., Salamalekis, G., Dafopoulos, K., Basios, G., Vogiatzi, P., & Papantoniou, N. (2017). Mild versus conventional ovarian stimulation for poor responders undergoing IVF/ICSI. *In Vivo*, 31(2), 231–237. <https://doi.org/10.21873/invivo.11050>
- Spaniel-Borowski, K. (2012). Atlas of the Mammalian Ovary. In *Atlas of the Mammalian Ovary*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-30535-1>
- Springer, L. N., McAsey, M. E., Flaws, J. A., Tilly, J. L., Sipes, I. G., & Hoyer, P. B. (1996). Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 139(2), 394–401. <https://doi.org/10.1006/taap.1996.0180>
- Thoma, M. E., McLain, A. C., Louis, J. F., King, R. B., Trumble, A. C., Sundaram, R., & Buck Louis, G. M. (2013). Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertility and Sterility*, 99(5). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.037>
- Treuting, P. M., Dintzis, S. M., & Montine, K. S. (2018). *Comparative Anatomy And Histology: A Mouse, Rat, And Human Atlas Second Edition*.
- Ulin, M., Cetin, E., Hobeika, E., Chugh, R. M., Park, H. S., Esfandyari, S., & Al-Hendy, A. (2021). Human Mesenchymal Stem Cell Therapy and Other Novel Treatment Approaches for Premature Ovarian Insufficiency. *Reproductive Sciences*, Vol. 28, pp. 1688–1696. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00528-z>
- Van Der Auwera, I., & D’Hooghe, T. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Human Reproduction*, 16(6), 1237–1243. <https://doi.org/10.1093/humrep/16.6.1237>
- Van Kempen, T. A., Milner, T. A., & Waters, E. M. (2011). Accelerated ovarian failure: A novel, chemically induced animal model of menopause. *Brain Research*, Vol. 1379, pp. 176–187. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.064>
- Velez, L. M., Heber, M. F., Ferreira, S. R., Abruzzese, G. A., Reynoso, R. M., & Motta, A. B. (2015). Effect of hyperandrogenism on ovarian function. *Reproduction*, 149(6), 577–585. <https://doi.org/10.1530/REP-15-0041>
- Vural, B., Duruksu, G., Vural, F., Gorguc, M., & Karaoz, E. (2019). Effects of

- VEGF + Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Inbred Rat Ovarian Functions in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Insufficiency Model. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15(4), 558–573. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09892-5>
- Wise, P. M. (1982). Alterations in Proestrous LH, FSH, and Prolactin Surges in Middle-Aged Rats (41356). *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 169(3), 348–354. <https://doi.org/10.3181/00379727-169-41356>
- Wraith, K. S., Magwenzi, S., Aburima, A., Wen, Y., Leake, D., & Naseem, K. M. (2013). Oxidized low-density lipoproteins induce rapid platelet activation and shape change through tyrosine kinase and Rho kinase–signaling pathways. *Blood*, 122(4), 580–589. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-491688>
- Xu, J., Gou, L., Zhang, P., Li, H., & Qiu, S. (2020). Platelet-rich plasma and regenerative dentistry. *Australian Dental Journal*, Vol. 65, pp. 131–142. <https://doi.org/10.1111/adj.12754>
- Xu, Y., Nisenblat, V., Lu, C., Li, R., Qiao, J., Zhen, X., & Wang, S. (2018). Pretreatment with coenzyme Q10 improves ovarian response and embryo quality in low-prognosis young women with decreased ovarian reserve: A randomized controlled trial. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0343-0>
- Yakin, K., Urman, B., & Balaban, B. (2022). Dynamic view of assisted reproduction in Turkey from 1996 to 2020. *Reproductive BioMedicine Online*, 44(4), 747–754. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2021.12.010>
- Yan, Z., Dai, Y., Fu, H., Zheng, Y., Bao, D., Yin, Y., ... Cui, Y. (2018). Curcumin exerts a protective effect against premature ovarian failure in mice. *Journal of Molecular Endocrinology*, 60(3), 261–271. <https://doi.org/10.1530/JME-17-0214>
- Younis, J. S., Izhaki, I., & Ben-Ami, M. (2016). The effect of LH supplementation to the GnRH antagonist protocol in advanced reproductive ageing women: A prospective randomized controlled study. *Clinical Endocrinology*, 84(1), 99–106. <https://doi.org/10.1111/cen.12886>
- Yu, R., Jin, H., Huang, X., Lin, J., & Wang, P. (2018). Comparison of modified agonist, mild-stimulation and antagonist protocols for in vitro fertilization in patients with diminished ovarian reserve. *Journal of International Medical Research*, 46(6), 2327–2337. <https://doi.org/10.1177/0300060518770346>
- Zhang, T., Yan, D., Yang, Y., Ma, A., Li, L., Wang, Z., ... Sun, Z. (2016). The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.09.002>
- Zhao, F., & Wang, W. (2020). Gengnianchun Recipe Protects Ovarian Reserve of Rats Treated by 4-Vinylcyclohexene Diepoxide via the AKT Pathway. *International Journal of Endocrinology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/9725898>

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	:	Adenosin difosfat
AMH	:	Anti-Müllerian hormon
ART	:	Üremeye yardımcı tedavi
ATP	:	Adenosin trifosfat
BMP	:	Kemik morfojenik proteinl
CoQ10	:	Koenzim Q10
DAB	:	Diaminobenzidin
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
DOR	:	Düşük over rezervi
E2	:	Östrojen hormonu
eCG	:	At koryonik gonadotropini
EDTA	:	Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
FOXO3a	:	Forkhead box O3
FSH	:	Folikül stimüle edici hormon
G-CSF	:	Granülosit koloni uyarıcı faktör
GDP	:	Guanozin difosfat ()
GH	:	Büyüme hormonu
GnRH	:	Gonadotropin salgılayan hormon
GTP	:	Guanozin trifosfat
H&E	:	Hematoksilen-Eozin
hCG	:	İnsan koryonik gonadotropini
İp	:	İntraperitoneal
İv	:	İntravenöz
KIT	:	Proto-oncogene receptor tyrosine kinase
KITL	:	Proto-oncogene receptor tyrosine kinase ligantı
KOH	:	Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon
LDL	:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LH	:	Lüteinizan hormon
MSC	:	Mezenkimal kök hücreler
mTORC1	:	Memeli rapamycin complex 1
NOA	:	Doğal yaşlı model
OVX	:	Ovaryumları alınmış
pAKT	:	Fosforile AKT
PCNA	:	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PGC	:	Primordiyal germ hücreleri
PI3K	:	Fosfotidilinositol-3-kinaz
PMBCs	:	Periferik kan mononükleer hücreleri
PMSG	:	Gebe Kısırak Serum Gonadotropini
POI	:	Prematür ovaryan yetmezliği
PRP	:	Plateletten zengin plazma
PTEN	:	Fosfataz ve tensin homolog
rLH	:	Rekombinant LH
Sc	:	Subkütan
SF	:	Serum Fizyolojik

SRY	:	Y kromozomundaki seks belirleyici bölge
TGF- β	:	Transforme edici büyüme faktörü
Tsc1	:	The tumor suppressor tuberous sclerosis complex 1
Tsc2:	:	The tumor suppressor tuberous sclerosis complex 2
VCD	:	4-vinilsikloheksen diepoksit
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü
YAP	:	Yes associated protein



8. TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, değerli bilgi ve deneyimleri ile eğitimimi sağlayan Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı değerli Öğretim Üyelerinden tez danışmanım Prof. Dr. Berrin AVCI'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR, ve diğer Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Semiha ERSOY, Prof. Dr. F. Zehra MİNBAY, Dr. Öğr. Üyesi Duygu GÖK YURTSEVEN, Uzm. Dr. Cihan ÇAKIR'a ve emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU ve Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ'ye ve Sanko Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şahin A. SIRMALI' ya eğitim sürecimdeki tüm emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm asistan arkadaşlarıma, çalışanlarına ve laboratuvar çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Biyo. Ayşe AKBAŞ'a ve özellikle tezimde büyük emekleri olan, ihtiyacım olduğunda her zaman destek olan Uzm. Dr. Cihan ÇAKIR ve yüksek lisans öğrencisi Gizem KURT'a teşekkür ederim.

Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Başkanı ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi Sorumlusu Prof. Dr. Gürkan UNCU, Doç. Dr. Işıl KASAPOĞLU ve Doç. Dr. Kiper ASLAN'a başta olmak üzere tüm çalışanlarına eğitimim boyunca verdikleri emek ve desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar imkanlarını esirgemeyen ve tecrübeleriyle yol gösteren Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mehmet CANSEV'e teşekkür ederim. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fiziyooloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr. Öğr. Üyesi Ayşen ÇAKIR'a desteklerinden ve emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Son olarak, beni yalnız bırakmayan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

9. ÖZGEÇMİŞ

İlk ve orta okul eğitimini 2001 yılında TED Kayseri Koleji'nde, lise eğitimini 2006 yılında Küçükçalık Anadolu Lisesi'nde tamamladı. 2007- 2011 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik lisans eğitimini tamamladı. 2013 yılından itibaren Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda araştırma görevlisi olarak çalışmaktadır. 2016 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisansını tamamladı. 2019 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'nde Üremeye Yardımcı Tedavi (ÜYTE) Laboratuvar Uygulamaları Sertifikalı Eğitim Programı eğitimini tamamladı.

