



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



GİZEM KURT

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

2024

**SIÇAN İN VİVO PREMATÜR OVARYAN YETMEZLİĞİ
MODELİNDE OVARYAN MEKANİK UYARILMANIN
FOLİKÜLER AKTİVASYONA ETKİSİ; İNTRAOVARYAN
İĞNE VE PLATELETTEN ZENGİN PLAZMA (PRP)
ENJEKSİYONUNUN KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

GİZEM KURT

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURSA-2024



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



**SIÇAN İN VİVO PREMATÜR OVARYAN YETMEZLİĞİ
MODELİNDE OVARYAN MEKANİK UYARILMANIN FOLİKÜLER
AKTİVASYONA ETKİSİ; İNTRAOVARYAN İĞNE VE
PLATELETTEN ZENGİN PLAZMA (PRP) ENJEKSİYONUNUN
KARŞILAŞTIRMALI ANALİZİ**

GİZEM KURT

ORCID

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN:

Prof. Dr. Berrin AVCI

Proje No: TYL-2023-1534

B.U.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi

BURSA-2024

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Sıçan İn Vivo Prematür Ovaryan Yetmezliği Modelinde Ovaryan Mekanik Uyarılmanın Foliküler Aktivasyona Etkisi; İntraovaryan İğne ve Plateletten Zengin Plazma (PRP) Enjeksiyonunun Karşılaştırmalı Analizi**” 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.

Gizem KURT
Tarih ve İmza



TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

14/06/2024

Adı Soyadı: Gizem KURT

Ana Bilim Dalı: Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı

Tez Konusu: Sıçan İn Vivo Prematür Ovaryan Yetmezliği Modelinde Ovaryan Mekanik Uyarılmanın Foliküler Aktivasyona Etkisi; İntraovaryan İğne ve Plateletten Zengin Plazma (PRP) Enjeksiyonunun Karşılaştırmalı Analizi

<u>ÖZELLİKLER</u>	<u>UYGUNDUR</u>	<u>UYGUN DEĞİLDİR</u>	<u>ACIKLAMA</u>
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

ETİK BEYANI	II
KABUL ONAY SAYFASI	Error! Bookmark not defined.
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	IX
İNGİLİZCE ÖZET	X
BUÜ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ	XI
TEZ KONUSUNUN KÜRESEL SÜRDÜRÜLEBİLİR KALKINMA HEDEFLERİ İLE İLİŞKİSİ	XI
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Dişi Üreme Sistemi	5
2.1.1. Ovaryum	5
2.1.1.1. Ovaryumun anatomisi	6
2.1.1.2. Ovaryumun embriyolojisi	7
2.1.1.3. Ovaryumun histolojisi	9
2.1.2. Oogenez	10
2.1.3. Folikülogenez.....	12
2.1.3.1. Primordiyal foliküller	12
2.1.3.2. Gelişmekte olan foliküller	13
2.1.3.2.1. Primer folikül	13
2.1.3.2.1.1. Unilaminar primer foliküller	13
2.1.3.2.1.2. Multilaminar primer foliküller	14
2.1.3.2.2. Sekonder (antral) foliküller	15
2.1.3.3. Matür (graaf) folikül.....	16
2.1.3.4. Atretik folikül.....	17
2.1.3.5. Ovulasyon	18
2.1.3.6. Luteinizasyon ve korpus luteum	19
2.2. Ovaryum Rezervi	20
2.3. Dişi Üreme Fizyolojisi	21
2.3.1. Hipotalamus-hipofiz gonadal eksen	21
2.3.2. Menstrual siklus	22
2.4. Sıçan Dişi Üreme Sistemi.....	24
2.4.1. Sıçan ovaryum anatomisi.....	25
2.4.2. Sıçan ovaryum embriyolojisi	25
2.4.3. Sıçan ovaryum histolojisi	26
2.4.4. Sıçanlarda foliküler gelişim	26
2.4.5. Sıçanlarda östrus siklusu	28
2.4.5.1. Proöstrus	29
2.4.5.2. Östrus.....	30
2.4.5.3. Metaöstrus.....	30
2.4.5.4. Diöstrus.....	30
2.5. İnfertilite ve Prematür Ovaryan Yetmezlik (POI)	32
2.5.1. POI’de ovaryum histolojisi	33
2.6. POI Hayvan Modelleri	33
2.6.1. Siklofosfamid (CTX) ile POI modeli oluşturulması	34

2.6.2. 4-Vinilsikloheksen diepoksit (VCD) ile POI modeli oluşturulması	34
2.6.3. D-galaktoz ile POI modeli oluşturulması	34
2.6.4. Cisplatin ile POI modeli oluşturulması	35
2.7. VCD	35
2.8. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon (KOH)	37
2.8.1. POI olgularında KOH protokolleri.....	37
2.8.2. POI olgularında KOH protokollerine eklenen adjuvan tedaviler	39
2.9. Plateletten Zengin Plazma (PRP).....	40
2.9.1. Üreme tıbbında PRP uygulamaları.....	42
2.10. Primordiyal Folikül Aktivasyonu ve Moleküler Mekanizmaları.....	43
2.10.1. Primordiyal folikül aktivasyonunda hippo sinyal yolağı.....	43
2.10.2. Primordiyal folikül aktivasyonunda PTEN/PI3K sinyal yolağı.....	45
2.10.3. Primordiyal folikül aktivasyonunda mekanik uyarılma	46
2.12. Çalışmanın Amacı.....	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1. Deney Hayvanları	49
3.2. Deney Grupları	49
3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulama Yöntemleri	51
3.4. Deneklerden Kan Örneklerinin Alınması.....	53
3.5. Deneysel Prematür Ovaryan Yetmezliği (POI) Hayvan Modeli Oluşturulması ..	54
3.6. Vajinal Smear Yöntemi İle Östrus Siklusu Evrelerinin Tayin Edilmesi.....	54
3.7. Plateletten Zengin Plazma (PRP) Eldesi ve İntraovaryan PRP Enjeksiyonu	55
3.8. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon (KOH) Protokolü	57
3.9. Deneklerin Sakrifiye Edilmesi ve Doku Eldesi	57
3.10. Doku Takibi.....	58
3.11. Kesit Alınması	58
3.12. Hematoksilen-Eozin (H&E) Boyaması.....	59
3.13. Ovaryan Foliküllerin Sayımı	60
3.14. ELISA.....	60
3.15. İstatistiksel Analiz.....	61
4. BULGULAR.....	62
4.1. Denek Ağırlık Ölçümleri.....	62
4.1.1. Denek vücut ağırlık ölçümleri	62
4.1.1.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin vücut ağırlık ölçümleri	62
4.1.1.2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin vücut ağırlık ölçümleri	63
4.1.1.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin vücut ağırlık ölçümleri	65
4.1.2. Denek ovaryum ağırlık ölçümleri	66
4.1.2.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR Grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD Grubu) deneklerin ovaryum ağırlık ölçümleri	67
4.1.2.2. POI grubu (VCD Grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH Grubu) oluşturan deneklerin ovaryum ağırlık ölçümleri.....	68
4.1.2.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH Grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin ovaryum ağırlık ölçümleri	69
4.2. Histolojik Bulgular.....	71
4.2.1. Histomorfolojik bulgular	71

4.2.1.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin histomorfolojik bulguları.....	72
4.2.1.2. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin histomorfolojik bulguları.....	80
4.2.2. Morfometrik bulgular	91
4.2.2.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin morfometrik bulguları	91
4.2.2.2. POI grubu (VCD Grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH Grubu) oluşturan deneklerin morfometrik bulguları.....	94
4.2.2.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin morfometrik bulguları	97
4.3. Biyokimyasal Bulgular	102
4.3.1. Serum sıvılarında biyokimyasal bulgular	102
4.3.1.1. Serum AMH konsantrasyonları	103
4.3.1.1.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin AMH konsantrasyonları	103
4.3.1.1.2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin AMH konsantrasyonları.....	104
4.3.1.1.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin AMH konsantrasyonları	104
4.3.2. Ovaryum dokusu homojenatlarında biyokimyasal bulgular	105
4.3.2.1. TAZ konsantrasyonları	106
4.3.2.1.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin TAZ konsantrasyonları.....	106
4.3.2.1.2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin TAZ konsantrasyonları	106
4.3.2.1.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin TAZ konsantrasyonları.....	107
4.3.2.2. NAIP konsantrasyonları	109
4.3.2.2.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin NAIP konsantrasyonları	109
4.3.2.2.2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH Grubu) oluşturan deneklerin NAIP konsantrasyonları.....	110
4.3.2.2.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH Grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin NAIP konsantrasyonları	111
4.3.2.3. CTGF konsantrasyonları.....	113
4.3.2.3.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin CTGF konsantrasyonları	113
4.3.2.3.2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH Grubu) oluşturan deneklerin CTGF konsantrasyonları.....	113
4.3.2.3.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH Grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin CTGF konsantrasyonları	114
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	117
5.1. Denek Seçimi.....	117
5.2. POI Modeli	118
5.3. POI Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Denek Vücut ve Ovaryum Dokusu Ağırlıklarına Etkisi	119
5.4. POI Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Ovaryan Folikül Sayıları ve AMH	

Konsantrasyonlarına Etkisi	121
5.4.1 NOR grubu ve VCD grubunda ovaryan folikül sayıları ve AMH konsantrasyonlarına etkisi	121
5.4.2. VCD grubu ve VCD+KOH grubunda ovaryan folikül sayıları ve AMH konsantrasyonlarına etkisi	122
5.4.3. VCD+KOH gruplarında ovaryan folikül sayıları ve AMH konsantrasyonlarına etkisi	124
5.5. POI Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Ovaryan Folikül Sayıları ve Hippo Sinyal Yolağına Etkisi	125
5.5.1. VCD+KOH gruplarında ovaryan folikül sayıları ve hippo sinyal yolağına etkisi	125
5.6. Sonuç	128
6. KAYNAKLAR	129
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	143
8. EKLER	145
9. TEŞEKKÜR	146
10. ÖZGEÇMİŞ	147

TÜRKÇE ÖZET

Tez çalışmasının amacı, infertilite nedenlerinden biri olan prematür ovaryan yetmezlik (POI) olgularında, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolü öncesi intraovaryan mekanik uyarma ve intraovaryan PRP enjeksiyonu uygulamasının hippo sinyal yolağı üzerinden ovaryan foliküllerin gelişimi üzerindeki etkisinin ve mekanizmasının karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir.

DeneySEL POI modeli oluşturmak, intraovaryan enjeksiyonlar ve KOH protokolü uygulamak amacıyla 45 adet dişi Sprague-Dawley cinsi sıçan 7 farklı gruba ayrıldı. Denekler üzerinde 15 gün boyunca subkutan olarak tek doz 4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD, 160 mg/kg/gün) enjeksiyonu ile POI modeli oluşturuldu. VCD enjeksiyonları ardından intraovaryan olarak; cerrahi yolla açma kapama, boş iğne ile mekanik uyarma, PRP ve SF enjeksiyonları yapıldı ve sonrasında KOH protokolü uygulandı. Deneklerin sakrifikasyonu ile eksize edilen ovaryum dokularında, H&E boyaması ile histomorfolojik değerlendirmeler; ELISA yöntemi ile serum AMH ve TAZ, NAIP, CTGF konsantrasyon tayinleri gerçekleştirildi.

VCD enjeksiyonları sonucunda deney gruplarında, ovaryan foliküllerden primordiyal folikül ve primer folikül sayılarında azalma, atretik folikül sayılarında artma, AMH konsantrasyonunda azalma, hippo sinyal yolağı proteinlerinin ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklar görüldü.

Bu çalışmada, sıçan deneySEL POI modelinde KOH protokolü öncesi uygulanan intraovaryan PRP enjeksiyonu hippo sinyal yolağının bozulmasında serum fizyolojik enjeksiyonuyla benzer etki gösterdi. Primordiyal foliküllerin aktivasyonunda doku içine mekanik uyarılma ile PRP enjeksiyonunun etkilerinin benzer olması ve hippo sinyal yolağı proteinleriyle folikül aktivasyon düzeylerindeki uyumsuzluk mekanik uyarılmaya bağlı folikül artışında farklı mekanizmaların araştırılması gerekliliğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: POI, VCD, mekanik uyarım, PRP, KOH, hippo sinyal yolağı

İNGİLİZCE ÖZET

THE EFFECT OF OVARIAN MECHANICAL STIMULATION ON FOLLICULAR ACTIVATION IN THE RAT IN VIVO MODEL OF PREMATURE OVARIAN INSUFFICIENCY; COMPARATIVE ANALYSIS OF INTRAOVARIAN NEEDLE AND PLATELET-RICH PLASMA (PRP) INJECTION

The aim of the thesis study is to comparatively evaluate the effect and mechanism of intraovarian mechanical stimulation and intraovarian PRP injection before the controlled ovarian hyperstimulation (COH) protocol on the development of ovarian follicles through the hippo signaling pathway in cases of premature ovarian insufficiency (POI), which is one of the causes of infertility.

In order to create an experimental POI model and apply intraovarian injections and COH protocol, 45 female Sprague-Dawley rats were divided into 7 different groups. A POI model was created on the subjects by subcutaneously injecting a single dose of 4-Vinylcyclohexene Diepoxide (VCD, 160 mg/kg/day) for 15 days. Intraovarian following VCD injections; Surgical opening and closing, mechanical stimulation with an empty needle, PRP and SF injections were performed, and then the COH protocol was applied. Histomorphological evaluations with H&E staining in the ovarian tissues excised after the sacrifice of the subjects; Serum AMH and TAZ, NAIP, CTGF concentration determinations were performed by ELISA method.

As a result of VCD injections, a decrease in the number of primordial follicles and primary follicles from ovarian follicles, an increase in the number of atretic follicles, a decrease in AMH concentration, and statistically significant differences in the expression of hippo signaling pathway proteins were observed in the experimental groups.

In this study, intraovarian PRP injection applied before the COH protocol in the rat experimental POI model had a similar effect to physiological saline injection in disrupting the hippo signaling pathway. The similarity of the effects of mechanical stimulation and PRP injection into the tissue on the activation of primordial follicles and the incompatibility between the Hippo signaling pathway proteins and follicle activation levels showed the need to investigate different mechanisms in the follicle increase due to mechanical stimulation.

Keywords: POI, VCD, mechanic stimulation, PRP, COH, hippo signaling pathway

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



Yüksek Lisans tezi olarak sunduğum “**Sıçan İn Vivo Prematür Ovaryan Yetmezliği Modelinde Ovaryan Mekanik Uyarılmanın Foliküler Aktivasyona Etkisi; İntraovaryan İğne ve Plateletten Zengin Plazma (PRP) Enjeksiyonunun Karşılaştırmalı Analizi**” başlıklı tez **3. ve 5.** Küresel Sürdürülebilir Kalkınma Hedefleri ile ilişkilidir.

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine göre düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen bir yıl boyunca kadında gebe kalma durumunun görülmemesi olarak ifade edilen infertilite, reproduktif periyottaki çiftlerin %15'ini ilgilendiren toplumsal bir sorun (Thoma ve ark., 2013) olarak görülmektedir. İnfertilitenin, hem erkek hem de kadın faktöre bağlı birçok nedeni olmakla birlikte, primordiyal folikül sayısında ve oositlerin kalitesindeki 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, 2020). Düşük over rezervinin yaştan bağımsız bir şekilde over rezervinde önemli düzeyde bir azalmanın olduğu, 35 yaşın altında 250 kadından 1'inde ve 35-40 yaş arasında 100 kadından 1'inde görüldüğü formu prematür ovaryan yetmezlik (POI, premature ovarian insufficiency) olarak tanımlanmaktadır (Ulin ve ark., 2021). İyatrojenik faktörlere (cerrahi, kemoterapi veya radyasyon tedavisi) ek olarak, spontan POI etiyolojileri arasında Turner sendromu veya Turner mozaik varyantları, Frajil X sendromu ve otoimmün bozukluklar bulunmaktadır. POI olgularının çoğunda etiyoloji tam olarak bilinmemektedir (Maclaran, & Panay, 2015). Spontan gelişen POI olgularında over rezervinin önemli bir düzeyde azalmış olması durumuna karşın, over korteksinde over rezervini oluşturan primordiyal foliküllerin az sayıda yer aldığı bilinmektedir. POI tedavisinde; overlerde kalan primordiyal foliküllerin harekete geçirilmesi ve üreme fonksiyonunu yerine getirecek olgun foliküllerin sayısının, kalitesinin ve yeterliliğinin artırılması amaçlı yardımcı üreme tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında POI olgularında uygulanan tedavi yaklaşımları tartışmalı olup henüz deneysel olmasına karşın bu uygulanan tedavi yaklaşımları arasında ovaryan mekanik aktivasyon ve plateletten zengin plazma (PRP) uygulamaları bulunmaktadır.

Doğal döngülerde foliküler olgunlaşmanın ilk basamağı ovaryum rezervini oluşturan primordiyal foliküllerin aktivasyonudur. Primordiyal folikül aktivasyonu dinamik bir süreç olup sıkı kontrol edilir ve moleküler mekanizması henüz tamamen aydınlığa kavuşmamıştır. Memeli ovaryumunda anahtar parakrin ve otokrin sinyalleşme modellerinin ortaya çıkmasıyla birlikte folikülogenez sırasında biyomekanik ve mekanik sinyalleşmenin rolleri çok fazla araştırılmamıştır. Mekanik

kuvvetlerin gelişim, doku homeostazı ve kanser büyümesinde hücrel dinamikleri ve işlevleri kontrol etmede bütünleyici bir rol oynadığı bilinmektedir (Hannezo, & Heisenberg, 2019; Heisenberg, & Bellaïche, 2013). Son çalışmalarda, ovaryum korteksinin mekanik parçalanmasının ve intraovaryan enjeksiyon işlemi ile dokunun delinmesinin, sırasıyla POI ve polikistik over sendromu (PKOS) olan hastalarda folikül büyümesini destekleyebileceği gösterilmiştir. Mekanik uyarıların ovaryan folikülogenezisin düzenlenmesinde kritik bir rol oynadığını gösteren kanıtlar ortaya çıkmıştır. İn vitro folikül kültürü, folikül büyümesinin, çevreleyen matriks sertliğine duyarlı olduğunu ve matriks tarafından uygulanan kompresif stresin folikül büyümesine ve gelişimine karşı hareket edebildiğini ortaya çıkarmıştır (Kawamura ve ark., 2013). Ayrıca dış korteks ve iç medulladaki ECM sertliğindeki bölgesel farkın, farklı folikül büyümesine veya göçüne katkıda bulunabileceği varsayılmıştır (Woodruff, & Shea, 2011). Mekanik kuvvetlerin moleküler sinyal dizilerinin düzenlenmesinde anahtar rol oynadığı ve bu bağlamda gerçekleşen değişikliklerin PKOS, endometriyozis veya POI gibi infertiliteye neden olan patolojik durumlarda gözlemlendiği, bozulmuş folikülogenezi ve azalmış oosit gelişim potansiyelini belirlediği görülmüştür (Giulia ve ark., 2023).

Yardımlı üreme tekniklerinde, POI olgularında uygulanan tedavi yaklaşımları daha fazla sayıda folikül gelişimi ve elde edilecek oosit sayı ve kalitesinin artırılmasını hedeflemektedir. Hücre proliferasyonu (Halder, & Johnson, 2011), apoptoz (Plouffe, Hong, & Guan, 2015) ve kök hücre kendini yenileme (Fu, Plouffe, Guan, 2017) kontrolü yoluyla organ boyutunu düzenleyen (Dong ve ark., 2007) ve işlev bozukluğu ile çeşitli hastalıklara (Fu, Plouffe, Guan, 2017), dokuda aşırı büyümeye (Halder, & Johnson, 2011) ve tümör oluşumuna (Fu, Plouffe, Guan, 2017) neden olan Hippo sinyal yolağı primordiyal foliküllerin aktivasyonunda önemlidir. Doku mekanik gerilimini serbest bırakan ve F-aktini bozan overin parçalanması uygulamasının iyi bilinen bir mekanotransdüksiyon yolu olan Hippo sinyal yolu aracılığıyla folikül aktivasyonunu ve büyümesini destekleyebileceği gösterilmiştir (Kawamura ve ark., 2013).

Hippo sinyal yolağı iyi bilinen bir mekanosinyalleşme yoludur. Hippo yolu, ECM sertliği (Dupont ve ark., 2011), substrat sertliği (Thomasy, Morgan, Wood, Murphy, & Russell, 2013), esneme (Aragona ve ark., 2013), hücre geometrisi (Dupont ve ark.,

2011), hücre yoğunluğu (Zhao ve ark., 2007), hücrel gerilim (Gonzalez ve ark., 2018) ve kayma gerilimi (Lee ve ark., 2017) gibi çeşitli sinyallere yanıt verebilir. Bu faktörler, büyüme, gelişme ve homeostaz gibi çeşitli hücrel süreçleri düzenlemek için Hippo sinyal yolağı ile entegre edilmiştir (Wu, & Guan, 2021). Hippo sinyal yolağı etkinleştirildiğinde YAP fosforile olur ve işlevsiz kaldığı veya bozulduğu sitoplazmaya yerleşir. Bununla birlikte, Hippo sinyal yolağı bozulduğunda, fosforile olmayan YAP, aşağı akış genlerinin ekspresyonuna yol açan TEA alanı aile üyeleri (TEAD 1-4) ile bir transkripsiyon aktivasyon kompleksi oluşturmak için nükleusa yer değiştirir. Hippo sinyal yolağının folikül büyümesinde rol oynadığı bulunmuştur. Hippo sinyal yolağının bozulması, YAP'ın folikül aktivasyonu için gerekli olabileceğini gösteren POI benzeri bir fenotipe neden olmuştur (St John ve ark., 1999). Bu, over parçalanmasının F-aktin polimerizasyonuna, artan nükleer YAP lokalizasyonuna ve primordiyal folikül aktivasyonuna yol açabileceğini gösteren Kawamura ve arkadaşlarının bir çalışmasıyla daha da desteklenmektedir (Kawamura ve ark., 2013). Ayrıca, F-aktin polimerizasyonunun kendisi artan nükleer YAP lokalizasyonuna ve folikül büyümesine yol açarak YAP'ın mekanik algılama kabiliyetini ve folikül aktivasyonundaki rolünü vurgulamaktadır (Cheng ve ark., 2015). Hücre dışı matris (ECM) sertliği ve kayma gerilimi gibi mekanik işaretler YAP/TAZ'ın güçlü düzenleyicileridir. Aktif YAP/TAZ, hücreler katı bir ECM üzerinde büyüdüğünde veya geniş bir yüzeye yayıldığında nükleusa girer. Tersine, hücreler yumuşak bir ECM'deyken veya küçük bir alana sıkıştırıldığında YAP/TAZ etkin değildir. Hücrelerin ECM'ye bağlanması, LATS'ye bağlı YAP fosforilasyonunu sınırlayarak Rho-GTPaz'ları aktive eder. F-aktinin bozulması, ECM'nin YAP1 nükleer lokalizasyonu üzerindeki etkisini bloke eder. ECM sertliği hücre çoğalması ve farklılaşması için önemlidir ve YAP/TAZ aktivitesi bu hücrel süreçlerde rol oynar (Chang ve ark., 2018; Dupont ve ark., 2011).

PRP, kan plazma fraksiyonunda yüksek konsantrasyonda bulunan trombositler olarak tanımlanmaktadır (Scully ve ark., 2019). Son yıllarda, özellikle rejeneratif tıpta otolog kandan hızlı ve basit yolla elde edilebilen, kısa sürede uygulanabilen ve immün cevabı tetiklemeyen PRP uygulamaları geniş kullanım alanına sahiptir. Kas-iskelet sistemi uygulamaları (Scully ve ark., 2019; Scully ve ark., 2020), oral-maksillofasiyal uygulamaları (Xu, Gou, Zhang, & Oiu, 2020) ve osteoartrit (Evans ve ark., 2020)

üzerinde PRP'nin pozitif etkisi gösterilmiştir. Trombosit aktivasyonundaki karışık duruma bakıldığında, trombositlerin tüm fizyolojik etkilerinin nasıl başlatıldığının ayrıntıları belirsizlik göstermektedir. Bununla birlikte, trombositlerin aktivasyona yanıt olarak bir dizi sitokin saldığı da bilinmektedir (Roh, Kim, Park, & Oh, 2016). Sitokin sinyallemesinin oosit, granüloza hücreleri 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 sitokin, aynı zamanda trombosit aktivasyonu sırasında alfa ve yoğun granül içeriklerinin salgılanması yoluyla trombositler tarafından da salındığı gösterilmiştir. Bu nedenle, PRP'nin folikül olgunlaşmasını uyarabilen proanjiojenik, proliferatif ve proinflamatuvar faktörlerin kolayca erişilebilir, bireyselleştirilmiş, maliyet etkin bir uygulama olduğu hipotezi mevcuttur.

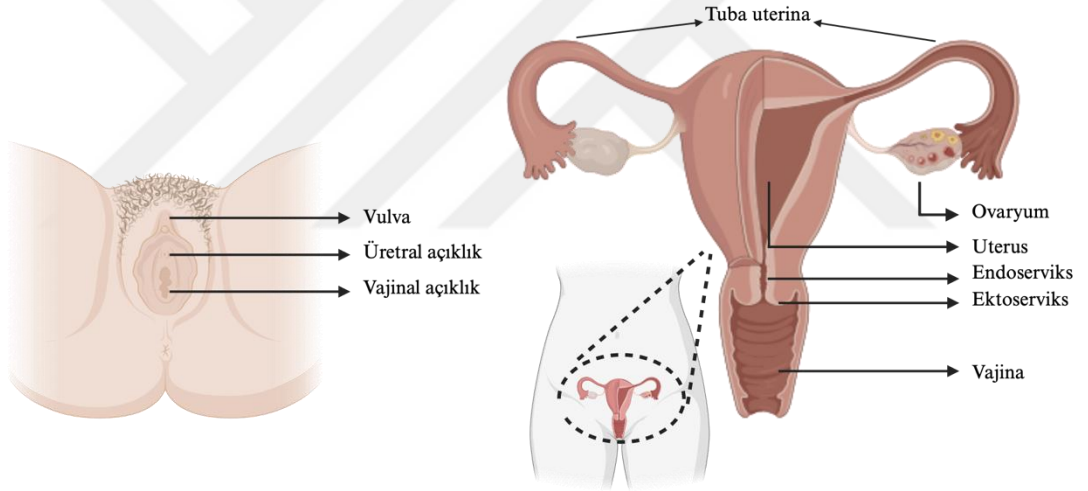
Yapılan çalışmalarda, intraovaryan PRP uygulaması umut vaat ediyor olsa da deneysel model oluşturulması açısından çalışmaların ortak özelliği, sahte enjeksiyon grubunu (sham) içermemesidir. Prosedürden kaynaklı, ovaryumlarda oluşan mekanik gerilme ve/veya hafif yaralanmanın, ovaryum fonksiyonunun geçici olarak yeniden başlamasına yol açan bir inflamatuvar yanıt ortaya çıkarmak için yeterli olduğu düşünülebilir ve ovaryumların enjeksiyon sırasında yaralanması, PRP ile tedavinin başarısına bakıldığında nedensel bir faktör olabileceği düşünülmektedir.

Bu bilgiler ışığında, “infertilite nedenlerinden biri olan POI olgularında, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolü öncesi uygulanan intraovaryan PRP enjeksiyonu, ovaryan foliküllerin aktivasyonunu, PRP'nin etkisi dışında, hippo sinyal yolağı üzerinden enjeksiyon iğnesinin oluşturduğu mekanik uyarılma ile gerçekleştirir” hipotezinden yola çıkılarak; sıçanlarda deneysel POI modelinde KOH öncesi intraovaryan mekanik uyarılma ve intraovaryan PRP enjeksiyonu uygulamasının ovaryan foliküllerin gelişimi üzerindeki etkisinin ve mekanizmasının karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dişi Üreme Sistemi

Dişi üreme sistemi gonadlar, genital kanallar ve dış genital organlar olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Magro-Lopez, & Muñoz-Fernández, 2021): vulva, vajina, ekto serviksi içeren alt ve endo serviksi, uterus, tuba uterina, ovaryumları içeren üst dişi üreme sistemi (Takada ve ark., 2023). Dişi üreme sisteminde germ hücreleri olan oositler ovaryumlarda üretilerek büyüme ve gelişme için tuba uterinaya taşınırlar. Taşınan bu oositler sperm hücresi ile karşılaştıklarında tuba uterinada döllenirler. Tüm bu sürecin kontrolü dişi üreme sistemi sorumluluğunda gerçekleşir (Şekil 1) (Magro-Lopez, & Muñoz-Fernández, 2021).



Şekil 1. Dişi üreme sistemi şematik gösterimi (BioRender üzerinden oluşturulmuştur).

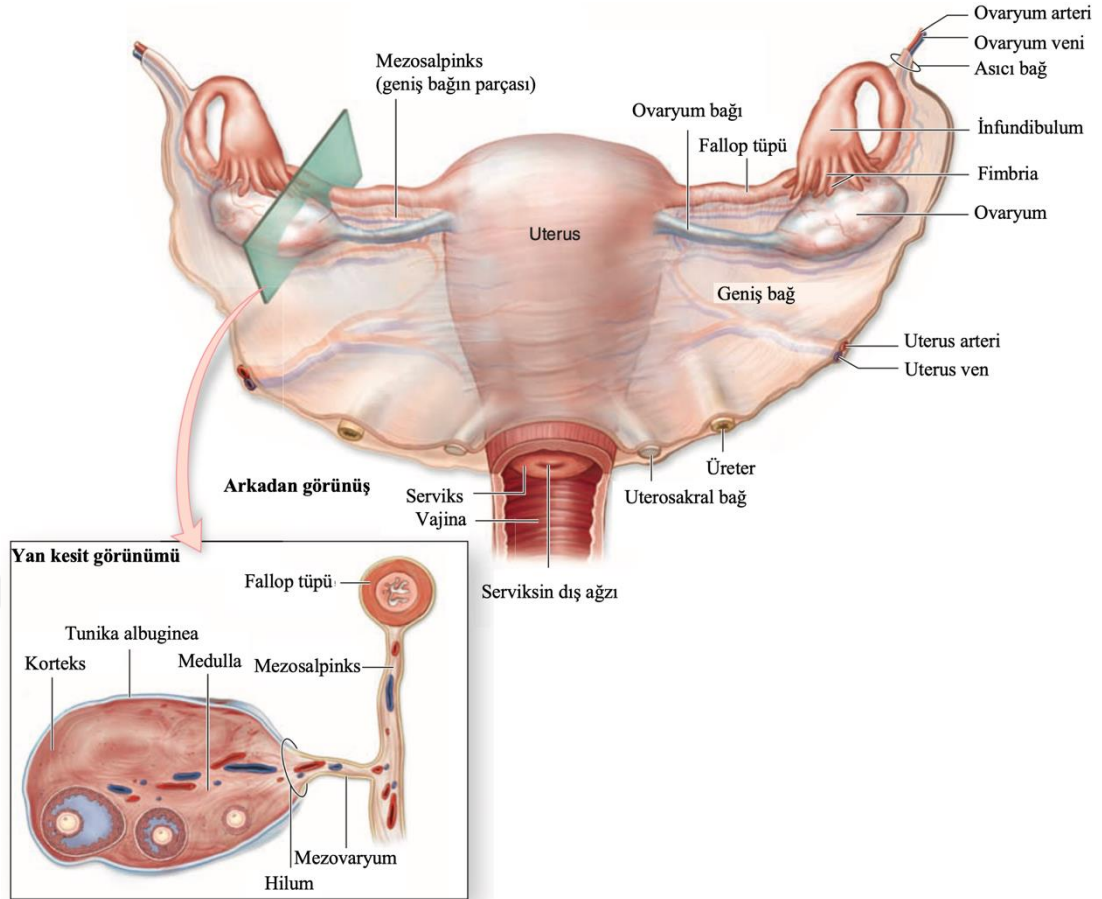
2.1.1. Ovaryum

Dişi üreme sistemi yapılarından biri olan ovaryumlar, uterusun sağ ve solunda lateral pelvik duvarlara yakın olarak konumlanmış organlardır. Ovaryumların birbirleriyle bağlantılı iki ana işlevi; gamet üretiminin gerçekleşme süreci olan gametogenez ile steroid yapılı östrojen ve progesteron hormonlarının sentezlenerek salgılandığı steroidogenez süreçleridir. Steroid hormonlardan biri olan östrojen, genital organların büyümesi ve olgunlaşmasından, meme bezinin gelişiminden sorumludur. Steroid hormonlardan bir diğeri olan progesteron, endometriyumdaki

salgı değişimlerinden ve meme bezinin laktasyona hazırlığından sorumludur. Her iki steroid hormon da fertilizasyona uğrayan oositin implantasyonu için uterusu hazırlamada görev alır ve böylece menstrual siklus düzenlenmesinde rol oynarlar (Ross, & Pawlina, 2019).

2.1.1.1. Ovaryumun anatomisi

Yaşa, hormonal parametrelere, menstrual evreye göre boyut olarak değişiklikler gösteren ovaryumlar, oval, badem şeklinde pembemsi beyaz yapıda bir çift organdır. Erişkin ovaryumları yaklaşık olarak 2,5-5 cm uzunluk, 1,5-3 cm genişlik ve 1-2 cm kalınlık gösterir. Pelvisin lateral duvarındaki ovaryan fossada bulunan ovaryumlar, broad ligament posterior yüzeyine mezovaryum denilen peritoneal kıvrım tarafından bağlıdır. Ovaryumun superior kısmı suspensor ligament ile pelvis duvarına; ovaryumun inferior kısmı ise ovaryan ligament ile uterusu bağlıdır. Ovaryan kan damarları ve sinirlerini taşıyan ovaryan ligament, gelişmekte olan gonadın pelvis tabanına bağlanmasını sağlayan embriyonik fibröz kordondur ve embriyonik dönemden gubernakulumun kalıntısıdır. Ovaryumun kortikal stromasını ve gelişimin farklı aşamalarındaki ovaryan folikülleri saran sıkı bağ doku yapılı tunika albuginea tabakasının üzerinde bulunan ovaryumun yüzey germinal epiteli, modifiye periton olan visseral periton uzantısı mezovaryum ile çevrilidir. Ovaryan kortikal stroma; fibroblast, düz kas hücresi gibi çeşitli tipte hücreler içeren matriks yapısıdır. Ovaryan medullar stroma ise düzensiz bağ dokudan oluşur. Ovaryan yüzey puberteye kadar düzgün şekilliysen, puberte sonrası tekrarlanan ovulasyonlardan dolayı skarlı ve düzensiz şekilli morfoloji gösterir (Şekil 2) (Dalley, & Agur, 2023; Eroschenko, 2012; Ross, & Pawlina, 2019; Saksouk, & Johnson, 2004).



Şekil 2. Ovaryum anatomisi (Schuenke, Schulte, & Schumacher, 2020).

2.1.1.2. Ovaryumun embriyolojisi

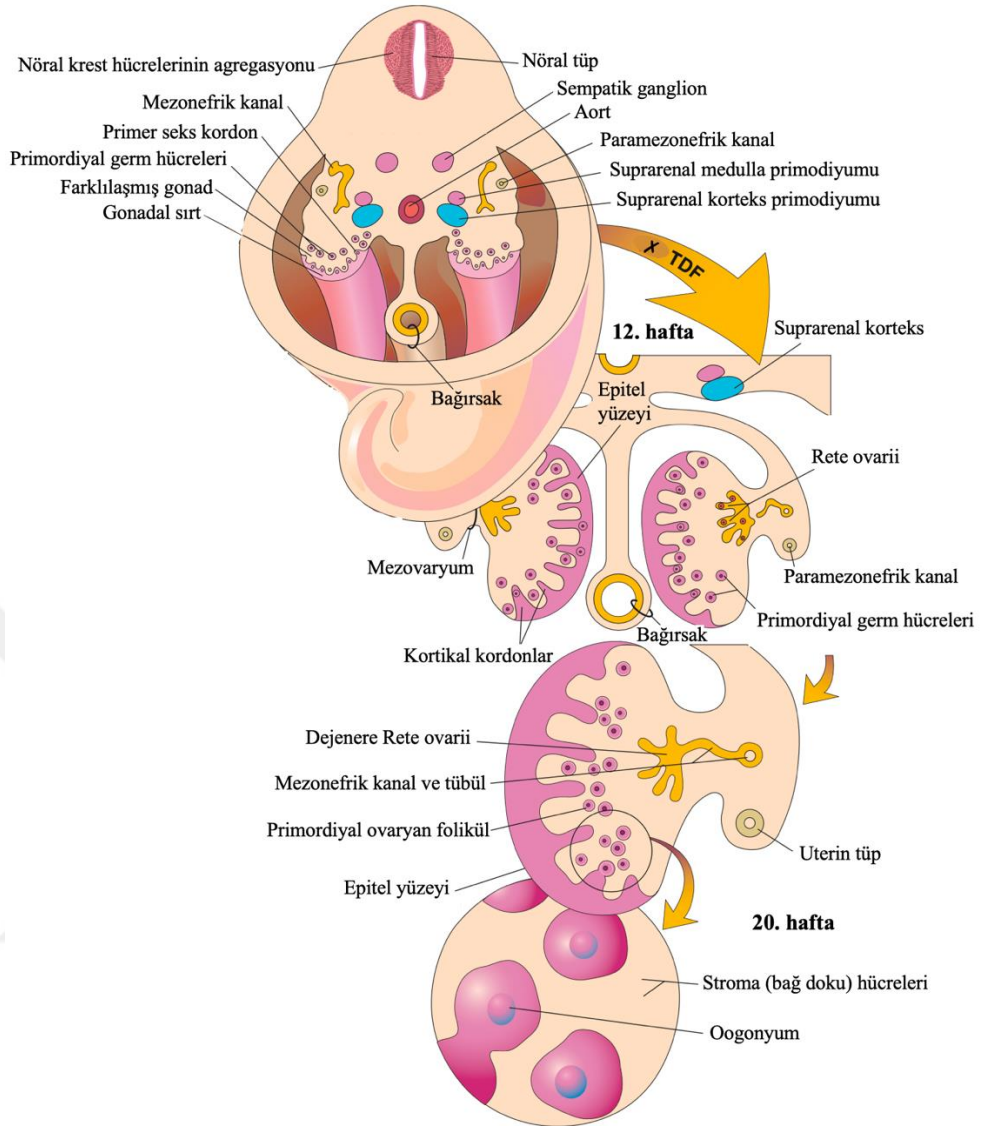
Cinsiyet farklılaşma süreci, gonozomal ve otozomal genlerin dahil olduğu birçok genin görev aldığı bir süreçtir. Cinsiyet farklılaşma sürecinin kilit noktası, Y kromozomu kısa kolunda (Yp11) lokalizasyon gösteren, testis gelişiminden sorumlu SRY genidir. SRY geninin kodladığı protein olan Testis Belirleyici Faktör (TBF)'dür. TBF etkisi altında erkek embriyo gelişimi; yokluğunda ise dişi embriyo gelişimi gerçekleşir (Sadler, 2018).

Germ hücrelerinin (sperm ve oositler) üretimini gerçekleştiren gonadlar (testis ve ovaryum) üç kaynaktan köken alır; posterior abdominal duvarı saran mezotelyum (mezodermal epitel), epitelin altındaki mezenşim (embriyonik bağ doku) ve primordiyal germ hücreleri (Moore, Persaud, & Torchia, 2015).

Gonadlar başlangıçta uzunlamasına bir çift genital ya da gonadal kabartı olarak görünür. Gonadal kabartı, mezotelyumun proliferasyonu ve altında bulunan

mezenşimin yoğunlaşması sonucu oluşur. Gelişimin 6. haftasına kadar gonadal kabartılarda germ hücreleri görülmez. Gelişimin 3. haftasında ise yolk kesesinin allantoise komşu duvarındaki hipoblast kökenli endoderm hücrelerinin arasında epiblasttan kökenli ekstraembriyonik splanknik mezodermden köken alan primordiyal germ hücreleri görülür. Gelişimin 4. haftası süresince son bağırsak mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketle göç ederler ve 5. haftanın başında primitif gonadlara, 6. haftada da gonadal kabartılara ulaşarak göçlerini tamamlarlar. Gonadal kabartılara olan göçün gerçekleşemediği senaryoda gonadlar gelişemez. Bu nedenle primordiyal germ hücreleri gonadların, ovaryum ya da testise diferansiyasyonu üzerine indüktif özelliktedir. Primitif gonadlara göç esnasında ve göçün tamamlanması sırasında gonadal kabartının epiteli proliferasyona uğrar ve epitel hücreleri, epitel altındaki mezenşime doğru nüfuz ederler. Bu ilerleyiş sonucunda yüzey epiteline bağlı birçok düzensiz şekilli primitif cinsiyet kordonları meydana gelir. Bu primitif cinsiyet kordonlarının oluşumu esnasındaki gonadlar hem dişi hem de erkek embriyolarda ayırt edilemediğinden ‘farklanmamış gonad’ olarak adlandırılırlar.

Primitif cinsiyet kordonları, SRY geni içeren Y kromozomu bulunmayan dişi embriyolarda düzensiz hücre kümeleri oluşturur ve primordiyal germ hücrelerini içerirler. Bu hücre kümeleri farklanmamış gonad (ovaryum) dokusunun medullar bölgesinde zamanla kaybolarak yerini ovaryum medullasını oluşturan vasküler stromaya bırakır. Erkek gonad yüzey epitelinden farklı olarak proliferasyona devam eden dişi gonad yüzey epiteli, gelişimin 7. haftasında mezenşimde yüzeye yakın kalan kortikal kordonlar da denilen ikinci nesil kordonların oluşumunda yer alır. Gelişimin 3. ayında izole hücre kümelerine ayrılan bu kordonlar proliferasyona devam ederek primitif germ hücrelerini çevrelerler. Primitif germ hücrelerinin her biri oogonyuma dönüşür ve primitif germ hücrelerini çevreleyen hücre kümelerini oluşturan epitel hücrelerinden foliküler hücreler oluşur. Oogonyumlar ve onları çevreleyen tek sıra yassı foliküler hücreler birlikte primordiyal folikülleri oluştururlar (Şekil 3) (Sadler, 2018).

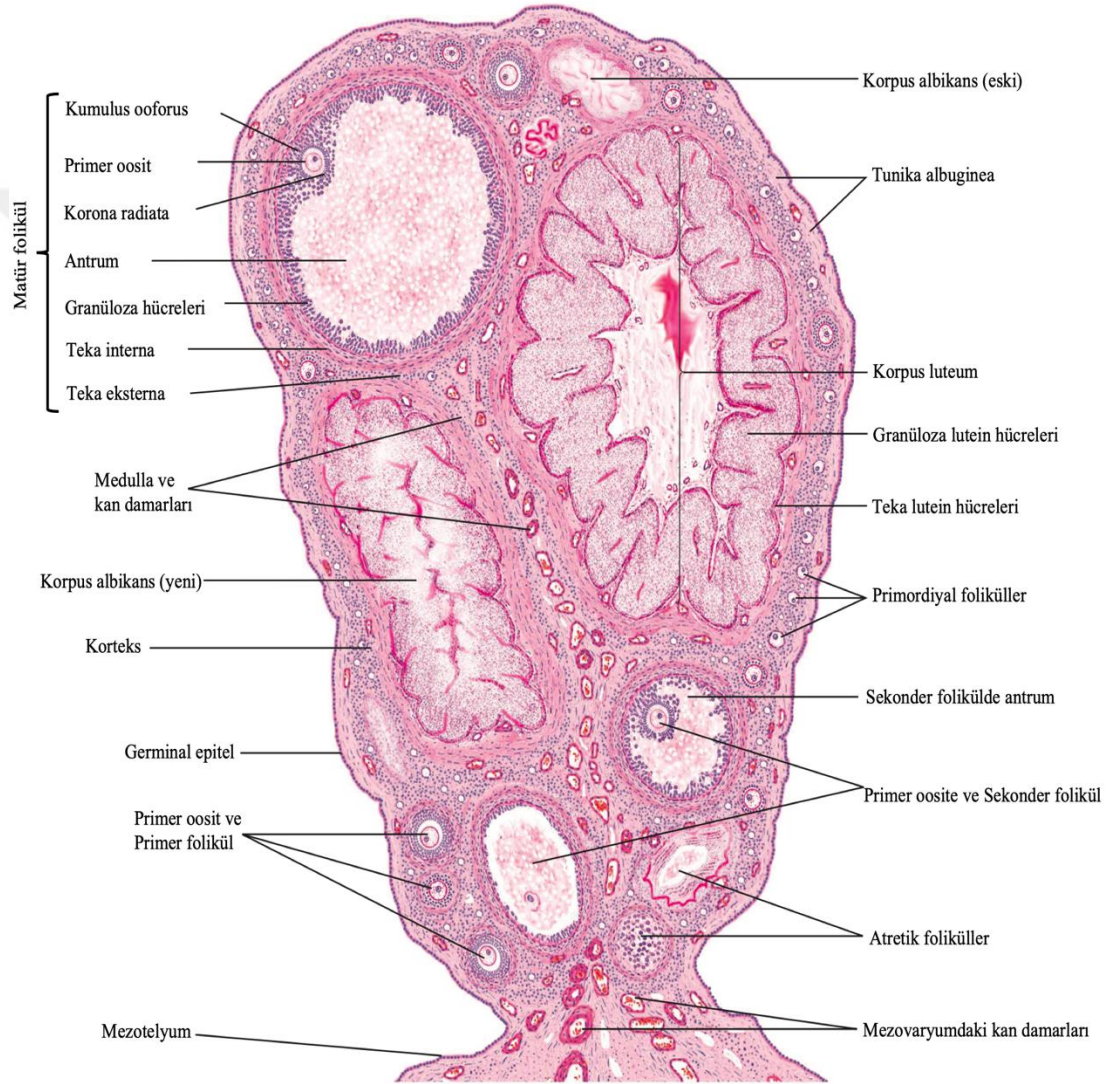


Şekil 3. Ovaryum embriyolojisi (Moore, Persaud, & Torchia, 2015).

2.1.1.3. Ovaryumun histolojisi

Her bir ovaryum tek katlı küboidal ya da yassı hücrelerden oluşan yüzey epiteli ile kaplıdır. Bu yüzey epiteli germinal epitel olarak da adlandırılır ve mezovaryumu çevreleyen mezotelyum ile süreklilik gösterir. Germinal epitelin hemen altında kollajen ve retiküler liflerce zengin, düzensiz yoğun bir bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea bulunur. Ovaryum, histolojik olarak aralarındaki sınır net bir şekilde tanımlanamamış korteks ve medulla adlı iki farklı kısımdan oluşur. Medulla kısmı ovaryumun merkezi bölgesinde bulunur. Medulla yapısı incelendiğinde gevşek bağ dokusu ve bağ doku içinde kısmen büyük kan damarları, lenfatik damarlar ve sinirler

görülür. Korteks ya da kortikal bölge, medullayı çevreleyerek ovaryumun periferinde konumlanır. Korteks yapısı incelendiğinde zengin bir bağ dokusunda gömülü olan gelişimin farklı evrelerindeki ovaryan folikülleri içerdiği görülür ve bu foliküllerin her birinin içinde primer oosit bulunur. Foliküllerin etrafında bulunan stroma dağınık düz kas liflerinden oluşur (Şekil 4) (Eroschenko, 2012; Mescher, 202; Ross, & Pawlina, 2019).

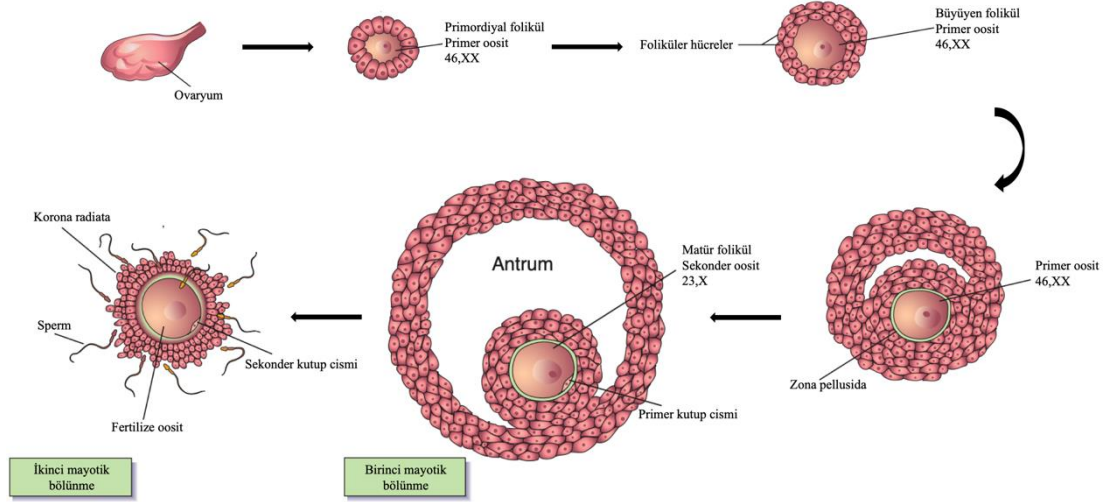


Şekil 4. Ovaryum histolojisi (Eroschenko, 2012).

2.1.2. Oogenez

Oogenez, primordiyal germ hücrelerinin oogonyumlara dönüşümü ve oogonyumların matür oositlere dönüşümünü kapsayan fizyolojik bir süreçtir. Bu süreç

gelişmekte olan oosit, oositin etrafını saran granüloza hücreleri ve kumulus hücreleri arasında gerçekleşen sayısız etkileşimlerden oluşur. Primordiyal germ hücreleri dışı gonadlara ulaştığında oogonyumlara dönüşür ve böylece fetal gelişimin 12. haftasında primer oositlere dönüşerek oogenez süreci başlar. Oogonyumlar ardışık olarak mitotik bölünmeler geçirir ve gelişimin 3. ayından itibaren primer oosite dönüşen hücrelerde mayotik bölünme başlar. Fakat bu mayotik bölünme puberteye kadar birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten aşamasında durur ve ilerlemez; mitotik bölünme ise oogonyumlarda devamlılık gösterir. Birinci mayoz bölünmenin profaz evresinin diploten aşamasındaki duraksama esnasında primer oositlerin olgunlaşma işlemi, granüloza hücrelerinden salgılanan oosit matürasyon inhibitörü (OMI) ile baskılanır. Doğumda ovaryumda primer oositler bulunur. Diploten aşamasında bekleyen primer oositler oluşmaya başladıkça oositlerin etrafını foliküler hücreler çevreler ve bunlar primordiyal folikülü oluşturur. Gelişimin 5. ayına kadar primer oositlerin sayısı 7 milyona ulaşır. Sonrasında eş zamanlı olarak hücre ölümleri başlar ve bu ölümler sonucunda oogonyum ve primer oositlerin çoğunda atrezi görülür. Doğum sonrası yeni doğmuş bir bebeğin ovaryumlarında yaklaşık olarak 2 milyon primer oosit olduğu, ancak bunların çoğunun puberteye kadar gerileyerek 400.000'e düştüğü varsayılır. Puberte başlangıcında primer oosit sayısı 40.000'e düşer. Bunlardan da yaklaşık 400'ü I. mayozununu tamamlayarak sekonder oosit olarak ovulasyonla ovaryumdan atılır. Pubertede diploten aşamasında duraklatılan birinci mayoz bölünme, ovulasyondan hemen önce tamamlanır. Profaz evresinde duran primer oositler, metafaz evresine doğru ilerler. Birinci mayoz bölünmenin tamamlanması sonucunda oluşan her yavru hücrenin kromozom sayısı eşittir, fakat sitoplazmik bölünme eşit hacimde gerçekleşmez. Sitoplazmanın büyük bir kısmını alan hücre sekonder oositi oluştururken daha az sitoplazmaya sahip olan hücre kutup cismine dönüşür ve bu primer kutup cismi dejenerasyona uğrar. Oluşan sekonder oosit ikinci mayoz bölünmeye girer ve ovulasyondan hemen önce gerçekleşen metafaz evresinde duraklar. Fertilizasyon gerçekleşirse sekonder oosit ikinci mayoz bölünmeyi tamamlar ve 23 kromozoma sahip ikinci bir kutup cismi oluşmasıyla sonuçlanır. Oluşan sekonder kutup cismi gelişimsel açıdan yetenekli değildir, apoptoza uğrar (Şekil 5) (Dudek, 2014; Moore, Persaud, & Torchia, 2015; Ross, & Pawlina, 2019).



Şekil 5. Oogenez (Moore, Persaud, & Torchia, 2015).

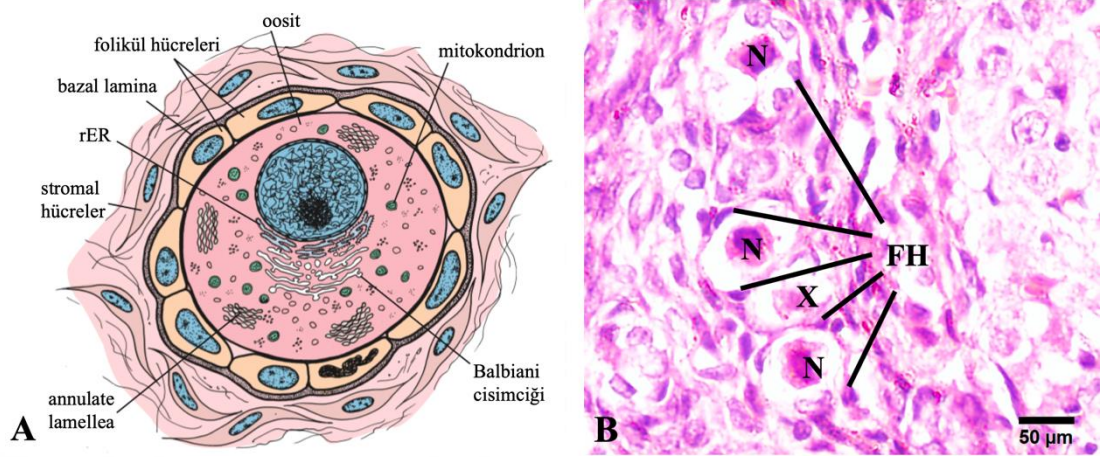
2.1.3. Folikülogenez

Dişi üreme sisteminin fonksiyonel yapı taşları ovaryum folikülleridir. Folikülogenez yalnızca oogenezde oosit üretiminde işlevsel değildir. Aynı zamanda dişi cinsel özelliklerin ve erken gebelik dönemi oluşumu için hormonların sentezinde de işlevsellik gösterir. Histolojik olarak bakıldığında folikülogenezdeki ovaryum folikülleri gelişimsel açıdan primordiyal foliküller, gelişmekte olan foliküller (primer folikül ve sekonder folikül) ve matür ya da Graaf folikül olmak üzere üç temel grupta kategorize edilir (Ross, & Pawlina, 2019).

2.1.3.1. Primordiyal foliküller

Folikül gelişiminin en erken aşaması olan primordiyal foliküller, fetal gelişimin 12. haftasında ovaryumlarda görülür ve büyümeleri gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır. Ovaryumlarda korteks stromasında tunika albugineanın hemen altında yerleşim gösterirler. Primordiyal foliküller içerisinde primer oosit yer alır. Primer oositin dış yüzeyini bazal lamina ile sınırlandırılmış olan tek katlı yassı folikül hücreleri çevreler. Primordiyal folikül içindeki primer oosit yaklaşık 25 µm çapındadır. Nükleusları, çok iyi bir şekilde dağılmış olan kromatin ve bir ya da birden fazla sayıda nükleolus içerir. Ooplazma olarak ifade edilen oosit sitoplazmasında Golgi cisimciği, endoplazmik retikulum, çok sayıda mitokondri ve lizozom organellerinin birikimi sonucu oluşan Balbiani cisimciği bulunur (Şekil 6A ve Şekil

6B) (Ross, & Pawlina, 2019).



Şekil 6. A. Primordiyal folikül (Ross, & Pawlina, 2019), **B.** Primer oositi çevreleyen folikül hücreleri (FH), primer oosit nükleusu (N), nükleusu kesite dahil olmayan oosit (X), H&E, x40

2.1.3.2. Gelişmekte olan foliküller

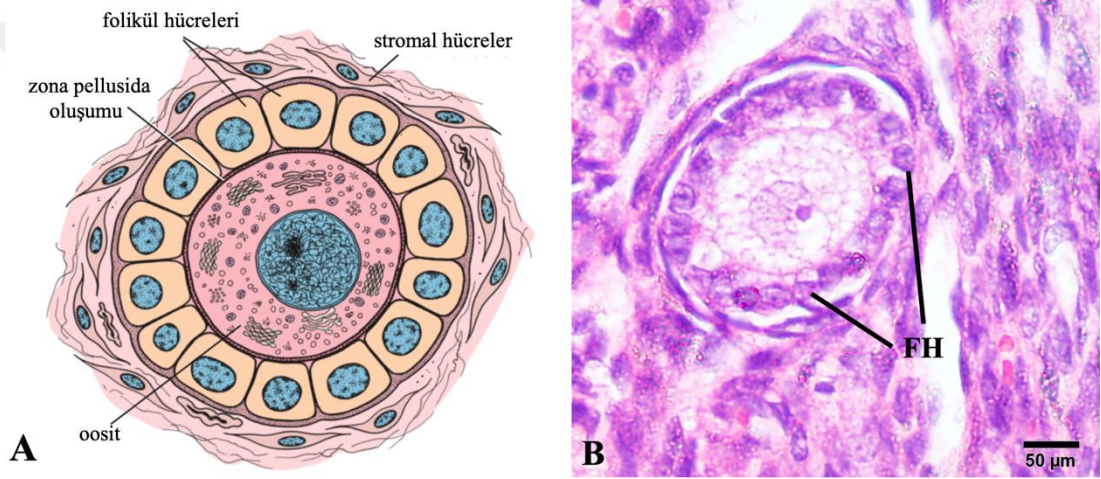
2.1.3.2.1. Primer folikül

Primordiyal foliküllerin gelişmekte olan foliküllere dönüşümü esnasında, primer oositte, oositi çevreleyen yassı folikül hücrelerinde ve komşu folikülün stromasında değişimler meydana gelir. Başlangıçta primer oositte hücrel büyüme ile çap artışı olur ve oositi çevreleyen yassı folikül hücreleri kübik forma dönüşür. Folikül hücreleri kübik form alarak granüloza hücreleri, büyüyen ve gelişen folikül de primer folikül olarak adlandırılır. Oosit büyüme gösterdikçe, oosit ile granüloza hücreleri arasında zona pellusida adlı hücre dışı bir örtü oluşumu gerçekleşir ve spesifik proteinler salgılanmaya başlar. Primer foliküller primer oositi çevreleyen granüloza hücrelerinin proliferasyonuna göre unilaminar primer folikül ve multilaminar primer folikül olarak iki farklı folikül evre gösterir (Ross, & Pawlina, 2019).

2.1.3.2.1.1. Unilaminar primer foliküller

Primordiyal folikülde bulunan primer oosit büyür ve oositi çevreleyen folikül hücreleri proliferasyona uğrar. Prolifere olan folikül hücreleri yassı formdan kübik forma geçerek tek sıra folikül hücrelerini oluşturur ve bu folikül artık unilaminar

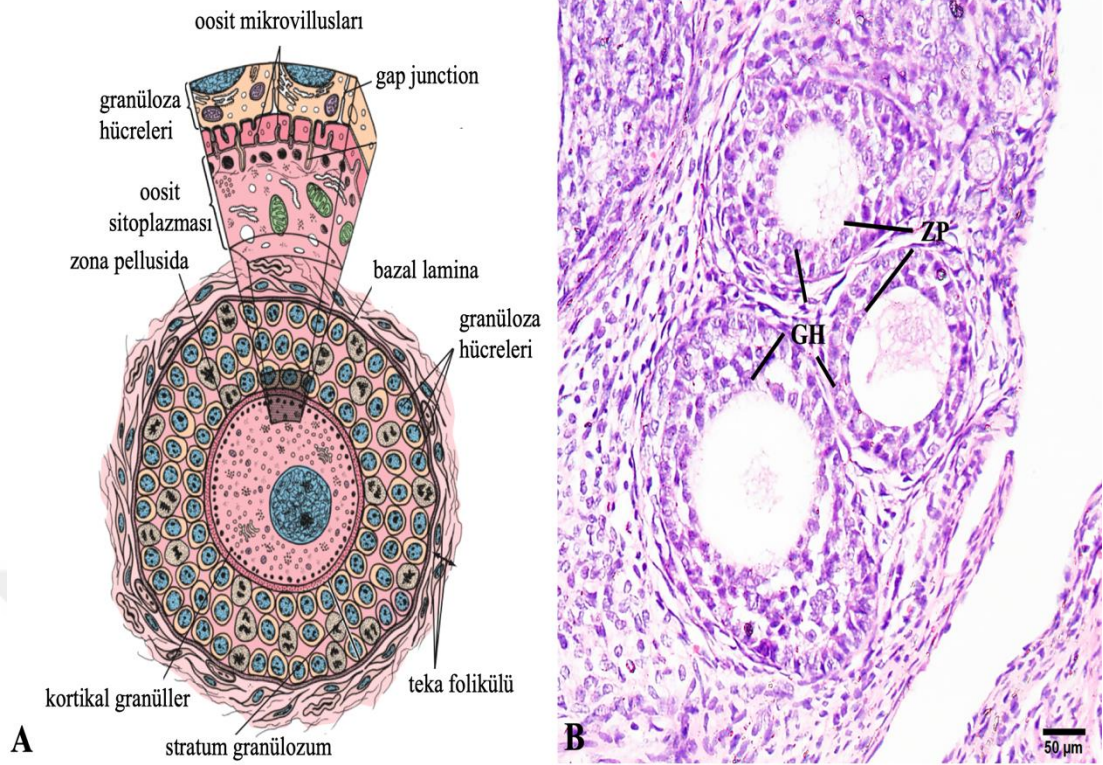
primer folikül olarak adlandırılır. Primer oosit büyüme ve gelişmeye devam eder ve spesifik proteinler salgılar. Zona pellusida glikoproteinleri olarak adlandırılan ZP1, ZP2 ve ZP3 proteinleri bir araya gelerek primer oosit ile folikül hücreleri arasında glikojen açısından zengin olan zona pellusida yapısını oluşturur. Bu proteinler arasında en önemli olanı, spermatozoa bağlama reseptörü ve akrozom reaksiyonunun indükleyici görevinde bulunan ZP3'tür. ZP2'nin de sekonder spermatozoa bağlayıcı protein olarak görev yaptığı bilinirken, ZP1'in henüz tam olarak hangi görevi üstlendiği bilinmemektedir. Unilaminar primer folikül içindeki primer oosit 50-80 µm çapa ulaşır (Şekil 7A ve Şekil 7B) (Ross, & Pawlina, 2019).



Şekil 7. A. Unilaminar primer folikül (Ross, & Pawlina, 2019), B. Primer oositi çevreleyen folikül hücreleri (FH). H&E, x40

2.1.3.2.1.2. Multilaminar primer foliküller

Unilaminar primer foliküldeki tek katlı kübik folikül hücreleri mitoz bölünme geçirerek proliferasyona uğrar ve çok katlı (2-8) hale gelerek membrana granuloza (stratum granulosum) katmanını oluşturur. Çok katlı kübik granuloza hücreleri ile çevrelenen bu folikül artık multilaminar primer folikül olarak adlandırılır. Granuloza hücreleri proliferasyona devam eder ve folikülü çevreleyen stromal hücreler diferansiyasyona uğrayarak teka folikülü tabakasını oluşturmaya başlar. Multilaminar primer folikül içindeki primer oosit 100-150 µm çapa ulaşır (Şekil 8A ve Şekil 8B) (Ross, & Pawlina, 2019).

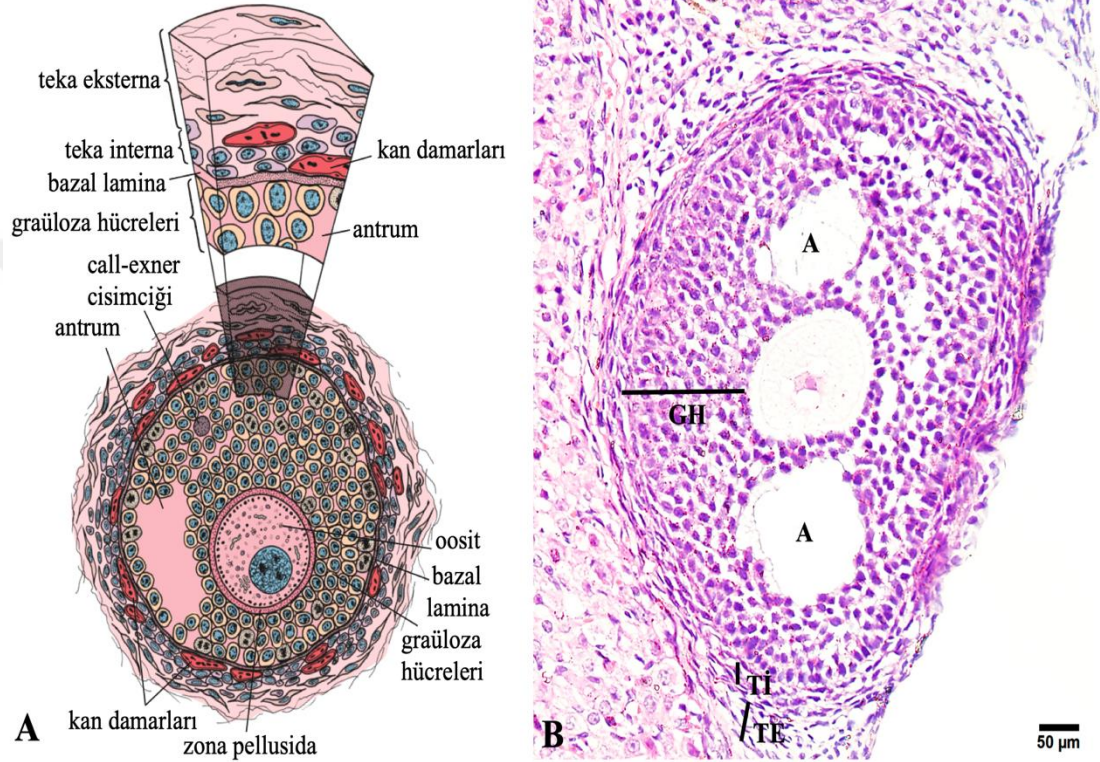


Şekil 8. A. Multilaminar primer folikül (Ross, & Pawlina, 2019), **B.** Primer oositi çevreleyen granüloza hücreleri (GH), zona pellusida (ZP). H&E, x20

2.1.3.2.2. Sekonder (antral) foliküller

Multilaminar primer folikül, granüloza hücre proliferasyonu sonucu büyümeye devam eder ve stratum granulozum tabakası 6-12 katlı hücre katman halini alır. Hücre katmandaki granüloza hücreleri arasında boş kavite oluşmaya başlar. Bu boş kavite, granüloza hücreleri tarafından salgılanmakta olan likör folikülü (folikül sıvısı) olarak da adlandırılan hyaluronik asit bakımından zengin sıvı ile dolar. Daha sonrasında bu sıvı dolu kavite birleşmeye başlayarak yarım ay şeklindeki antrum olarak adlandırılan tek bir boşluğu oluştururlar. Folikül artık sekonder ya da antral folikül olarak adlandırılır. Folikülü çevreleyen stromal hücreler diferansiyasyona uğrayarak teka interna ve teka eksterna olmak üzere iki farklı tabakayı oluşturur. Teka interna granüloza hücrelerine yakın lokalizasyon gösteren iç tabakadır ve vasküler yapı olup steroid sentezinden sorumlu olan kübik salgı hücrelerinden oluşur. Teka interna tabakasında salgı hücrelerinin yanında fibroblast ve kollajen fibriller de bulunur. Teka interna ve granüloza hücre tabakası arasında bulunan bazal lamina sayesinde avasküler yapıdaki granüloza hücre tabakası korunmuş olur. Teka eksterna

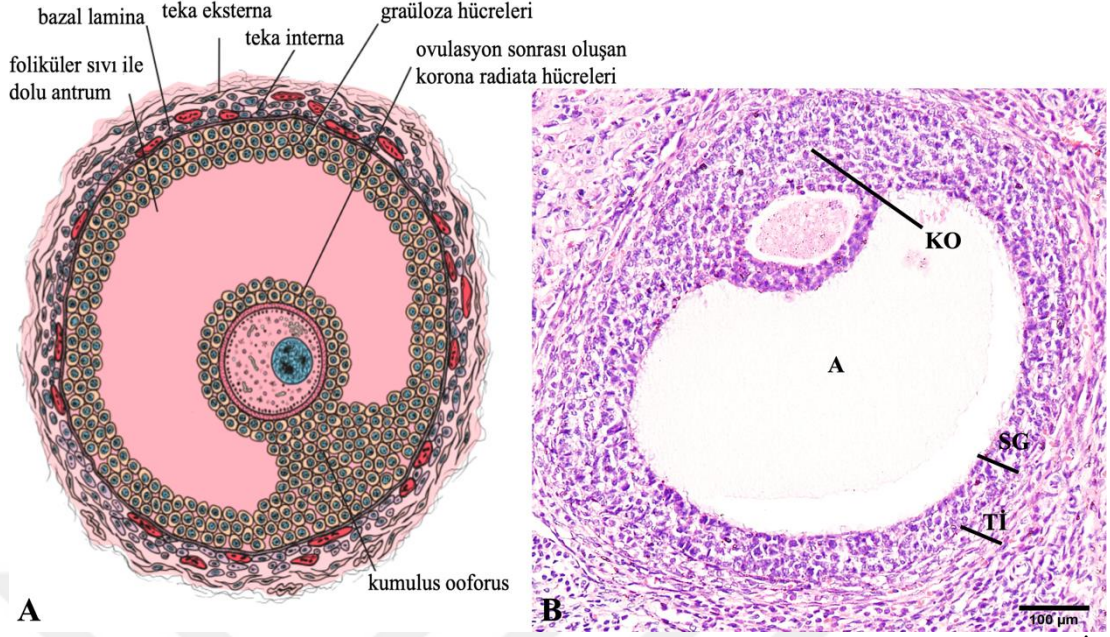
tabakası vasküler bağ doku yapılı, düz kas hücresi ve kollajen liflerden oluşan dış tabakadır. Sekonder folikül içindeki oosit yaklaşık 125 µm çapa ulaşır ve oositin büyümesi, granüloza hücrelerinden salgılanan oosit olgunlaşma inhibitörünün (OMI) antruma salınmasıyla baskılanarak durdurulur. Folikül gelişimi ilerledikçe OMI konsantrasyonunda azalma görülür (Şekil 9A ve Şekil 9B) (Ross, & Pawlina, 2019).



Şekil 9. A. Sekonder folikül (Ross, & Pawlina, 2019), B. Granüloza hücreleri (GH), teka interna (TI), teka eksterna (TE), antrum (A). H&E, x20

2.1.3.3. Matür (graaf) folikül

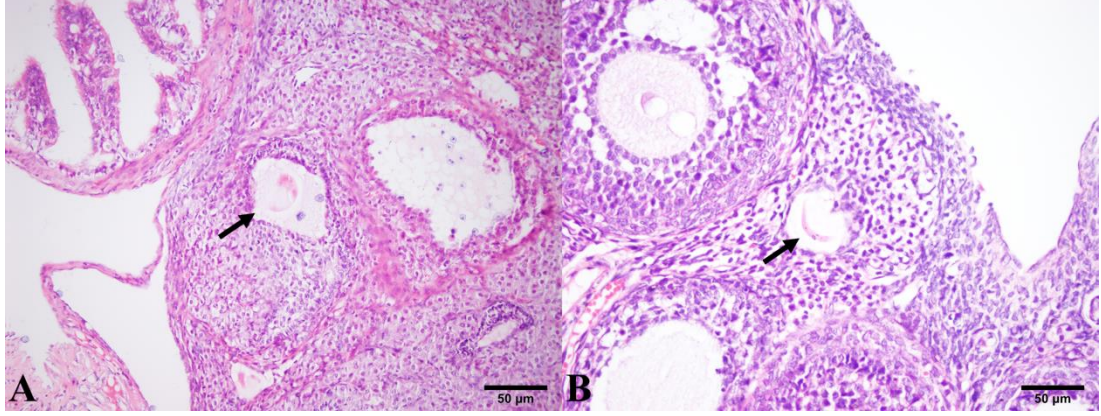
Sekonder foliküldeki hacimsel büyüme ile antrumda da bir genişleme izlenir. Oosit, folikül içerisinde kenara doğru çekilir ve granüloza hücreleri antruma doğru kumulus ooforus adlı bir tepe oluşturur. Oositi çevreleyen, ovulasyon esnasında oosit ile birlikte dışarı atılan birkaç katlı granüloza hücre tabakası olan korona radiata oluşur. Böylece matür (graaf) folikül oluşumu tamamlanır (Şekil 10A ve Şekil 10B) (Ross, & Pawlina, 2019).



Şekil 10. A. Graaf folikül (Ross, & Pawlina, 2019), **B.** Stratum granulozum (SG), teka interna (TI), kumulus ooforus (KO), antrum (A). H&E, x20

2.1.3.4. Atretik folikül

Menstrual siklusun foliküler evresinde oluşan foliküllerden yalnızca biri olgunlaşmasını tamamlar ve ovulasyona uğrar, kalan diğer foliküller gelişimlerinin farklı evrelerinde atreziye uğrarlar. Atrezi esnasında mitotik süreç durur. Granuloza hücreleri bazal laminadan ayrılarak hidrolitik enzimler üretir ve oosit dejenerasyonu gerçekleşir. Nötrofil ve makrofajlar granuloza hücrelerine doğru göç ederler. Teka interna hücreleri hipertrofiye uğrayarak foliküler boşluk meydana getirir ve bu boşluk bağ dokusu hücreleri tarafından doldurulur. Atreziye uğrayan primordiyal foliküllerin oluşturduğu boşluklar hızla stromal hücreler tarafından doldurulduğu için ovaryum histolojik kesitlerinde primordiyal foliküllerin atretik formları görülmez. Atretik foliküllerden kalan parçalanmış kısımlar makrofajlar tarafından fagositoza uğrar ve oluşan boşluklar stromal hücreler tarafından doldurulur. Böylece bazal membran kalınlığındaki artış ile camsı membran adlı hyalinize bir bant yapısı oluşur (Şekil 11A ve Şekil 11B) (Ross, & Pawlina, 2019).



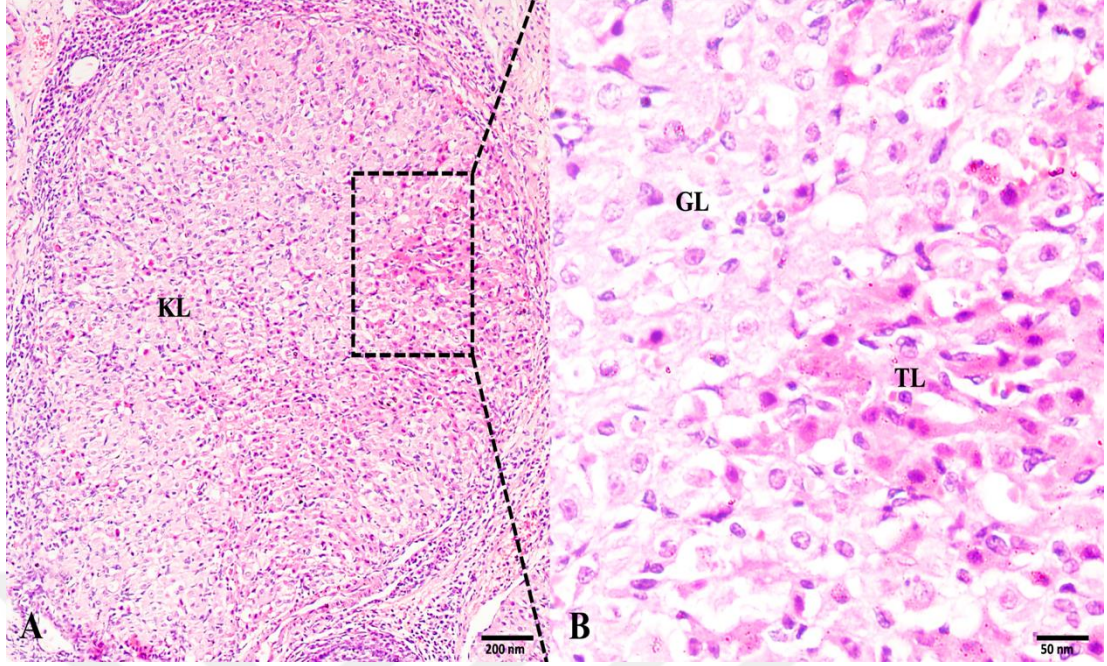
Şekil 11. Atretik foliküller (siyah ok). H&E x20 (A), x40 (B)

2.1.3.5. Ovulasyon

Birinci mayoz bölünmeyi tamamlayan sekonder oositin, ovaryumdan hormonal değişikliklerin ve enzimatik etkilerin sonucunda etrafını çevreleyen kumulus hücreleriyle beraber folikülden atıldığı süreç olan ovulasyon, ortalama 28 gün süren menstrual siklusun ortasında yani 14. günü civarında gerçekleşir. Sekonder oositin, folikülden atılması esnasında foliküler sıvı hacmi basıncında artış, aktif plazminojen ile folikül duvarının enzimatik proteolizi, oosit-kumulus kompleksi ve stratum granulozum arasında glikozaminoglikanların hormonal olarak birikmesi, teka eksterna tabakasında bulunan düz kas liflerinin prostaglandinler tarafından kasılması gibi olaylar meydana gelir. Ovulasyon gerçekleşmeden hemen önce ovaryum yüzeyindeki küçük bir alanda kan akışı durur ve foliküler stigma olarak bilinen germinal epitelin bu alanı çıkıntı oluşturarak yırtılır. Korona radiata ve kumulus hücreleri ile çevrelenmiş olan oosit, oluşan bu yırtık kısımdan folikül dışına atılır. Ovaryumdan atılan sekonder oosit, kumulus hücrelerinden tuba uterinada bulunan fimbrialar tarafından tutulur. Tuba uterinayı kaplayan silli hücreler ile taşınan oositin peritoneal kaviteye geçişi engellenir. Ovulasyon sonrası yaklaşık 24 saat boyunca canlı kalan sekonder oosit, fertilizasyon gerçekleşmediği zaman tuba uterinadan geçerken dejenerasyona uğrar. Tuba uterinaya giremeyen oositler ise peritoneal kavitede dejenere olurlar. Tuba uterinada tutulan sekonder oosit, sperm tarafından fertilize edildiğinde ikinci mayoz bölünmeyi tamamlar. Mayoz II'nin tamamlanmasıyla 23 kromozomlu 'n' sayıda DNA'ya sahip haploid karakterde ovum oluşur (Mescher, 2021; Ross, & Pawlina, 2019).

2.1.3.6. Luteinizasyon ve korpus luteum

Ovulasyon sonrası sekonder oositin folikülden atılması sonucunda kalan granüloza hücreleri ve teka interna tabakasından oluşan foliküler duvar, ovaryum korteksinde geçici bir endokrin bez olan korpus luteumu oluşturmak üzere parçalanır. Granüloza hücreleri ve teka interna tabakasındaki kılcal damarlardan foliküler lümene doğru kanama gerçekleşir ve antrumda pıhtı olarak biriken kan korpus hemorajikum adlı yapıyı oluşturur. Stromadan gelen bağ dokusu hücreleri foliküler boşluğu doldurur. Granüloza ve teka hücrelerinde bölünme sürecinde sayıca artış meydana gelir ve korpus luteumun büyük çoğunluğunu granüloza hücreleri oluşturur. Granüloza ve teka hücreleri, luteinizasyon sürecinin başlamasıyla granüloza lutein ve teka lutein hücrelerine evrilir. Bu lutein hücrelerde morfolojik değişimler sonucu boyut artışı görülür ve hücrelerin sitoplazmaları lipit damlacıkları ile dolar. Bu hücrelerde yoğun agranüler endoplazmik retikulum (aER) ve tübüler kristal mitokondrionlar bulunur. Korpus luteum oluşumu başlangıcında teka internadan gelen kan ve lenfatik damarlar stratum granülozuma doğru büyüyerek korpus luteumda zengin bir vasküler yapı oluşturur. Bu vasküler yapı progesteron ve östrojen salgılar. Bu hormonlar, fertilizasyon sonrası gelişmekte olan zigotun implantasyonu için uterusun iç tabakası olan endometriyumun büyümesini ve salgı fonksiyonunu uyarır. Fertilizasyon ve implantasyonun gerçekleşmediği durumda menstrual korpus luteum oluşur ve yalnızca 14 gün boyunca aktif kalır. İnsan koryonik gonadotropin (hCG) ve diğer luteotropinlerin salgılanmamasıyla progesteron ve östrojen salgısı azalır. Progesteron ve östrojenin azalmasıyla ovulasyonun yaklaşık 10-12 gün sonrasında korpus luteum dejenere olur. Hücreler lipitle dolar ve boyutları küçülerek otolize uğrarlar. Dejenere korpus luteum hücreleri arasında biriken hyalin materyal yerini korpus albikansa bırakır. Korpus albikans, birkaç aylık sürede yavaşça kaybolup ovaryum korteksinin derinlerine gömülür (Şekil 12A ve Şekil 12B) (Mescher, 2021; Ross, & Pawlina, 2019).



Şekil 12. Korpus luteum. A. Korpus luteum (KL) H&E, x10 B. Teka lutein hücreleri (TL), Granüloza lutein hücreleri (GL). H&E, x40

2.2. Ovaryum Rezervi

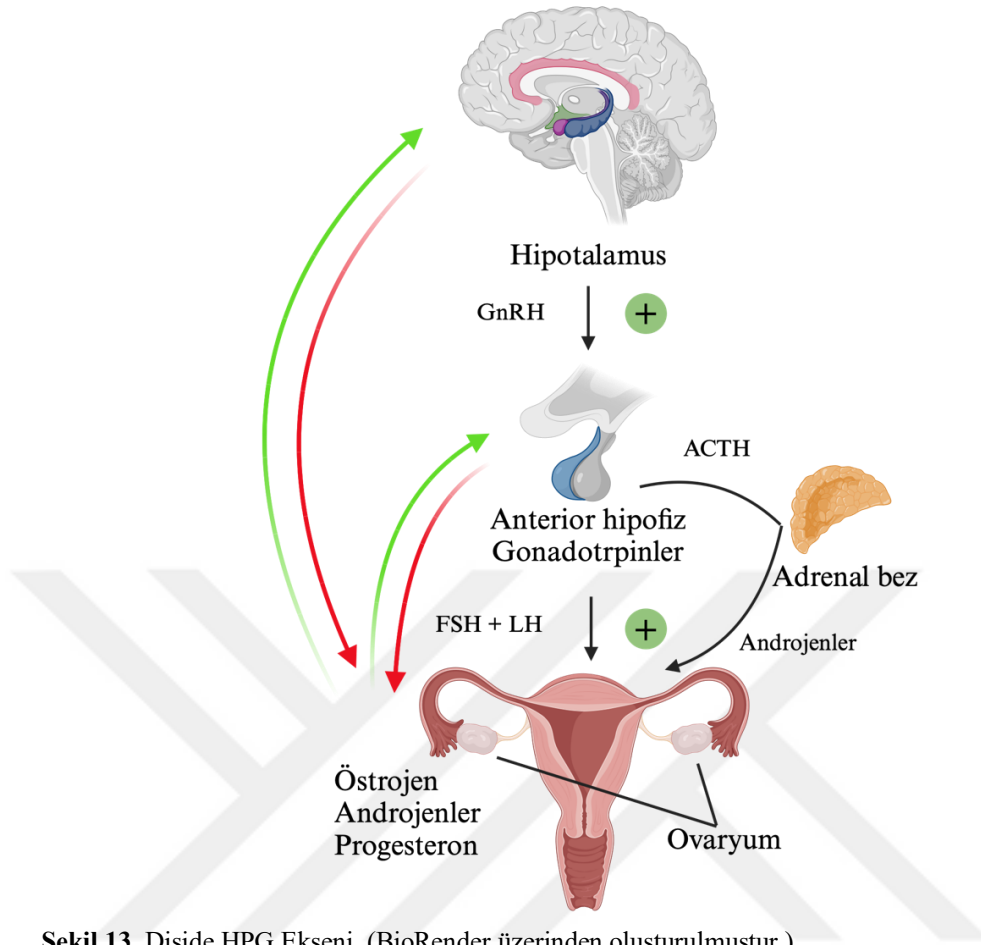
Büyük ölçüde primordiyal foliküller ve daha az sayıda gelişmekte olan foliküllerden oluşan ve bu foliküllerde bulunan primer oositlerin kalitesine göre belirlenen ovaryum rezervi, dişi üreme kapasitesini tanımlamak için kullanılır. Ovaryum rezervi yaşla birlikte azalma gösterdiği için ovaryum yaşı olarak da tanımlanmaktadır. Ovaryum rezervi, yaşa bağımlı edinilen klinik sonuçlar, biyokimyasal parametreler (FSH, LH, AMH, inhibin B, bazal östradiol), ultrasonografik görüntülemelerde edinilen antral folikül sayısı (AFC) ve ovaryum hacmi değerlendirilerek belirlenir (Gleicher, Weghofer, & Barad, 2011).

Prenatal dönemde oluşan folikül hücrelerinin sayısı doğumda 1 milyona kadar düşer. Puberte başlangıcında 400.000 civarı folikül kalır ve yaşam boyunca azalmaya devam eder (Faddy, Gosden, Gougeon, Richardson, & Nelson, 1992). Primordiyal foliküller, gelişmekte olan foliküllere olgunlaşır ve gelişen foliküllerden fazla olanlar atretik forma geçerek yok olurlar (Mcgee, & Hsueh, 2000).

2.3. Dişü Üreme Fizyolojisi

2.3.1. Hipotalamus-hipofiz gonadal eksen

Üreme sistemi için etken rol oynayan hipotalamik pituiter gonadal (HPG) eksen, menstrual siklusun düzenli bir şekilde ilerlemesini ve süreklilik göstermesini sağlayan nöroendokrin bir eksendir. Diğer nöroendokrin eksenler gibi HPG ekseni de hipotalamus ile ön hipofiz bezi arasında gerçekleşen etkileşimlerden oluşur. HPG ekseni, germ hücrelerinin büyümesi ve olgunlaşmasında, dişü gonadlardaki gonadal steroidlerin sentezinde görevlidir (Oyola, & Handa, 2017). Kisspeptin ve reseptörü KiSS1Ri gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) nöronlarını hipotalamik yollar aracılığıyla uyararak gonadotropinlerin salgılanmasını tetikler. Medyan eminensten GnRH pulsatif olarak salgılandığında, hipofiz portal sistemine geçen GnRH ön hipofiz bezini, folikül stimulan hormonu (FSH) ve luteinize edici hormonu (LH) salgılamak için tetikler. Gonadotropik hormonlar olarak tanımlanan FSH ve LH hormonları sistemik dolaşıma girer, folikül büyümesi, ovulasyon ve korpus luteum oluşumunda etki gösterirler. Bunlara ek olarak steroidogeneizde rol oynarlar. Steroidogeneiz sonucu oluşan östrojen ve progesteron gibi gonadal steroidler, fertilizyonun gerçekleşmesi durumunda embriyonun implantasyonunun sağlanması için endometriyumunu düzenlerler. Ayrıca bu steroidler, geri bildirimler ile FSH, LH ve GnRH'nin serbest bırakılmasını düzenlerler (Şekil 13) (Baskind, & Balen, 2016; Li, Liu, Wang, Zhao, & Qi, 2021).



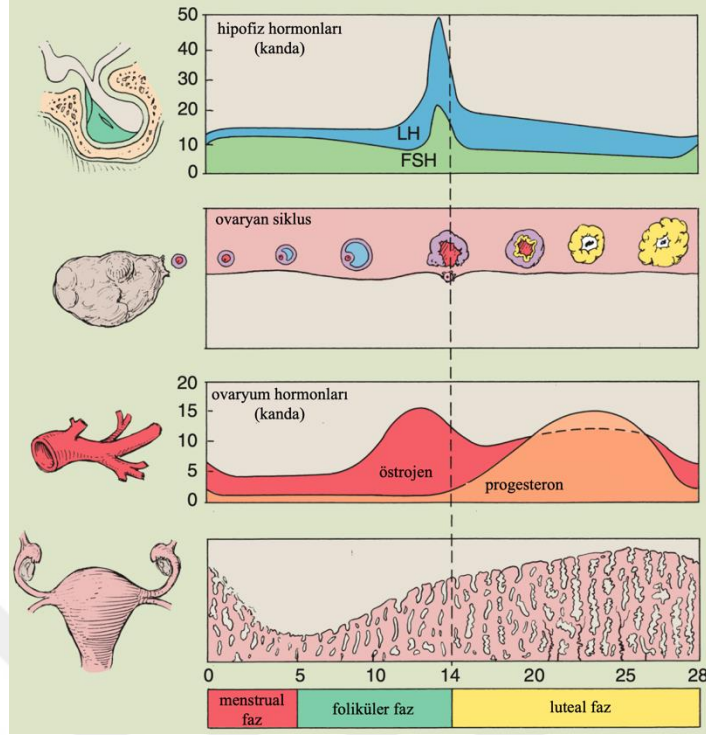
Şekil 13. Dişide HPG Ekseni. (BioRender üzerinden oluşturulmuştur.)

2.3.2. Menstrual siklus

Potansiyel bir gebelik dönemi için uterusu hazırlayan menstrual siklus, sağlıklı bir dişide düzenli olarak 21 ile 35 gün arasında, 7 günden kısa süren bir döngüde meydana gelen, ortalama 13 yaş civarında başlayıp ortalama 45 yaş civarına kadar devam eden fizyolojik bir süreçtir. Menstrual siklus; menstruasyon, foliküler matürasyon, ovulasyon ve korpus luteum oluşumu gibi fizyolojik olaylar üzerine kurulan, ovulasyon öncesi gerçekleşen foliküler faz ve ovulasyon sonrası gerçekleşen luteal faz olmak üzere iki farklı ana fazda gerçekleşir (Şekil 13). Bu iki ana faz da kendi içinde alt fazlara ayrılır: erken foliküler faz, geç foliküler faz, ovulasyon, erken luteal faz, luteal faz ve geç luteal faz. Östrojen, progesteron, FSH ve LH hormonlarındaki dalgalanmalar menstrual siklusun alt evrelerini karakterize eder.

Menstruasyon ile başlayan erken foliküler fazın tamamlanması 4 ile 6 gün arasında sürer ve bu süreçte dişideki gonadal hormonların seviyeleri kısmen düşük ve

sabittir. Foliküler faz ovulasyon gerçekleşene kadar devam eder ve bu fazda ön hipofizden FSH ve LH salınarak ovaryumlar üzerinde etki eder. Bu etki ile başta östradiol olmak üzere östrojen üreten birkaç primer folikül gelişimi başlar. Geç foliküler fazda ise her biri bir oosit içeren ovaryum folikülleri olgunlaştıkça östrojen seviyesinde bir artış görülür. Östrojen seviyesi kritik bir noktaya yükseldiği zaman gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) seviyesi artar ve bu artışla beraber LH seviyesinde hızlı bir artış görülür. Geç foliküler fazdaki LH artışı sonucu ovulasyon tetiklenir ve matür folikül yırtılarak I. mayozunu tamamlamış sekonder oosit ovaryumdan tuba uterinaya bırakılır. Ovulasyon fazı 14. gün civarında 12 ile 16 saat arasında gerçekleşir. Ovulasyondan hemen sonra erken luteal faz başlar ve bu fazda yırtılan folikül korpus luteum formuna geçerek progesteron ve az miktarda östrojen salgılar. Luteal fazda, fertilizasyon sonucu gelişen embriyonun implantasyonu için endometriumun hazırlanmasında etkili olan progesteron seviyesinin zirveyi, östrojenin de ikinci daha küçük zirveyi gördüğü fazdır. Embriyonun implantasyonunun gerçekleşmesi durumunda luteal faz gebelik ile sonlanır. Fertilizasyon gerçekleşmezse korpus luteum dejenere olur ve buna bağlı olarak geç luteal fazda progesteron ve östrojen seviyelerinde bir düşüş meydana gelir. Hormon seviyelerindeki düşüş bir sonraki siklusun yeniden başlamasını sağlar. Endometriyal yıkım meydana gelir ve menstruasyon kanaması ile sonuçlanır, endometriumun fonksiyonel tabakası ortamdaki uzaklaştırılır (Şekil 14) (Baker, & Lee, 2022; Carmichael, Thomson, Moran, & Wycherley, 2021).



Şekil 14. Menstrual siklus (Ross, & Pawlina, 2019).

2.4. Sıçan Dişi Üreme Sistemi

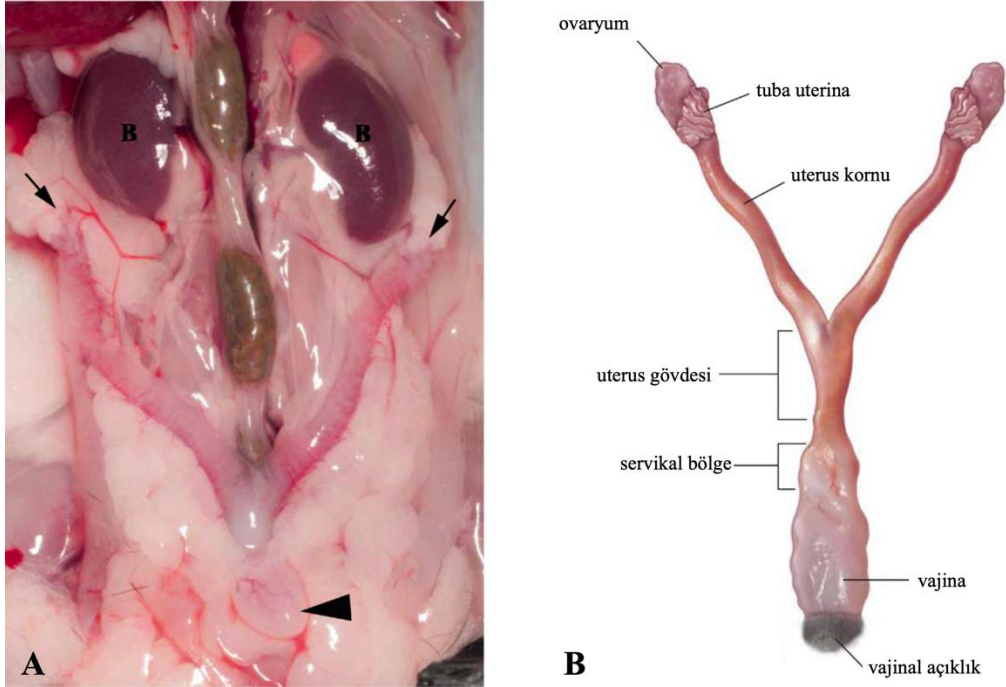
Ovaryumlar, tuba uterina, uterus, serviks ve vajina yapılarından oluşan sıçan dişi üreme sistemine bakıldığında zaman, bu yapıların prenatal dönemde immatür durum gösterdiği ve postnatal döneme girildiğinde gelişimsel sürecini tamamladığı görülür. Sıçan dişi üreme sisteminin gelişimsel dönemleri ise insan dişi üreme sisteminin gelişimsel dönemlerine göre farklılıklar göstermektedir (Tablo 1) (Parker, & Picut, 2016; Treuting, Dintzis, & Montine, 2017).

Tablo 1. Sıçan ve insan dişi üreme sisteminin karşılaştırmalı gelişim dönemleri.

DÖNEMLER		SÜRE	
Sıçan	İnsan	Sıçan	İnsan
Neonatal Dönem	Yenidoğan Dönemi	0-7 gün	0-28 gün
İnfantil Dönem	İnfant Dönem	8-20 gün	1-2 ay
Juvenil dönem	Çocukluk Dönemi	21-32 gün	2-12 ay
Peripubertal Dönem	Ergenlik Dönemi	33-37 gün	12-16 yaş
Geç Pubertal Dönem	Ergenlik Dönemi	38-46 gün	

2.4.1. Sıçan ovaryum anatomisi

Bilateral olarak böbrek kaudal kutuplarında konumlanan ve küresel şekilli olan sıçan ovaryumları, dorsal vücut duvarına mezovaryum ile bağlanır. Sıçan ovaryumları mezovaryum ve mezosalpinks ile sarılmış periton boşluk olarak bilinen şeffaf elastik bursa ile çevrilidir. Ovaryumların çapı yaklaşık olarak 5 mm, ağırlığı ise ortalama 60-100 mg arasında değişiklik göstermektedir. Sıçan ovaryum anatomisi Şekil 15'te görülmektedir (Lów, Molnár, & Kriska, 2016; Parker, & Picut, 2016; Treuting ve ark., 2017).



Şekil 15. Sıçan ovaryum anatomisi. **A.** In situ olarak sıçan dişi üreme sisteminde ovaryumlar (oklar), böbrek (B), idrar kesesi (ok ucu) (A). **B.** Ex vivo olarak sıçan dişi üreme sistemi (Treuting ve ark., 2017).

2.4.2. Sıçan ovaryum embriyolojisi

Sıçan ovaryumlarının embriyoner gelişim süreci insan ovaryumunun embriyonik gelişimsel süreci ile benzerlik gösterse de gelişim aşamaları, gerçekleştiği zaman aralığı bakımından daha kısa bir aralıkta gerçekleşmektedir. Sıçanlarda farklılaşmaya başlamamış olan gonad dokuları sölomik epitel kalınlaşması olarak ortaya çıkar ve prenatal dönemin yaklaşık 10. gününde genital kabartı olarak belirginleşir. Prenatal

dönemin 11. gününde primordiyal germ hücrelerinin bu genital kabartıya göçü başlar ve göç sonucunda mitotik bölünmeler geçirerek sayıca artış gösterirler. Doğum esnasında germ hücresi olan oogonyumlar, ovaryum kordonları ve yassı pregranüloza hücreleri (epitelyal hücreler) oluşur. Prenatal dönemin yaklaşık olarak 15. gününde oogonyumlar birinci mayozun profaz evresine girerler. Doğumdan sonra, postnatal dönemin 3. gününde primordiyal foliküller oluşurlar ve 3. günden itibaren epitelyal hücreler olan pregranüloza hücreleri ile çevrili oositler bulunur (Cappellen, 1998; Guigon, & Magre, 2006; Mcgee, & Hsueh, 2000).

2.4.3. Sıçan ovaryum histolojisi

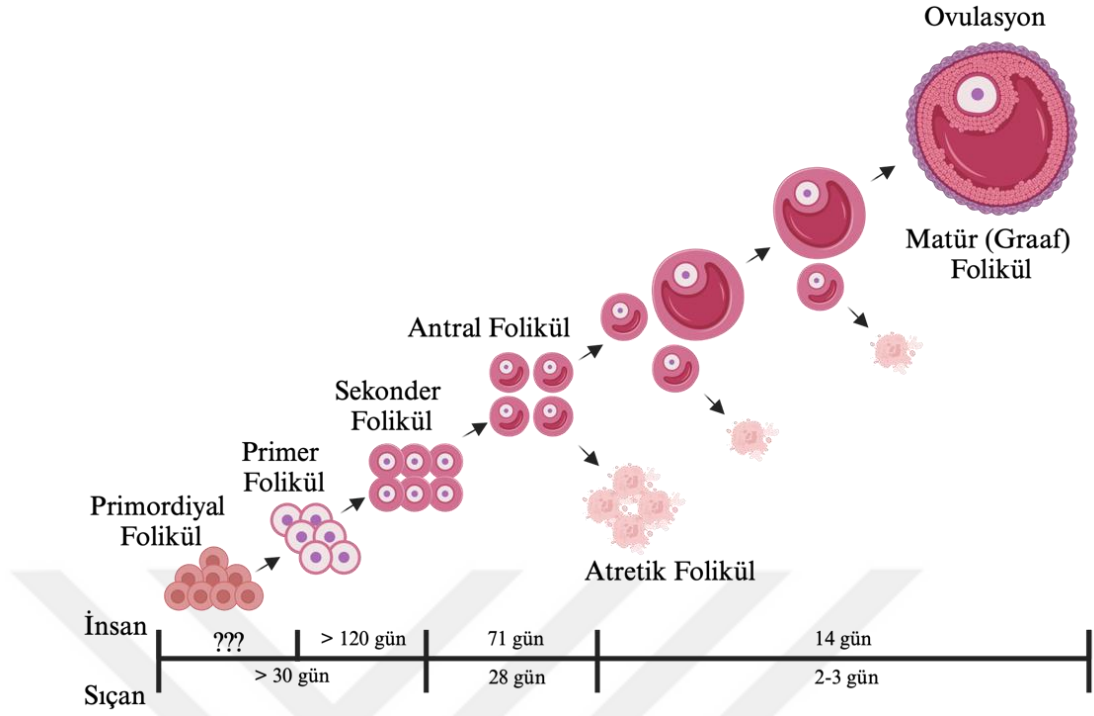
Sıçan ovaryumları, periovaryal kese ile çevrilerek abdominal kaviteden ayrılır. Ovaryum yüzeyinde, germinal epitel olarak da adlandırılan tek katlı kübik epitel hücrelerinden oluşan tabaka bulunur. Epitelin hemen altında testisin tunika albuginea yapısı ile homolog olan kollajen bakımından zengin bir bağ doku tabakası bulunur. Ovaryum genel hatlarıyla gelişmekte olan folikülleri ve korpus luteumu içeren korteks ile fibröz yağ dokusu, kan damarları ve hilus sinirleri içeren medulla olmak üzere iki bölümden oluşur. Ovaryum stroması ise fibroblast benzeri hücrelerden meydana gelen bağ dokusundan oluşur (Löw ve ark., 2016; Treuting ve ark., 2017).

2.4.4. Sıçanlarda foliküler gelişim

Sıçanlarda folikül gelişimi, postnatal dönemin 10. gününe kadar hipofiz hormonlarından bağımsız, 10. gününden sonra gonadotropin bağımlı bir şekilde gerçekleşir. Ovaryum foliküllerinde apoptoz, postnatal dönemin 18. gününe kadar az seviyede gerçekleşmekte ve bu dönemde erken antral foliküller görülmektedir (Mcgee, Hsu, Kaipia, & Hsueh, 1998). Postnatal dönemin 27. gününde ise korteks ve medulla bölgelerinin ayırımı belirginleşir. Sıçan ovaryumlarındaki folikülogenez süreci, yaklaşık olarak 60 günlük ya da yaklaşık 15 östrus döngüsü olacak kadar bir süreçte primordiyal foliküllerden matür (graaf) foliküllere farklılaşarak gerçekleşir (Şekil 16) (Mcgee, & Hsueh, 2000).

Doğum sonrasında, postnatal dönemin 3. gününde kortekste, tunika albugineanın altında, primer oositi (11-15 μm) içeren primordiyal foliküllerin (17-20 μm) olduğu görülür (Boubekri, Gernigon-Spychalowicz, Khammar, & Exbrayat, 2007; Mcgee, Perlas, LaPolt, Tsafiriri, & Hsueh, 1997; Rajah, Glaser, & Hirshfield, 1992). Foliküler hücreleri bazal lamina çevreler ve böylece stroma hücreleri ile aralarında bir bariyer oluşturur. Primer folikül aşamasının ilk aşaması olan unilaminar primer foliküller yaklaşık 27 μm çapa ulaşır ve etrafında 8-13 adet granuloza hücresi olan primer oositi (yaklaşık 16 μm) içerir. Primer folikül aşamasının ikincisi olan multilaminar primer foliküller ise yaklaşık 64 μm çapa ulaşır ve etrafında 25-29 adet granuloza hücresi olan primer oositi (yaklaşık 38 μm) içerir (Boubekri ve ark., 2007). Postnatal dönemin 7. gününde ise sekonder foliküller (70 μm) görülmeye başlanır. (Boubekri ve ark., 2007; Mcgee ve ark., 1997; Mcgee ve ark., 1998).

Puberte, yaklaşık olarak postnatal dönemin 34. gününde başlar ve 35. gününde, östrus evresinden 8-11 saat sonra (Cossigny, Findlay, & Drummond, 2012) ilk ovulasyon gerçekleşir. Bu süreçte insanlarda gerçekleşen ovulasyondan farklı olarak birden fazla sayıda oosit I. mayozunu tamamlayarak ovaryumdan atılır (Mcgee, & Hsueh, 2000). Ovulasyon sürecinin başarılı olup olmadığı ovaryum dokusu kesitlerindeki korpus luteumların varlığı ile belirlenir. Sıçanlarda östrus döngüsü premenapozal döneme kadar düzenli olarak gerçekleşir. Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda bu dönem yaklaşık olarak 8. ayda başlar (Suttie ve ark., 2017) ve 12-15. ayın sonunda kalıcı östrusa girerler. Kalıcı östrusu, kalıcı diöstrus ve ardından anöstrus evreleri takip eder (Şekil 16) (Huang, Steger, Bruni, & Meites, 1978).



Şekil 16. Sıçan ovaryum gelişimi ve zamana göre gelişim süreçleri. (BioRender üzerinden oluşturulmuştur.)

2.4.5. Sıçanlarda östrus siklusu

İnsan üreme döngüsü olan menstrual siklusun sıçanlarda görülen formu östrus siklusu olarak adlandırılır. Menstrual siklus ortalama 28 gün sürerken; östrus siklusu ortalama 4-5 gün sürmektedir. Östrus siklusu, farklı hücre tiplerinin oluşup kaybolduğu, ovaryum folikülleri tarafından salgılanan östrojen ve progesteron hormonlarındaki değişimlerin meydana geldiği dinamik bir süreçtir. Östrus siklusunun uzunluğu, gündüz-gece döngüsünde gerçekleşen değişimler, yaş, sıcaklık, beslenme, gürültü ve stres kaynaklı olarak değişkenlik gösterebilmektedir. Östrus döngüsünün 4 farklı evresi bulunmaktadır:

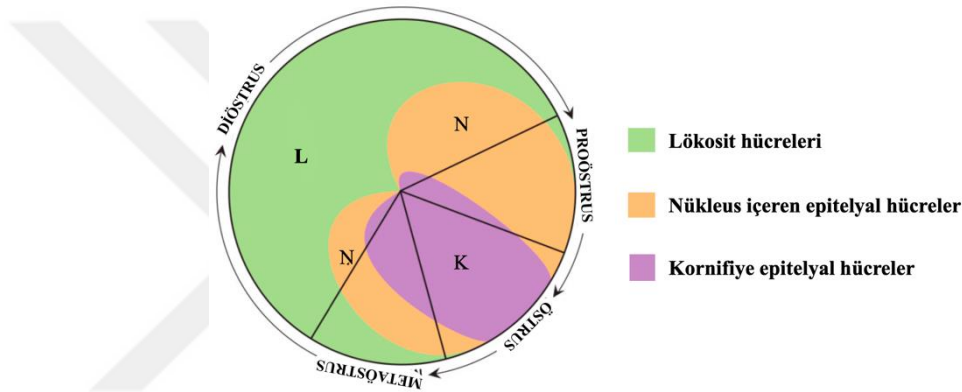
1. Proöstrus
2. Metaöstrus
3. Östrus
4. Diöstrus

Östrus siklusu evrelerini tayin etmek için başvurulan en yaygın yöntem vajinal sitoloji yöntemidir ve bu yöntem non-invaziv olması, maliyet açısından ucuz olması, kolay olması ve doğruluğu açısından en yaygın başvurulan yöntemdir. Vajinal sitoloji

yöntemi ile vajinal bölgeden alınan hücre örneklerinin morfolojik analizi mikroskopik olarak analiz edilerek östrus siklusu evrelerinin tayini gerçekleştirilir. Morfolojik inceleme ile 3 farklı hücre tipi görülür (Şekil 17):

1. Lökosit hücreleri
2. Nükleus içeren epitelyal hücreler
3. Kornifiye epitelyal hücreler

Morfolojik inceleme sonucunda bu hücrelerin varlığına ve yoğunluğuna göre sıçanın östrus siklusunun hangi evresinde olduğu tayin edilir (Ajayi, & Akhigbe, 2020; Cora, Kooistra, & Travlos, 2015).



Şekil 17. Sıçan östrus siklusu (Ajayi, & Akhigbe, 2020).

2.4.5.1. Proöstrus

Östrus siklusunun bu evresi yaklaşık olarak 12 saat süren kısa bir evredir. Bu evrede, düzgün görünüm ve boyuta sahip küçük boyutlu, yuvarlak şekilli, bazofilik boyanan nükleus içeren epitelyal hücreler baskın hücre tipleridir. Nükleus içeren epitelyal hücrelere ek olarak az miktarda kornifiye hücreler de gözlenebilirken nötrofil hücre tiplerine rastlanmaz. Ancak erken proöstrus evresinde diöstrus evresinin bitiminden kalan nötrofil hücre tipleri gözlenebilir (Şekil 18A). Proöstrus süresince FSH ve LH seviyelerinde artış görülür ve bu artış östrus evresine doğru maksimum düzeye ulaşır. Proöstrus evresinin başlangıcında düşük olan östrojen seviyesi, evre sonuna doğru en yüksek seviyesine ulaşır. Proöstrus evresinin sonuna doğru progesteron seviyesinde de bir artış gözlenir. Yükselen LH ile proöstrus evresinden östrus evresine geçişte ovulasyon tetiklenir (Ajayi, & Akhigbe, 2020; Cora ve ark., 2015).

2.4.5.2. Östrus

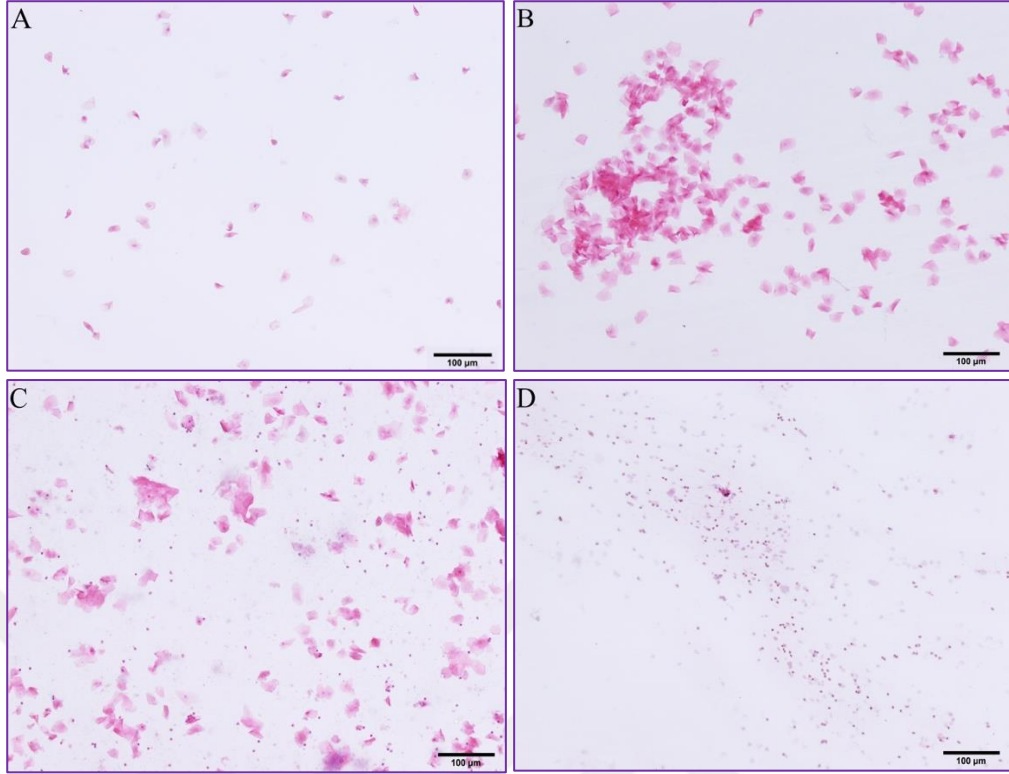
Östrus siklusunun bu evresi 24-48 saat süren bir evredir. Bu evrede, nükleus içermeyen keratinize epitelyal hücreler yoğun olarak gözlenen hücre tipleridir. Nükleus içeren epitelyal hücreler de daha az yoğunlukta gözlenirken; nötrofil hücre tipleri yoktur ya da östrus evresinin sonuna doğru gözlenebilir (Şekil 18B). Östrus evresi, insan menstrual siklusundaki proliferatif evreye denk gelmektedir. Östrus evresi başlamadan hemen önce ovulasyon gerçekleşir, östrojen seviyelerinde bir azalma gözlenir (Ajayi, & Akhigbe, 2020; Cora ve ark., 2015).

2.4.5.3. Metaöstrus

Östrus siklusunun bu evresi 6-8 saat süren en kısa evredir. Bu evrede, nükleus içermeyen keratinize epitelyal hücreler, nötrofil hücre tipleri ve daha az yoğunlukta nükleus içeren farklı boyutlardaki epitelyal hücreler gözlenir (Şekil 18C). Metaöstrus evresi, insan menstrual siklusundaki luteal faz başlangıcına denk gelmektedir ve bu evrede östrojen ve progesteron seviyeleri düşüktür (Ajayi, & Akhigbe, 2020; Cora ve ark., 2015).

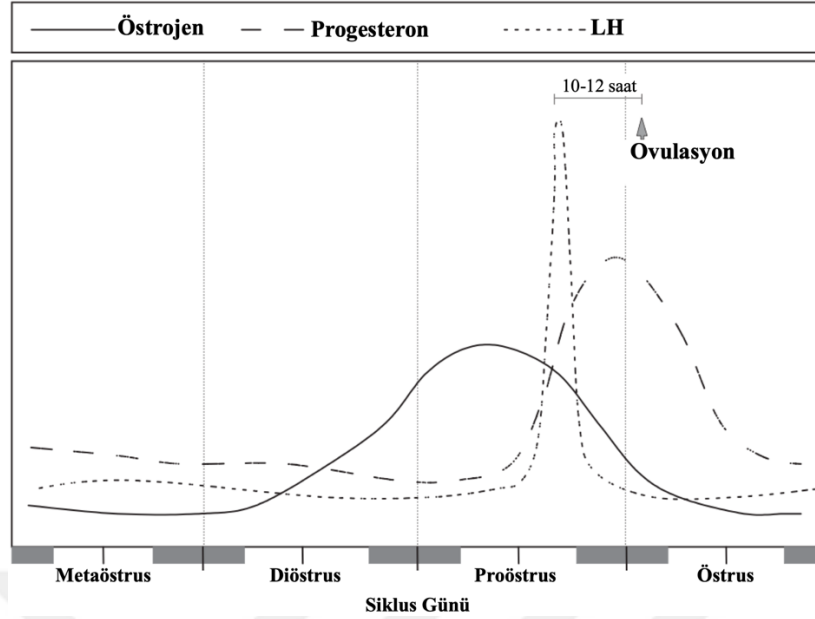
2.4.5.4. Diöstrus

Östrus siklusunun bu evresi 48-72 saat süren en uzun evredir. Bu evrede nötrofil hücre tipleri baskın olarak gözlenir (Şekil 18D). Diöstrus evresi, insan menstrual siklusundaki luteal faz sonuna denk gelmektedir. Diöstrus evresinin başlangıcında düşük seviyede olan östrojen, diöstrus evresinin sonuna doğru artış gösterir (Ajayi, & Akhigbe, 2020; Cora ve ark., 2015).



Şekil 18. Vajinal smear fotoğrafları. Östrus siklusunun evreleri: proöstrus (A), östrus (B), metaöstrus (C) ve diöstrus (D).

Sıçanlarda üreme döngüsü olan östrus siklusu, insan menstrual siklusunda olduğu gibi nöroendokrin sistemden etkilenmektedir. Östrus siklusunun proöstrus evresinde FSH, LH ve prolaktin seviyelerinde artış meydana gelir. FSH seviyesindeki artış ile ovaryum foliküllerinin büyümesi uyarılır ve böylece foliküllerden salgılanacak olan östrojen hormonu seviyesinde artış gerçekleşir. Östrojen artışı ile ovulasyonu tetikleyen LH hormon seviyesinde pik görülür ve bu proöstrus evresinden östrus evresine geçişi ifade eder. Geçiş aşamasında korpus luteum oluşumu da gerçekleşerek metaöstrus ve diöstrus evrelerinde baskın olan progesteron salgılanmasını başlatır ve östrojen seviyesinde azalmalara neden olur. Ovulasyon sonucu fertilizasyon süreci başlamazsa korpus luteum dejenere olur ve progesteron seviyesinde düşüş gerçekleşir. Nöroendokrin sistemde gerçekleşen bu değişimlere bakılarak; proöstrus evresinin foliküler gelişimi içerdiği, ovulasyonun östrus evresinde gerçekleştiği, korpus luteum yapısının metaöstrus evresinde olduğu ve diöstrus evresinin de dinlenme aşaması olduğu görülür (Şekil 19) (Ajayi, & Akhigbe, 2020; Goldman, Murr, & Cooper, 2007).



Şekil 19. Sıçan östrus siklusundaki hormonal değişimler (Goldman ve ark., 2007).

2.5. İnfertilite ve Prematür Ovaryan Yetmezlik (POI)

İnfertilite, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tanımlaması ile bir çiftin 12 ay boyunca düzenli bir şekilde ve korunma yöntemi kullanmadan cinsel ilişki yaşamasına rağmen gebelik elde edilememesi şeklinde ifade edilir (Thoma ve ark., 2013). İnfertil çiftlerin yaklaşık olarak %85'inin infertilite nedeni tanımlanabilirken; bu çiftlerin %15'inin infertilite nedeni tanımlanamamakta ve "açıklanmayan infertilite" olarak kabul görmektedir (Carson, & Kallen, 2021).

İnfertilite erkek ve kadın faktörlü olmak üzere birçok nedenden kaynaklanır. Yaşlanmaya bağlı olarak primordiyal foliküllerin sayıca azalması ile ovaryum rezervinin düşmesi ve beraberinde foliküllerde bulunan oositlerin kalitesinde de azalma görülmesi sonucu, yani biyolojik yaşlanma sonucunda düşük over rezervi (DOR) olarak tanımlanan hastalık görülür. Ovaryan rezervin yaştan bağımsız olarak 40 yaşından önce tükenmesi prematür ovaryan yetmezlik (POI) olarak tanımlanır.

POI, 40 yaştan daha genç bir kadında en az dört aylık amenore gibi menstrual bozukluk görülmesi, hipofiz gonadotropin FSH seviyesinin (>40 IU/l) yüksek, östrojen (E2) seviyesinin (<50 pg/ml) düşük çıkması, matür folikül eksikliği sonucu klinik tanısı konulan ve kadın infertilitesinde yaygın bir şekilde görülen infertilite nedenlerinden biridir. Bir kadında anti-Müllerian hormon (AMH) seviyesi, 15 ve daha üzerinde folikül varlığı ile ilişkili olup, 15 ve daha fazla sayıda foliküle sahip

kadınlarda 2,16 ng/ml; 5 ve daha az sayıda foliküle sahip ya da folikülü olmayan kadınlarda 0,33-0,42 ng/ml olarak belirlenir (Chon, Umair, & Yoon, 2021; Xiong ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2016).

2.5.1. POI'de ovaryum histolojisi

Ovaryum histolojisinin incelenmesi ile over rezervi ve foliküllerin durumları tayin edilerek prematür ovaryan yetmezliği değerlendirmesi için kesin bir yanıt oluşturulur. POI'de ovaryum morfolojisine bakıldığında; küçük boyutlu ovaryumlara sahip, foliküler rezervin azaldığı ve normal boyutlu ovaryuma sahip, foliküler olgunlaşmanın daha az olduğu iki farklı türde morfoloji gösterebilir. Küçük boyutlu ve foliküler rezerve sahip olmayan ovaryumda; primordiyal folikül havuzu ve atretik foliküller bulunursa da korpus albicans ve kollajen açısından zengin bağ dokusu ile çevrili stroma bulunur. Normal boyutlu ve az sayıda foliküler rezerve sahip olan ovaryumda ise primordiyal foliküllerin varlığına rağmen gelişmekte olan foliküller gözlenmemektedir. Işık mikroskopik ve transmisyon elektron mikroskopik (TEM) incelemeler ile korpus albicans ve oldukça yoğun bir bağ dokusu gözlenir. Aynı zamanda bu ovaryumlarda medulla ve korteks ayırımı net görülmemektedir. Transmisyon elektron mikroskopik (TEM) inceleme ile ovaryum stromasında homojen dağılım göstermeyen, yüksek konsantrasyonlu kollajen lifler ve fibroblastlar gözlenmektedir. Ovaryumda çoğu antral folikülün histolojik olarak anormal olması ve foliküllerde kısmi dökülmeler sonucu granüloza hücrelerinin tamamen yok olması söz konusudur. (Chon, Umair, & Yoon, 2021).

2.6. POI Hayvan Modelleri

Prematür ovaryan yetmezliğinin altında yatan nedenler büyük ölçüde bilinmemekte, oluşumunda ve gelişiminde ovaryum rezervinin ilişkili olduğu bilinmemektedir. Oosit olgunlaşması ve matürasyonunu östrojen aracılı bir etki ile düzenleyen ovaryum granüloza hücrelerinin (OGC) apoptoza uğraması ovaryum rezervi ve fonksiyonunun azalmasında rol oynayan önemli bir mekanizmadır. Primordiyal foliküllerin granüloza hücrelerinin apoptozu, çeşitli faktörler kullanılarak

önemli yollar aracılığıyla indüklenmekte ve POI modeli oluşturulmaktadır (Liu, Li, Wang, Chen, & Zheng, 2016). Deneysel POI Modeli oluşturmak amacıyla kullanılan ajanlar aşağıda belirtilmiştir.

2.6.1. Siklofosfamid (CTX) ile POI modeli oluşturulması

Siklofosfamid (CTX), DNA ile çapraz bağlanarak DNA sentezini inhibe eder ve tümör hücrelerinin, hücre döngüsünde proliferasyona uğrayan hücrelerin apoptozuna sebebiyet veren farmakolojik etkisi vardır. Siklofosfamid, oksidatif stres ile ovaryum disfonksiyonuna ve granüloza hücrelerinin apoptozunu indükleyerek glutatyon seviyesindeki düşüşle birlikte foliküllerin azalmasına neden olur. Sıçanlarda deneysel prematür ovaryan yetmezliği hayvan modeli oluşturmak için tek bir intraperitoneal enjeksiyon ile 100 mg/kg siklofosfamid uygulanmaktadır (Zheng, Ma, Chen, & Li, 2022).

2.6.2. 4-Vinilsikloheksen diepoksit (VCD) ile POI modeli oluşturulması

4-vinilsikloheksen diepoksit (VCD), DNA hasarı ile primordiyal folikül ve primer foliküllerin atrezisini hızlandırarak ovaryum rezervinde azalmaya sebebiyet veren kimyasal bir ajandır. İnsanlarda oluşan menopozal geçişi taklit ederek ovaryum disfonksiyonuna neden olur (Li, X. Ve ark., 2019). Sıçanlarda deneysel prematür ovaryan yetmezliği hayvan modeli oluşturmak için 15 gün boyunca intraperitoneal enjeksiyon ile 160 mg/kg/gün 4-vinilsikloheksen diepoksit uygulanmaktadır (Qin ve ark., 2022). Çalışma kapsamında kullanılan POI modeli VCD ile gerçekleştirilmiştir (Bölüm 2.7’de detaylı olarak anlatılmıştır).

2.6.3. D-galaktoz ile POI modeli oluşturulması

Şeker galaktozlarının metabolizmasını etkileyen galaktozemi, POI ile ilişkili genetik metabolik bozukluktur. Laktoz ve glikoz şekerlerinden oluşan galaktozun metabolizmasında üç enzim rol oynar: galaktokinaz (GALK), galaktoz 1-fosfat üridiltransferaz (GALT) ve UDP-galaktoz 4-epimeraz (GALE). Bu metabolik yolun

son ürünü ise glikolizasyonda kullanılan UDP-glukoz'dur. Galaktozemi görülen kadınlarda GALT yokluğunda biriken galaktozun (GAL) yarattığı toksik etki sonucunda ovaryum folikül rezervinde hızlandırılmış bir atrezi ve POI oluşumu gözlenir (Dovom ve ark., 2019). Sıçanlarda deneysel POI hayvan modeli oluşturmak için 1 kg galaktoz bakımından zenginleştirilmiş gıda, 650 g standart gıda toz ile 350 g galaktoz tozu distile suda karıştırılarak hazırlanarak peletlere dönüştürülür ve kuruduktan sonra kullanılmak üzere 2-4 °C sıcaklıkta saklanır. Hazırlanan peletler gebe sıçanlara, gebeliklerinin 3. gününden itibaren farklı zaman dilimlerinde verilerek POI modeli oluşturulur (Dovom ve ark., 2022).

2.6.4. Cisplatin ile POI modeli oluşturulması

Kanser tedavilerinde reçete edilen Cisplatin ve diğer platin bazlı ilaçlar, primordiyal folikülleri yok ederek folikül apoptozunu indükler ve ovaryum folikül rezervini azaltır. Yüksek dozda alımları sonucunda ise dönüşü olmayan ovaryum hasarları meydana gelir. Sıçanlarda deneysel prematür ovarian yetmezliği hayvan modeli oluşturmak için iki hafta boyunca haftada bir kez olmak üzere intraperitoneal enjeksiyon ile 6 mg/kg dozda 2 ml Cisplatin uygulanmaktadır (Luo, Ruan, & Mueck, 2023).

2.7. VCD

Hayvan çalışmalarında, bazı kimyasalların kadınlarda görülen erken menopozu taklit ederek primordiyal folikülleri yok etme potansiyelinin olduğu görülmüştür. Endüstriyel bir kimyasal olan VCD de bu kimyasallardan biridir. Ulusal Toksikoloji Programı, fare ve sıçanlarda kanserojen potansiyel taranması için VCD ile uzun süreli çalışma yürütmüştür. Hayvanlarda uzun süreli (13 hafta) VCD maruziyeti sonrasında VCD'nin kanserojen potansiyele sahip olduğu, VCD etkisi sonucunda ovaryum ve uterus atrofisinin görüldüğü sonucuna varılmıştır. Bu bulgular ile VCD'nin primordiyal folikül havuzu tahribatına yol açtığı gösterilmiştir (Kappeler, & Hoyer, 2012).

VCD'nin foliküller üzerindeki etkisine moleküler açıdan bakıldığında; tekrarlayan dozlarla kullanımının ovaryan folikülleri selektif olarak etkilediği görülmektedir. Primordiyal folikül ve primer foliküllerin sayısını apoptoz sürecini başlatarak azalttığı bildirilmiştir (Hu ve ark., 2001a; Hu ve ark., 2001b; Springer ve ark., 1996a, Springer ve ark., 1996b). Primordiyal folikül ve primer foliküllerde oosit canlılığı ve sağkalımında etkin rol oynayan, oosit ve granüloza hücreleri arasındaki hücre-hücre etkileşiminden sorumlu proto-onkogen reseptör tirozin kinaz (KIT) ve ligantı (KITLG) sinyal yolağını etkiler (Fernandez ve ark., 2008; Jin ve ark., 2005; Parrott, & Skinner, 1999). Primordiyal ve primer foliküller FSH reseptörü içermemekte ve canlılıkları KIT / KITLG sinyal yolağı üzerinden korunmaktadır (Parrott, & Skinner, 1999; Yoshida ve ark., 1997). Yapılan çalışmalarda VCD'nin KIT mRNA ekspresyonunu düşürdüğü, KITLG mRNA ekspresyonunu arttırdığı ve KIT / KITLG sinyal yolunu inhibe ederek ovaryum toksisitesine neden olduğu bildirilmiştir (Keating ve ark., 2009; Keating ve ark., 2011).

VCD ile POI modelinin indüklendiği çalışmalar sonucunda POI hayvan modeli oluşturulmasında VCD kullanımı tercih edilmektedir. VCD ile oluşturulan POI hayvan modelinin avantajlarına bakıldığında; fare ve sıçanlarda selektif olarak primordiyal ve primer folikül sayısında apoptozu hızlandırarak azalış gösterdiği (Hoyer, & Sipes, 2007; Keating ve ark., 2009), uygun seviyelerde hormonal değişiklikler gösterdiği (Mayer ve ark., 2002), uygulama yapılan hayvanlarda herhangi bir cerrahi işleme gerek duyulmadığı ve genetik açıdan değişiklik göstermediği (Van Kempen, Milner, & Waters, 2011), önceki çalışmalarda in vivo ve in vitro olarak çalışılabileceğinin gösterilmiş olduğu (Mayer ve ark., 2002), çevre dokularında hasar oluşturmadığı (Muhammad ve ark., 2009), enjeksiyon uygulaması sonrasında hesaplanan zaman dilimlerinde premenapozal, perimenapozal ve postmenapozal evrelerin dahil olduğu uzun süreli çalışmalarda kullanılabilir olduğu (Mayer, Devine, Dyer, & Hoyer, 2004) görülmektedir. VCD'nin enjeksiyonu ile primordiyal ve primer foliküller de dahil olmak üzere küçük foliküllerin atrezisinin görülmüş olsa da sekonder folikül gelişimi sonrası daha büyük foliküller üzerinde bir etkisinin olduğuna dair bir kanıt bulunmamıştır (Cao ve ark., 2020).

2.8. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon (KOH)

Yardımcı üreme tedavi yöntemlerinde kullanılan bir teknik olan kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH), tek bir siklusta ovaryumlardan optimal sayı ve iyi kalitede oosit eldesi için çok sayıda folikülün güvenilir bir yolla geliştirilmesinde kullanılır. Geliştirilen bu foliküllerdeki oositler, oosit toplama işlemi ile anestezi altındaki hastadan toplanarak, embriyoloji laboratuvarında erkek hastadan temin edilen sperm hücreleri ile in vitro ortamda fertilizasyon işlemine tabi tutulur. Fertilizasyon sonucu oluşan embriyolar, luteal evrede kadın hastanın uterusuna yerleştirilir. KOH sonrası elde edilen çok sayıdaki foliküller arasından preovulatuvar foliküllerin toplanmasıyla birlikte, iyi kalite sergilemeyen oositlerin elde edilmesi de mümkündür (Fitko, & Szlezzyngier, 1994).

Hipotalamus-hipofiz gonadal eksenini üzerinde etkinlik gösteren kontrollü ovaryan hiperstimülasyon, hipofizin baskılanması süreciyle başlar. Hipofiz, gonadotropin salgılayıcı hormon (GnRH) analogları ile inhibe edilerek endojen luteinizan hormonun seviye artışını durdurur. Hipofizin baskılanma durumuna göre KOH protokolleri, uzun ve kısa protokoller olarak uygulanır. Menstrual siklusun bir önceki siklus zamanının midluteal fazında kullanılan GnRH analogu ile endojen FSH ve LH salgılanmasının durdurulması ve foliküler gelişiminin ekzojen gonadotropinler tarafından kontrollü bir şekilde sağlanması uzun protokoller ile gerçekleştirilir. Uzun protokolde olduğu gibi GnRH analogunun uzun maruziyetinden kaçınmak amacıyla kısa süreli olarak maksimum düzeyde ovaryumların uyarılması ise kısa protokoller ile gerçekleştirilir (Macklon ve ark., 2006; Neiderberger ve ark., 2018).

2.8.1. POI olgularında KOH protokolleri

İn vitro fertilizasyon (IVF), kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sonrası oosit içeren foliküllerin toplanmasını kapsayan çok aşamalı bir işlemdir. KOH uygulaması sonrasında folikül aspirasyonu, in vitro oosit matürasyonu, embriyo gelişimi, embriyonun transferi ve implantasyonu aşamaları gelmektedir. Başarılı bir IVF sonucu için tüm bu aşamalar kritik önemdedir. Bu aşamaların ilk kritik adımı ise transfer için en uygun embriyonun seçimine olanak tanıyacak şekilde optimal sayıda ve yüksek

kalitede oosit eldesinin sağlanması amacıyla gerçekleştirilen kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolünün uygulanmasıdır. KOH protokolü uygulanacak olan hasta profilleri değişkenlik göstermektedir; hasta profilleri 4-5'ten fazla oosite sahip olmayanlar zayıf yanıt veren, 6-15 oosite sahip olanlar normal yanıt veren, >15 oosite sahip olanlar aşırı yanıt veren hastalardır. Zayıf yanıt veren hasta profilleri ovaryan rezervin azalmasının yaşa bağımlı (>40 yaş) olarak gerçekleşmesiyle düşük over rezervi (DOR), yaştan bağımsız (<40 yaş) olarak gerçekleşmesiyle de prematür ovaryan yetmezlik (POI) olarak tanımlanır (Pabalan ve ark., 2014). KOH, özellikle zayıf yanıt veren hastalarda tek bir baskın folikül yerine çok sayıda folikül gelişiminin indüklenmesinin dışarıdan sağlanan gonadotropin dozları ile gerçekleşmesini amaçlayan tedavi protokülüdür (Pandian, McTavish, Aucott, Hamilton, & Bhattacharya, 2010). IVF tedavilerinde KOH ile çok sayıda oosit eldesi klinik gebelik ve canlı doğum oranlarında iyileştirmeler sağlamıştır (Sunkara ve ark., 2011). Ancak literatürde bulunan çalışmalar incelendiğinde, DOR ve POI olguları için standart olarak kabul görmüş bir protokol henüz bulunmamaktadır.

IVF tedavisi sonucu başarı eldesinde en fazla zorlanılan hasta grupları arasındaki POI olgularında klinik gebelik sonuçlarının iyileştirilmesi amacıyla farklı stimülasyon protokolleri önerilmektedir. Bu protokoller hipofiz baskılanması, gonadotropin dozlarının artırılması, ovaryan stimülasyonu esnasında adjuvan tedavilerin dahil edilmesi, modifiye doğal siklusların uygulanması şeklindedir (Orvieto ve ark., 2008; Pandian ve ark., 2010).

POI olgularında optimal sayı ve kalitedeki oosit eldesi için uygulanan FSH, LH gibi ekzojen gonadotropinlerin işlevselliği birçok farklı çalışmada incelenmiştir. Farklı gonadotropin formlarının uygulandığı çalışmalarda klinik sonuçlarda herhangi bir etki görülmemiştir (Van Wely ve ark., 2011). Gonadotropin dozunda artışın olduğu çalışmalarda da klinik sonuçlarda bir etki olmadığı (Lekamge, Lane, Gilchrist, & Tremellen, 2008; Pandian ve ark., 2010), artan doz uygulamasının ayrıca farklı düzeylerde yan etkiler gösterdiği ve maliyet açısından yüksek bir tablo ile karşılaştığı görülmüştür (Cheung ve ark., 2005; Kailasam, Keay, Wilson, Ford, & Jenkins, 2004). GnRH agonistlerinin standart uzun protokol, kısa protokol ve ultra uzun protokol olarak hipofiz baskılanmasında kullanımını sonucunda embriyo eldesinde ve transfer için seçilebilecek embriyo sayısında farklılık olmadığı görülmüştür

(Pandian ve ark., 2010; Schoolcraft, Eric, Minjarez, Stevens, & Gardner, 2008). GnRH antagonistleri ve uzun protokol uygulanması sonucu iptal edilen siklus oranlarında, gonadotropin dozunda, toplanan oosit sayısında, embriyo gelişiminde, implantasyonda ve klinik gebelik oranlarında bir farklılığın bulunmadığı görülmüştür (Cheung ve ark., 2005).

2.8.2. POI olgularında KOH protokollerine eklenen adjuvan tedaviler

POI olgularında kullanılan protokollerden hangisinin daha etkin bir tedavi protokolü olduğu hususunda kesin bir sonuca varılamamıştır (Griesinger, Diedrich, Tarlatzis, & Kolibianakis, 2006). IVF tedavi sonuçlarının iyileştirilmesi için POI olgularında uygulanan kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokollerine ek olarak adjuvan veya tamamlayıcı tedavilerin uygulanması da önerilmektedir. Bu tedaviler folikül gelişimini, oosit matürasyonunu, embriyo eldesi ve kalitesini iyileştirebilmek amacıyla kullanılan ek tedavi yöntemleri olarak tanımlanmaktadır. KOH protokolüne ek olarak kullanımı tavsiye edilen adjuvan tedaviler; androjen (testosteron, dehidroepiandrosteron) takviyesi (Doan, Quan, & Nguyen, 2017; Kotb, Hassan, & AwadAllah, 2016; Qin, Fan, & Qin, 2017; Saharkhiz ve ark., 2018; Zhang ve ark., 2016;) ya da androjen düzenleyici ajan (letrozol aromataz inhibitörü) (Bastu ve ark., 2016; Yu, Jin, Huang, Lin, & Wang, 2018), rekombinant LH (rLH) (Humaidan ve ark., 2017; Merviel ve ark., 2008; Younis, Izhaki, & Ben-Ami, 2016), steroid hormon takviyesi (östradiol ve progesteron) (Davar, Neghab, & Naghshineh, 2018; Davar, Rahsepar, & Rahmani, 2013), büyüme hormonu (GH) (Bassiouny, Dakhly, Bayoumi, & Hashish, 2016; Choe ve ark., 2018; Li ve ark., 2017; Merviel ve ark., 2008), koenzim Q10 (CoQ10) (Gat ve ark., 2016; Xu ve ark., 2018), klamifen sitrat (Pilehvari ve ark., 2016; Siristatidis ve ark., 2017) ve aspirin (Frattarelli, McWilliams, Hill, Miller, & Scott Jr., 2008; Merviel ve ark., 2008) gibi uygulamalardan oluşmaktadır. Bu adjuvan tedavilerin kullanımı henüz araştırma düzeyindedir, kabul görmüş bir tedavi yöntemi olarak tanımlanmamaktadır. Son yıllarda üreme tıbbında, POI deneysel modellemesinde folikül gelişiminde, oosit matürasyonunda ve elde edilen embriyoların kalitesinde iyileştirme sağlanması amacıyla kök hücre ve plateletten zengin plazma (PRP) enjeksiyonu uygulamasının yapıldığı çalışmalar bulunmaktadır.

(Ahmadian ve ark., 2020; Fraison ve ark., 2023).

2.9. Plateletten Zengin Plazma (PRP)

Trombositler (plateletler), megakaryosit olarak adlandırılan, kemik iliğindeki büyük poliploid hücrelerden (nükleusları çoklu kromozom setleri içeren hücreler) türetilen küçük, membran ile sınırlandırılmış, nükleus bulundurmeyen sitoplazmik fragmanlardır. Trombositler, kan damarlarının sürekli denetiminde, hasar görmüş dokunun onarımında ve fibrin, eritrosit, lökosit gibi kan elemanlarının damarların iç yüzeyinde kitle şeklinde yapışmasını sağlayarak hemostazda (kanamanın kontrolünde) pıhtı oluşumunda fonksiyon görürler. Hemostazda, trombüs olarak adlandırılan pıhtı kitlesinin oluşumu için öncelikli olarak trombositlerin aktive olması gerekmektedir. Trombositler, serotonin, adenozin difosfat (ADP), kollajen, trombin, tromboksan, oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein (oxLDL) gibi spesifik trombosit membran reseptörlerine bağlanan çeşitli agonistler tarafından farklı mekanizmalar aracılığıyla aktive edilirler (Cakiroglu ve ark., 2020; Diaz-Ricart, White, Escolar, & Galan, 2009; Li, Delaney, O'Brien, & Du, 2010; Lopez-Vilchez, Mescher, 2021; Ross, & Pawlina, 2019; Shen ve ark., 2017; Wraith ve ark., 2013). Trombositler aktive edildiklerinde intrasitoplazmik granül içeriklerini salarlar. Bu intrasitoplazmik granüller, vasküler hasardaki trombosit yanıtı için elzem faktörler içeren çok sayıdaki alfa ve daha az sayıdaki yoğun lizozomal granüller olmak üzere ikiye ayrılırlar. Yüzlerce farklı protein içeriğinden oluşan, zimojen formdaki büyüme faktörü içeriği ile doku onarımı ve hemostazda rol oynayan alfa trombosit granüllerinin büyük çoğunluğu ana megakaryositlerden sentezlenmektedir. Sayıca daha az olan, trombositte özgü fonksiyonel işlevi tam olarak bilinmeyen ancak pıhtı lizisinde görev yaptığı düşünülen yoğun lizozomal trombosit granülleri ise adenozin difosfat (ADP), adenozin trifosfat (ATP), guanozin difosfat (GDP), guanozin trifosfat (GTP), serotonin, histamin, polifosfat, magnezyum ve kalsiyum gibi küçük moleküller içermektedir (Scully ve ark., 2019; Scully ve ark., 2020). Alfa trombosit granülleri çok sayıda büyüme faktörü içermektedir. Bu büyüme faktörlerine; trombositlerin primer büyüme faktörü olan glikoprotein yapılı PDEGF (Trombosit Kaynaklı Epidermal Büyüme Faktörü, Platelet-Derived Epidermal Growth Factor) (Gao, Song, Huang, Wang, & Wang, 2021), doku

onarımında etkili olan IGF-1 ve IGF-2 (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1-2, Insulin-Like Growth Factor 1-2) (Gao ve ark., 2021; Tülek, & Kahraman, 2022), hücrel farklılaşma ve bağ doku onarımında görevli olan TGF- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü- β , Transforming Growth Factor- β) üyeleri (Tülek, & Kahraman, 2022), mezodermal ve nöroektodermal tabakalardan köken alan hücrelerde mitojenik etki gösteren FGF-1 ve FGF-2 (Fibroblast Büyüme Faktörü 1-2, Fibroblast Growth Factor 1-2) (Turner, & Grose, 2010), vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, fibroblastlar üzerinde mitojenik etkili ve anjiyogenezde de rol oynayan EGF (Epidermal Büyüme Faktörü, Epidermal Growth Factor) (Gao ve ark., 2021), tümör anjiyogenezinde etki gösteren VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü, Vascular Endothelial Growth Factor) (Tülek, & Kahraman, 2022) örnek olarak verilebilir.

Plazma (%55), kırmızı kan hücreleri (alyuvarlar) (%41), trombositler ve beyaz kan hücreleri (akyuvarlar) (%4) içeren, venöz yöntemle (flebotomi) alınmış tam kanın sitrat ya da EDTA bazlı antikoagülan içerikli tüpe alınarak santrifüjlenmesiyle farklı bileşenlerine ayrılması sonucu yüksek konsantrasyonlu trombosit elde edilir (Şekil 20). Bu yüksek konsantrasyona sahip trombositlerin aktivasyonu farklı aktivatörler (serotonin, ADP, kollajen gibi) aracılığıyla sağlanır. Trombositlerin aktivasyonu tamamlanınca trombosit bakımından zengin plazma (plateletten zengin plazma, PRP) açığa çıkar. Santrifüj işlemi ile kırmızı kan hücreleri elimine edilerek daha yüksek konsantrasyona sahip plazma üretimi sağlanır (Şekil 20). PRP içeriğindeki trombositler aktive edildiğinde büyüme, hücre proliferasyonu ve anjiyogenez gibi fizyolojik olaylarda rol oynar (Scully ve ark., 2019; Scully ve ark., 2020; Seckin, Ramadan, Mouanness, Kohansieh, & Merhi, 2022). Ayrıca istenilen hedef trombosit konsantrasyonunu verebilen hazır ticari PRP kitleri de bulunmaktadır. PRP'nin hızlı ve kolay olarak temin edilmesi, uygulama yönteminin basit ve kısa süreli olması, immün yanıtta etki göstermesi, maliyet açısından uygun olması sebebiyle son yıllarda PRP'ye olan ilgi artmış ve PRP tıpta birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır.



Şekil 20. Venöz olarak alınan insan tam kanından PRP izolasyonu (“PRP Nedir?”).

2.9.1. Üreme tıbbında PRP uygulamaları

Literatür taraması yapıldığında üreme tıbbında da PRP kullanımının olduğu birçok çalışma ile karşılaşılmaktadır. Raporlanan ilk çalışmada bilateral ooforektomi sonrası ovaryum kriyoprezervasyonu yapılan ovaryum dokusu tekrar çözülerek intraperitoneal olarak yerleştirilmiş ve jel formunda olan PRP, ovaryum dış yüzeyini kaplayacak şekilde pro-anjiyojenik ve proliferatif görevde bulunacak şekilde uygulanmıştır. Bu uygulamanın ardından yardımcı üreme teknikleri ile gerçekleştirilen siklusta oosit elde edilmesi ve embriyo oluşumu gerçekleştirilmiştir. Elde edilen embriyo ile gerçekleştirilen transfer işlemi klinik gebelik ve canlı doğumla sonuçlanmıştır. Bu çalışmada, PRP uygulamanın sonuca bir katkısının olup olmadığının belirlenebilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu vurgusu yapılarak PRP'nin üreme tıbbındaki işlevselliğinin araştırılması önerilmiştir (Callejo ve ark., 2013). PRP'nin üreme tıbbında kullanılmaya başlanmasıyla birlikte endometriyal kalınlıkta artışa, fibroziste iyileştirici etkiye, implantasyon oranında artışa yol açtığını gösteren çalışmalar da yapılmıştır (Eftekhari, Neghab, Naghshineh, & Khani, 2018). PRP, üreme tıbbı alanında in vitro fertilizasyon (IVF) tedavisinde adjuvan tedavi olarak uygulanmaya başlamıştır. İnfertil hastalarda PRP'nin intraovaryan olarak uygulanması ile oosit toplanması sonucu oosit matürasyonu sağlanmış ve embriyo transferi gerçekleştirilmiştir (Sills, Rickers, Li, & Palermo, 2018). PRP'nin intraovaryan olarak uygulandığı bir başka çalışmada da ovaryan rezervin belirteci olan anti-Müllerian hormon (AMH) seviyelerinde artma, folikül stimulan hormon (FSH) seviyelerinde azalma gerçekleştirilerek, folikülogenezde, toplanan oosit sayısında iyileştirmeler ve düşük oranda da spontan gerçekleşen gebelikler görülmüştür (Farimani, Heshmati, Poorolajal, & Bahmanzadeh, 2019; Hsu,

Hsu, Hsu, Chiu, & Dorjee, 2020; Sfakianoudis ve ark., 2019). Tüm bu çalışmalarda PRP'nin intraovaryan enjeksiyonu sonucunda olumlu gelişmeler raporlanmış olsa da deneysel olarak sadece intraovaryan enjeksiyonun gerçekleştirildiği sham grubu oluşturulmamıştır. Sham enjeksiyonu olmadığı için ovaryumların mekanik etkiyle uyarılması sonucu fonksiyonel olarak kısmen iyileşmeye gitme ihtimali gözardı edilememektedir. Deneysel prematür ovaryan yetmezliği modeli oluşturulan bir çalışmada intraovaryan serum fizyolojik (SF) enjeksiyonunun ovaryum fonksiyonunun iyileştirilmesi için yeterli olmadığı gösterilmiştir (Ahmadian ve ark., 2020).

PRP, otolog olarak direkt hasta kanından elde edilebilmesi ve maliyet açısından uygun olması (Su ve ark., 2018), uygulanmasının kolay gerçekleştirilebiliyor olması ve sonrasında etkisini uzun vadede gösterebiliyor olması, iyileşme süresinin uzamaması ve yan etkilerinin az olması (Pietrzak, & Eppley, 2005) nedeniyle avantajlı olarak kabul edilen adjuvan bir tedavidir. Bu avantajlarından dolayı PRP kullanımı sadece üreme tıbbında sınırlı kalmayıp tüm tıbbi alanlarda da yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır.

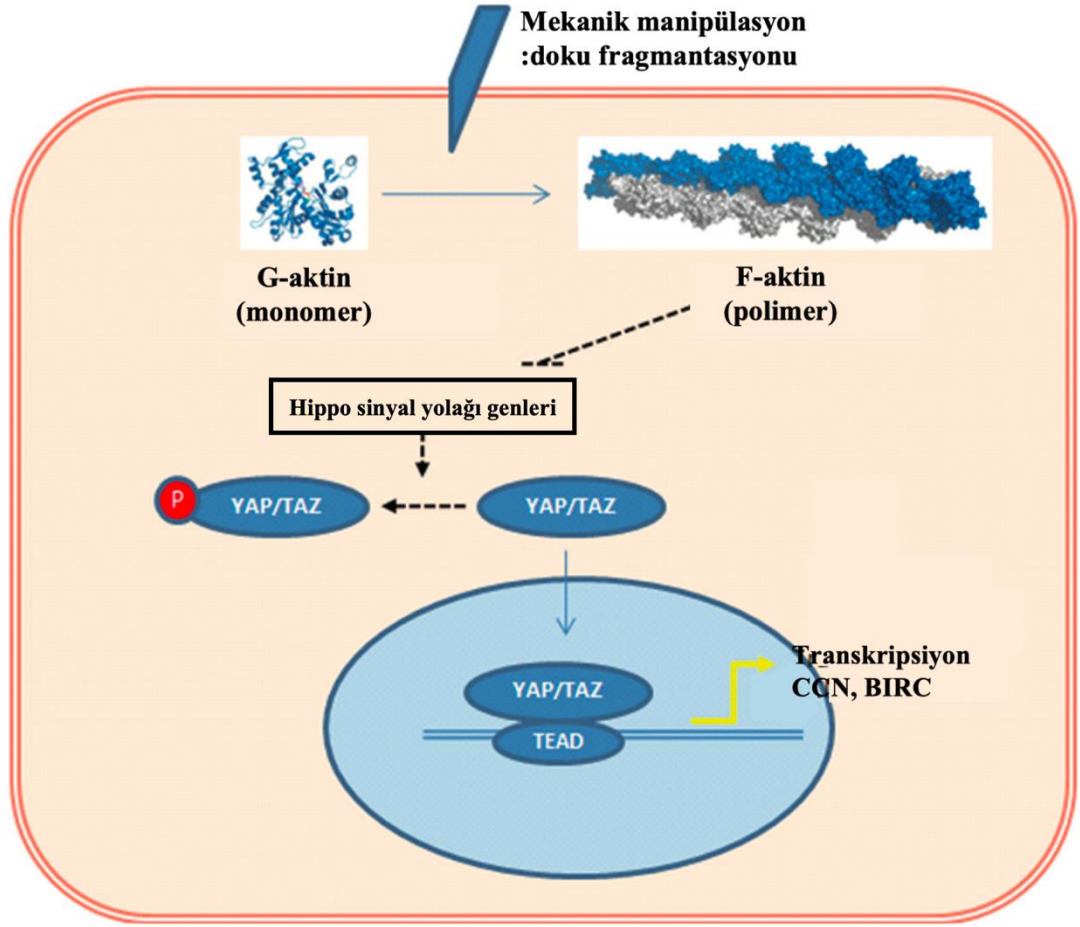
2.10. Primordiyal Folikül Aktivasyonu ve Moleküler Mekanizmaları

Ovaryan foliküllerin aktivasyonunun tam olarak nasıl gerçekleştiği henüz bilinmese de aktivatör ve baskılayıcı fizyolojik yollar ile kontrol edildiği bilinmektedir. Primordiyal foliküllerin aktivasyonunun gerçekleşmesinde etkili olan farklı moleküler mekanizmalar bulunmaktadır. Aşağıda primordiyal folikül aktivasyonunda rol oynayan sinyal yolları verilmiştir.

2.10.1. Primordiyal folikül aktivasyonunda hippo sinyal yolağı

Primordiyal folikül aktivasyonunda rol oynayan ilk yolak Hippo sinyal yolağıdır. Hippo sinyal yolağı, hücre proliferasyonunu kontrol eden, gelişim ve rejenerasyon sırasında organ büyümesini uygun zamanda sonlandıran, organ boyutunun korunmasında görev alan hücre içi sinyal sistemidir. Hippo sinyali, bir serin/treonin kinaz kaskadında görev yapan, transkripsiyonel koaktivatörleri; YAP (Evet-ilişkili

protein, Yes-associated protein) ve TAZ'ı (PDZ-bağlama motifli transkripsiyonel koaktivatör) fosforile ederek etkisiz hale getiren birkaç negatif büyüme düzenleyicisinden oluşur. Hippo sinyali bozulduğunda, YAP ve TAZ fosforilasyonunda azalma ve ardından YAP ve TAZ'ın nükleer seviyelerinde artma görülür. Artan nükleer YAP ve TAZ, TEAD (TEA/ATTS DNA bağlanma alanını içeren transkripsiyon faktörleri) proteinleri ile etkileşime girerek CCN (Hücrel İletişim Ağı, Cellular Communication Network) protein ailesi üyesi olan CTGF (CCN2) (Bağ Dokusu Büyüme Faktörü, Connective Tissue Growth Factor) ve NOV (CCN3) (Nöroblastoma Aşırı Ekspresyon Eden, Nephroblastoma Overexpressed) büyüme faktörleri ile folikül büyümesini teşvik eden BIRC (Bakuloviral Apoptoz İnhibitörleri Tekrarını İçeren, Baculoviral IAP repeat-containing) apoptoz inhibitörlerinin ekspresyonunda artışa yol açar (Şekil 21). CCN ve BIRC proteinleri hücre büyümesi, proliferasyonu ve hayatta kalmasını uyarır. Hippo sinyal yolu, YAP/TAZ ve diğer transkripsiyon faktörlerinin fosforilasyonu aracılığıyla işlevsiz hale gelmelerine neden olur ve anormal doku büyümesini aktif olarak önler. Hücre dışı ligand kaynaklı sinyal yollarının aksine Hippo sinyal yolağı spesifik hücre dışı ligandlara ve reseptörlere sahip değildir. Aktin, hücrel süreçlerde etkin mikofilamentler oluşturan işlevsel bir proteindir. Globüler aktinin (G-aktin) fibriler aktine (F-aktin) polimerizasyonu hücre şeklinin korunması ve hücre hareketi için önemlidir. Aktin polimerizasyonu, Hippo sinyal yolu ile ilişkili genlerin işlevini bozarak nükleer YAP ve TAZ lokalizasyonunda artmaya; fosfo-YAP (pYAP) seviyelerinde azalmaya neden olur. Böylece CCN büyüme faktörlerinin ve folikül büyümesini teşvik eden BIRC apoptoz inhibitörlerinin artmasına yol açar (Şekil 21) (Hsueh, & Kawamura, 2020; Hsueh, Kawamura, Cheng, & Fauser, 2015; Kawamura ve ark., 2013; Kawamura, Kawamura, & Hsueh, 2016; Lee, & Chang, 2019).

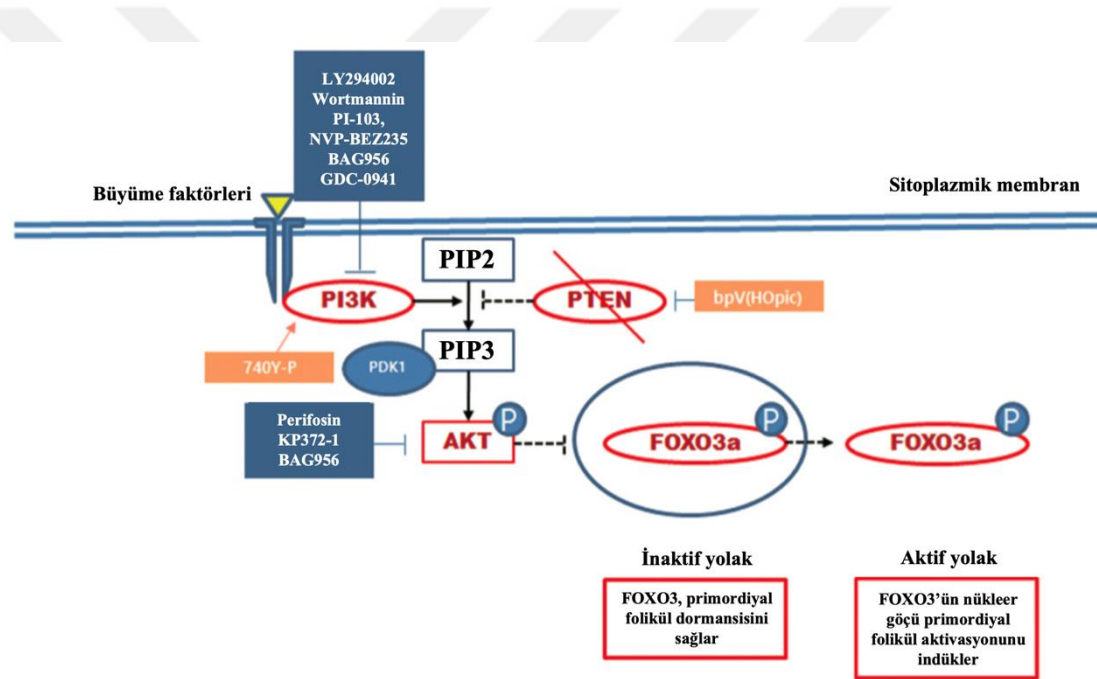


Şekil 21. Hippo sinyal yolağı aktivasyonu (Lee, & Chang, 2019).

2.10.2. Primordiyal folikül aktivasyonunda PTEN/PI3K sinyal yolağı

Primordiyal folikül aktivasyonunda rol oynayan bir diğer yolak ise PTEN/PI3K (Fosfotaz ve tensin homolog / fosfatidilinositol-3-kinaz) sinyal yolağıdır. PTEN/PI3K sinyal yolağının ovaryumdaki dormansi halinin ve primordiyal folikül aktivasyonunun düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. FOXO alt sınıfları, hücre döngüsünün durdurulmasında, apoptozda önemli rollerde bulunan transkripsiyon faktörleridir. Oositlerde FOXO3a, özellikle primordiyal foliküllerin oluşumunda nükleusa aktarılan, ovaryuma özgü mekanizmaları etkileyerek foliküler büyümenin başlatılmasında baskılayıcı etkiye sahip bir faktördür. PTEN'in oosit spesifik olarak silinmesi, FOXO3a nakavtının indüklediği fenotipte primordiyal folikül aktivasyonuna neden olur. PI3K, PTEN nakavtını baskılar, ancak FOXO3 nakavt ovaryan fenotipi baskılamamaktadır. PTEN'in oosit spesifik silinmesi ile ikincil haberci PIP2 (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat) PI3K ile indüklenen PIP3'e

(fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfat) dönüşür ve sonrasında PDK1'i (fosfatidilinositol bağımlı kinaz1) aktive ederek AKT aktivasyonunu sağlar. Nükleusta gerçekleşen AKT aktivasyonu, FOXO3a hiperfosforilasyonuna ve nükleusa göçüne yol açarak primordiyal foliküllerin aktivasyonunu destekler (Şekil 22). PTEN/PI3K/AKT/FOXO3 sinyal yolunun hiperaktivasyonu ya da negatif regülasyonu, foliküler aktivasyonu geciktirir ve primordiyal foliküllerin atrezisinde önemli ölçüde artışa neden olur. Tam tersi durumda PTEN'in inhibisyonu ve PI3K'nin aktivasyonu ile inaktif foliküllerin aktivasyonu sağlanır. PTEN, PI3K/AKT sinyal yolunun negatif düzenleyicisi olarak görev yapmaktadır (Hsueh, & Kawamura, 2020; Lee, & Chang, 2019).



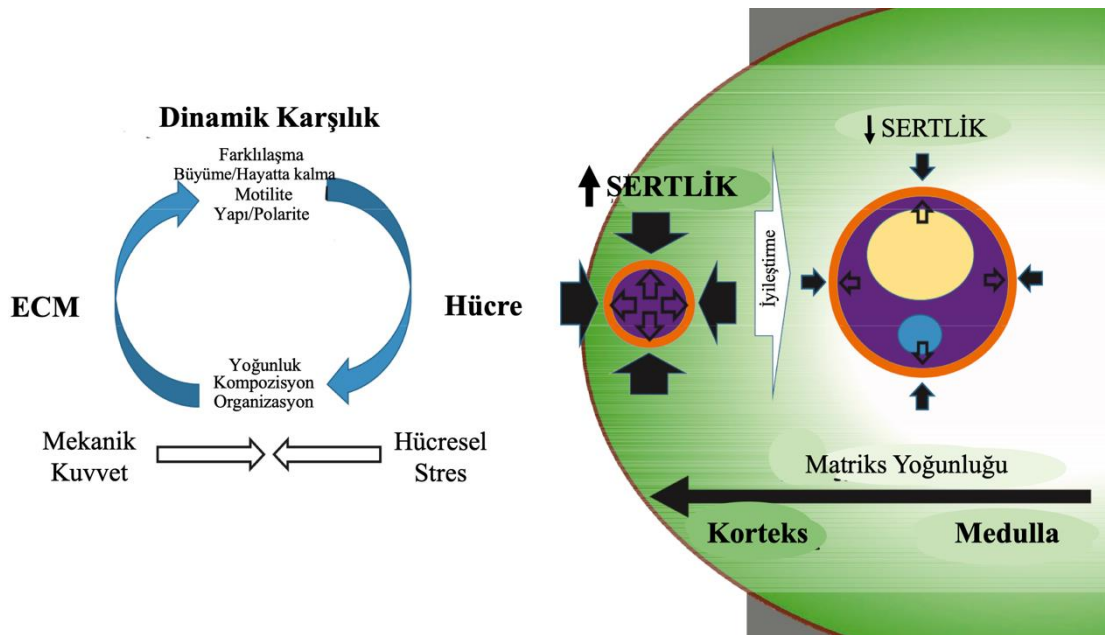
Şekil 22. PTEN/PI3K/AKT/FOXO3 sinyal yolağı ve modülatörleri (Lee, & Chang, 2019).

2.10.3. Primordiyal folikül aktivasyonunda mekanik uyarılma

Folikülogenez sürecinde birçok hormonal ve moleküler faktörlerin işlevsel olarak görev aldığı biliniyor olsa da bu süreçte ekstrasellüler matrisin (ECM, extra cellular matrix) rolü tam olarak bilinmemektedir. Ovaryum fonksiyonunun ve ovaryan hücrelerin mikroçevreleri arasındaki etkileşimlerde mekanobiyojinin de rolü olduğu düşünülmektedir. Primordiyal foliküllerin, kolajen bakımından zengin olan ovaryum korteksindeki lokalizasyonu ile foliküler düzenlenim sağlanır ve bu yapısal değişimin

korunması için katı bir fiziksel ortam sunulur. ECM sertliğinin de foliküler gelişimi ve oosit matürasyonunu sınırlayarak primordiyal foliküllerin puberteye kadar uyku halinde kalmasını sağlar. Gelişmekte olan diğer foliküllerin de ovaryum medullasına göçünde daha yumuşak ECM ile karşılaşarak matürasyonlarını kolayca gerçekleştirmektedirler. Böylece ECM sertliğindeki değişikliklerin foliküler gelişimde etkili olduğu görülmektedir (Fàbregues ve ark., 2021).

ECM'de oluşan mekanik kuvvet hücre tarafından algılanır ve hücre yapısı ve fonksiyonunda değişikliklere yol açar. Bu değişiklikler, mekanik sinyallemeyle birlikte gen ekspresyonunu ve hücre çekirdeğinin epigenetik yeniden yapılanmasını değiştirebilir, bu da ECM içeriğinde, bileşiminde ve organizasyonunda değişikliklere ve matrisin genel olarak yeniden şekillenmesine yol açabilir. Hücreler mekanik kuvveti algılar ve buna hücre içi kasılma gerilimiyle karşılık vererek hücresel stres yaratır. Bu şekilde kuvvetle üretilen mekanokimyasal sinyaller hem hücreyi hem de çevresini etkiler. Folikülogenezde sert dış ovaryum korteksindeki mekanik kuvvetler primordiyal folikül üzerinde etki ederek onun hareketsiz durumuna katkıda bulunur. Folikül içindeki gerilim kuvvetleri buna karşı koyar. Daha esnek olan iç medullanın yeniden düzenlenmesi mekanik gerilimi azaltır ve folikülün folikülogenez yoluyla ilerlemesine izin verir (Şekil 23) (Thorne ve ark., 2015).



Şekil 23. Hücre ile çevresi, özellikle ECM arasındaki çift yönlü etkileşimin dinamik karşılıklı kavramını gösteren şematik diyagram (Thorne ve ark., 2015).

Yapılan bir çalışmada primordiyal foliküllerin kolajen bakımından zengin olan ovaryum korteksi bölgesinde bulunduğu, foliküler düzenlenimi destekleyen ve büyüme sınırlandıran sert bir fiziksel ortam oluşturulduğu görülmüştür. Ayrıca matriks bileşenlerinin biyolojik yaşa ve foliküler matürasyonun aşamalarına bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Ouni ve ark., 2020). Yapılan başka bir çalışmada da fare ovaryumuna verilen fiziksel hasar sonucunda G-aktin'in F-aktin'e polimerizasyonunda geçici bir artış olduğu ve böylece Hippo sinyalini bozarak YAP fosforilasyonunu azaltıp nükleer YAP seviyelerinde artışa neden olduğu görülmüştür. Bu artış CCN büyüme faktörleri ve BIRC apoptoz inhibitörlerinin ekspresyonlarında artışa neden olmuştur (Hsueh, & Kawamura, 2020).

2.12. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, “infertilite nedenlerinden biri olan prematür ovaryan yetmezlik (POI) olgularında, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolü öncesi uygulanan intraovaryan PRP enjeksiyonu, ovaryan foliküllerin aktivasyonunu, PRP'nin etkisi dışında, hippo sinyal yolağı üzerinden enjeksiyon iğnesinin oluşturduğu mekanik uyarılma ile gerçekleştirir” hipotezinden yola çıkılarak; sıçanlarda deneysel POI modelinde KOH öncesi intraovaryan mekanik uyarma ve intraovaryan PRP enjeksiyonu uygulamasının ovaryan foliküllerin gelişimi üzerindeki etkisinin ve mekanizmasının karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

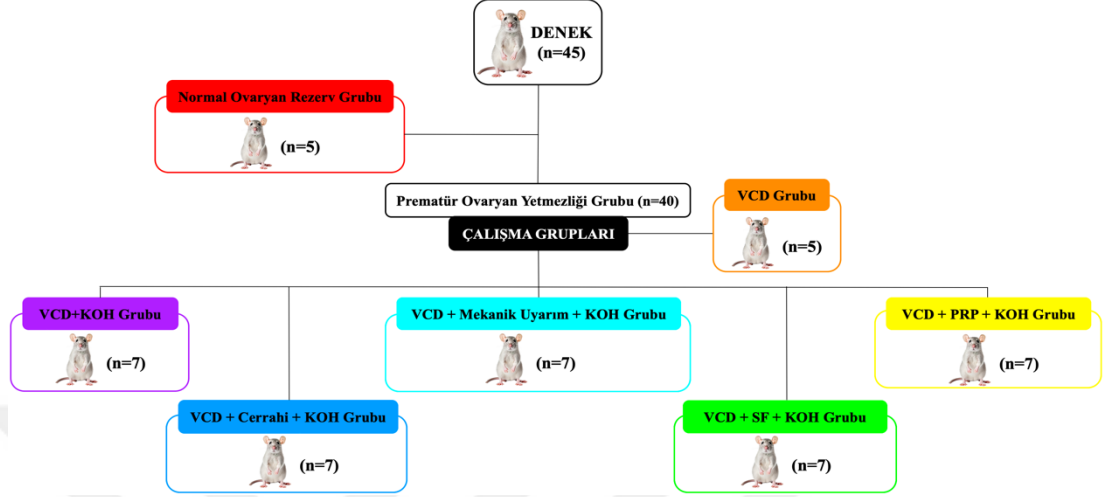
Tez çalışmamızın yapılması amacıyla Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan 28.02.2023 tarihli ve 2023-04/07 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır. Tez çalışması etik ilkeler çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmasında kullanılmak üzere Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Birimi (DENHAB)'nden ortalama 180-200 g ağırlığında, 60 günlük 45 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan temin edilmiştir. Sıçanlara herhangi bir besin ve su kısıtlaması uygulanmaksızın 12 saatlik aydınlık ve karanlık ışık döngüsünde, normal oda sıcaklığında, her bir kafeste en fazla 5 adet sıçan olacak şekilde DENHAB'da standart kafeslerde sıçanların takibi gerçekleştirilmiştir. Tez çalışması süresince uygulanan tüm deneysel işlemler DENHAB ve Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı araştırma ve uygulama laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Deney Grupları

Tez çalışması için temin edilen tüm deneklerin over rezervi açısından farklılık gösterebileceği göz önünde bulundurularak homojen bir dağılım sağlanması amacıyla, çalışma başlangıcında hassas tartı ile denek ağırlıkları ve Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile serum Anti-Müllerian Hormon (AMH) düzeyleri tayin edildi. Ölçümler sonucunda %25-75 dilim aralığında tayin edilen serum AMH değerleri, denek ağırlıkları da baz alınarak çalışmaya dahil edilirken; aralığın dışındaki denekler çalışmaya dahil edilmedi.

Tez çalışmasına dahil edilen denekler, normal ovaryan rezerv (NOR) grubu ve prematür ovaryan yetmezliği (POI) grubu olmak üzere 2 ana gruba ayrıldı. POI grubu ise 6 farklı alt gruba ayrıldı.

Tez çalışmasında oluşturulan 7 grup ve bu gruplara dahil edilen deneklerin sayısı Şekil 24’te şema olarak gösterilmiştir.



Şekil 24. Çalışma grupları ve alt grupları.

- **Normal Ovaryan Rezerv (NOR) Grubu (n=5):** Deneyin 1. günü kan örneği alınarak serum AMH düzeyi ölçülen ve sonrasında sakrifiye edilen denekler
- **Prematür Ovaryan Yetmezliği (POI) Grubu (n=40):** 15 gün boyunca VCD enjeksiyonu uygulanan denekler
 - **VCD Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonları sonrası kan örneği alınarak sakrifiye edilen denekler
 - **VCD + KOH Grubu (n=7):** VCD enjeksiyonları ardından KOH protokolü (9 gün) uygulaması sonrası sakrifiye edilen denekler
 - **VCD + Cerrahi + KOH Grubu (n=7):** VCD enjeksiyonları ardından cerrahi işlem ve KOH protokolü (9 gün) uygulaması sonrası sakrifiye edilen denekler
 - **VCD + Mekanik Uyarım + KOH Grubu (n=7):** VCD enjeksiyonları ardından mekanik uyarım ve KOH protokolü (9 gün) uygulaması sonrası sakrifiye edilen denekler
 - **VCD + SF + KOH Grubu (n=7):** VCD enjeksiyonları ardından intraovaryan serum fizyolojik ve KOH protokolü (9 gün) uygulaması sonrası sakrifiye edilen denekler
 - **VCD + PRP + KOH Grubu (n=7):** VCD enjeksiyonları ardından intraovaryan PRP ve KOH protokolü (9 gün) uygulaması sonrası sakrifiye edilen denekler

3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulama Yöntemleri

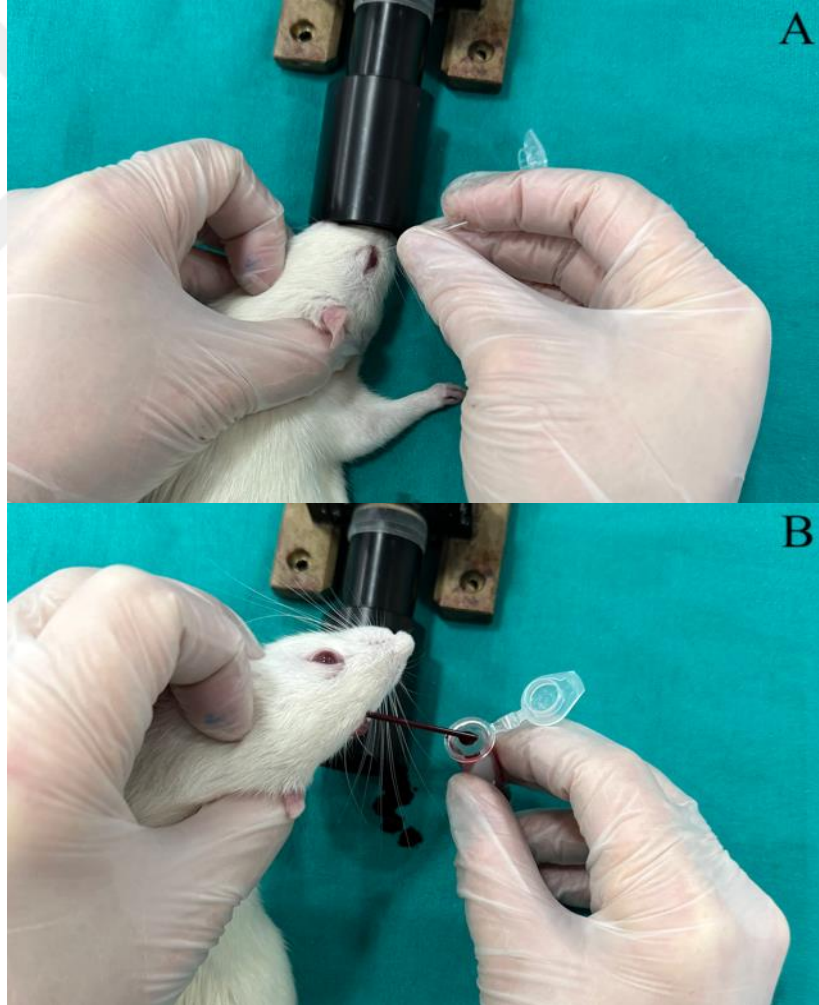
Tez çalışması enjeksiyonlarında kullanılan kimyasal maddeler ve uygulama yöntemleri Tablo 2’de açıklanan biçimde ve literatür bilgileri de göz önünde bulundurularak enjeksiyon günleri boyunca aynı zaman diliminde gerçekleştirildi. Enjeksiyonlar için kimyasal maddelerin dozları deneklerin vücut ağırlıkları baz alınarak belirlendi. Çalışma grupları ve kimyasal madde enjeksiyonlarının zamanları Şekil 25’te şema olarak gösterilmiştir.

Tablo 2. Enjeksiyonlarda kullanılan kimyasal maddeler ve uygulama yöntemleri.

ETKEN MADDE	ÇÖZÜCÜ MADDE	DOZ	SÜRE	UYGULAMA YÖNTEMİ
4-Vinylcyclohexene Diepoxide (VCD)	DMSO (1 ml/kg)	160 mg/kg/gün (Frye ve ark., 2012)	15 gün	Subkutan
Dimetil Sülfoksit (DMSO) (VCD sham)	-	1 ml/kg/gün (Frye ve ark., 2012)	15 gün	Subkutan
Plateletten Zengin Plazma (PRP)	-	1 doz (Ahmadian ve ark., 2020)	1 gün	İntraovaryan
Serum Fizyolojik (SF) (PRP sham)	-	PRP ile aynı hacim (Ahmadian ve ark., 2020)	1 gün	İntraovaryan
Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) Agonist	-	1,5µg/100g/gün (Gong ve ark., 2015)	7 gün	İntraperitoneal
Gebe Kısırak 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 aynı hacim	7 gün	İntraperitoneal

3.4. Deneklerden Kan Örneklerinin Alınması

Denekler sevofluran inhalasyon anestezisi altındayken kan örnekleri retro-orbital olarak alındı. Derin anestezi etkisindeki deneklerin kafası ve çenesi sabit bir şekilde tutularak parmak yardımıyla göz kapağı yukarı doğru çekildi ve middorsal şekilde orbital ven pleksuslar mikrokapillar tüp aracılığıyla yırtıldı, steril eppendorf tüplere yaklaşık 500 µl kanın dolması sağlandı. Alınan kan örnekleri 15 dakika boyunca 4500 rpm’de santrifüj edildi ve santrifüj sonrası serum kısmı mikropipet yardımı ile yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı. Elde edilen kan serumları, serum anti-Müllerian Hormon (AMH) seviyelerinin Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile değerlendirilmesi için -20°C’ye kaldırıldı (Şekil 26A ve Şekil 26B).



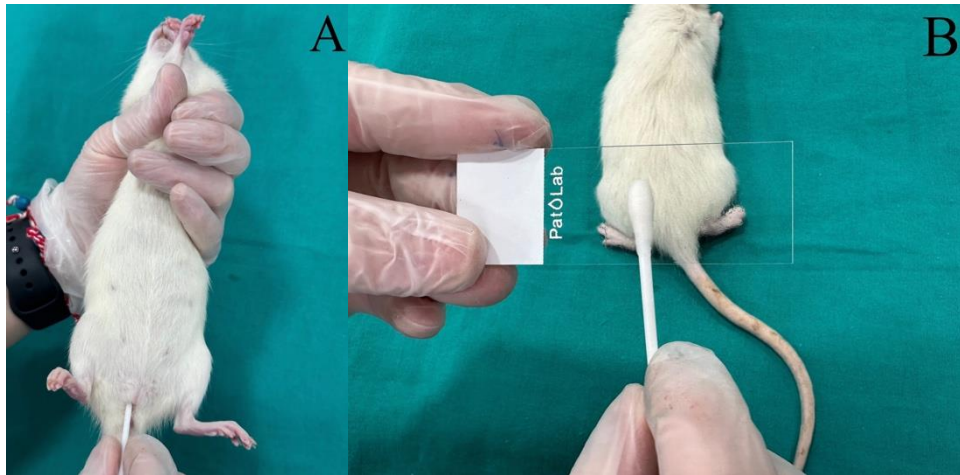
Şekil 26. (A) ve (B) mikrokapillar tüp ile yırtılan orbital ven pleksuslarından kan örneklerinin alınması.

3.5. Deneysel Prematür Ovaryan Yetmezliği (POI) Hayvan Modeli Oluşturulması

Tez çalışmasında deneysel prematür ovaryan yetmezliği (POI) hayvan modeli, 15 gün süresince, 160 mg/kg/gün olacak şekilde, günde tek doz 4-Vinilsikloheksen Diepoksit (VCD) subkütan enjeksiyonu yapılarak gerçekleştirildi (Frye ve ark., 2012). Deneysel POI hayvan modelinin oluşturulduğunun doğrulanması için ovaryan doku kesitlerinin histolojik değerlendirilmesinde gelişimin farklı aşamalarındaki folikül sayıları ve çalışmanın 1. ve 15. günlerinde alınan kan serumu örneklerinde Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile değerlendirilen serum anti-Müllerian Hormon (AMH) seviyeleri karşılaştırıldı.

3.6. Vajinal Smear Yöntemi İle Östrus Siklusu Evrelerinin Tayin Edilmesi

Tez çalışması süresince, uygulanacak enjeksiyon ve deneklerin sakrifikasyonu işlemlerinin gerçekleştirilebilmesi amacıyla deneklerde östrus siklusu evrelerinin tayin edilmesi için vajinal smear tekniği kullanıldı. Vajinal smear incelemesi için deneklerden vajinal sürüntü yayma fırçaları ile alınarak lam üzerinde yayıldı (Şekil 27A ve Şekil 27B) ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kuruyan preparatlar Tablo 3'teki protokole göre hazırlandı. Hazırlanan preparatların mikroskopik incelemesinde östrus siklusu aşamaları Tablo 4'teki tanımlara göre tayin edildi.



Şekil 27. Vajinal smear inceleme için alınan vajinal sürüntü (A) ve sürüntünün lama yayılması (B).

Tablo 3. Vajinal smear preparatlarının boyama protokolü.

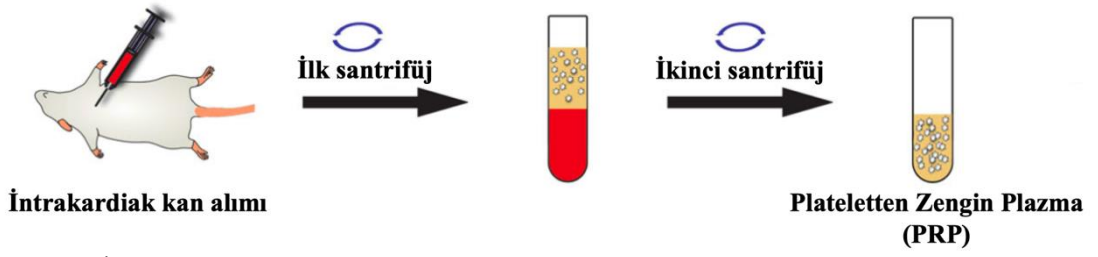
1	%70'lik alkol	10 dips
2	Su	1 dips
3	Harris'in Hematoksileni	1 dk
4	Su	Su rengi berraklaşincaya kadar
5	Eozin	5 dips
6	Su	Su rengi berraklaşincaya kadar
7	Kurutma	Preparatlar tamamen kuruyuncaya kadar
8	Kapatma	

Tablo 4. Östrus siklusu evrelerinin tayin edilme kriterleri.

Proöstrus	Nükleus içeren epitel hücrelerinin daha yoğun gözlemlendiği, lökositlerin gözlemlenmediği preparatlar
Östrus	Nükleus içeren süperfisiyal hücrelerin %75, keratinize hücrelerin %25 oranda gözlemlendiği preparatlar
Metaöstrus	Nükleus içeren hücreler ve kornifiye hücrelerle birlikte çok sayıda lökositin gözlemlendiği preparatlar
Diöstrus	Neredeyse tamamen lökositlerin gözlemlendiği preparatlar

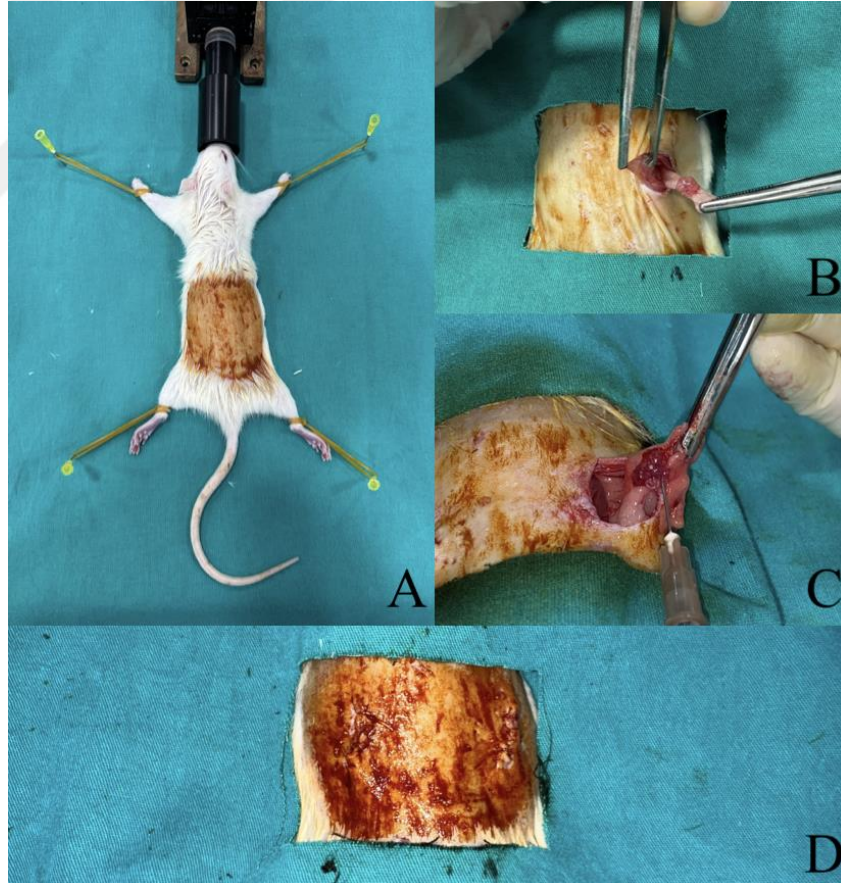
3.7. Plateletten Zengin Plazma (PRP) Eldesi ve İntraovaryan PRP Enjeksiyonu

Sevofluran inhalasyon anestezisi etkisindeki tek erkek denekten, steril koşullar altında intrakardiak olarak elde edilen kan örneği, sitrat bazlı antikoagülan içeren tüpe alındı ve spesifik olarak istenen platelet konsantrasyonunu verebilen ticari kit (T-Biyoteknoloji Laboratuvarı, Bursa, TÜRKİYE) ile plateletten zengin plazma (PRP) elde edildi. PRP kiti üretici firmasının belirlediği kullanım talimatları baz alınarak 4 dakika boyunca 1150 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası 5 mL'lik tüpe bağlı 16G'lik bir enjektör buffy coat katmanına kadar içeri doğru ilerletilip enjektör ucu döndürülerek PRP aspirasyonu gerçekleştirildi. Aspire edilen PRP çözeltisi ayrı bir steril tüpe aktarıldı ve hafifçe çalkalandı (Fraidakis ve ark., 2023). Platelet sayısının enjeksiyonların tamamında sabit olması amacıyla her bir deneğe enjeksiyonu yapılacak olan hücre sayım cihazı (Celltac E.S., Nihon Kohden, Tokyo, JAPONYA) kullanılarak kan örneği ve elde edilen PRP çözeltisinde platelet hücre sayısının ölçümü gerçekleştirildi. Ölçüm sonucunda kan örneğinde 175×10^3 platelet/ μL tespit edildi (Şekil 28).



Şekil 28. İntrakardiak olarak alınan sıçan tam kanından PRP elde edilmesi (Ahmadian ve ark., 2020).

Son doz VCD enjeksiyonundan bir gün sonra, 16. günde, denek sevofluran anestezisi etkisindeyken dorsalden gerçekleştirilen bilateral insizyon ile ovaryumların her ikisine de yaklaşık $21,5 \times 10^5$ platelet/15 μ l konsantrasyonda intraovaryan PRP enjeksiyonu gerçekleştirildi. Enjeksiyon sonrasında insizyon alanı sütüre edilerek kapatıldı (Şekil 29). Serum fizyolojik enjeksiyon grubunu oluşturan deneklere de PRP yerine yine aynı miktarda serum fizyolojik enjeksiyonu yapıldı.



Şekil 29. (A), (B), (C), (D) Sevofluran inhalasyon anestezisi altındaki sıçana intraovaryan PRP enjeksiyonu.

3.8. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon (KOH) Protokolü

Primordiyal foliküllerin aktivasyonunun gerçekleşmesi için 4 haftalık bir zaman dilimi kadar beklendikten sonra intraovaryan enjeksiyonların ardından östrus siklusu düzenli seyreden deneklere kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokolü uygulandı. KOH uygulamasına başlanmadan önce deneklerde östrus siklusunun tayini amacıyla vajinal smear ile örnekler alındı. Östrus siklusunun proöstrus evresinde bulunan deneklere, KOH protokolünden biri olan ‘GnRH long agonist protokolü’ uygulandı. Siklusun 3-9. günleri arasındaki her gün intraperitoneal olarak 1,5µg/100 g doz GnRH agonist enjeksiyonu (Cetrotide; Merck, USA) uygulandı. Siklusun 9. günü intraperitoneal olarak 5IU/100 g tek doz PMSG (Oviser; Hipra, İspanya) enjeksiyonu uygulandı. PMSG enjeksiyonundan 28 saat geçtikten sonra intraperitoneal olarak 10IU/100 g tek doz hCG (Ovitrelle; Serono, USA) enjeksiyonu uygulanarak ovulasyonun uyarılması sağlandı (Gong ve ark., 2015).

3.9. Deneklerin Sakrifiye Edilmesi ve Doku Eldesi

Deneklerin sakrifikasyonu, deneklere uygulanan enjeksiyonların tamamlanması sonrasında östrus siklusunun östrus evresinde gerçekleştirildi. Denekler, sevofluran inhalasyon anestezisi altındayken abdominal bölgeden açılarak bilateral ooferektomi işlemi uygulandı (Şekil 30). Sağ ooferektomi ile alınan ovaryum dokusu Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) tekniğinde kullanılmak amacıyla -80°C derin dondurucuya kaldırılırken; sol ooferektomi ile alınan ovaryum dokusu hassas terazi ile tartılıp ağırlığı ölçüldükten sonra histomorfolojik değerlendirmede kullanılmak üzere 1 hafta boyunca %10'luk formalin solüsyonunda bekletilerek immersiyon fiksasyonu gerçekleştirildi. Bilateral ooferektomi işlemi tamamlandıktan sonra deneklerin ötanazisi servikal dislokasyon ile yapıldı.



Şekil 30. Ooferektomi işlemi ile elde edilen ovaryum dokusu.

3.10. Doku Takibi

Bir hafta boyunca fiksasyonu gerçekleştirilen ovaryum dokularının histomorfolojik olarak değerlendirilmesi amacıyla fiksasyon sonrasında doku takibi Tablo 5'te görüldüğü şekilde gerçekleştirildi. Doku takibi tamamlanan ovaryum dokuları parafin bloklara gömüldü.

Tablo 5. Doku takibi protokolü.

	1. GÜN			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'lık alkol	2 saat	8	Parafin-I	1,5 saat
4	%96'lık alkol-I	2 saat	9	Parafin-II	1,5 saat
5	%96'lık alkol-II	Gece boyunca	10	Parafin-III	1 saat
			11	Parafine Gömme	

3.11. Kesit Alınması

Doku takibinde parafin bloklara gömülen ovaryum dokularından, hematoksil-eozin (H&E) boyamasında kullanılmak amacıyla mikrotom (Leica, RM 2245) aracılığıyla 5 µm kalınlığında sıralı kesitler halinde, ovaryum dokusu boyunca 5'er kesit atlanarak pozitif şarjlı lamalar üzerine kesitler alındı. Başlangıç kesiti olarak en az

2-3 sekonder folikülün görüldüğü kesit kabul edildi ve devamında gelen 5 farklı seviyeden kesit alınarak bu kesitlere hematoksilin-eozin (H&E) boyaması gerçekleştirildi.

3.12. Hematoksilin-Eozin (H&E) Boyaması

Histomorfolojik değerlendirme ve folikül sayımında kullanılmak üzere belirlenen parafin kesitler 60°C'lik etüvde gece boyunca bekletildi ve ertesi gün Tablo 6'da verilen hematoksilin-eozin (H&E) boyaması protokolüne göre boyandı.

Tablo 6. Hematoksilin-Eozin boyama protokolü.

1	Ksilen-I	20 dk
2	Ksilen-II	20 dk
3	Kurutma	Kesitler tamamen kuruyana kadar
4	%96'lık alkol	3 dk
5	%90'lık alkol	3 dk
6	%70'lik alkol	3 dk
7	Akan su	3 dk
8	Harris'in Hematoksileni	8 dk
9	Akan su	Su rengi berraklaşınca kadar
10	%1'lik Asit alkol	1 dips
11	Akan su	5 dk
12	Amonyaklı su	7 dips
13	Akan su	3 dk
14	Eozin	3 dk
15	Akan su	Su rengi berraklaşınca kadar
16	%70'lik alkol	10 dips
17	%90'lık alkol	10 dips
18	%96'lık alkol	10 dips
19	Kurutma	Kesitler tamamen kuruyana kadar
20	Ksilen-III	20 dk
21	Ksilen-IV	20 dk
22	Kapatma	

3.13. Ovaryan Foliküllerin Sayımı

Hematoksilen-eozin (H&E) boyaması protokolü gerçekleştirilen ovaryum dokusu kesitlerinde, ışık mikroskobu yardımıyla ovaryan foliküllerin sınıflandırması ve sayımı gerçekleştirildi. Parafin bloklardan alınan kesitlerde, en az 2-3 sekonder folikülün gözlemlendiği kesit başlangıç kesiti olarak kabul edildi. Kabul edilen başlangıç kesitinden itibaren alınan her kesitin arasından 5'er kesit atlanarak kesitler lamlara alındı. Hazırlanan lamlardaki 9 kesit üzerinde ovaryan folikül sınıflandırması ve sayımı, Tablo 7'de belirtilen değerlendirme kriterlerine göre yapıldı.

Tablo 7. Ovaryan folikül sınıflandırması (Yan ve ark., 2018).

Primordiyal Folikül	Primer oosit ve etrafını çevreleyen tek katlı yassı pregranüloza hücre tabakası
Unilaminar Primer Folikül	Primer oosit ve etrafını çevreleyen tek katlı kübik granüloza hücre tabakası, zona pellusida oluşmaya başlamış
Multilaminar Primer Folikül	Primer oosit ve etrafında henüz antral boşluğun görülmediği, ≥ 2 sıralı kübik granüloza hücre tabakası, zona pellusida belirgin
Sekonder Folikül	Primer oosit-zona pellusida ve etrafında >5 sıralı granüloza hücre tabakası, belirgin teka tabakası ve çok sayıda küçük antral boşluklar
Graaf Folikül	Kumulus-oosit kompleksi, tek antral boşluk ve belirgin teka interna-teka eksterna tabakaları
Atretik Folikül	Oosit ve granüloza tabakasında bütünlük kaybı ya da kaybolmuş granüloza tabakası

3.14. ELISA

Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile kan serumunda serum AMH (katalog no: E0456Ra, BT LAB, Sangay) düzeyleri ve eksiz edilen ovaryum dokularının homojenatlarında TAZ (katalog no: E2471Ra, BT LAB, Sangay), NAIP (katalog no: E3418Ra, BT LAB, Sangay) ve CTGF (katalog no: E0356Ra, BT LAB, Sangay) protein düzeyleri üretici firma yönlendirmeleri dikkate alınarak ölçüldü. ELISA yöntemi çalışılırken kan serumu ve doku homojenatı örnekleri ile standartlar, mikropipet yardımıyla antikor ile kaplanmış olan ELISA plak kuyularına yüklendi. ELISA plak kuyularının tamamına biyotinlenmiş antikor

solüsyonu yüklenerek 1 saat boyunca 37°C sıcaklıkta ve karanlık ortamda inkübasyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra ELISA kiti içerisindeki yıkama solüsyonu ile tüm örnekler 3 defa yıkandı. Yıkama sonrası streptavidin-HRP yüklenerek 1 saat boyunca 37°C sıcaklıkta ve karanlık ortamda inkübasyonu gerçekleştirildi. İnkübasyon tamamlandıktan sonra yıkama solüsyonu ile tüm örnekler 5 defa yıkandı. Yıkama sonrası kromojen substrat solüsyonu yüklenerek 20 dakika boyunca 37°C sıcaklıkta ve karanlık ortamda inkübasyonu gerçekleştirildi. Son aşamada enzim reaksiyonunu sonlandırmak için eklenen solüsyon yüklendi ve 5 dakika içinde 450 nm dalga boyu ile örneklerin optik dansiteleri ölçüldü. Örneklerin analit konsantrasyon hesaplamaları standart eğri baz alınarak yapıldı. AMH, TAZ, NAIP ve CTGF ELISA kitlerinin sırasıyla sensitivitesi 0.051 ng/mL, 10.57 ng/L, 0.11 ng/mL ve 0.012 ng/mL; ölçüm aralığı 0.1-40 ng/mL, 20-3800 ng/L, 0.25-16 ng/mL ve 0.05-10 ng/mL; çalışma içi CV <math><8\%</math>, <math><8\%</math>, <math><8\%</math> ve <math><8\%</math>; çalışmalar arası CV <math><10\%</math>, <math><10\%</math> ve <math><10\%</math> şeklindeydi.

3.15. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, SPSS v.28 (IBM) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Shapiro Wilk Testi ile verilerin parametrik veya non-parametrik dağılım gösterdiklerinin tayini yapıldıktan sonra; parametrik dağılım gösteren verilerde iki grup arasında yapılacak karşılaştırmalarda Student-T Testi; ikiden fazla grup arasında yapılacak karşılaştırmalarda One-Way ANOVA Testi; gruplar arası yapılacak ikili karşılaştırmalarda Post Hoc Tukey Testi uygulandı. Elde edilen sonuçlar %95'lik güven aralığında değerlendirildi ve $p<0,05$ düzeyindeki sonuçlarda istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu kabul edildi. İstatistik analizler ile elde edilen verilerin grafiklendirilmesinde GraphPad yazılımı kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. Denek Ağırlık Ölçümleri

4.1.1. Denek vücut ağırlık ölçümleri

Tez çalışmasındaki tüm gruplarda yer alan deneklere 15 gün boyunca subkutan olarak gerçekleştirilen VCD enjeksiyonlarının başladığı gün (G1) ve VCD enjeksiyonlarının bittiği gün (G15) vücut ağırlık ölçümleri yapıldı. Ağırlık ölçüm sonuçları gruplar arasında karşılaştırıldı.

4.1.1.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin vücut ağırlık ölçümleri

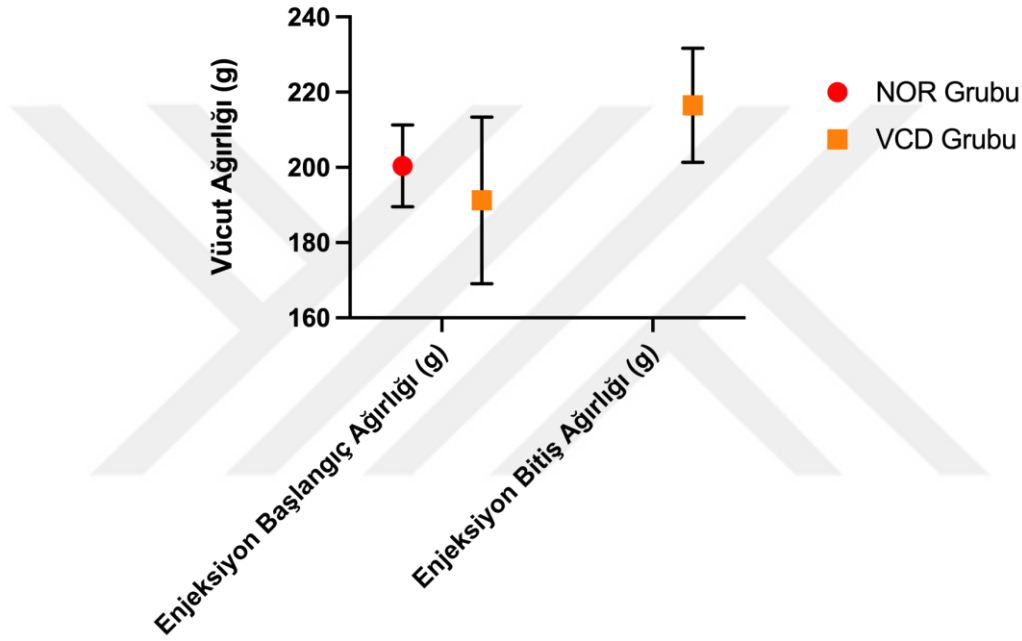
Normal ovaryan rezerve sahip deneklerin yer aldığı NOR grubunda; çalışmanın başlangıç günü (G1) denek vücut ağırlıklarının ölçümleri yapıldı ve herhangi bir enjeksiyon işlemi gerçekleştirilmeden, vaginal smear değerlendirmesi ile östrus siklus takibi yapılarak, östrus evresinde sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Prematür ovaryan yetmezliğine sahip deneklerin yer aldığı VCD grubunda; henüz enjeksiyonların başlamadığı, çalışmanın başlangıç gününde ve 15 gün boyunca subkutan olarak gerçekleştirilen VCD enjeksiyonlarının bittiği günde (G15) denek vücut ağırlıklarının ölçümleri yapıldı ve sonrasında deneklerin sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi. NOR grubu ve VCD grubunda gerçekleştirilen denek vücut ağırlık ölçümleri enjeksiyonların başlangıç günü sırasıyla $200,4 \pm 10,88$ g ve $191,25 \pm 22,15$ g olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0,656$) (Tablo 8, Grafik 1).

Tablo 8. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin vücut ağırlıklarının ölçüm sonuçları.

	Normal Ovaryan Rezerv Grubu (NOR Grubu)	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	p**
Enjeksiyonların başlangıç günü (G1) vücut ağırlıkları (g)*	200,40 ± 10,88	191,25 ± 22,15	0,656
Enjeksiyonların bitiş günü (G15) vücut ağırlıkları (g)*	-	216,50 ± 15,19	-

*Veriler ortalama ağırlık ve SD (Standart Deviasyon) (g) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin vücut ağırlıklarının ortalamaları.

4.1.1.2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin vücut ağırlık ölçümleri

Prematür ovaryan yetmezliğine sahip deneklerin yer aldığı VCD grubunda 15 gün boyunca subkutan olarak gerçekleştirilen VCD enjeksiyonlarının başlangıcında (G1) ve enjeksiyonların sonunda (G15) deneklerin sakrifiye edilmeden hemen önce denek vücut ağırlıklarının ölçümleri yapıldı. VCD+KOH grubunda ise 15 gün boyunca subkutan olarak gerçekleştirilen VCD enjeksiyonlarının başlangıcında (G1) ve VCD enjeksiyonu ardından uygulanan KOH protokolü tamamlandıktan sonra (yaklaşık G55) deneklerin sakrifiye edilmeden hemen önce denek vücut ağırlıklarının ölçümleri

yapıldı. VCD grubu ve VCD+KOH grubunda gerçekleştirilen denek vücut ağırlık ölçümleri enjeksiyonların başlangıç günü (G1) sırasıyla 191,25±22,15 g ve 197,57±13,11 g olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi (p=0,509). VCD grubu (G15) ve VCD+KOH grubunda (G55) gerçekleştirilen denek vücut ağırlık ölçümleri sırasıyla 216,5±15,19 g ve 244,29±13,91 g olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı fark olduğu belirlendi (p=0,003) (Tablo 9, Grafik 2).

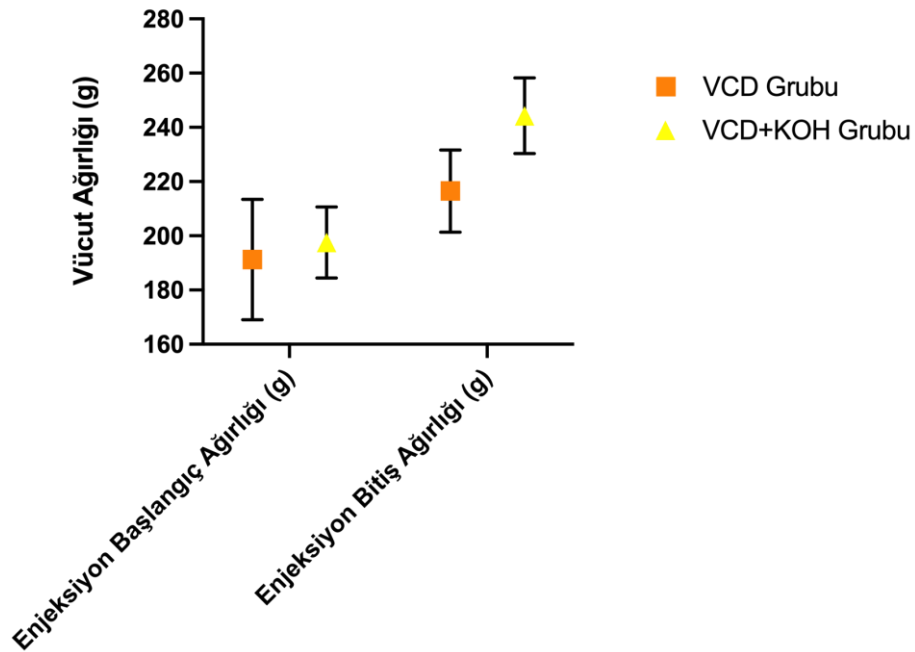
Tablo 9. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin vücut ağırlıklarının ölçüm sonuçları.

	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	VCD+KOH Grubu	p**
Enjeksiyonların başlangıç günü (G1) vücut ağırlıkları (g)*	191,25 ± 22,15	197,57 ± 13,11	0,509
Enjeksiyonların bitiş günü (G15 ve G55) vücut ağırlıkları (g)*	216,50 ± 15,19 [†]	244,29 ± 13,91 [†]	0,003

♦VCD grubu ile VCD +KOH grubu kıyaslandığında vücut ağırlıkları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,003).

*Veriler ortalama ağırlık ve SD (Standart Deviasyon) (g) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin vücut ağırlıklarının ortalamaları.

4.1.1.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin vücut ağırlık ölçümleri

POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve çalışmanın deney gruplarını oluşturan POI modeli oluşturulduktan sonra cerrahi yolla açılıp kapatılan (VCD+Cerrahi+KOH grubu), ovaryum dokusuna boş enjeksiyon uygulaması ile mekanik yolla uyarılan (VCD+Mekanik+KOH grubu), ovaryum içine PRP enjeksiyonu uygulanan (VCD+PRP+KOH grubu), ovaryum içine SF enjeksiyonu uygulanan (VCD+SF+KOH grubu) ve tüm bu uygulamaların ardından kontrollü ovaryan hiperstimülasyon yapılarak etkinliğinin değerlendirildiği deneklerin VCD enjeksiyonlarının başlangıcında (G1) ve sakrifikasyon öncesinde (G55) vücut ağırlık ölçümleri yapıldı. VCD enjeksiyonlarının başlangıcında vücut ağırlık ölçümleri yapılan deneklerin ortalama ağırlıklarına bakıldığında VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH grupları için sırasıyla 197,57±13,11 g, 186,86±21,24 g, 187,71±20,16 g, 201,00±10,60 g ve 194,43±9,86 g olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak bu gruplar arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi (p=0,389). Sakrifikasyon öncesinde vücut ağırlık ölçümleri yapılan deneklerin ortalama ağırlıklarına bakıldığında ise aynı gruplar için sırasıyla 244,29±13,91 g, 245,00±15,91 g, 229,29±18,06 g, 251,57±25,23 g ve 256,86±18,55 g olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak bu gruplar arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi (p=0,099) (Tablo 10, Grafik 3 ve Grafik 4).

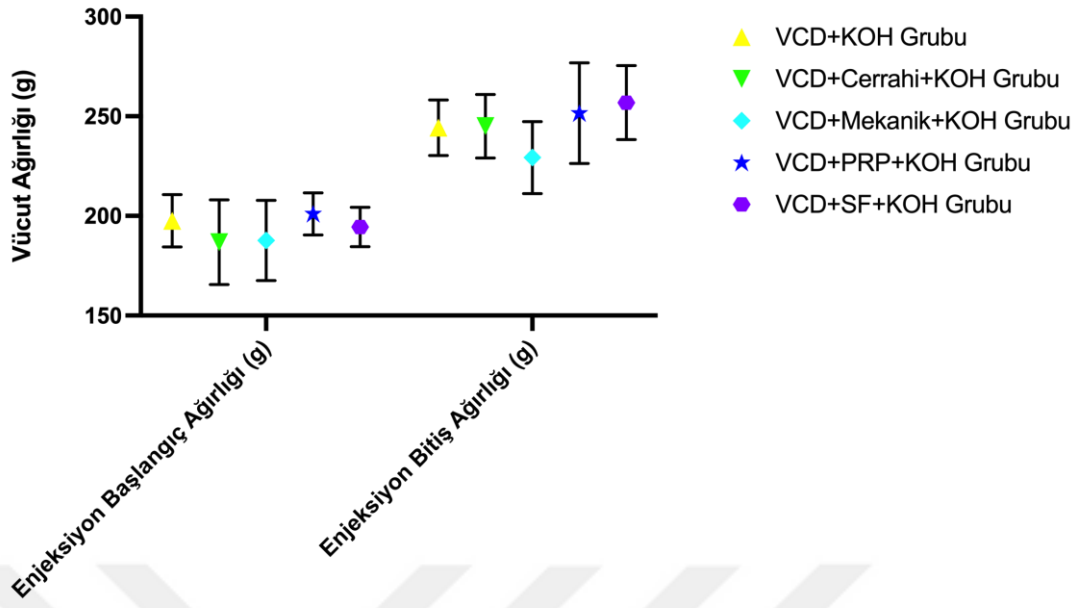
Tablo 10. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin vücut ağırlıklarının ölçüm sonuçları.

	VCD + KOH Grubu	VCD + Cerrahi + KOH Grubu	VCD + Mekanik + KOH Grubu	VCD + PRP + KOH Grubu	VCD + SF + KOH Grubu	p**,***
Enjeksiyonların başlangıç günü (G1) vücut ağırlıkları (g)*	197,57 ± 13,11	186,86 ± 21,24	187,71 ± 20,16	201,00 ± 10,60	194,43 ± 9,86	0,389
Enjeksiyonların bitiş günü (G55) vücut ağırlıkları (g)*	244,29 ± 13,91	245,00 ± 15,91	229,29 ± 18,06	251,57 ± 25,23	256,86 ± 18,55	0,099

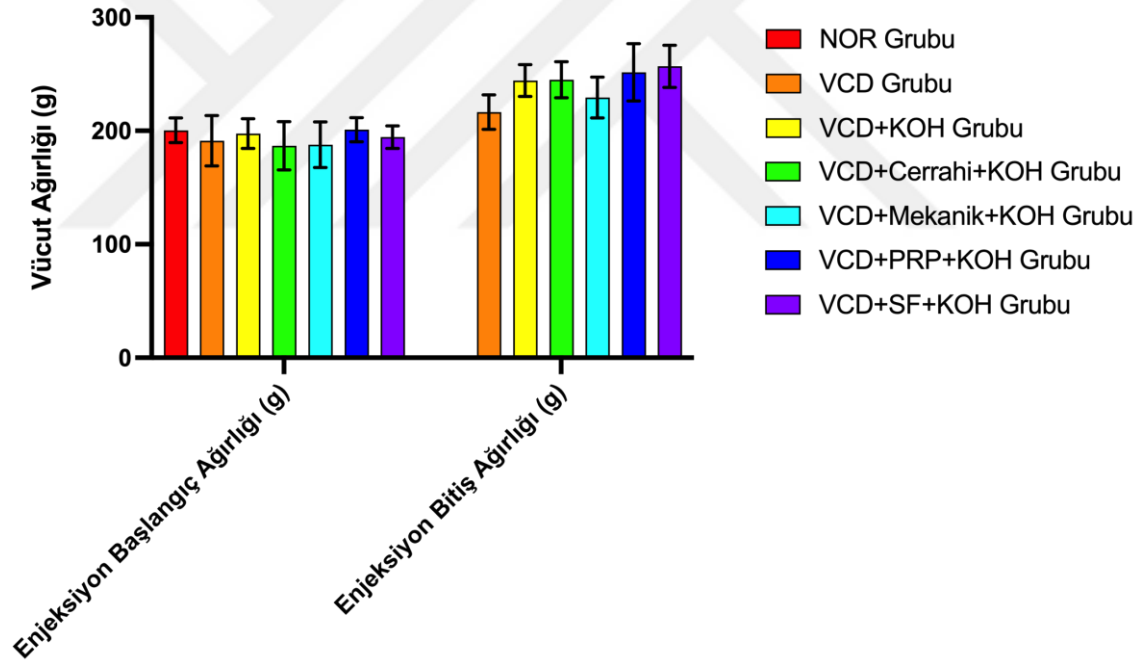
*Veriler ortalama ağırlık ve SD (Standart Deviasyon) (g) olarak verildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Post Hoc Tukey Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 3. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin vücut ağırlıklarının ortalamaları.



Grafik 4. Enjeksiyon başlangıcı ve enjeksiyon bitişinde deneklerin vücut ağırlıklarının ölçüm ortalamalarının tüm gruplardaki karşılaştırması.

4.1.2. Denek ovaryum ağırlık ölçümleri

Tez çalışmasındaki tüm gruplarda yer alan denekler sakrifiye edilmeden önce sevofluran inhalasyon anestezisi altındayken ovaryumları eksize edilerek, dokuların ağırlık ölçümleri yapıldı. Ağırlık ölçüm sonuçları gruplar arasında karşılaştırıldı.

4.1.2.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR Grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD Grubu) deneklerin ovaryum ağırlık ölçümleri

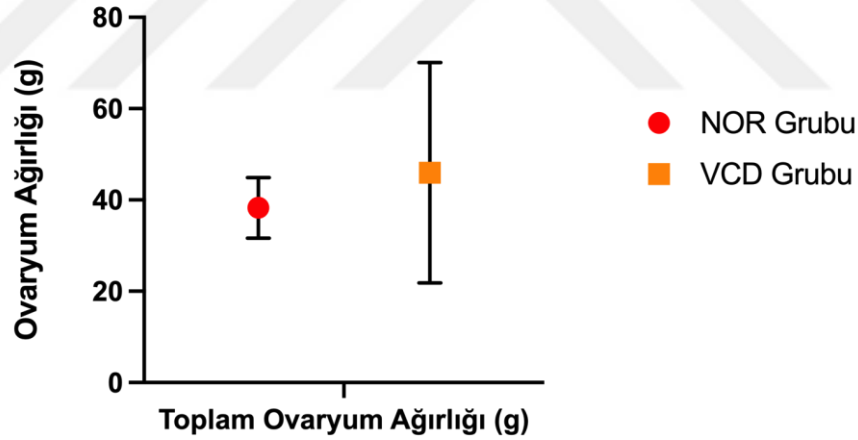
NOR grubunda ve POI modeli oluşturulan grupta VCD enjeksiyonlarının bittiği gün sakrifikasyon sonrası denek ovaryumları eksize edilerek ovaryum ağırlık ölçümleri yapıldı. NOR grubu ve VCD grubunda ovaryum ağırlık ölçümleri sırasıyla $38,28 \pm 6,62$ g ve $45,98 \pm 24,115$ g olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,418$) (Tablo 11, Grafik 5).

Tablo 11. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin ovaryum ağırlıklarının ölçüm sonuçları.

	Normal Ovaryan Rezerv Grubu (NOR Grubu)	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	p**
Toplam Ovaryum Ağırlığı (mg)*	$38,28 \pm 6,62$	$45,98 \pm 24,115$	0,418

*Veriler ortalama ağırlık ve SD (Standart Deviasyon) (mg) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 5. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin ovaryum ağırlıklarının ortalamaları.

NOR grubunda ve POI modeli oluşturulan grupta VCD enjeksiyonlarının bittiği gün sakrifikasyon sonrası denek ovaryum dokularının makroskobik karşılaştırılması Şekil 31’de gösterilmektedir. VCD grubuna ait ovaryum dokusunun NOR grubuna kıyasla daha küçük olduğu görülmektedir.



Şekil 31. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerden eksise edilen ovaryum dokularının makroskobik görüntüsü.

4.1.2.2. POI grubu (VCD Grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH Grubu) oluşturan deneklerin ovaryum ağırlık ölçümleri

POI grubu (VCD grubu) ve POI modeli oluşturulduktan sonra kontrollü ovaryan hiperstimülasyon uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin sakrifikasyon sonrası ovaryum ağırlık ölçümleri yapıldı. VCD grubu ve VCD+KOH grubunda gerçekleştirilen denek ovaryum ağırlık ölçümleri sırasıyla $45,98 \pm 24,115$ g ve $82,04 \pm 13,24$ g olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak bu iki grup arasında anlamlı fark olduğu belirlendi ($p=0,004$) (Tablo 12, Grafik 6).

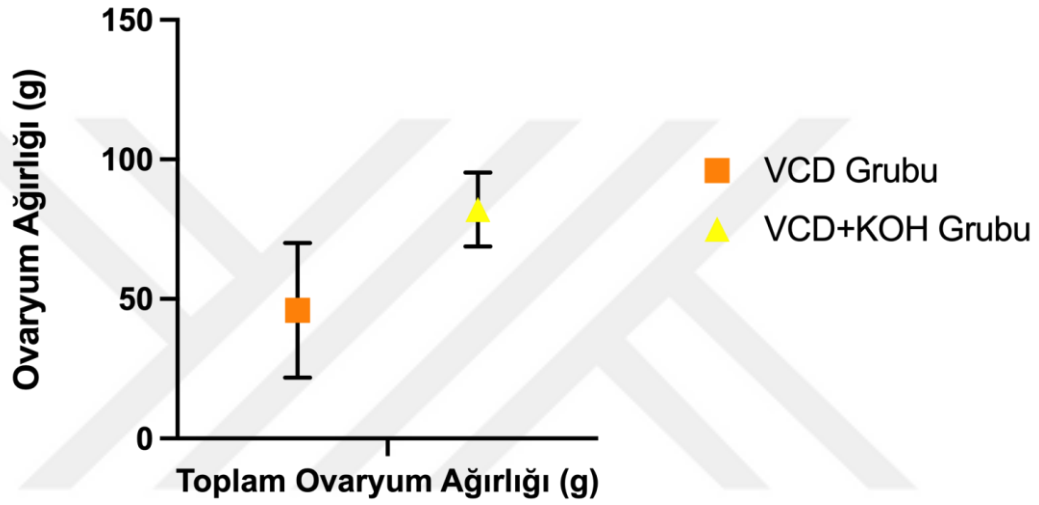
Tablo 12. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin ovaryum ağırlıklarının ölçüm sonuçları.

	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	VCD+KOH Grubu	p**
Toplam Ovaryum Ağırlığı (mg)*	45,98 ± 24,115 [♦]	82,04 ± 13,24 [♦]	0,004

♦VCD grubu ile VCD+KOH grubu kıyaslandığında toplam ovaryum ağırlığı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,004).

*Veriler ortalama ağırlık ve SD (Standart Deviasyon) (mg) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 6. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin ovaryum ağırlıklarının ortalamaları.

4.1.2.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH Grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin ovaryum ağırlık ölçümleri

POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve çalışmanın deney gruplarını oluşturan POI modeli oluşturulduktan sonra cerrahi yolla açılıp kapatılan (VCD+Cerrahi+KOH grubu), ovaryum dokusuna boş enjeksiyon uygulanarak mekanik yolla uyarılan (VCD+Mekanik+KOH grubu), ovaryum içine PRP enjeksiyonu uygulanan (VCD+PRP+KOH grubu), ovaryum içine SF enjeksiyonu uygulanan (VCD+SF+KOH grubu) ve tüm bu uygulamaların ardından kontrollü ovaryan hiperstimülasyon yapılarak etkinliğinin değerlendirildiği deneklerin sakrifikasyon sonrası eksize edilen ovaryum dokularının ağırlık ölçümleri yapıldı. VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH grupları için ovaryum ağırlıkları sırasıyla 82,04±13,24 g,

85,24±11,71 g, 86,63±14,97 g, 104,71±14,96 g ve 102,71±15,29 g olarak hesaplandı ve istatistiksel olarak bu gruplar arasında anlamlı fark olduğu belirlendi (p=0,011) (Tablo 13, Grafik 7 ve Grafik 8).

Tablo 13. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin ovaryum ağırlıklarının ölçüm sonuçları.

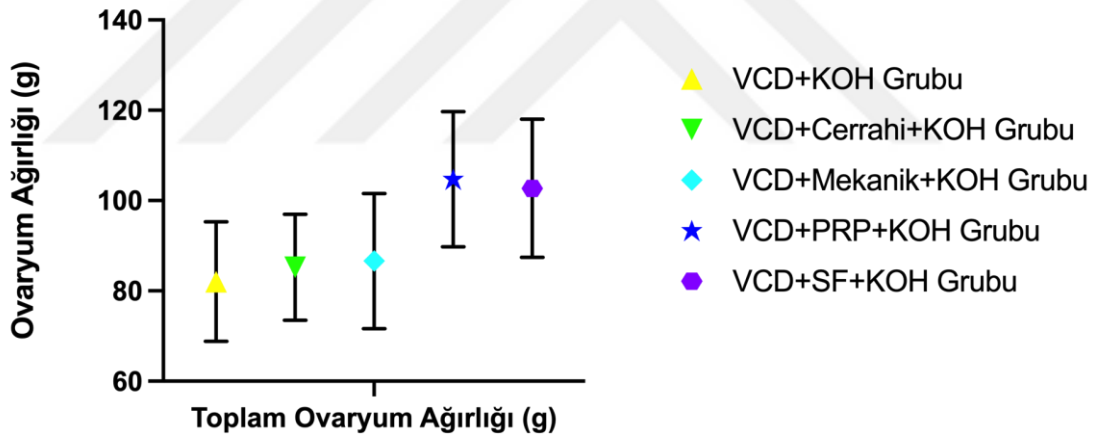
	VCD + KOH Grubu	VCD + Cerrahi + KOH Grubu	VCD + Mekanik + KOH Grubu	VCD + PRP + KOH Grubu	VCD + SF + KOH Grubu	p ^{**} , ^{***}
Toplam Ovaryum Ağırlığı (mg)*	82,04 ± 13,24 [†]	85,24 ± 11,71	86,63 ± 14,97	104,71 ± 14,96 [†]	102,71 ± 15,29	0,011

†VCD+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu kıyaslandığında toplam ovaryum ağırlığı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,039).

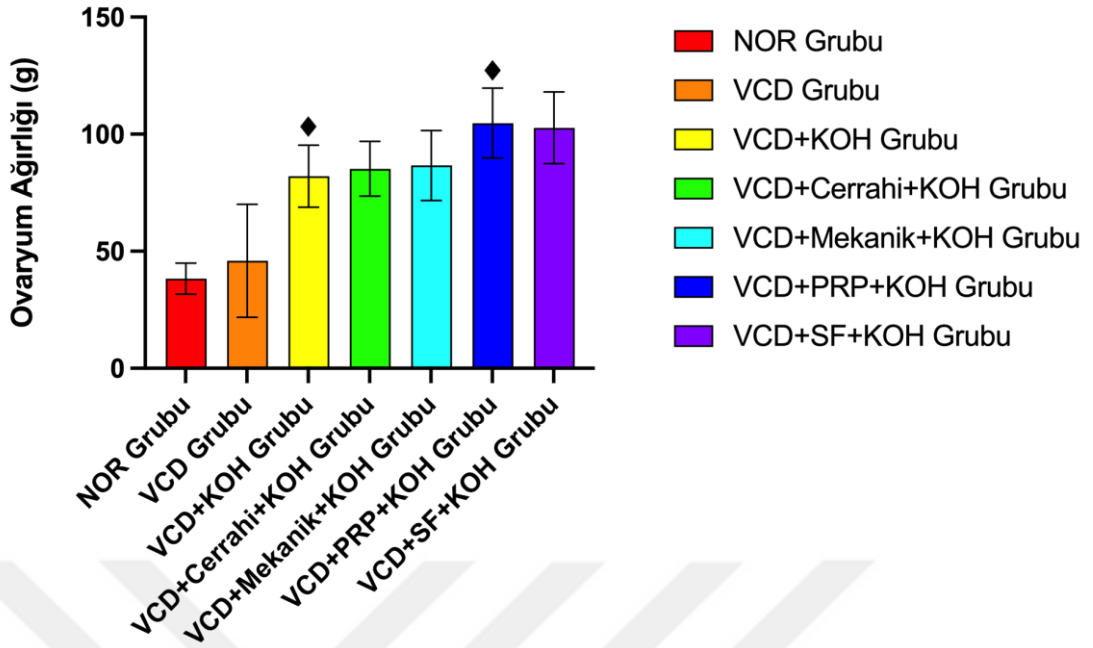
*Veriler ortalama ağırlık ve SD (Standart Deviasyon) (mg) olarak verildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Post Hoc Tukey Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 7. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin ovaryum ağırlıklarının ortalamaları.



Grafik 8. Denekler sakrifiye edilmeden önce sevofluran inhalasyon anestezisi altındayken eksize edilen denek ovaryumlarının ağırlık ölçüm ortalamalarının tüm gruplardaki karşılaştırması.

4.2. Histolojik Bulgular

Tez çalışmasında NOR ve VCD gruplarında olan deneklerin östrus siklusunun östrus evresindeyken (G15); VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH gruplarında olan deneklerin son enjeksiyon olarak yapılan hCG enjeksiyonu sonrası 34-36. saatler arasında (G55) sevofluran inhalasyon anestezisi altında ovaryum dokularının eksizyonu yapıldı ve denekler sakrifiye edildi. Deneklerden elde edilen ovaryum dokusu örneklerinden alınan, H&E boyaması ile boyanan 5 µm kalınlıktaki sıralı parafin kesitlerde histolojik değerlendirme ve folikül sayımı gerçekleştirildi.

4.2.1. Histomorfolojik bulgular

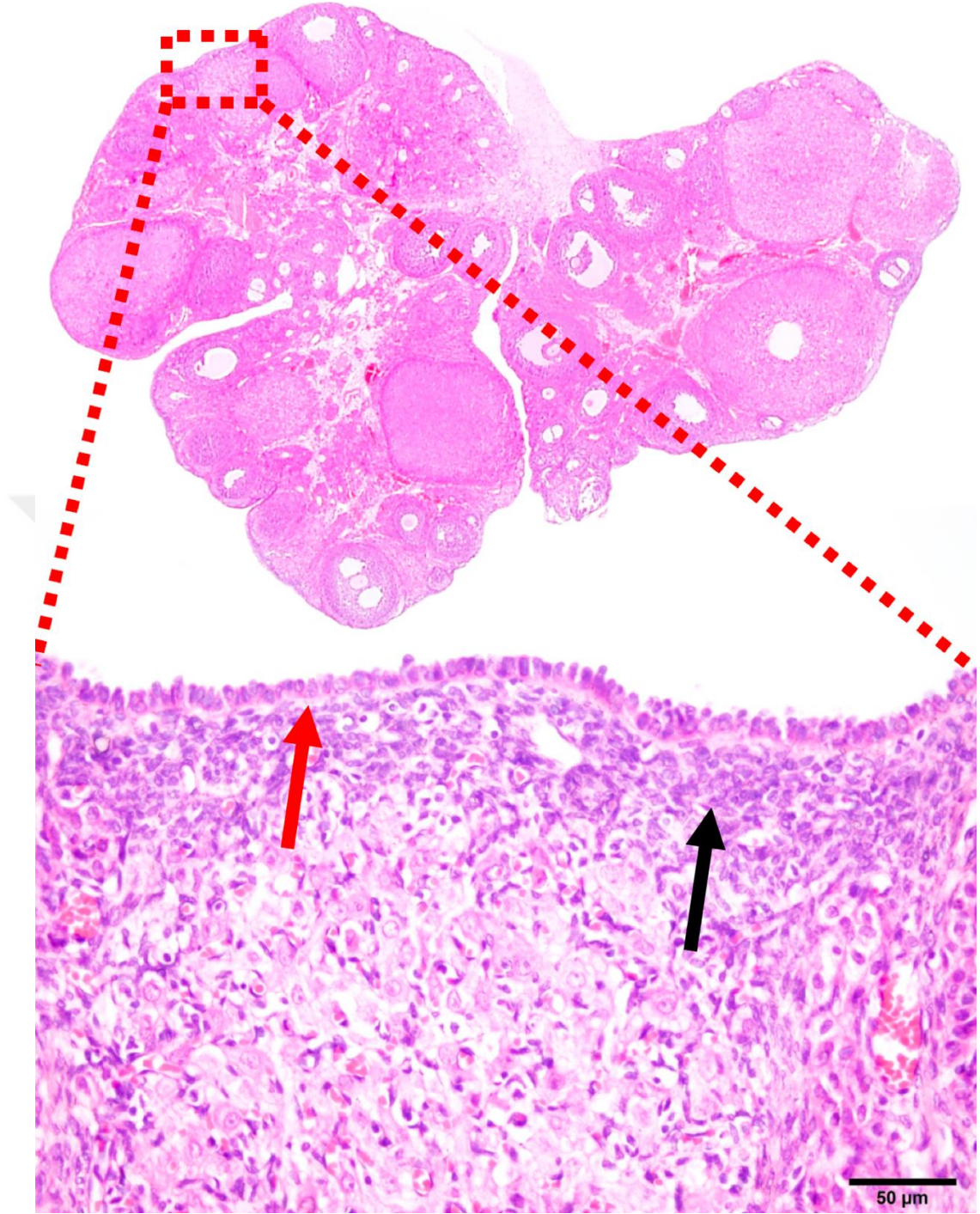
H&E ile boyanan preparatlarda ışık mikroskobu kullanılarak histomorfolojik değerlendirmeler gerçekleştirildi.

4.2.1.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin histomorfolojik bulguları

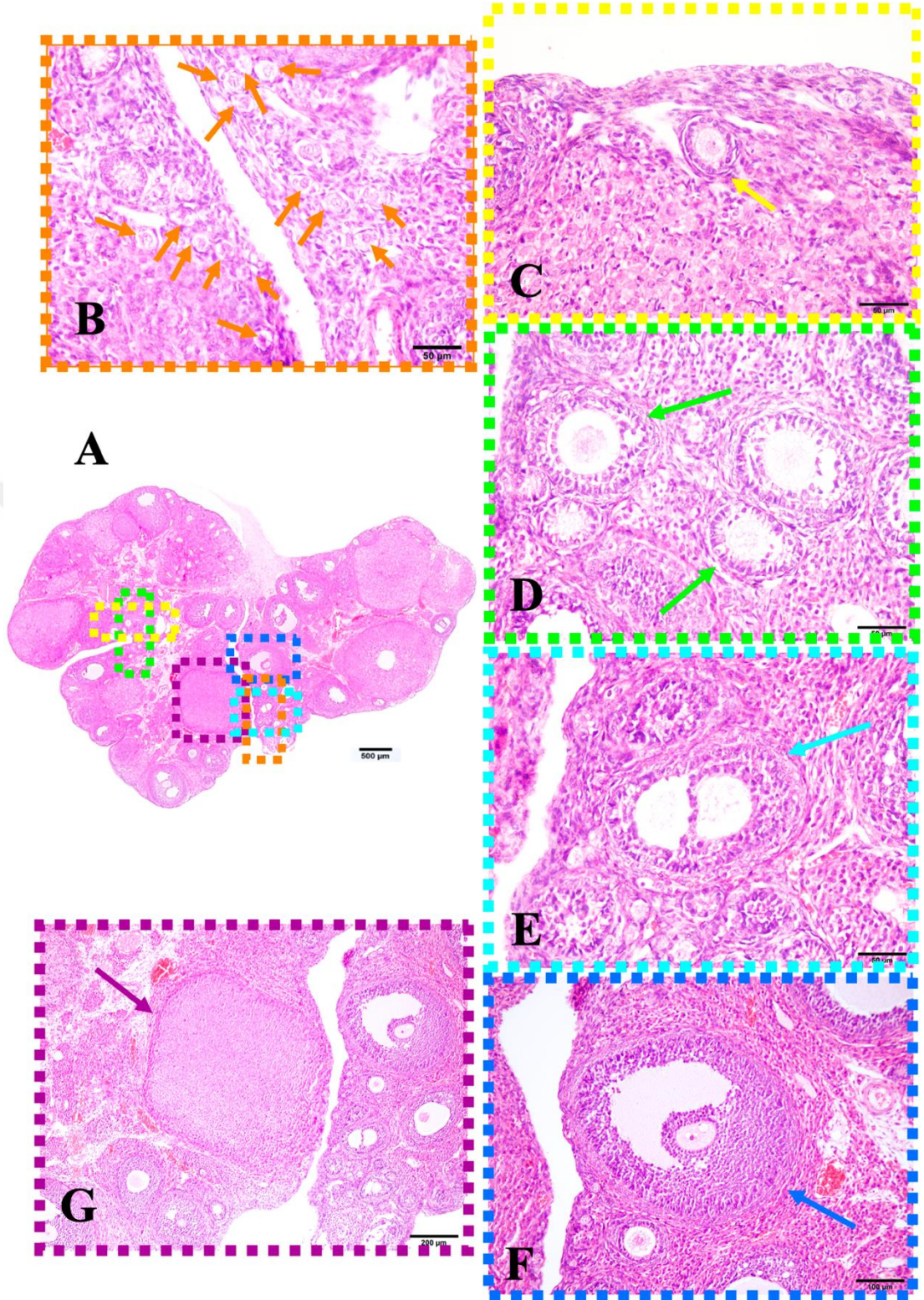
Normal ovaryan rezerve sahip deneklerin yer aldığı NOR grubu ve prematür ovaryan yetmezliğine sahip deneklerin yer aldığı VCD grubu deneklerine ait ovaryum dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik değerlendirmeleri karşılaştırıldı.

NOR grubu deneklerine ait ovaryum dokusu kesitleri incelendiğinde (Şekil 32 ve Şekil 33); ovaryum dokusunun yüzeyini kaplayan germinal epitelin tek katlı yassı formdan tek katlı kübik forma geçiş gösterdiği gözlemlendi. Germinal epitelin hemen altında bulunan, bağ dokusu hücreleri ve bağ dokusu liflerinden meydana gelen sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea tabakası gözlemlendi (Şekil 32). Tunika albuginea tabakasının altına bakıldığında; ovaryumun periferik bölgesinde yer alan, gelişimlerinin farklı evrelerindeki ovaryan folikülleri ve düz kas hücrelerini içeren selüler bağ doku yapısındaki kortikal bölge (korteks tabakası) ve ovaryumun merkezi bölgesinde yer alan, içinde çok sayıda kıvrımlı kan damarları, lenf damarları ve sinirler bulunan gevşek bağ dokusu yapısındaki medullar bölge (medulla tabakası) sınırları net bir şekilde ayırt edildi. Korteksin stroması içinde gelişimlerinin farklı evrelerindeki normal morfolojiye sahip foliküller görüldü. Korteksin tunika albuginea tabakasına komşu kısımlarında tek sıra yassı foliküler hücreler ile çevrili, büyük ökromatik nükleusu bulunan primer oositi içeren normal morfolojiye sahip primordiyal foliküller gözlemlendi (Şekil 33B). Primordiyal foliküller, korteks stromasında bulunan gelişimlerinin farklı evrelerindeki foliküller arasında da gözlemlendi. Korteks stromasının daha derinlerine inildikçe tek sıra kübik granüloza hücreleri ve net bir şekilde ayırt edilemeyen, glikoprotein bakımından zengin zona pellusida tabakası ile çevrilmiş oositi içeren unilaminar primer foliküller gözlemlendi (Şekil 33C). Granüloza hücreleri, asidofilik karakter sergileyen sitoplazma ve bazofilik karakter sergileyen zengin kromatin içerikli nükleus görülmesi sonucunda tanımlandı. Stromada birkaç sıra kübik granüloza hücreleri ve sınırları net bir şekilde ayırt edilebilen zona pellusida tabakası ile çevrilmiş primer oositi içeren normal morfolojiye sahip multilaminar primer foliküller görüldü (Şekil 33D). Korteks stromasında, medulla tabakasına yakın yerleşim gösteren, çok katmanlı granüloza hücre tabakasına, granüloza hücrelerinin aralarında düzensiz, asidofilik karakterde folikül sıvısı ile dolu

antrumlara ve normal morfolojiye sahip sekonder foliküller gözlemlendi (Şekil 33E). Sekonder folikülleri çevreleyen; granüloza tabakasına yakın kısımda kas demetleri, fibroblastlar ve vasküler yapılardan oluşan teka interna ile dış kısımda düz kas hücreleri ve kollajen liflerden oluşan teka eksterna olmak üzere teka tabakası gözlemlendi. Sekonder foliküllere kıyasla oosit ve folikül çapının arttığı, folikül sıvısı ile dolu antrumun tek bir boşluk halini aldığı ve içerdiği oositin de antrumda kenara doğru çekilmesi ile karakterize, foliküler gelişim sürecinin son evresinde olan normal morfolojiye sahip graaf (matür) foliküller görüldü (Şekil 33F). Graaf foliküllerde oositin granüloza hücreleri ile bağlantısını sağlayan kumulus ooforus ve oositi çevreleyen korona radiata yapıları net bir şekilde gözlemlendi. Foliküler gelişimlerinin farklı evrelerinde olan foliküllere ek olarak çok az sayıda foliküler hücre düzenlenimi dejenere olmuş, camsı membran görünümdeki dalgalı hyalin tabakası ile karakterize atretik foliküller gözlemlendi. Östrus siklusunun farklı zamanlarda gerçekleşmiş ovulasyon dönemlerinden kaynaklı, büyük nükleusları olan ve daha soluk boyanma gösteren sitoplazmaları bulunan merkezi yerleşimli granüloza lutein hücreleri ve daha küçük nükleuslu periferik yerleşimli teka lutein hücreleri ile karakterize olan korpus luteum yapıları görüldü (Şekil 33G). Ovaryumun merkezinde yer alan medulla tabakasının içerdiği kas demetleri, bağ doku lifleri ve sinirler ile normal morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi.



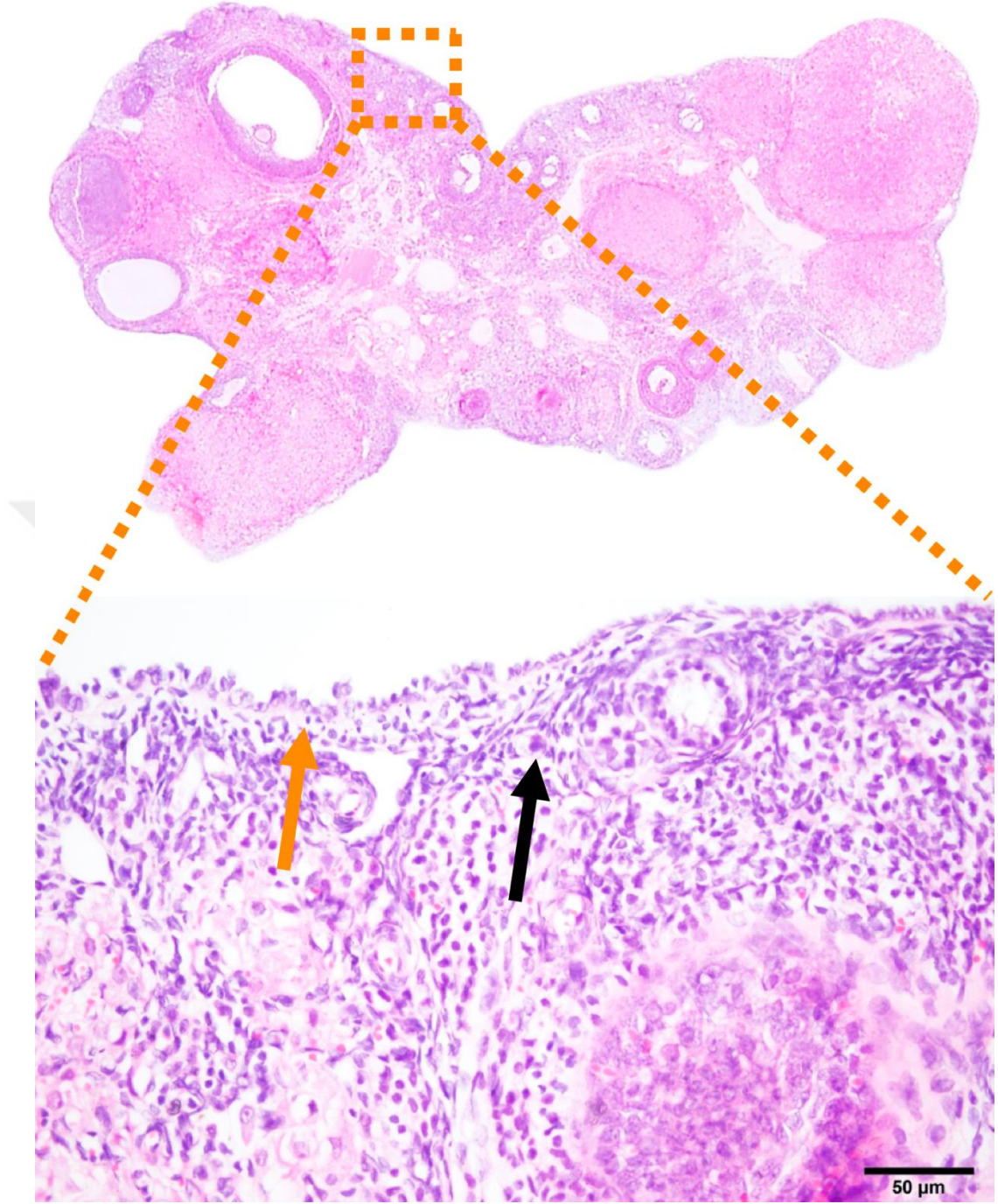
Şekil 32. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) deneklerden elde edilen ovaryum dokusu kesitinde germinal epitel (kırmızı ok) ve tunika albuginea (siyah ok). H&E, x40.



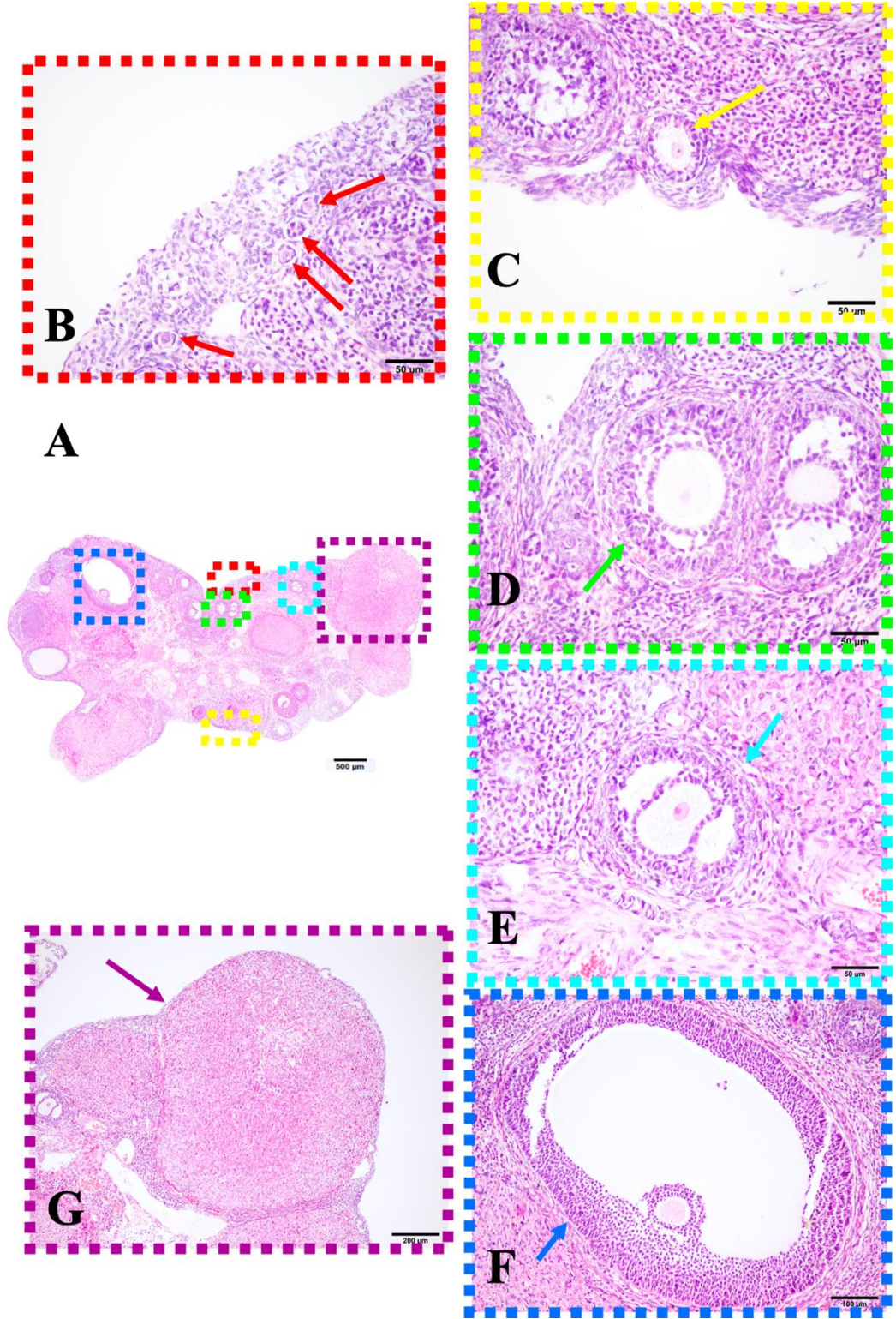
Şekil 33. A. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) deneklerden elde edilen ovaryum dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik genel görünümü. H&E, x1.25. B. Primordiyal foliküller (turuncu oklar) H&E, x40. C. Unilaminar primer folikül (sarı ok). H&E, x40. D. Multilaminar primer foliküller (yeşil oklar). H&E, x40. E. Sekonder folikül (mavi ok). H&E, x40. F. Graaf (matür) folikül (lacivert ok). H&E, x20. G. Korpus luteum (mor ok). H&E, x10.

VCD grubu deneklerine ait ovaryum dokusu kesitleri incelendiğinde (Şekil 34 ve Şekil 35); ovaryum dokusunun yüzeyini kaplayan germinal epitelin ve tunika albugineanın NOR grubu ile benzerlik göstererek tek katlı yassı formdan tek katlı kübik forma geçiş gösterdiği gözlemlendi (Şekil 34). Korteks bölümüne bakıldığında NOR grubuna kıyasla gelişmelerinin farklı evrelerindeki folikül sayılarında ve morfolojik olarak normal foliküllerde azalmalar olduğu görüldü (sayısal değerler 4.1.2.1.'de detaylı olarak verilmiştir). Folikül bazında bakıldığında, özellikle preantral foliküller olarak tanımlanan, küçük çaptaki erken dönem foliküller olan primordiyal foliküller, unilaminar primer foliküller ve multilaminar primer foliküllerde belirgin azalmalar (Şekil 35B, Şekil 35C ve Şekil 35D), foliküler gelişimin farklı aşamalarında atretik formdaki folikül sayılarında ise artmalar olduğu gözlemlendi (Şekil 36). Atretik foliküller morfolojik açıdan incelendiğinde; granüloza hücreleri ile oositler arasındaki hücresel bağlantıların bozulduğu, granüloza hücre nükleuslarında piknotik görünümlerin arttığı, oositlerin asido-filik karakter sergilediği, oositlerde yapısal olarak bozulmalara neden olan vakuolizasyon ve fragmantasyonda artışların olduğu gözlemlendi (Şekil 36). Sekonder folikül ve graaf (matür) foliküllerin NOR grubuna kıyasla sayısal anlamda benzerlik gösterdiği, fakat histolojik yapılarının bozulduğu görüldü (Şekil 35E, Şekil 35F ve Şekil 36). Sekonder folikül ve graaf (matür) foliküllerde piknotik görünümlü nükleuslar içeren granüloza hücrelerinin görüldüğü ve granüloza hücreleri ile oositler arasındaki bağlantılarda bozulmaların olduğu, atretik sekonder folikül ve graaf (matür) foliküller gözlemlendi (Şekil 36). Korpus luteum sayılarının NOR grubu ile benzer olduğu fakat morfolojik olarak asidofilik boyanmada artışla birlikte dejenere hücrelerin arttığı gözlemlendi (Şekil 35G). Ovaryumun medulla tabakasının NOR grubu ile benzer özellikler sergilediği görüldü.

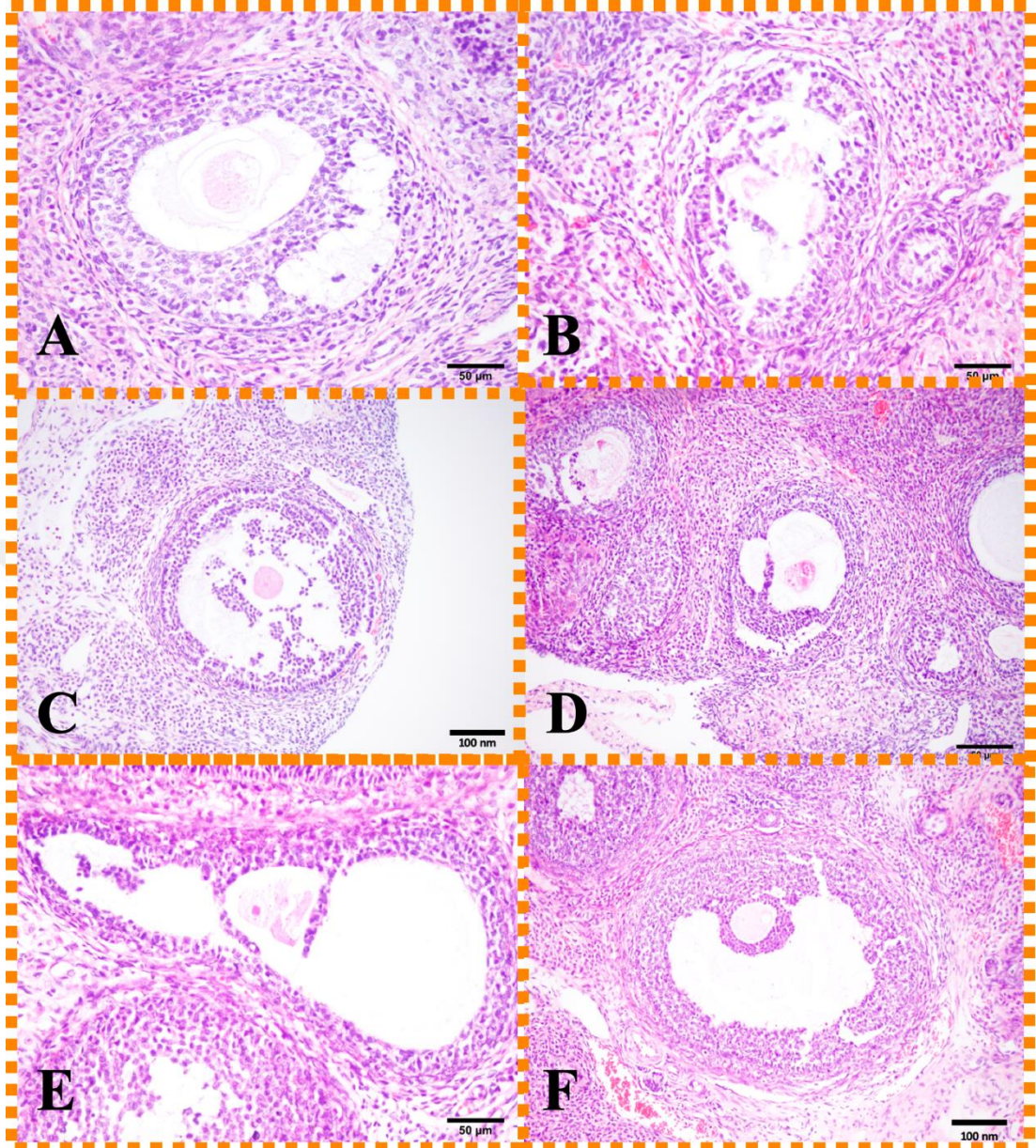
VCD grubu ovaryum dokusu kesitlerinde ayrıca Graaf folikül boyutunda kistik formda foliküller olduğu gözlemlendi. Ovaryum dokusundan alınan tüm seri kesitler incelendiğinde; bu kistik foliküllerin bazılarında oositin bulunduğu (şekil 37A ve Şekil 37B) fakat bazı kistik foliküllerde ise oositin bulunmadığı görüldü (Şekil 37C). Foliküller preantral folikül (primordiyal folikül, unilaminar primer folikül, multilaminar primer folikül) ve antral folikül (sekonder folikül, graaf- matür folikül) olarak sınıflandırıldığında; preantral folikül sayılarında NOR grubuna kıyasla azalma olduğu, antral folikül sayılarının ise benzer olduğu görüldü.



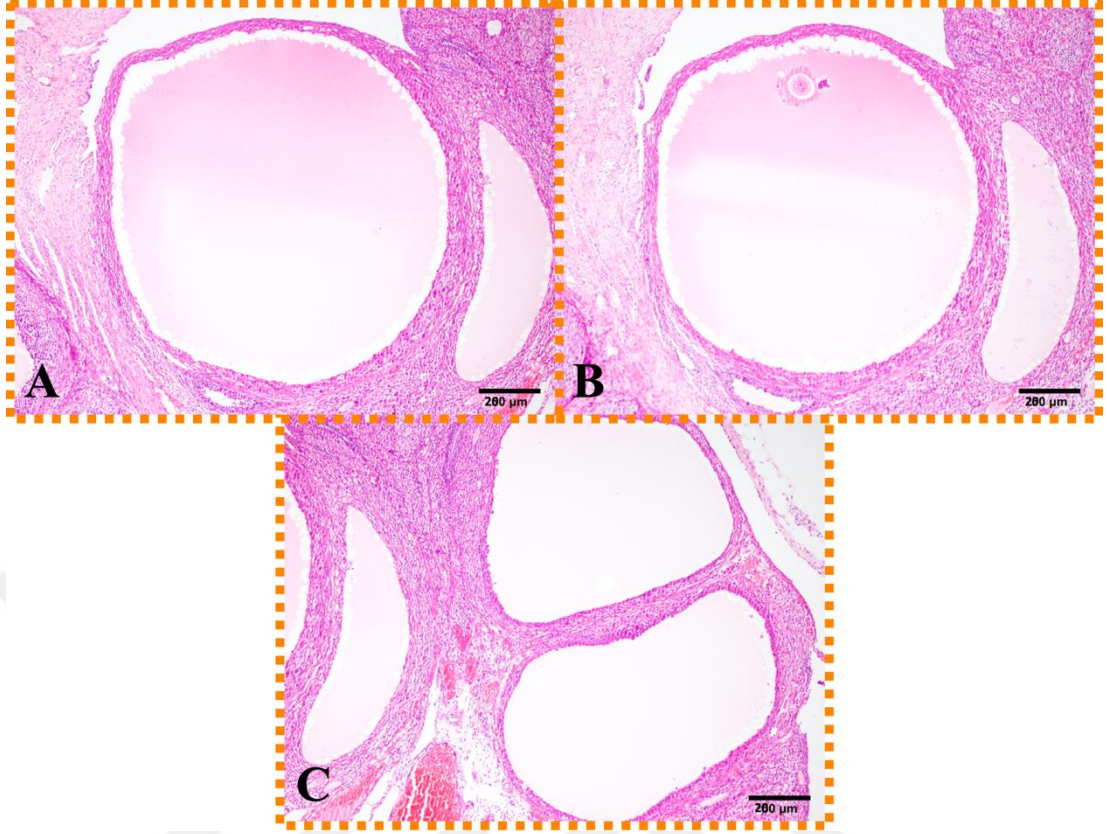
Şekil 34. POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerden elde edilen ovaryum dokusu kesitinde germinal epitel (turuncu ok) ve tunika albuginea (siyah ok). H&E, x40.



Şekil 35. A. Prematür ovaryan yetmezliği grubu (VCD grubu) deneklerden elde edilen ovaryum dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik genel görünümü. H&E, x1.25. B. Primordiyal foliküller (kırmızı oklar) H&E, x40. C. Unilaminar primer folikül (sarı ok). H&E, x40. D. Multilaminar primer foliküller (yeşil ok). H&E, x40. E. Sekonder folikül (mavi ok). H&E, x40. F. Graaf (matür) folikül (lacivert ok). H&E, x20. G. Korpus luteum (mor ok). H&E, x10.



Şekil 36. Prematür ovaryan yetmezliği grubu (VCD grubu) deneklerinden elde edilen ovaryum dokusu kesitlerinde antral atretik foliküllerin ışık mikroskopik görüntüsü. **A ve B.** Granüloza hücreleri antral boşluğa dökülmüş atretik sekonder foliküller. H&E, x40. **C.** Oosit-granüloza hücre bağlantısı bozulmuş atretik sekonder folikül. H&E, x10. **D.** Asidofilik sitoplazmaya sahip oosit içeren atretik sekonder folikül. H&E, x10. **E.** Fragmentasyon görülen oosit ve piknotik nüleusa sahip granüloza hücreleri içeren atretik graaf folikül. H&E, x40. **F.** Oosit sitoplazmasında vakuol bulunan atretik graaf folikül. H&E, x10.



Şekil 37. Prematür ovaryan yetmezliği grubu (VCD grubu) deneklerinden elde edilen ovaryum dokusu kesitlerinde kistik formdaki foliküllerin ışık mikroskopik görüntüsü. **A.** Kesite oositi dahil olmayan oosit içeren kistik folikül. H&E, x10. **B.** Kesite oositi dahil olan oosit içeren kistik folikül. H&E, x10. **C.** Oosit içermeyen kistik foliküller. H&E, x10.

4.2.1.2. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin histomorfolojik bulguları

Prematür ovaryan yetmezliği modeli oluşturulan alt gruplardaki deneklere ait ovaryum dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik değerlendirmeleri karşılaştırıldı (Şekil 38).

VCD+KOH grubunda ovaryum dokusu kesitleri incelendiğinde; doku bütünlüğünün korunduğu ve germinal epitelin NOR grubunda olduğu gibi düzenlenim gösterdiği görüldü. Primordiyal folikül ve gelişmekte olan foliküllerin morfolojik yapısının NOR grubuyla benzer olduğu görüldü (Şekil 39-44). Primordiyal folikül, unilaminar primer folikül ve multilaminar primer folikül sayılarında NOR grubuna kıyasla azalma olduğu, VCD grubu ile benzerlik gösterdiği gözlemlendi (Şekil 39-41). Sekonder folikül sayısında NOR grubu ve VCD grubuna kıyasla azalma olduğu görüldü (Şekil 42). Graaf (matür) folikül, atretik folikül ve korpus luteum sayılarında

VCD grubu ile benzerlik gösterdiği görüldü (Şekil 43 ve Şekil 44). Tüm sıralı kesitlerin incelenmesi sonucu belirlenen oosit içermeyen kistik folikül sayılarının VCD grubuna kıyasla arttığı gözlemlendi (Şekil 38-44). VCD grubuna kıyasla preantral folikül sayılarında benzerlik olduğu, antral folikül sayılarında ise azalmaların olduğu görüldü (sayısal değerler 4.1.2.2.'de detaylı olarak verilmiştir).

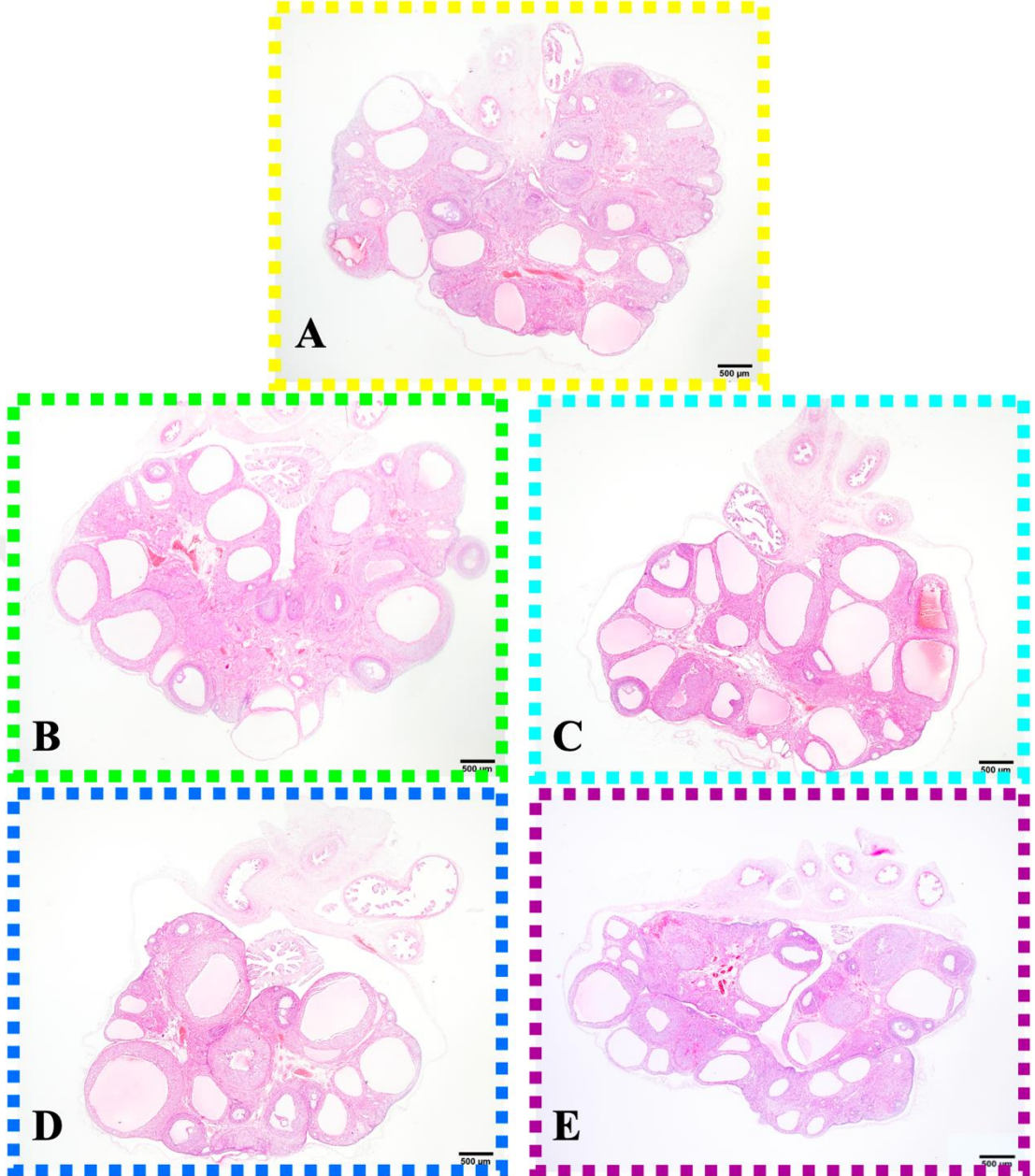
POI modeli oluşturulduktan ve cerrahi olarak açılıp kapatıldıktan sonra KOH protokolü uygulanan deneklerde (VCD+Cerrahi+KOH grubu) ovaryum dokusu kesitleri incelendiğinde; doku bütünlüğünün korunduğu ve germinal epitelin NOR grubu ile benzer düzenlenim gösterdiği saptandı. Primordiyal folikül ve gelişmekte olan foliküllerin morfolojik yapısının NOR grubuyla benzer olduğu görüldü (Şekil 39-44). VCD+KOH grubuna kıyasla primordiyal folikül, unilaminar primer folikül ve multilaminar primer folikül sayılarında azalmalar olduğu gözlemlendi (Şekil 39-41). VCD+KOH grubuna kıyasla sekonder folikül, graaf (matür) folikül, atretik folikül, korpus luteum, oosit içermeyen kistik folikül, preantral folikül ve antral folikül sayılarının benzer olduğu görüldü (Şekil 42-45).

POI modeli oluşturulduktan ve mekanik yolla uyarıldıktan sonra KOH protokolü uygulanan deneklerde (VCD+Mekanik+KOH grubu) ovaryum dokusu kesitleri incelendiğinde; doku bütünlüğünün korunduğu ve germinal epitelin NOR grubu ile benzer düzenlenim gösterdiği görüldü. Primordiyal folikül ve gelişmekte olan foliküllerin morfolojik yapısının NOR grubuyla benzer olduğu görüldü (Şekil 39-44). VCD+KOH grubu ve VCD+Cerrahi+KOH grubu ile kıyaslandığında primordiyal folikül sayılarında anlamlı düzeyde bir artmanın olduğu saptandı. VCD+KOH grubu ve VCD+Cerrahi+KOH grubu ile kıyaslandığında unilaminar primer folikül, multilaminar primer folikül, sekonder folikül, graaf (matür) folikül, atretik folikül, korpus luteum, oosit içermeyen kistik folikül, preantral folikül ve antral folikül sayılarında benzerlik gösterdiği görüldü (sayısal değerler 4.1.2.2.'de detaylı olarak verilmiştir).

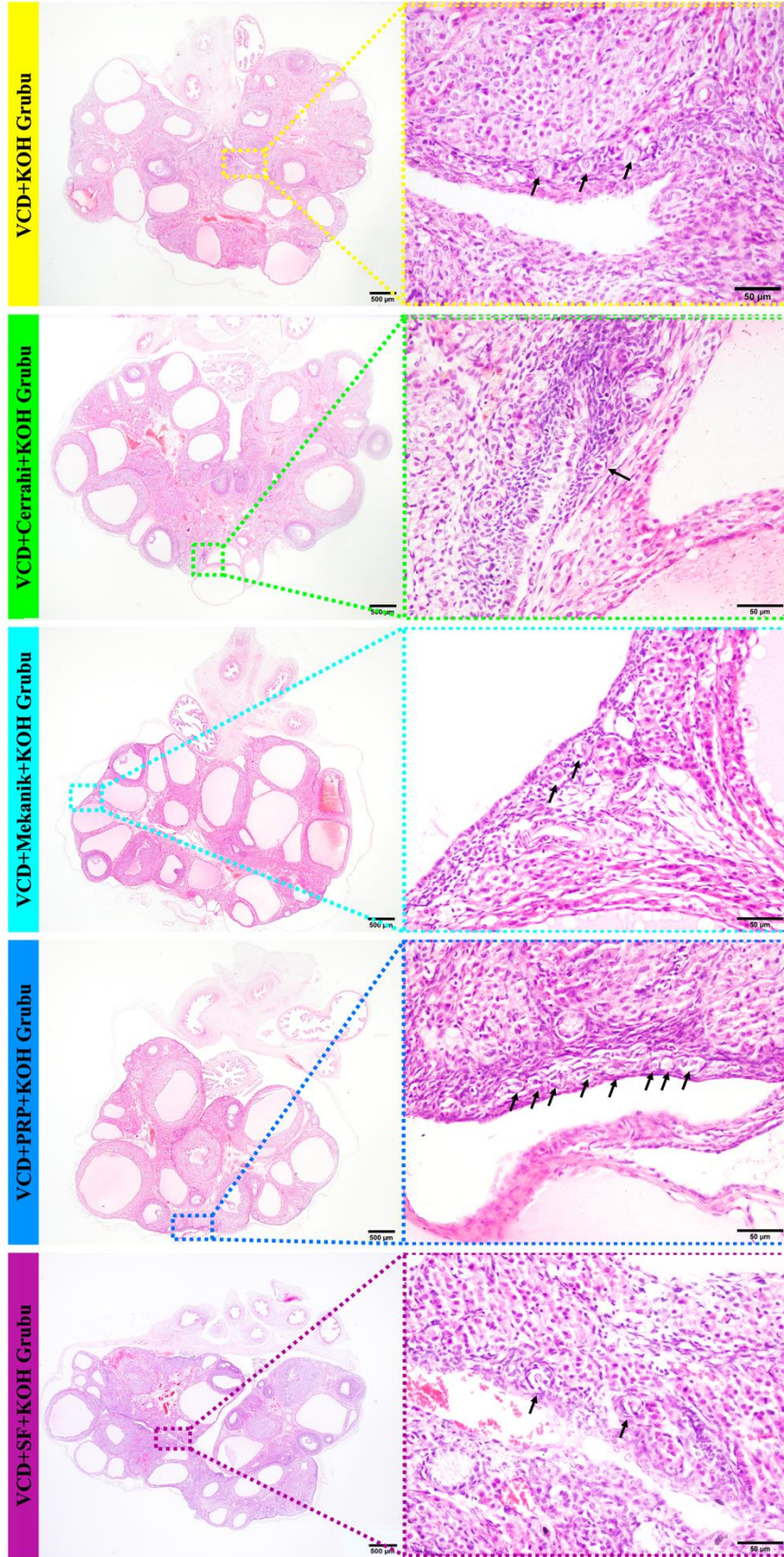
POI modeli oluşturulduktan ve intraovaryan PRP enjeksiyonu yapıldıktan sonra KOH protokolü uygulanan deneklerde (VCD+PRP+KOH grubu) ovaryum dokusu kesitleri incelendiğinde; doku bütünlüğünün korunduğu ve germinal epitelin, primordiyal folikül ve gelişmekte olan foliküllerin morfolojik yapısının NOR grubu ve diğer gruplarla benzer olduğu görüldü (Şekil 39-44). VCD+KOH grubu ve

VCD+Cerrahi+KOH grubu ile kıyaslandığında primordiyal folikül sayılarında ciddi düzeyde bir artmanın olduğu gözlemlendi. VCD+Mekanik+KOH grubu ile kıyaslandığında unilaminar primer folikül sayılarında azalmanın olduğu gözlemlendi. VCD+KOH grubu, VCD+Cerrahi+KOH grubu ve VCD+Mekanik+KOH grubu ile kıyaslandığında multilaminar primer folikül, sekonder folikül, graaf (matür) folikül, atretik folikül, korpus luteum, oosit içermeyen kistik folikül, preantral folikül ve antral folikül sayılarında benzerlik saptandı (sayısal değerler 4.1.2.2.'de detaylı olarak verilmiştir).

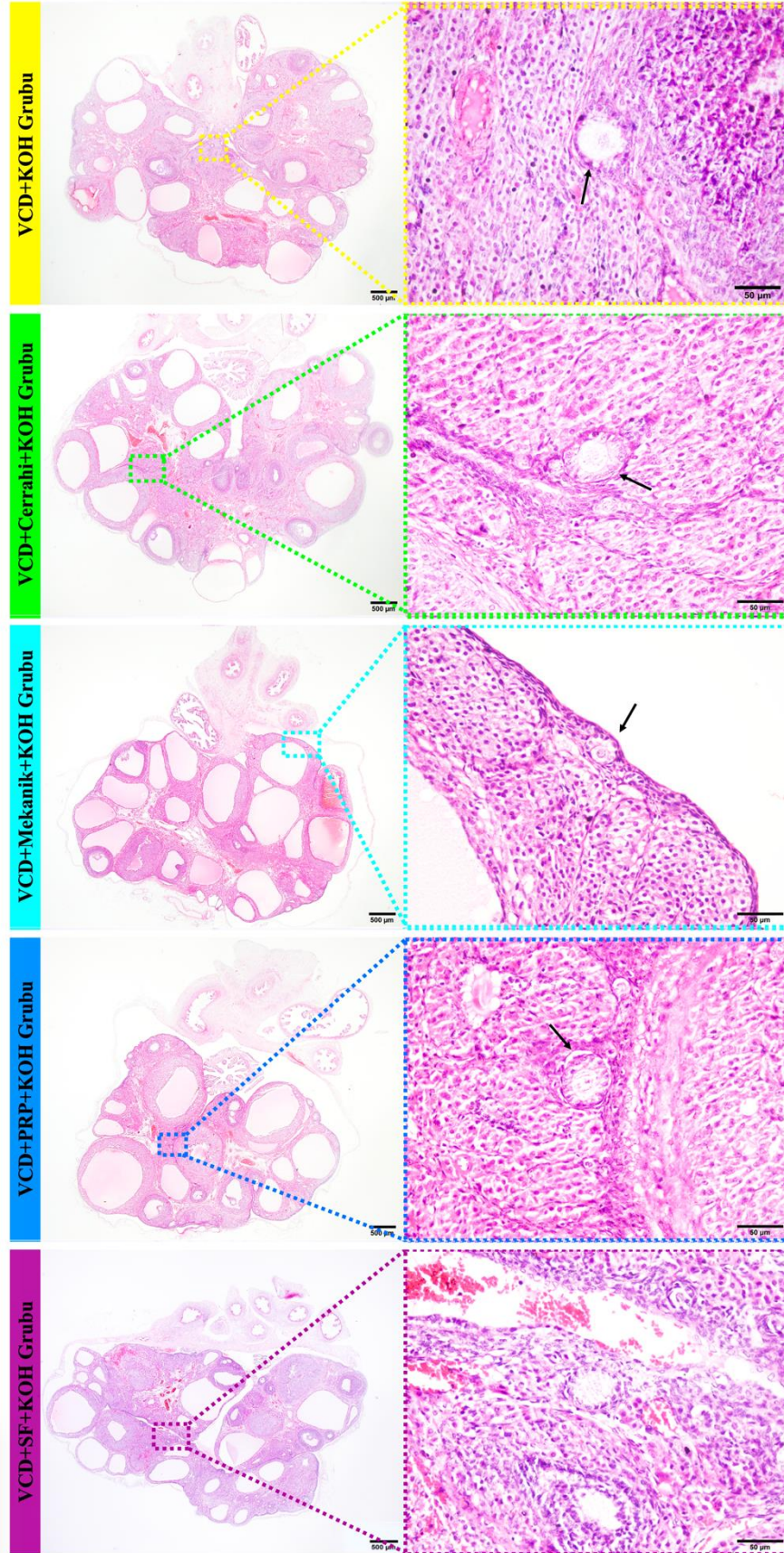
POI modeli oluşturulduktan ve intraovaryan serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapıldıktan sonra KOH protokolü uygulanan deneklerde (VCD+SF+KOH grubu) ovaryum dokusu kesitleri incelendiğinde; doku bütünlüğünün korunduğu, germinal epitelin ve ovaryan foliküllerin diğer gruplarla benzer morfolojide olduğu görüldü (Şekil 39-44). VCD+PRP+KOH grubu ile kıyaslandığında primordiyal folikül sayılarında azalmanın olduğu gözlemlendi. VCD+Mekanik+KOH grubu ile kıyaslandığında unilaminar primer folikül ve preantral folikül sayılarında azalmanın olduğu gözlemlendi. VCD+KOH grubu, VCD+Cerrahi+KOH grubu ve VCD+PRP+KOH grubu ile kıyaslandığında multilaminar primer folikül, sekonder folikül, graaf (matür) folikül, atretik folikül, korpus luteum, oosit içermeyen kistik folikül, preantral folikül ve antral folikül sayılarında benzerlik gösterdiği gözlemlendi (Şekil 39-45) (sayısal değerler 4.1.2.2'de detaylı olarak verilmiştir).



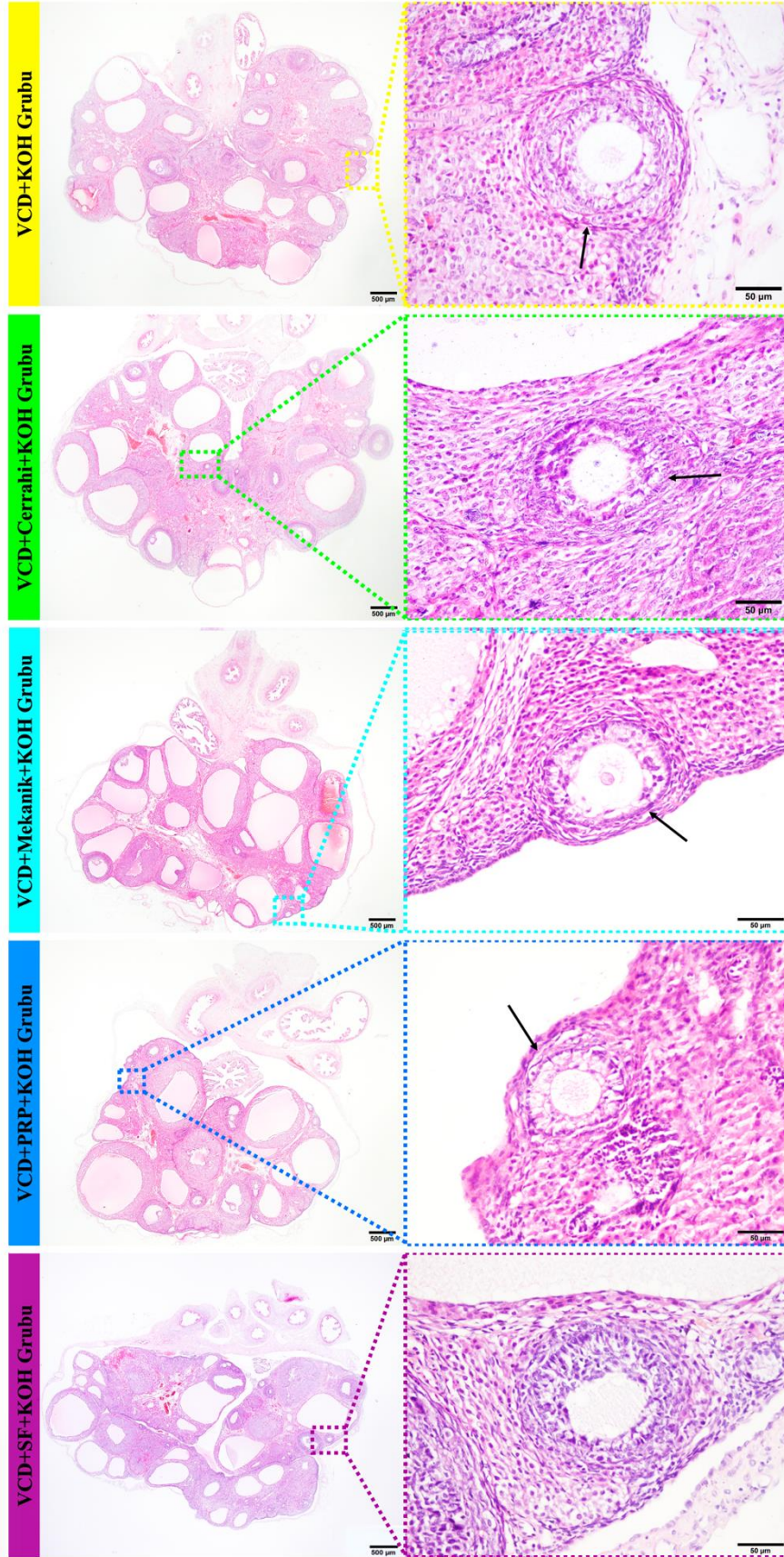
Şekil 38. A. Prematür ovaryan yetmezliği oluşturulduktan sonra KOH protokolü uygulanan (VCD+KOH grubu) deneklerden elde edilen ovaryum dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik genel görünümü. H&E, x1.25. B. Prematür ovaryan yetmezliği oluşturulup cerrahi yolla açılıp kapatıldıktan sonra KOH protokolü uygulanan (VCD+Cerrahi+KOH grubu) deneklerden elde edilen ovaryum dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik genel görünümü. H&E, x1.25. C. Prematür ovaryan yetmezliği oluşturulup mekanik yolla uyarıldıktan sonra KOH protokolü uygulanan (VCD+Mekanik+KOH grubu) deneklerden elde edilen ovaryum dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik genel görünümü. H&E, x1.25. D. Prematür ovaryan yetmezliği oluşturulup intraovaryan PRP enjeksiyonundan sonra KOH protokolü uygulanan (VCD+PRP+KOH grubu) deneklerden elde edilen ovaryum dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik genel görünümü. H&E, x1.25. E. Prematür ovaryan yetmezliği oluşturulup intraovaryan serum fizyolojik (SF) enjeksiyonundan sonra KOH protokolü uygulanan (VCD+SF+KOH grubu) deneklerden elde edilen ovaryum dokusu kesitlerinin ışık mikroskopik genel görünümü. H&E, x1.25.



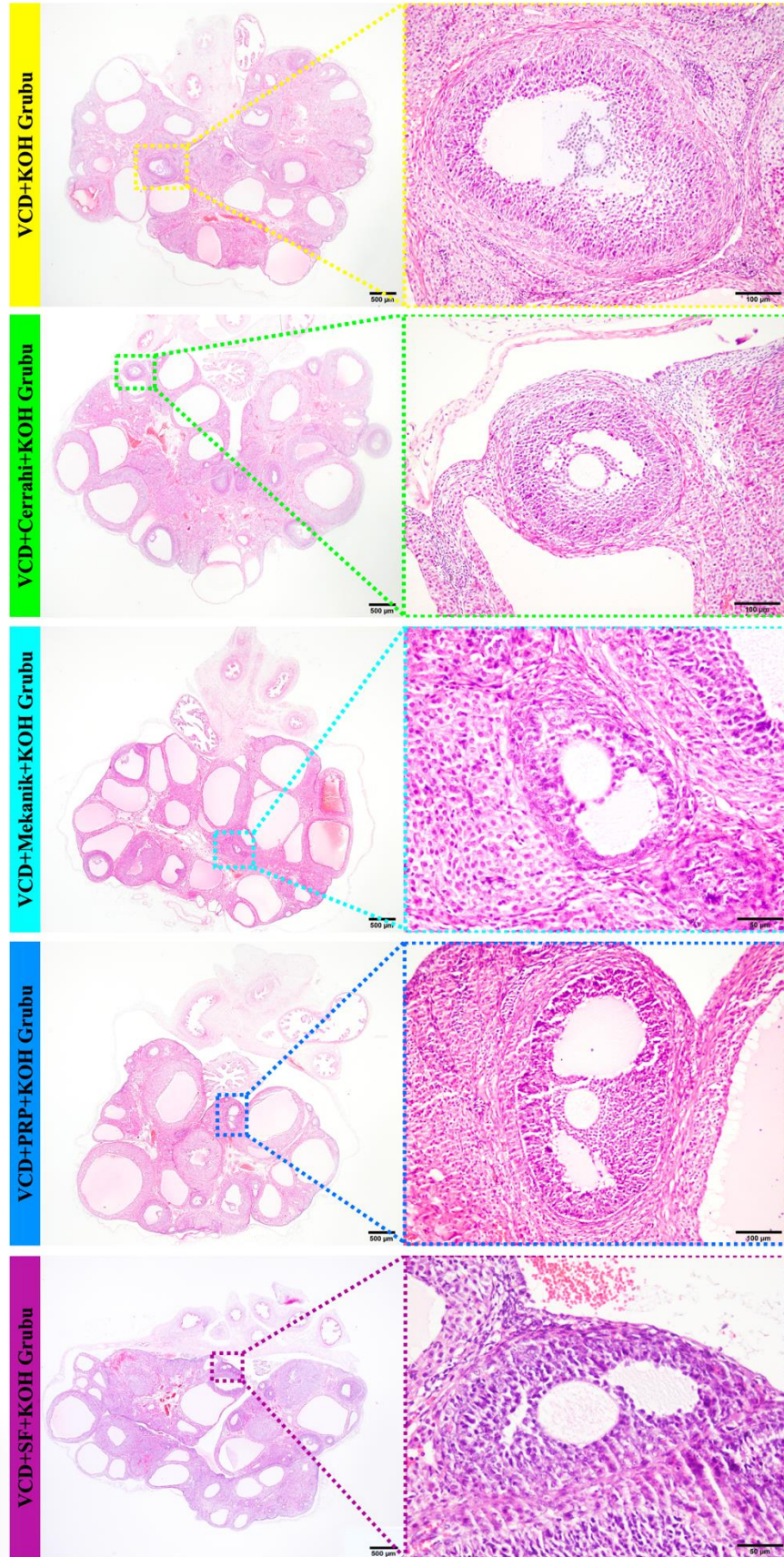
Şekil 39. VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH gruplarında primordiyal foliküllerin ışık mikroskopik görünümü. H&E



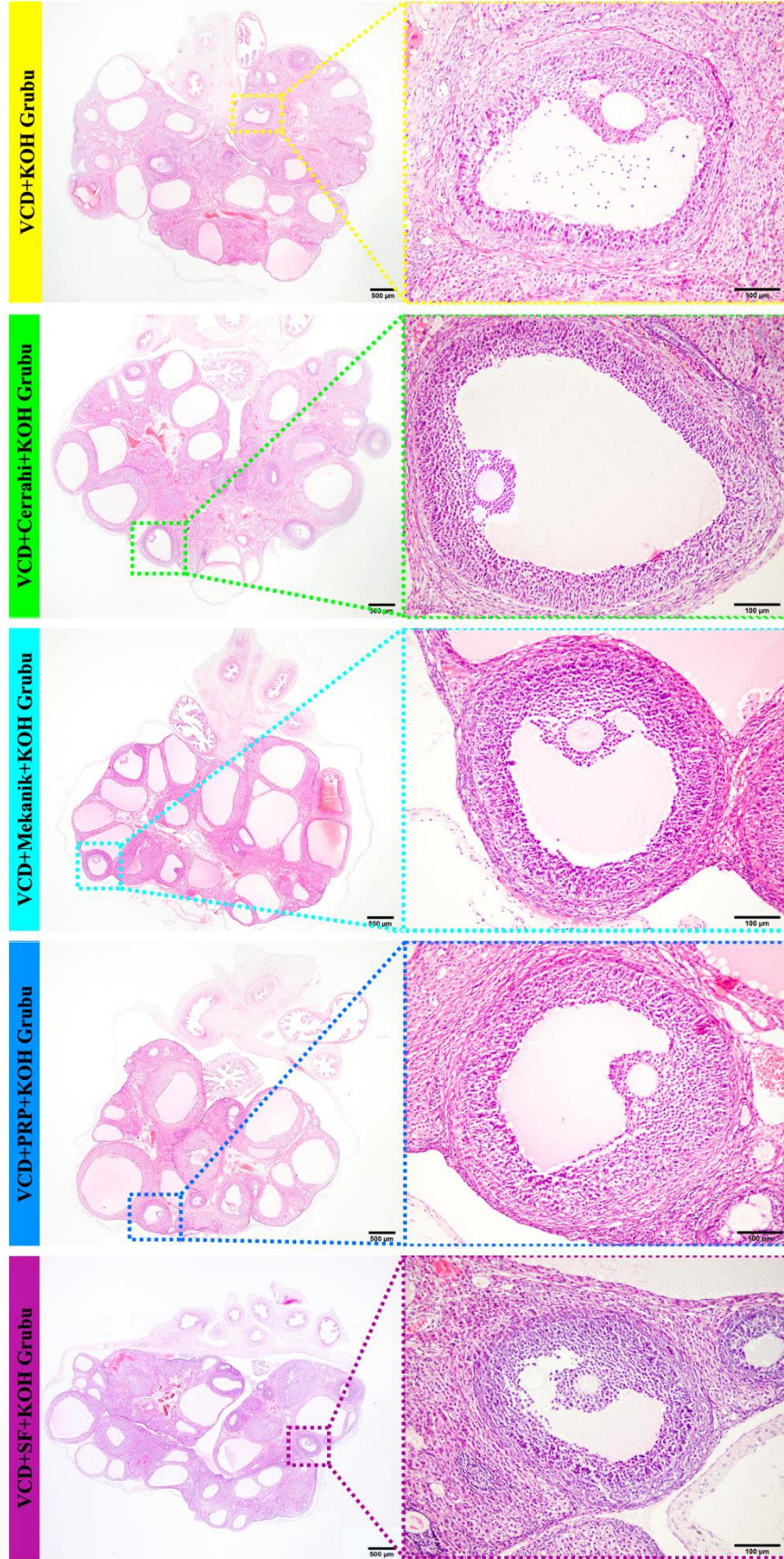
Şekil 40. VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH gruplarında unilaminar primer foliküllerin ışık mikroskopik görünümü. H&E



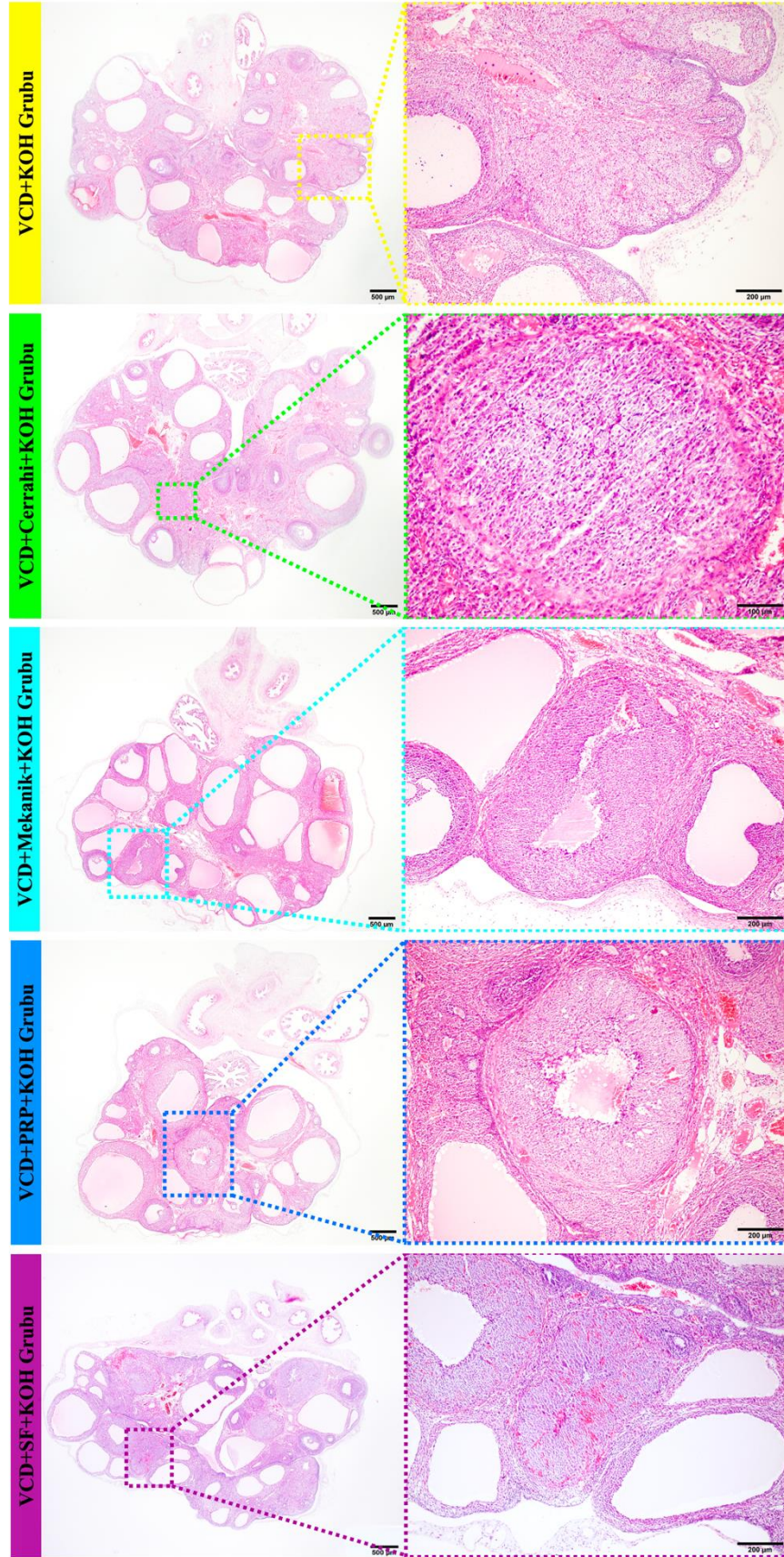
Şekil 41. VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH gruplarında multilaminar primer foliküllerin ışık mikroskopik görünümü. H&E



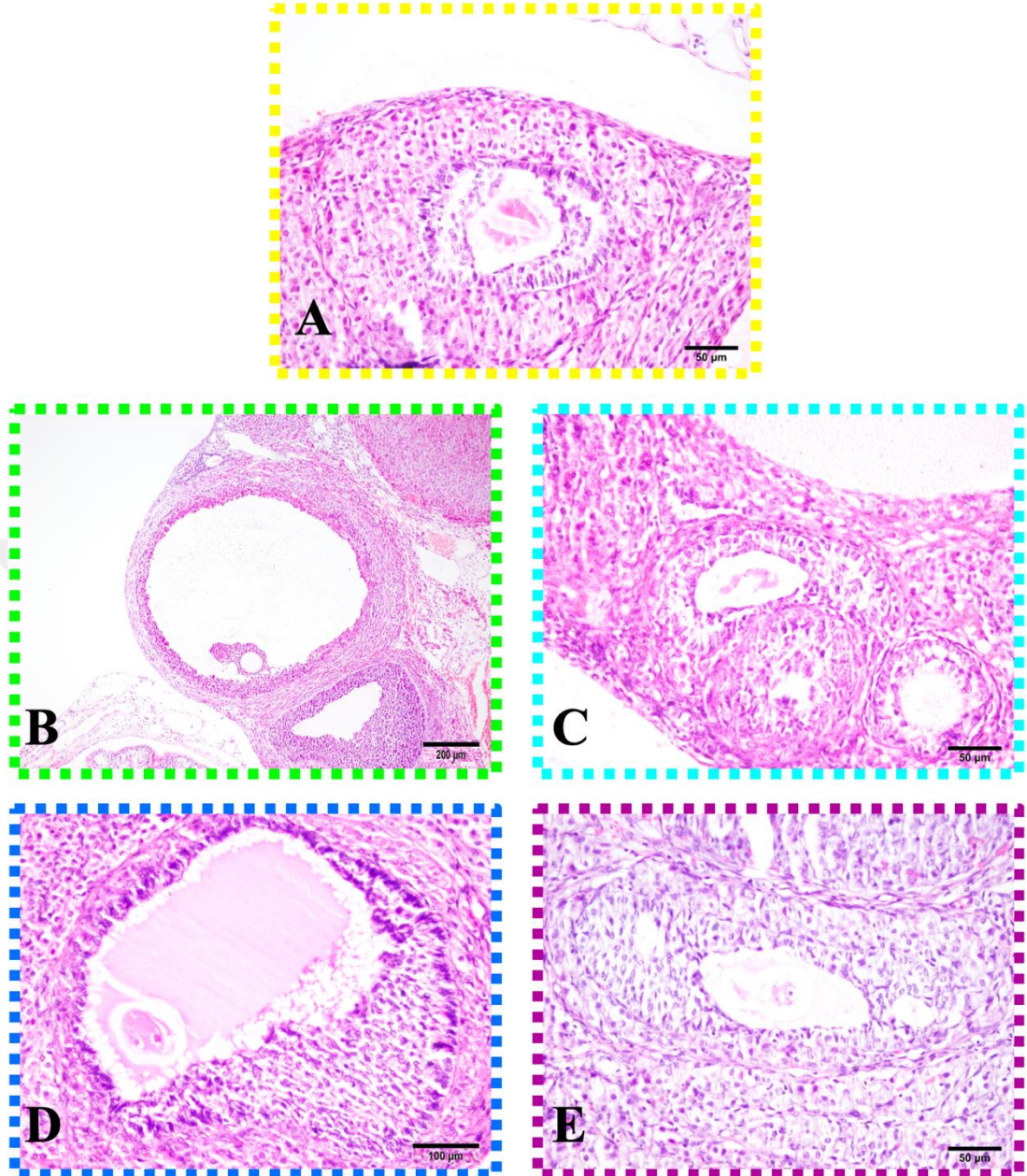
Şekil 42. VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH gruplarında sekonder foliküllerin ışık mikroskopik görünümü. H&E



Şekil 43. VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH gruplarında graaf (matür) foliküllerin ışık mikroskopik görünümü. H&E



Şekil 44. VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH gruplarında korpus luteum yapılarının ışık mikroskopik görünümü. H&E



Şekil 45. A. VCD+KOH grubunda, B. VCD+Cerrahi+KOH grubunda, C. VCD+Mekanik+KOH grubunda, D. VCD+PRP+KOH grubunda, E. VCD+SF+KOH grubunda atretik foliküllerin ışık mikroskopik görünümü. H&E.

4.2.2. Morfometrik bulgular

Tez çalışmasındaki tüm gruplardaki deneklerden elde edilen ovaryum dokularından alınan parafin kesitlerde H&E boyaması sonrası primordiyal folikül, unilaminar primer folikül, multilaminar primer folikül, sekonder folikül, matür (graaf) folikül, atretik folikül ve korpus luteum sayımları yapılarak morfometrik değerlendirmeler gerçekleştirildi. Ayrıca her bir gruba ait doku kesitlerindeki ovaryan foliküllerin sayım sonuçları preantral folikül (primordiyal folikül, unilaminar primer folikül ve multilaminar primer folikül) ve antral folikül (sekonder folikül ve matür (graaf) folikül) olmak üzere iki farklı gruba ayrılarak morfometrik olarak değerlendirildi.

4.2.2.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin morfometrik bulguları

Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) denekler ile POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin doku kesitlerinde gelişim sürecinin farklı evrelerinde bulunan foliküller ve korpus luteum sayımları yapıldı. Sayım sonuçları ortalama değer \pm standart sapma olarak Tablo 14 ve Grafik 9'da görülmektedir.

VCD grubu doku kesitleri sonuçlarına bakıldığında NOR grubuna kıyasla primordiyal folikül (sırasıyla $7,6 \pm 1,24$ ve $21,73 \pm 2,19$), unilaminar primer folikül (sırasıyla $3,94 \pm 0,86$ ve $8,04 \pm 1,53$) ve multilaminar primer folikül (sırasıyla $1,67 \pm 0,26$ ve $2,62 \pm 0,51$) sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın (sırasıyla $p < 0,001$, $p = 0,002$ ve $p = 0,011$) olduğu belirlendi. VCD grubu doku kesitleri sonuçlarına bakıldığında NOR grubuna kıyasla morfolojik olarak normal formda foliküller yerine atretik formda foliküllerin bulunduğu ve atretik folikül sayılarında (sırasıyla $1,33 \pm 0,34$ ve $0,22 \pm 0,14$) istatistiksel olarak anlamlı bir artma olduğu belirlendi ($p < 0,001$). Gelişim sürecinin farklı evrelerinde bulunan folikül ve korpus luteum sayımlarına bakıldığında sonuçların benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi. VCD grubu doku kesitleri sonuçlarına bakıldığında NOR grubundan farklı olarak oosit içermeyen kistik formda folikül (oosit (-) kistik folikül) morfolojisine sahip foliküller görüldü.

Tablo 14. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin morfolometrik bulguları.

Ovaryan Folikül Sınıflandırması*	Normal Ovaryan Rezerv Grubu (NOR Grubu)	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	p**
Primordiyal Folikül	21,73 ± 2,19 [♠]	7,60 ± 1,24 [♠]	<0,001
Unilaminar Primer Folikül	8,04 ± 1,53 ^Δ	3,94 ± 0,86 ^Δ	0,002
Multilaminar Primer Folikül	2,62 ± 0,51 [∇]	1,67 ± 0,26 [∇]	0,011
Sekonder Folikül	2,18 ± 0,40	1,98 ± 0,62	0,495
Matür (Graaf) Folikül	1,00 ± 0,25	0,73 ± 0,28	0,101
Atretik Folikül	0,22 ± 0,14 [∅]	1,33 ± 0,34 [∅]	<0,001
Korpus Luteum	2,69 ± 1,34	3,67 ± 0,89	0,194
Oosit (-) Kistik Folikül	-	0,01 ± 0,04	-

♠ NOR grubu ile VCD grubu kıyaslandığında primordiyal folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0,001).

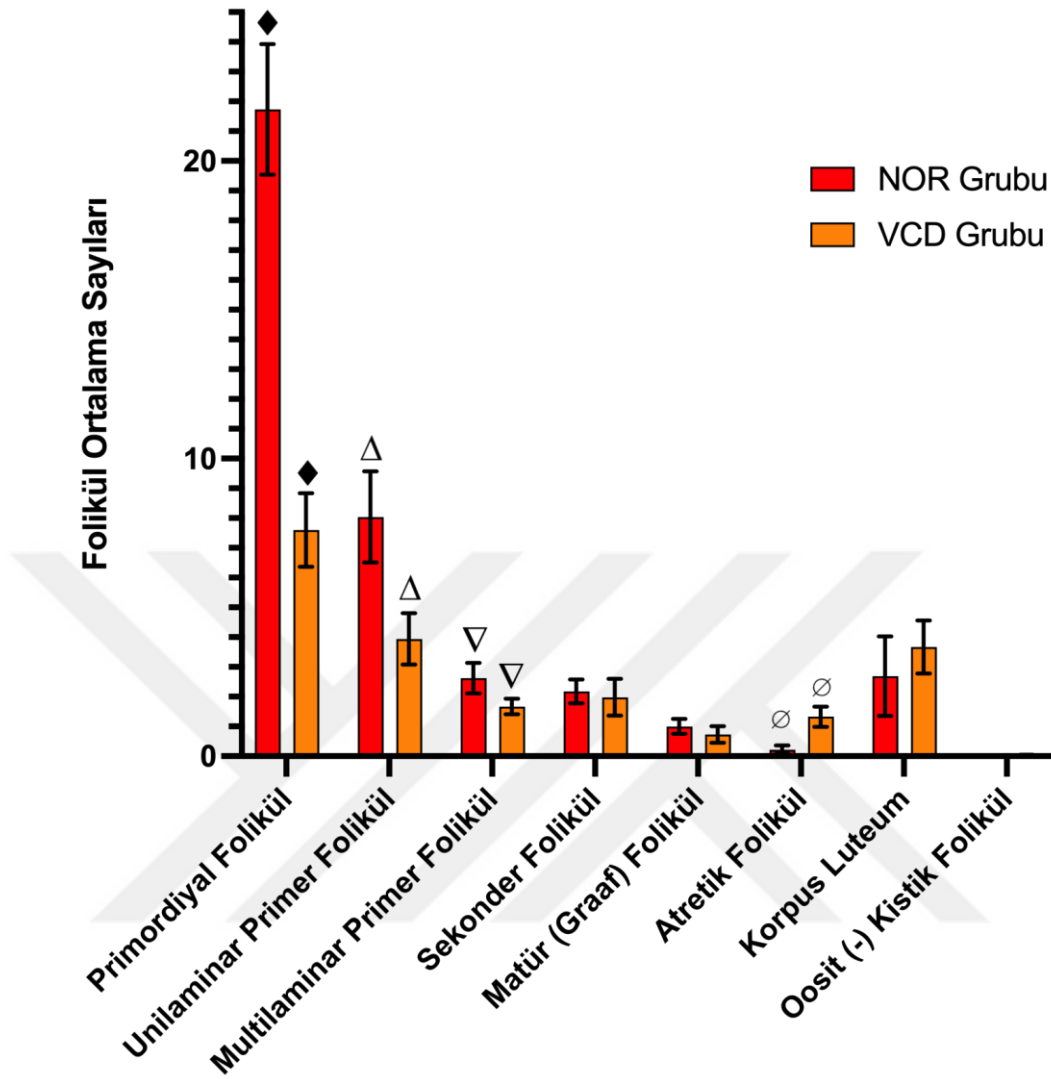
Δ NOR grubu ile VCD grubu kıyaslandığında unilaminar primer folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,002).

∇ NOR grubu ile VCD grubu kıyaslandığında multilaminar primer folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,011).

∅ NOR grubu ile VCD grubu kıyaslandığında atretik folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0,001).

*Veriler ortalama folikül sayısı ve SD (Standart Deviasyon) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 9. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin morfometrik bulguları.

VCD grubu doku kesitleri sonuçlarına bakıldığında NOR grubuna kıyasla preantral folikül (sırasıyla $13,22 \pm 1,58$ ve $32,4 \pm 3,29$) sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın ($p < 0,001$) olduğu belirlendi. VCD grubunda NOR grubuna kıyasla antral folikül (sırasıyla $2,71 \pm 0,59$ ve $3,18 \pm 0,23$) sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın ($p = 0,073$) olmadığı belirlendi (Tablo 15, Grafik 10).

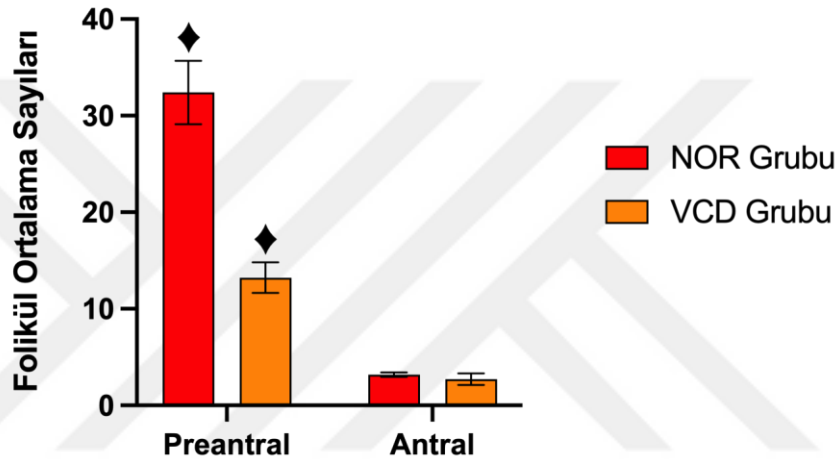
Tablo 15. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin morfolometrik bulguları.

Ovaryan Folikül Sınıflandırması*	Normal Ovaryan Rezerv Grubu (NOR Grubu)	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	p**
Preantral Folikül	32,40 ± 3,29 [†]	13,22 ± 1,58 [†]	<0,001
Antral Folikül	3,18 ± 0,23	2,71 ± 0,59	0,073

♦ NOR grubu ile VCD grubu kıyaslandığında preantral folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0,001).

*Veriler ortalama folikül sayısı ve SD (Standart Deviasyon) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 10. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin morfolometrik bulguları.

4.2.2.2. POI grubu (VCD Grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH Grubu) oluşturan deneklerin morfolometrik bulguları

POI modeli oluşturulan (VCD grubu) ve POI modeli oluşturulduktan sonra KOH uygulanan gruptaki (VCD+KOH grubu) doku kesitlerinde gelişim sürecinin farklı evrelerinde bulunan foliküller ve korpus luteum sayımları yapıldı. Sayım sonuçları ortalama değer ± standart sapma olarak Tablo 16 ve Grafik 11’de görülmektedir.

VCD+KOH grubu doku kesitleri sonuçlarına bakıldığında; VCD grubuna kıyasla multilaminar primer folikül (sırasıyla 1,06±0,26 ve 1,67±0,26) ve sekonder folikül (sırasıyla 0,7±0,32 ve 1,98±0,62) sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın (sırasıyla p<0,001 ve p<0,001) olduğu belirlendi. VCD+KOH grubu doku kesitleri sonuçlarına bakıldığında VCD grubuna kıyasla oosit içermeyen kistik formda folikül (oosit (-) kistik folikül) morfolojisine sahip folikül sayılarında (sırasıyla 2,33±1,26 ve

0,01±0,04) istatistiksel olarak anlamlı bir artma olduğu belirlendi (p=0,003). Gelişim sürecinin farklı evrelerinde bulunan folikül ve korpus luteum sayılarına bakıldığında sonuçların benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi.

Tablo 16. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin morfolometrik bulguları.

Ovaryan Folikül Sınıflandırması*	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	VCD+KOH Grubu	p**
Primordiyal Folikül	7,60 ± 1,24	5,87 ± 2,38	0,118
Unilaminar Primer Folikül	3,94 ± 0,86	3,16 ± 1,22	0,187
Multilaminar Primer Folikül	1,67 ± 0,26 [♠]	1,06 ± 0,26 [♠]	<0,001
Sekonder Folikül	1,98 ± 0,62 ^Δ	0,70 ± 0,32 ^Δ	<0,001
Matür (Graaf) Folikül	0,73 ± 0,28	0,67 ± 0,37	0,722
Atretik Folikül	1,33 ± 0,34	1,38 ± 0,48	0,830
Korpus Luteum	3,67 ± 0,89	3,05 ± 1,11	0,257
Oosit (-) Kistik Folikül	0,01 ± 0,04 [∇]	2,33 ± 1,26 [∇]	0,003

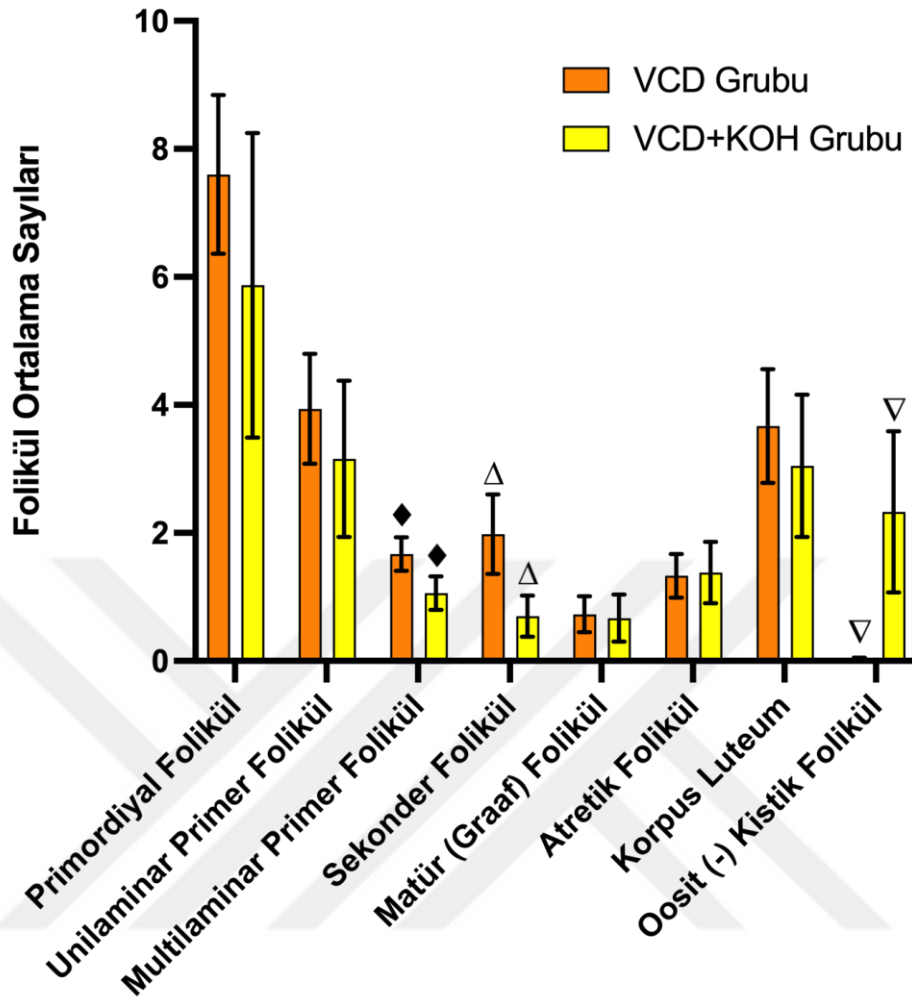
♠ VCD grubu ile VCD+KOH grubu kıyaslandığında multilaminar primer folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0,001).

Δ VCD grubu ile VCD+KOH grubu kıyaslandığında sekonder folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0,001).

∇ VCD grubu ile VCD+KOH grubu kıyaslandığında oosit (-) kistik folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,003).

*Veriler ortalama folikül sayısı ve SD (Standart Deviasyon) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 11. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin morfometrik bulguları.

VCD+KOH grubu doku kesitleri sonuçlarına bakıldığında VCD grubuna kıyasla antral folikül (sırasıyla $1,37 \pm 0,52$ ve $2,71 \pm 0,59$) sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın ($p < 0,001$) olduğu belirlendi. VCD grubu doku kesitleri sonuçlarına bakıldığında NOR grubuna kıyasla preantral folikül (sırasıyla $10,10 \pm 3,48$ ve $13,22 \pm 1,58$) sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın ($p = 0,060$) olmadığı belirlendi (Tablo 17, Grafik 12).

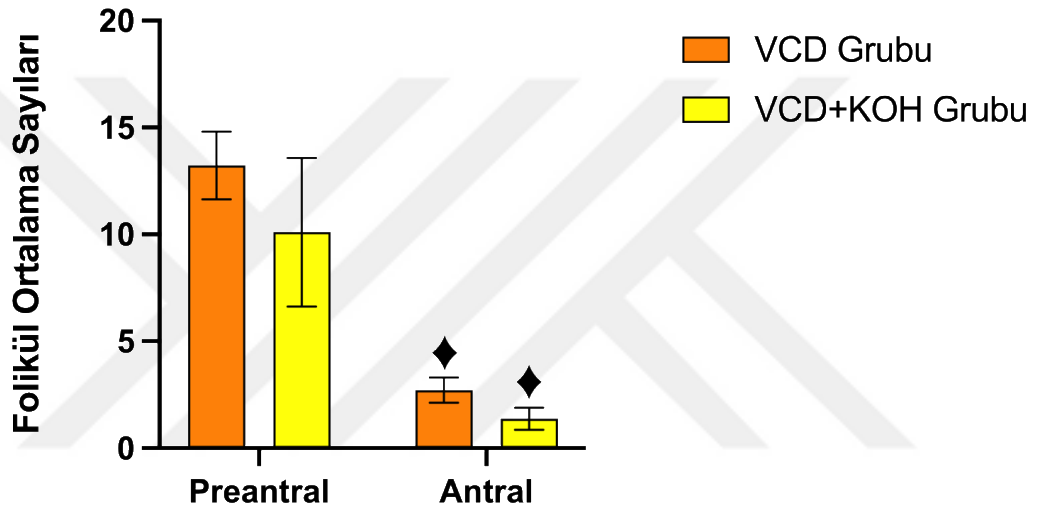
Tablo 17. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin morfometrik bulguları.

Ovaryan Folikül Sınıflandırması*	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	VCD+KOH Grubu	p**
Preantral Folikül	13,22 ± 1,58	10,10 ± 3,48	0,060
Antral Folikül	2,71 ± 0,59*	1,37 ± 0,52*	<0,001

♦ VCD grubu ile VCD+KOH grubu kıyaslandığında antral folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0,001).

*Veriler ortalama folikül sayısı ve SD (Standart Deviasyon) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 12. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin morfometrik bulguları.

4.2.2.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin morfometrik bulguları

POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve çalışmanın deney gruplarını oluşturan POI modeli oluşturulduktan sonra cerrahi yolla açılıp kapatılan (VCD+Cerrahi+KOH grubu), ovaryum dokusuna boş enjeksiyon uygulaması ile mekanik yolla uyarılan (VCD+Mekanik+KOH grubu), ovaryum içine PRP enjeksiyonu uygulanan (VCD+PRP+KOH grubu), ovaryum içine SF enjeksiyonu uygulanan (VCD+SF+KOH grubu) ve tüm bu uygulamaların ardından kontrollü ovaryan hiperstimülasyon yapılarak etkinliğinin değerlendirildiği deneklerin doku kesitlerinde gelişim sürecinin farklı evrelerinde bulunan foliküller ve korpus luteum sayımları yapıldı. Sayım sonuçları ortalama değer ± standart sapma olarak Tablo 18,

Grafik 13 ve Grafik 14'te görülmektedir.

VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH gruplarına ait doku kesitlerinin sonuçlarına bakıldığında; primordiyal folikül ve unilaminar primer folikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,002$ ve $p=0,004$). Primordiyal folikül sayıları açısından gruplar karşılaştırıldığında; VCD+Cerrahi+KOH grubu ile VCD+Mekanik+KOH grubu; VCD+Cerrahi+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu; VCD+PRP+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,021$, $p=0,009$ ve $p=0,027$). Unilaminar primer folikül sayıları için gruplar karşılaştırıldığında; VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu; VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi (sırasıyla $p=0,022$ ve $p=0,013$). Gelişim sürecinin farklı evrelerinde bulunan folikül ve korpus luteum sayılarına bakıldığında sonuçların benzer olduğu ve istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü.

Tablo 18. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin morfolometrik bulguları.

Ovaryan Folikül Sınıflandırması*	VCD + KOH Grubu	VCD + Cerrahi + KOH Grubu	VCD + Mekanik + KOH Grubu	VCD + PRP + KOH Grubu	VCD + SF + KOH Grubu	p**,***
Primordiyal Folikül	5,87 ± 2,38	4,92 ± 2,09 ^Δ	8,65 ± 2,21 [♦]	9,03 ± 2,10 [∇]	5,41 ± 1,89 [∇]	0,002
Unilaminar Primer Folikül	3,16 ± 1,22	3,02 ± 1,05	3,59 ± 1,16 [∅]	1,84 ± 0,42 [∅]	1,73 ± 0,97 [∅]	0,004
Multilaminar Primer Folikül	1,06 ± 0,26	0,91 ± 0,47	0,79 ± 0,44	0,84 ± 0,41	0,75 ± 0,17	0,541
Sekonder Folikül	0,70 ± 0,32	0,79 ± 0,24	0,57 ± 0,21	0,67 ± 0,40	0,76 ± 0,20	0,623
Matür (Graaf) Folikül	0,67 ± 0,37	1,05 ± 0,49	0,98 ± 0,53	0,76 ± 0,43	0,86 ± 0,33	0,474
Atretik Folikül	1,38 ± 0,48	1,37 ± 0,35	1,68 ± 0,63	1,40 ± 0,72	1,13 ± 0,41	0,451
Korpus Luteum	3,05 ± 1,11	2,25 ± 0,89	1,76 ± 0,45	2,13 ± 0,81	1,79 ± 0,84	0,053
Oosit (-) Kistik Folikül	2,33 ± 1,26	3,41 ± 1,80	3,25 ± 1,31	2,78 ± 1,00	2,86 ± 1,61	0,649

♦ VCD+Cerrahi+KOH grubu ile VCD+Mekanik+KOH grubu kıyaslandığında primordiyal folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,021).

Δ VCD+Cerrahi+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu kıyaslandığında primordiyal folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,009).

∇ VCD+PRP+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu kıyaslandığında primordiyal folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,027).

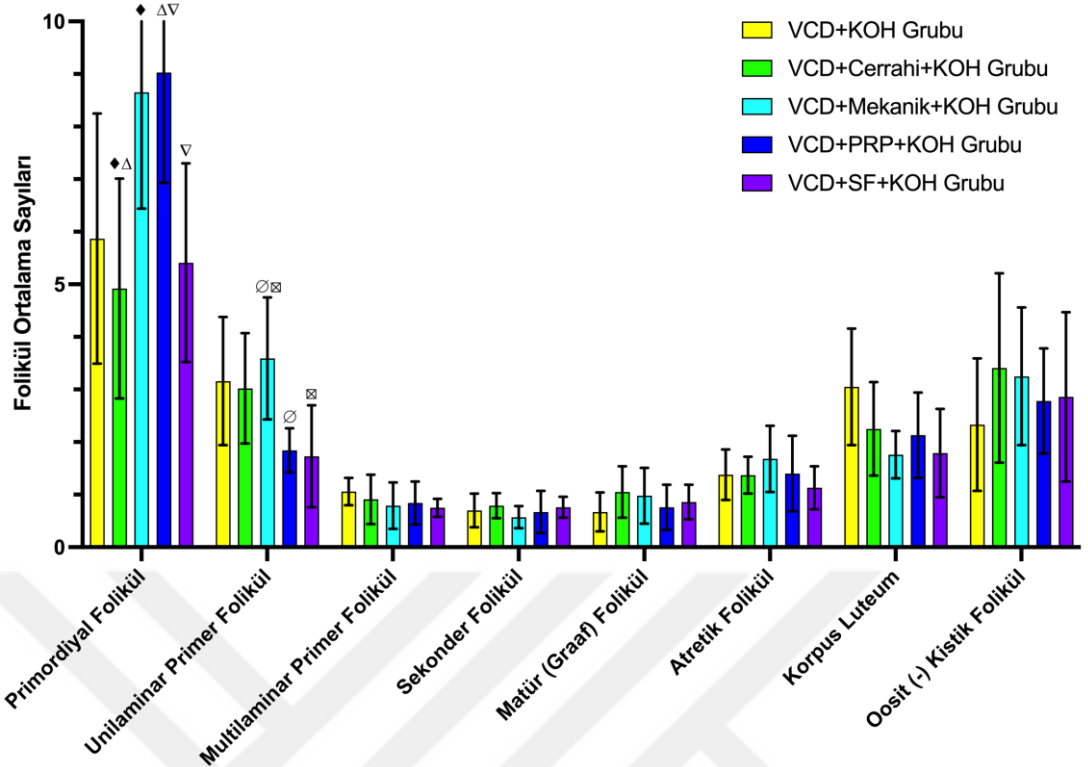
∅ VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu kıyaslandığında unilaminar primer folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,022).

∞ VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu kıyaslandığında unilaminar primer folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,013).

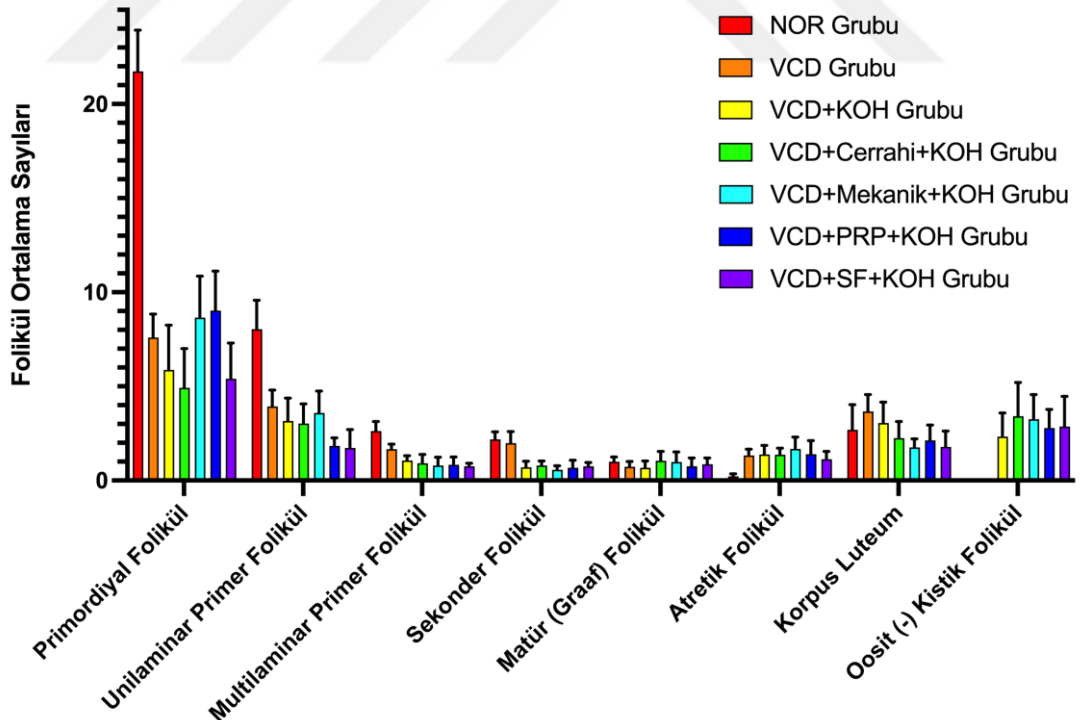
*Veriler ortalama folikül sayısı ve SD (Standart Deviasyon) olarak verildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Post Hoc Tukey Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 13. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin morfometrik bulguları.



Grafik 14. Deneklere ait doku kesitlerinde gelişim sürecinin farklı evrelerinde bulunan folikül ve korpus luteum sayılarının tüm gruplardaki karşılaştırması.

VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH gruplarına ait doku kesitleri incelendiğinde; preantral folikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p=0,024$). Preantral folikül sayıları için gruplar karşılaştırıldığında; VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p=0,028$). VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH gruplarına ait doku kesitleri sonuçlarına bakıldığında antral folikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p=0,624$) (Tablo 19, Grafik 15 ve Grafik 16).

Tablo 19. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve çalışma gruplarını oluşturan deneklerin morfometrik bulguları.

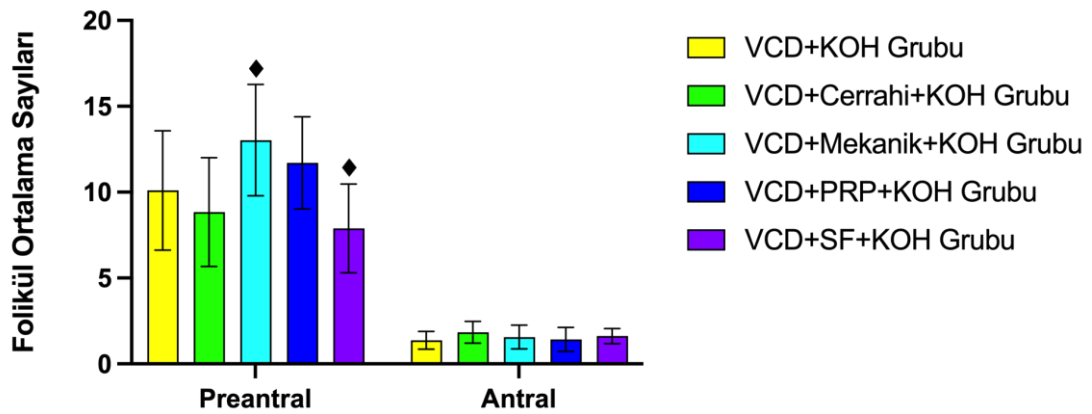
Ovaryan Folikül Sınıflandırması*	VCD + KOH Grubu	VCD + Cerrahi + KOH Grubu	VCD + Mekanik + KOH Grubu	VCD + PRP + KOH Grubu	VCD + SF + KOH Grubu	$p^{**},***$
Preantral Folikül	10,10 ± 3,48	8,84 ± 3,17	13,03 ± 3,24 [†]	11,71 ± 2,68	7,89 ± 2,58 [†]	0,024
Antral Folikül	1,37 ± 0,52	1,84 ± 0,63	1,56 ± 0,69	1,43 ± 0,70	1,62 ± 0,44	0,624

† VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu kıyaslandığında preantral folikül sayısı bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0,024$).

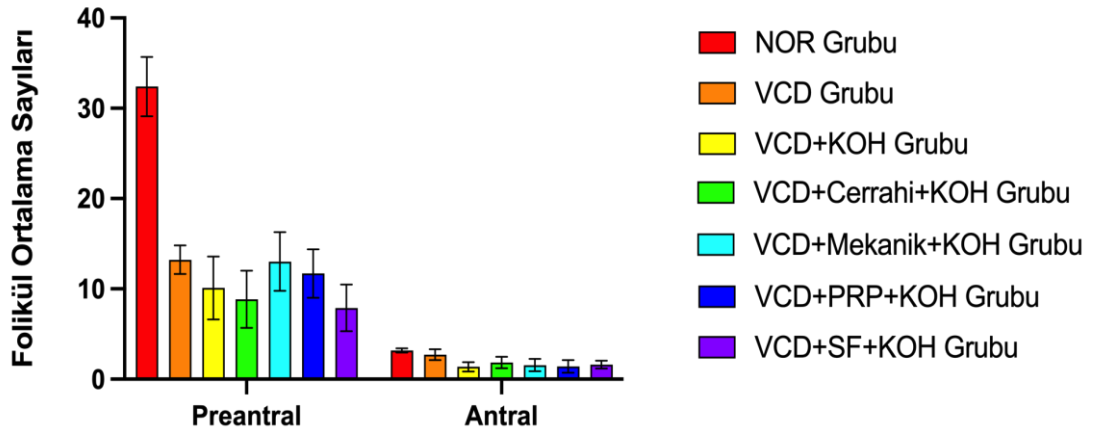
*Veriler ortalama folikül sayısı ve SD (Standart Deviasyon) olarak verildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Post Hoc Tukey Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 15. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin morfometrik bulguları.



Grafik 16. Deneklere ait doku kesitlerinde preantral folikül ve antral folikül sayılarının tüm gruplardaki karşılaştırması.

4.3. Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. Serum sıvılarında biyokimyasal bulgular

Tez çalışmasındaki tüm gruplardaki deneklerden, herhangi bir uygulama yapılmadan önce, çalışmanın ilk günü 1. gün (G1) AMH değerleri için kan örnekleri alındı. Subkutan olarak 15 gün boyunca devam eden VCD enjeksiyonlarının bitiminde, NOR grubu hariç, tüm gruplardaki deneklerden 15. gün (G15) AMH değerleri için kan örnekleri alındı. VCD grubu hariç, POI modeli oluşturulup cerrahi yolla açılıp kapatılma, mekanik yolla uyarılma, PRP enjeksiyonu, SF enjeksiyonu sonrası KOH protokolü uygulanan diğer tüm gruplardaki deneklerden 55. gün (G55) AMH değerleri için kan örnekleri alındı. Kan alma işlemlerinin tamamı denekler sevofluran inhalasyon anestezisi altındayken deneklerden retro-orbital olarak gerçekleştirildi. Kan örneklerinden elde edilen serum sıvılarında Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) yöntemi ile serum anti-Müllerian Hormon (AMH) konsantrasyonları tayin edildi.

4.3.1.1. Serum AMH konsantrasyonları

4.3.1.1.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin AMH konsantrasyonları

Normal ovaryan rezerve sahip deneklerin yer aldığı NOR grubu ile prematür ovaryan yetmezliğine sahip deneklerin yer aldığı VCD grubu deneklerinden elde edilen 1. gün serum örneklerinde bakılan serum AMH konsantrasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı belirlendi ($p=0,091$) (Tablo 20 ve Grafik 17).

Tablo 20. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) deneklerin G1 AMH konsantrasyonu ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin G1 AMH konsantrasyonu.

	Normal Ovaryan Rezerv Grubu (NOR Grubu) (G1 AMH)	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu) (G1 AMH)	p**
AMH*	7,08 ± 0,81	6,94 ± 0,74	0,091

*Veriler ortalama AMH konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/mL) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Normal ovaryan rezerve sahip deneklerin yer aldığı NOR grubu deneklerinden elde edilen 1. gün serum örneklerinde bakılan serum AMH konsantrasyonları ile POI'ye sahip deneklerin yer aldığı VCD grubu deneklerinden elde edilen 15. gün serum örneklerinde bakılan serum AMH konsantrasyonları karşılaştırıldığında NOR grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olduğu görüldü ($p=0,010$) (Tablo 21 ve Grafik 17).

Tablo 21. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) deneklerin G1 AMH konsantrasyonu ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin G15 AMH konsantrasyonu.

	Normal Ovaryan Rezerv Grubu (NOR Grubu) (G1 AMH)	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu) (G15 AMH)	p**
AMH*	7,08 ± 0,81 [†]	4,15 ± 1,57 [†]	0,010

† NOR grubu G1AMH konsantrasyonu ile VCD grubu G15 AMH konsantrasyonu kıyaslandığında iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,010).

*Veriler ortalama AMH konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/mL) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.3.1.1.2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin AMH konsantrasyonları

VCD ve VCD+KOH grupları arasındaki 1. gün serum örneklerinde bakılan serum AMH konsantrasyonları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı belirlendi (p=0,727). VCD ve VCD+KOH grupları arasındaki 15. gün serum örneklerinde bakılan serum AMH konsantrasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü (p=0,019). (Tablo 22 ve Grafik 17).

Tablo 22. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin G1 ve G15 AMH konsantrasyonları.

	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	VCD+KOH Grubu	p**
G1 AMH	2,94 ± 0,74	2,79 ± 0,91	0,727
G15 AMH	4,15 ± 1,57 ^Δ	2,46 ± 0,39 ^Δ	0,019
G55 AMH	-	4,84 ± 0,83	-

Δ VCD grubu ile VCD+KOH grubu kıyaslandığında G15 AMH konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,019).

*Veriler ortalama AMH konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/mL) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4.3.1.1.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin AMH konsantrasyonları

VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH grupları arasındaki 1., 15. ve 55. gün serum örneklerinde bakılan serum AMH konsantrasyonları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir farkın

(sırasıyla p=0,148, p=0,083 ve p=0,518) olmadığı belirlendi (Tablo 23 ve Grafik 17).

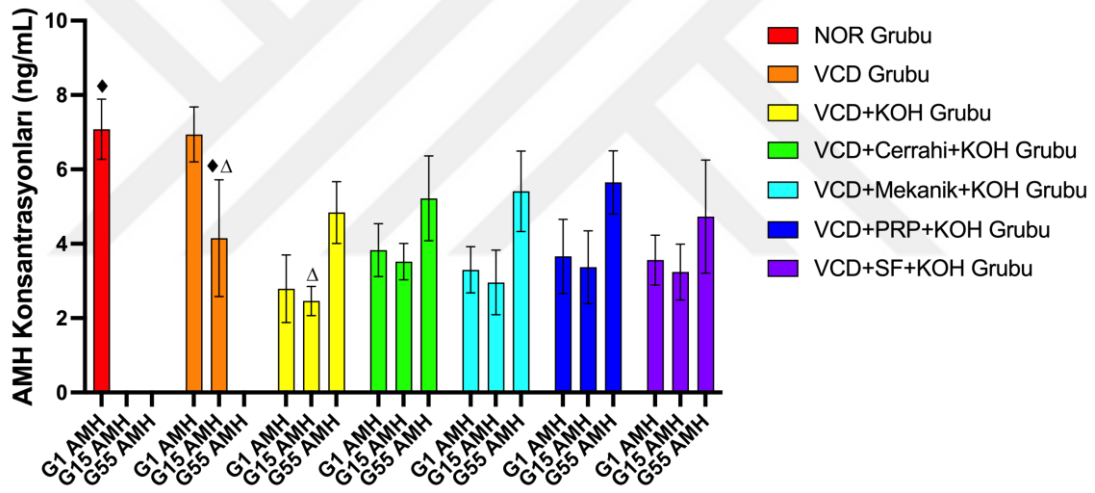
Tablo 23. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin G1, G15 ve G55 serum AMH konsantrasyonları.

	VCD + KOH Grubu	VCD + Cerrahi + KOH Grubu	VCD + Mekanik + KOH Grubu	VCD + PRP + KOH Grubu	VCD + SF + KOH Grubu	p ^{**,***}
G1 AMH	2,79 ± 0,91	3,83 ± 0,71	3,30 ± 0,62	3,66 ± 1,00	3,56 ± 0,67	0,148
G15 AMH	2,46 ± 0,39	3,52 ± 0,49	2,96 ± 0,87	3,37 ± 0,98	3,24 ± 0,75	0,083
G55 AMH	4,84 ± 0,83	5,22 ± 1,14	5,41 ± 1,08	5,65 ± 0,85	4,73 ± 1,52	0,518

*Veriler ortalama AMH konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/mL) olarak verildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Post Hoc Tukey Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 17. Tez çalışmasının 1., 15. ve 55. günlerinde elde edilen serum örneklerindeki AMH konsantrasyonlarının (ng/mL) tüm gruplarda karşılaştırılması.

4.3.2. Ovaryum dokusu homojenatlarında biyokimyasal bulgular

Tez çalışmasındaki tüm gruplarda yer alan denekler sevofluran inhalasyon anestezisi altındayken deneklerin ovaryum dokuları eksize edildi. Alınan ovaryum dokularında homojenizasyon işlemi gerçekleştirildi ve elde edilen ovaryum dokusu homojenatlarında Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) yöntemi ile TAZ, NAIP ve CTGF konsantrasyonları tayin edildi.

4.3.2.1. TAZ konsantrasyonları

4.3.2.1.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin TAZ konsantrasyonları

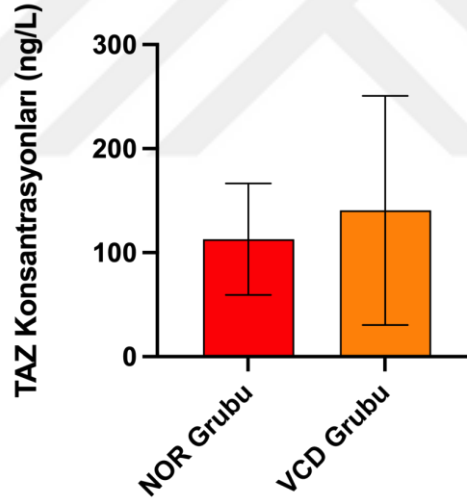
NOR ve VCD grupları arasındaki TAZ konsantrasyonları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p=0,557$) (Tablo 24, Grafik 18).

Tablo 24. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin TAZ konsantrasyonları.

	Normal Ovaryan Rezerv Grubu (NOR Grubu)	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	p**
TAZ*	112,97 ± 53,67	140,68 ± 110,19	0,557

*Veriler ortalama TAZ konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/L) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 18. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin TAZ konsantrasyonları (ng/L).

4.3.2.1.2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin TAZ konsantrasyonları

VCD ve VCD+KOH grupları arasındaki TAZ konsantrasyonları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı ($p=0,820$) (Tablo 25, Grafik 19).

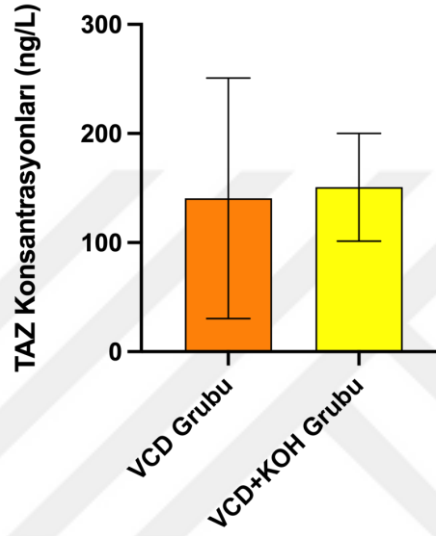
Tablo 25. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin TAZ konsantrasyonları.

	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	VCD+KOH Grubu	p**
TAZ*	140,68 ± 110,19	150,79 ± 49,33	0,820

*Veriler ortalama TAZ konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/L) olarak verildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Post Hoc Tukey Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 19. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin TAZ konsantrasyonları (ng/L).

4.3.2.1.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin TAZ konsantrasyonları

VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH grupları arasındaki TAZ konsantrasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlendi ($p<0,001$). TAZ konsantrasyonları için gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında VCD+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu; VCD+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu; VCD+Cerrahi+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu; VCD+Cerrahi+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu; VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu; VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görüldü (sırasıyla $p<0,001$, $p=0,015$, $p=0,002$, $p=0,045$, $p=0,001$, ve $p=0,028$). (Tablo 26, Grafik 20 ve Grafik 21).

Tablo 26. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin TAZ konsantrasyonları.

	VCD + KOH Grubu	VCD + Cerrahi + KOH Grubu	VCD + Mekanik + KOH Grubu	VCD + PRP + KOH Grubu	VCD + SF + KOH Grubu	p**,***
TAZ*	150,79 ± 49,33 ^Δ	164,16 ± 24,93 [∇]	158,23 ± 44,43 [⊠]	284,79 ± 83,13 ^{◆∇⊠}	248,67 ± 49,94 ^{Δ⊠}	<0,001

◆ VCD+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu kıyaslandığında TAZ konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0,001).

Δ VCD+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu kıyaslandığında TAZ konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,015).

∇ VCD+Cerrahi+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu kıyaslandığında TAZ konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,002).

∅ VCD+Cerrahi+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu kıyaslandığında TAZ konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,045).

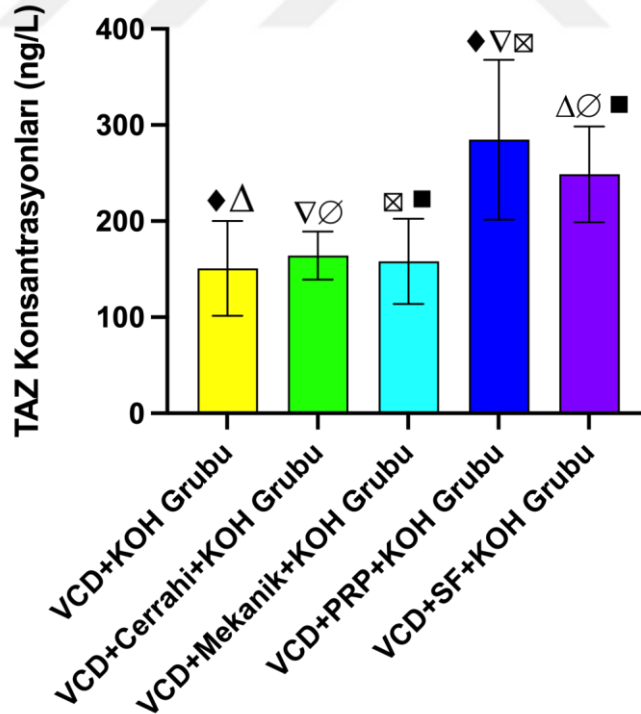
⊠ VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu kıyaslandığında TAZ konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,001).

■ VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu kıyaslandığında TAZ konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,028).

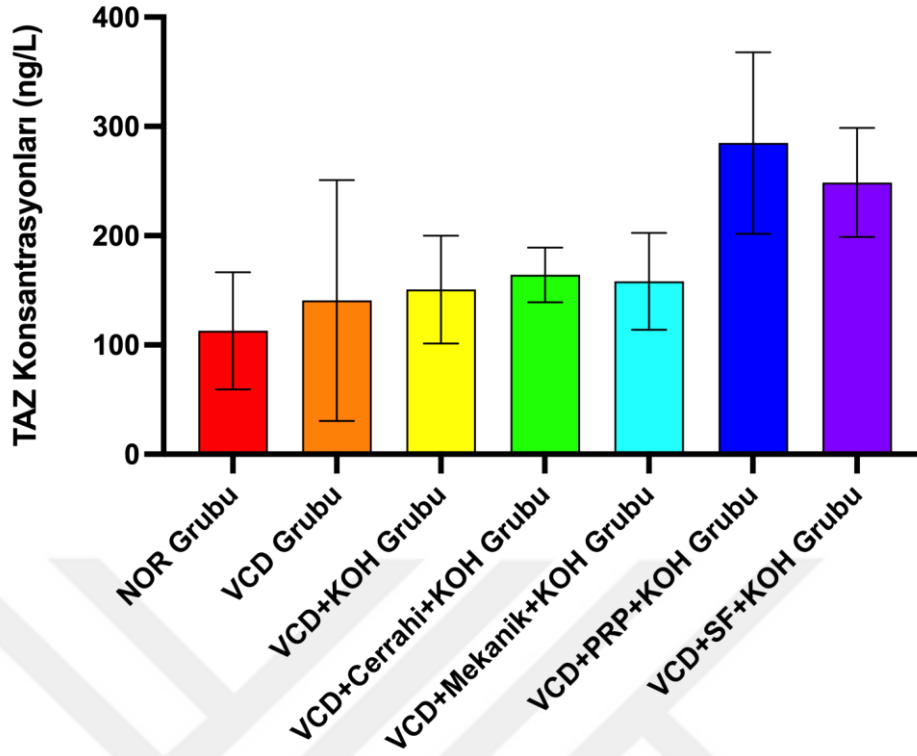
*Veriler ortalama TAZ konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/L) olarak verildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Post Hoc Tukey Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 20. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin TAZ konsantrasyonları (ng/L).



Grafik 21. Deneklere ait TAZ konsantrasyonlarının tüm gruplardaki karşılaştırması (ng/L).

4.3.2.2. NAIP konsantrasyonları

4.3.2.2.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin NAIP konsantrasyonları

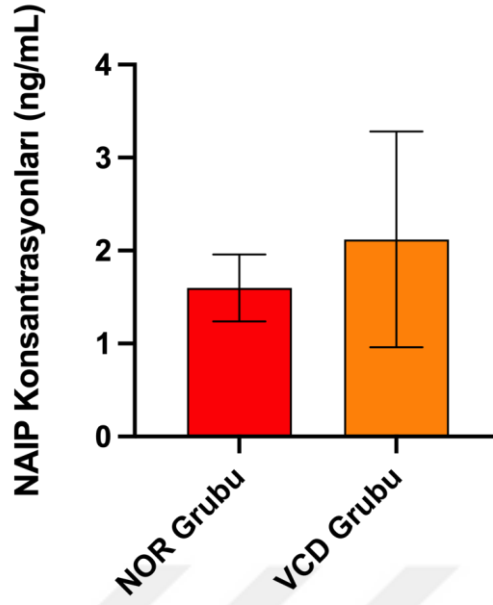
NOR ve VCD grupları arasındaki NAIP konsantrasyonları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,270$) (Tablo 27, Grafik 22).

Tablo 27. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin NAIP konsantrasyonları.

	Normal Ovaryan Rezerv Grubu (NOR Grubu)	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	p**
NAIP*	1,60 ± 0,36	2,12 ± 1,16	0,270

*Veriler ortalama NAIP konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/mL) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 22. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin NAIP konsantrasyonları (ng/mL).

4.3.2.2.2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH Grubu) oluşturan deneklerin NAIP konsantrasyonları

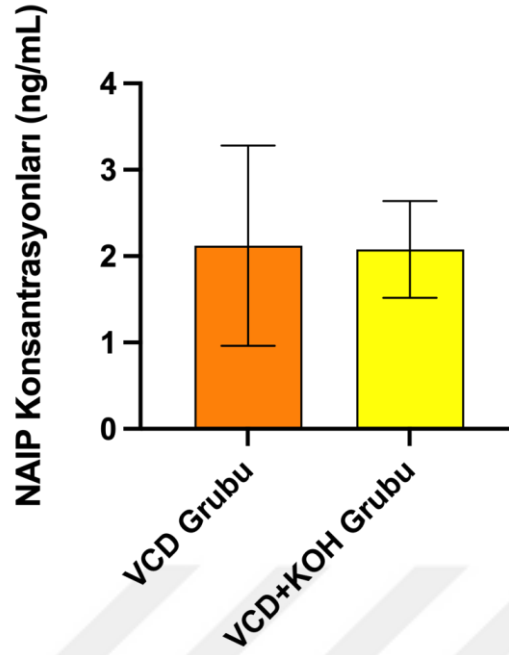
VCD ve VCD+KOH grupları arasındaki NAIP konsantrasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0,936$) (Tablo 28, Grafik 23).

Tablo 28. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin NAIP konsantrasyonları.

	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	VCD+KOH Grubu	p**
NAIP*	2,12 ± 1,16	2,08 ± 0,56	0,936

*Veriler ortalama NAIP konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/mL) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 23. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin NAIP konsantrasyonları (ng/mL).

4.3.2.2.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH Grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin NAIP konsantrasyonları

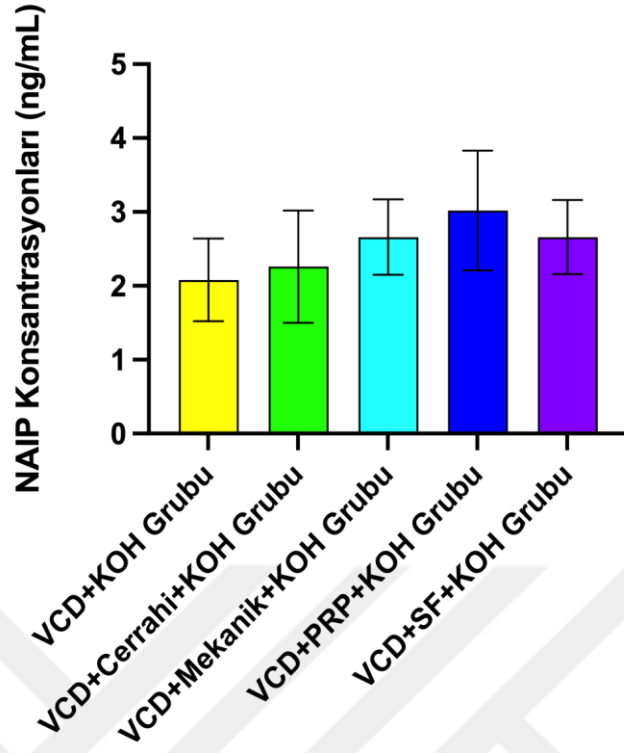
VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH grupları arasındaki NAIP konsantrasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı görüldü ($p=0,078$) (Tablo 29, Grafik 24 ve Grafik 25).

Tablo 29. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin NAIP konsantrasyonları.

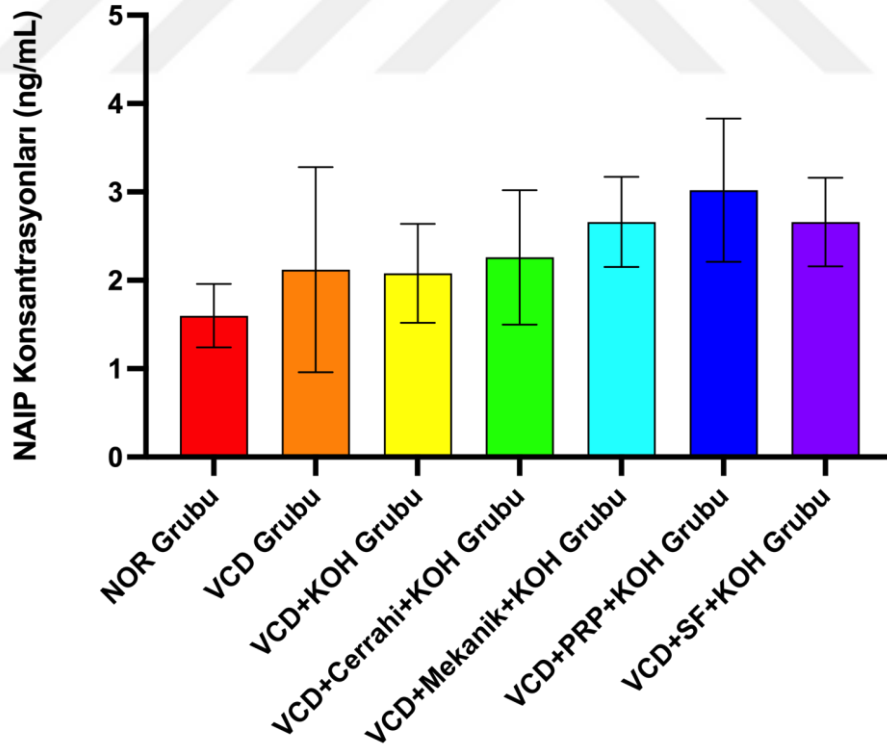
	VCD + KOH Grubu	VCD + Cerrahi + KOH Grubu	VCD + Mekanik + KOH Grubu	VCD + PRP + KOH Grubu	VCD + SF + KOH Grubu	p**
NAIP*	2,08 ± 0,56	2,26 ± 0,76	2,66 ± 0,51	3,02 ± 0,81	2,66 ± 0,50	0,078

*Veriler ortalama NAIP konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/mL) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 24. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin NAIP konsantrasyonları (ng/mL).



Grafik 25. Deneklere ait NAIP konsantrasyonlarının tüm gruplardaki karşılaştırması (ng/mL).

4.3.2.3. CTGF konsantrasyonları

4.3.2.3.1. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin CTGF konsantrasyonları

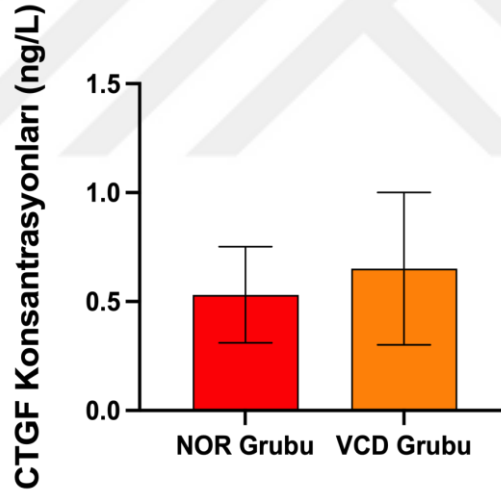
NOR ve VCD grupları arasındaki CTGF konsantrasyonları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=0,466$) (Tablo 30, Grafik 26).

Tablo 30. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin CTGF konsantrasyonları.

	Normal Ovaryan Rezerv Grubu (NOR Grubu)	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	p**
CTGF*	0,53 ± 0,22	0,65 ± 0,35	0,466

*Veriler ortalama CTGF konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/L) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 26. Normal ovaryan rezerve sahip (NOR grubu) ve POI modeli oluşturulan (VCD grubu) deneklerin CTGF konsantrasyonları (ng/L).

4.3.2.3.2. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH Grubu) oluşturan deneklerin CTGF konsantrasyonları

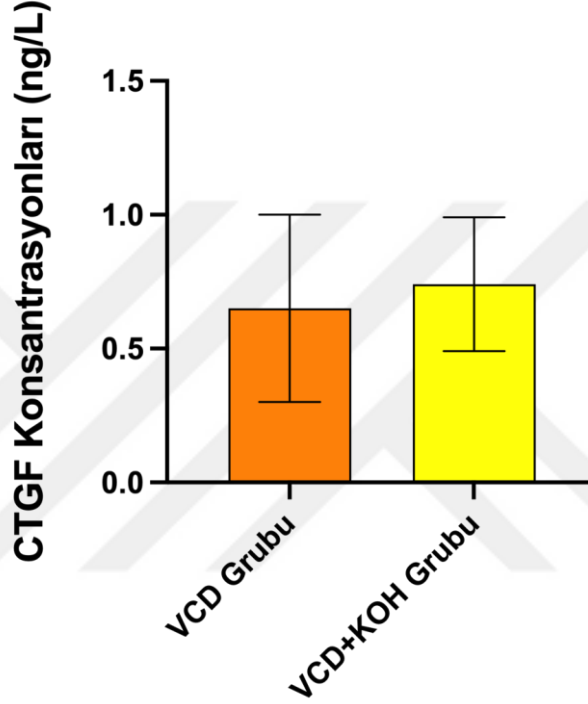
VCD ve VCD+KOH grupları arasındaki CTGF konsantrasyonları karşılaştırıldı ve istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görüldü ($p=0,578$) (Tablo 31, Grafik 27).

Tablo 31. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin CTGF konsantrasyonları.

	Prematür Ovaryan Yetmezliği Grubu (VCD Grubu)	VCD+KOH Grubu	p**
CTGF*	140,68 ± 110,19	150,79 ± 49,33	0,820

*Veriler ortalama CTGF konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/L) olarak verildi.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student-T Testi uygulandı ve $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 27. POI grubu (VCD grubu) ve POI modelinde KOH protokolü uygulanan grubu (VCD+KOH grubu) oluşturan deneklerin CTGF konsantrasyonları (ng/L).

4.3.2.3.3. POI modelinde KOH protokolü uygulanan grup (VCD+KOH Grubu) ve deney gruplarını oluşturan deneklerin CTGF konsantrasyonları

VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH grupları arasındaki CTGF konsantrasyonları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0,001$). CTGF konsantrasyonları için gruplar ikili olarak karşılaştırıldığında VCD+KOH grubu ile VCD+Mekanik+KOH grubu; VCD+Cerrahi+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu; VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu; VCD+Mekanik+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görüldü (sırasıyla $p=0,019$, $p=0,004$, $p=0,002$, ve $p < 0,001$). (Tablo 32, Grafik 28 ve Grafik 29).

Tablo 32. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve çalışma gruplarını oluşturan deneklerin CTGF konsantrasyonları.

	VCD + KOH Grubu	VCD + Cerrahi + KOH Grubu	VCD + Mekanik + KOH Grubu	VCD + PRP + KOH Grubu	VCD + SF + KOH Grubu	p ^{**,***}
CTGF*	0,74 ± 0,25 [♦]	0,60 ± 0,07 ^Δ	0,46 ± 0,15 ^{♦∇∅}	0,81 ± 0,16 [∇]	0,94 ± 0,13 ^{Δ∅}	<0,001

♦ VCD+KOH grubu ile VCD+Mekanik+KOH grubu kıyaslandığında CTGF konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,019).

Δ VCD+Cerrahi+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu kıyaslandığında CTGF konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,004).

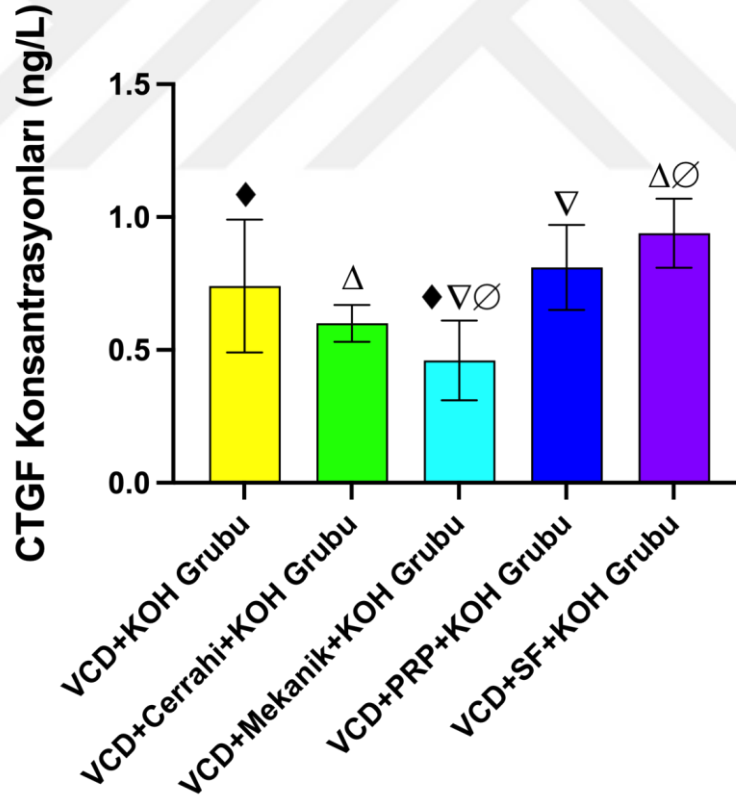
∇ VCD+ Mekanik+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu kıyaslandığında CTGF konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0,002).

∅ VCD+ Mekanik+KOH grubu ile VCD+SF+KOH grubu kıyaslandığında CTGF konsantrasyonları bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p<0,001).

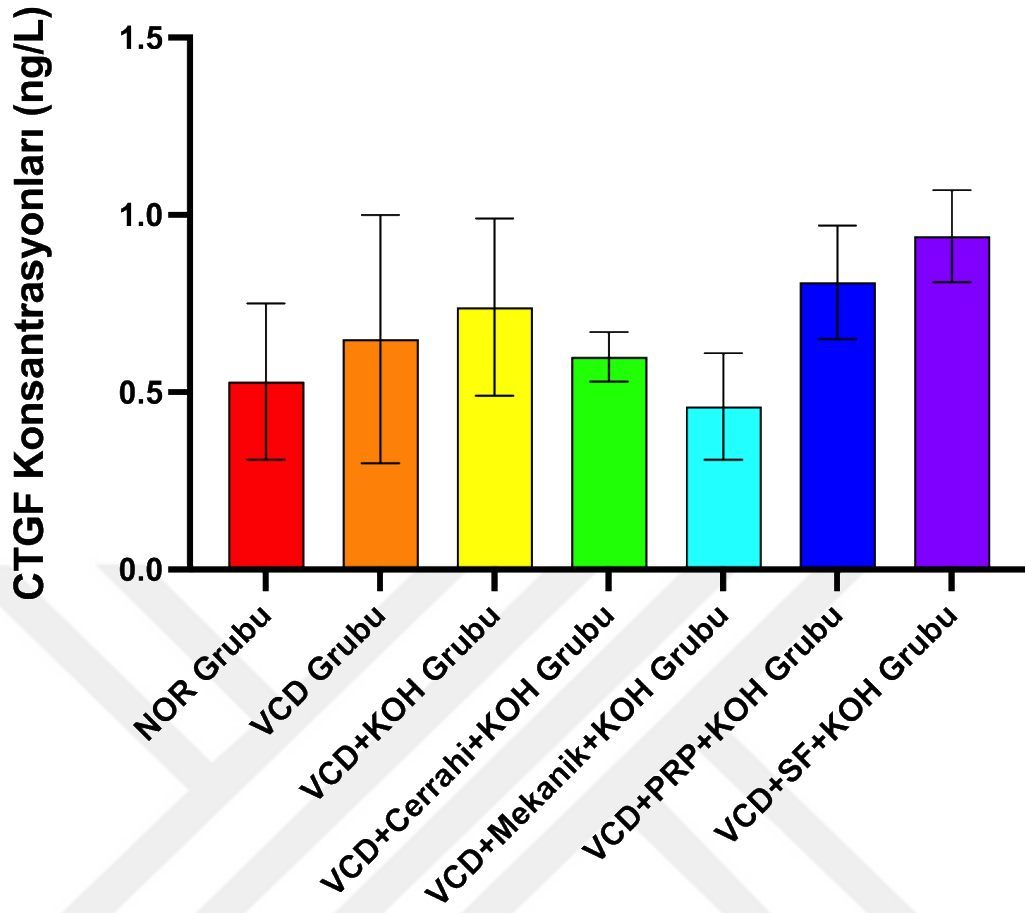
*Veriler ortalama CTGF konsantrasyonları ve SD (Standart Deviasyon) (ng/L) olarak verildi.

** Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda Post Hoc Tukey Testi uygulandı ve p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 28. POI modelinde KOH uygulanan grup (VCD+KOH grubu) ve çalışma gruplarını oluşturan deneklerin CTGF konsantrasyonları (ng/L).



Grafik 29. Deneklere ait CTGF konsantrasyonlarının tüm gruplardaki karşılaştırması (ng/L).

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, “infertilite nedenlerinden biri olan prematür ovaryan yetmezlik (POI) olgularında, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolü öncesi uygulanan intraovaryan PRP enjeksiyonu, ovaryan foliküllerin aktivasyonunu, PRP’nin etkisi dışında, hippo sinyal yolağı üzerinden enjeksiyon iğnesinin oluşturduğu mekanik uyarım ile gerçekleştirir” hipotezinden yola çıkarak, sıçanlarda deneysel POI modeli oluşturulmuş, POI modelinde KOH öncesi intraovaryan mekanik uyarım ve intraovaryan serum fizyolojik veya PRP enjeksiyonu uygulamasının karşılaştırmalı olarak primordiyal foliküllerin aktivasyonu, ovaryan foliküllerin gelişimi üzerindeki etkisi ve mekanizması değerlendirilmiştir.

5.1. Denek Seçimi

İdeal hayvan modelleri ve değerlendirme indeksleri ilaç geliştirme ve mekanizma araştırmaları için gereklidir. Deneysel çalışmalarda hayvan modellerinin kullanımı deneklerin kolay eldesi, invaziv testlerin uygulanabilirliği, kapsamlı doku örnekleme sağlanması, hastalık şiddetinin standardize edilebilmesi gibi nedenlerle avantajlıdır. Özellikle kontrollü deney koşullarının mümkün olması önemlidir. Üreme fonksiyonu alanında, özellikle dişi hayvanların kullanımını içeren araştırmalarda, fareler ve sıçanlar, muhtemelen iyi karakterize edilmiş östrus döngüleri ve güvenli kullanımları nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu kemirgenlerdeki östrus döngüsünün kısa ve kesin uzunluğu onları çok uygun kılmaktadır. Deney hayvanlarında östrus döngüsünün değerlendirilmesi, hipotalamus-hipofiz gonadal eksenin bütünlüğünün ve dişi üreme sisteminin işleyen üreme fonksiyonunun yararlı bir ölçütüdür. İlaçların ve kimyasalların üreme fonksiyonu üzerindeki etkilerini araştırmak için de kullanılabilir; sıklıkla üreme organlarının tipik morfolojisi, sitolojisi ve histolojisinde bir bozulma ve östrus döngüsünün belirli evrelerinin süresinde değişiklik olarak ifade edilir (Ajayi, & Akhigbe, 2020). Bu çalışmada, ovaryumda oluşturulan mekanik uyarım ve PRP enjeksiyonunun ovaryan folikül aktivasyonuna etkisini değerlendirmek amacıyla, Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlar denek olarak kullanılmış ve POI modeli oluşturulmuştur.

5.2. POI Modeli

Günümüzde POI etiyojisi dikkate alınarak tercih edilen POI hayvan modelleri; kemoterapik ilaç kaynaklı POI modelleri, otoimmün POI modelleri, zihinsel strese ilişkin POI modelleri ve galaktoz (GAL) POI modelleri olarak sınıflandırılabilir. Ancak farklı POI hayvan modeli yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin, otoimmün ve zihinsel strese ilişkin POI hayvan modellerinin stabilitesi düşüktür. GAL kaynaklı hayvan modeli, klinik POI hastalarının fizyolojik yaşlanma özelliklerini daha iyi taklit edebilir ancak başarı oranı daha düşüktür. Bu nedenle ilaç müdahalesi ve mekanizma araştırması için ideal bir hayvan modeli seçmek hâlâ büyük bir zorluktur (Dai ve ark., 2023). POI'ye neden olan patolojilerin çeşitliliğini yansıtmak için fare modelleri dört yaklaşımdan birini kullanma eğilimindedir. İlk yaklaşım, cisplatin, siklofosfamid ve busulfan gibi kemoterapik ilaçlar POI modelleri oluşturmak için kullanılmıştır. Çünkü kemoradyoterapi geri dönüşü olmayan ovaryum dokusu hasarına neden olabilmektedir. Bu tür ilaçların tek seferlik uygulanması modelleme etkileri sağlayabilir, ancak kemoterapi ovaryum dokusunun yanı sıra diğer doku ve organlara da zarar verir. Bu durum farelerin tedaviden ölmesine neden olabilir ve toksik bileşiklerin uygulanması araştırmacılar için risk oluşturur. İkinci yaklaşım, iatrojenik cerrahinin neden olduğu ovaryum dokusu hasarını taklit etmek için ooforektomi veya kısmi rezeksiyon uygulanmasıdır. Cerrahi modellerin başarı oranları yüksektir ve ovaryum dokusundaki hasar hedeflenebilir ancak bu modeller POI'nin yalnızca son aşamasını taklit eder ve POI'nin diğer sistemler üzerindeki etkilerini doğru şekilde taklit edemez. Üçüncü yaklaşım, otoimmün modeller adrenal hastalığın, tiroid hastalığının ve Addison hastalığının otoimmün formlarının neden olduğu ovaryum dokusu hasarını taklit etmek için kullanılmıştır. Farelere ZP3 enjekte etmek, otoimmün hücrelerin ayrım gözetmeksizin folikülleri öldürmesine ve dolayısıyla ovaryan yetmezliğe neden olur. Bu çalışmada tercih edilen VCD, özellikle primordiyal ve primer foliküller dahil olmak üzere küçük folikülleri öldürür; erken dönemde ise sekonder folikül gelişiminden sonra büyük foliküller üzerinde VCD'nin bir etkisi olduğuna dair kanıt yoktur. VCD'nin küçük foliküller üzerindeki öldürücü etkisi, Bax/Bcl2 apoptoz yolu, Rictor/mTORC yolu ve Kit ligand sinyal yolu ile ilişkilidir. Düşük doz VCD'nin

primordiyal folikülleri aktive ettiği bulunmuş ve reproduktif sisteme toksik etkilerine ek olarak, primordiyal foliküllerin VCD tarafından hızla tükenmesinin de POI'nin nedeni olabileceği öne sürülmüştür. VCD kaynaklı POI modelinin başarı oranı yüksektir, etkileri kalıcıdır ve deneklere zarar vermez. Uzun süreli, yüksek dozlu VCD tedavisinin, küçük folikülleri öldürdüğü ve POI'yi indükleyerek foliküler büyüme periyodu sırasında foliküler gelişimi ve atılımı hızlandırdığı bulunmuştur. VCD ile indüklenen modellerin diğer bir avantajı da ovaryan yetmezliğin distal sistemler üzerindeki etkisi gibi POI komplikasyonlarını taklit etme potansiyelidir (Cao ve ark., 2020). Tüm bu veriler doğrultusunda, bu çalışmada sıçanlarda POI modelini oluşturmak üzere VCD tedavisi tercih edilmiş ve deneysel modelin oluşturulduğu, morfolojik veriler olan preantral folikül sayılarındaki ve serum AMH seviyelerindeki anlamlı azalma ile model desteklenmiştir.

5.3. POI Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Denek Vücut ve Ovaryum Dokusu Ağırlıklarına Etkisi

Çalışma kapsamında normal ovaryan rezerve sahip deneklerle VCD grubundaki deneklerin vücut ağırlığı ve ovaryum dokularının ağırlığında bir fark saptanmamıştır (sırasıyla $p=0,656$ ve $p=0,418$). Bununla birlikte POI modeli oluşturulan ve ardından KOH protokolü uygulanan grupta hem vücut ağırlıklarının hem de ovaryum dokusu ağırlıklarının anlamlı olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (sırasıyla vücut ağırlıkları için $p=0,003$, ovaryum dokusu ağırlıkları için $p=0,004$). Bu gruplar arasındaki anlamlı artışın sakrifikasyon işleminin iki grupta 15. ve 65. günlerde yapılması sonucunda olması muhtemeldir. Bu düşünce, tüm ağırlık ölçümlerinin 65. günde yapıldığı KOH protokolü uygulanan gruplar arasında (VCD+KOH, VCD+Cerrahi+KOH, VCD+Mekanik+KOH, VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH) vücut ağırlıklarının benzer olması ile desteklenmektedir. Literatürde Muhammad ve ark. (2009) çalışmalarında, VCD uyguladıkları Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda doza bağımlı olarak gıda alımının azaldığını ve buna bağlı olarak kilo kaybının gerçekleştiğini rapor etmişlerdir (Muhammad ve ark., 2009). Haas ve ark. (2007) da yaptıkları çalışmada, 160 mg/kg VCD uyguladıkları C57Bl/6 cinsi farelerin kilo alımının azaldığını bildirmişlerdir (Haas, Christian, & Hoyer, 2007). Literatürde kilo

alımının arttığını ya da değişmediğini (Sahambi, Visser, Themmen, Mayer, & Devine, 2008) bildiren çalışmalar da mevcuttur. Laboratuvarlarımızda gerçekleştirilen ve POI modeli oluşturulan iki çalışmada da enjeksiyonların başlangıç ve bitiş günü vücut ağırlık ölçümlerinde gruplar arasında fark bulunmamıştır (Cakir ve ark. 2024; Kuspinar, 2023). Bu veriler VCD uygulamasının vücut ağırlığı üzerine etkisinin olmadığı sonucunu destekler niteliktedir. Bu gözlem, VCD enjeksiyonlarının gıda tüketimini veya kişinin metabolizmasını etkilemediğini göstermektedir. Vücut kitle indeksinin, gonadotropin dozlarının ayarlanmasında ve ovaryan stimülasyon protokolleri kapsamında foliküler gelişim sürecinin düzenlenmesinde önemli bir belirleyici etken olduğu göz önüne alındığında (Maged ve ark., 2019), vücut ağırlığı ölçümleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaması, POI modeli oluşturulduktan sonra uygulanan KOH protokolünün etkinliğini değerlendirmek açısından bir standardizasyona katkıda bulunarak uygun bir değerlendirme yapılmasına olanak sağlamaktadır.

Çalışmada POI modeli oluşumunu desteklemek amacıyla NOR ve VCD gruplarının karşılaştırması yapılmış, mevcut literatürle uyumlu olarak (Flaws, Doerr, Sipes, & Hoyer, 1994), VCD enjeksiyonlarını takiben ovaryum dokusu ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu veri, VCD enjeksiyonlarının ovaryum dokusu üzerinde genel bir etkiden ziyade primordiyal ve primer foliküller üzerinde spesifik bir etkiye sahip olduğu fikrini desteklemektedir. Bununla birlikte KOH protokolü uygulanan gruplar arasında ovaryum dokusu ağırlıklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görülmüştür (sırasıyla $p=0,099$ ve $p=0,011$). Ovaryum dokusundaki anlamlı farkın nedeni VCD+KOH grubu ile VCD+PRP+KOH grubu karşılaştırıldığında, PRP uygulanan grubun lehine ovaryum ağırlığının yüksek olmasıdır. Ovaryum ağırlığındaki artış, ovaryan stimülasyon protokolünde kullanılan ajanların indüklediği steroidojenik etkilere atfedilebilir (Neunzig, & Bernhardt, 2014; Chimote, & Chimote, 2018). Yapılan bir çalışma da ovaryan stimülasyonun doku fizyolojisini değiştirerek kan akışını ve ovaryum hacmini arttırdığını doğrulamıştır (Pan, Wu, Cheng, Wu, & Chang, 2003). Kan akışı, ovaryum dokusundaki hem folikülogenez hem de steroidogenez aşamalarında önemli bir rol üstlenir (Abulafia, & Sherer, 2000). Dolayısıyla bu çalışmanın bulguları KOH protokolünü takiben artmış

folikülogenez ve artmış vasküler yapıları ortaya koymakta ve kullanılan KOH protokolünün etkinliğini doğrulamaktadır.

5.4. POI Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Ovaryan Folikül Sayıları ve AMH Konsantrasyonlarına Etkisi

5.4.1 NOR grubu ve VCD grubunda ovaryan folikül sayıları ve AMH konsantrasyonlarına etkisi

Ovaryan rezervi temsil eden foliküller iki gruptan oluşur. Bunlardan biri “Dormant foliküller” olarak da tanımlanan hormon üretimi olmayan, inaktif primordiyal foliküllerdir. Rezervi gösteren diğer foliküller ise büyümekte olan foliküllerdir. Klinik pratikte, primordiyal folikülleri kantitatif olarak değerlendirme şansı olmadığı için büyümekte olan foliküllere bakılmaktadır ve aynı zamanda gelişmekte olan foliküllerin granüloza hücrelerinden üretilen AMH hormonu konsantrasyonları değerlendirilmektedir. AMH, gonadotropinlerden bağımsız olarak ve kısmen androjen tarafından uyarılan, primordiyal foliküllerin büyümesini ve gelişimini engelleyici etkiye sahip olan bir polipeptittir. Büyük antral foliküllerin androjen ve östrojen biyosentezini kısıtlayan CYP17 (aromataz) enzimini inhibe eder. Granüloza hücreleri giderek gonadotropine bağımlı bir şekilde çoğaldıkça ve foliküller büyüdükçe, estradiol androjene üstün gelir ve estradiol AMH sekresyonunu inhibe ederek sekresyonunu küçük foliküllerle sınırlandırır. Artan gonadotropin bağımlılığı ve büyüyen foliküller nedeniyle AMH üretiminin azalması, östrojen ağırlıklı preovulatar folikülün ortaya çıkmasına izin verir (Bedenk, Vrtačnik-Bokal, & Virant-Klun, 2020).

Bu çalışmada, tüm deney gruplarında standardizasyonu sağlamak amacıyla, enjeksiyonlar başlamadan önce (G1) deneklerin ELISA yöntemiyle serum AMH değerlerine bakıldı ve %25-75 dilim aralığında tayin edilen serum AMH değerlerine sahip denekler çalışmaya dahil edildi. Tüm gruplarda ovaryan rezerv belirteci olarak AMH değeri standardize edilerek çalışmanın sonucunu etkileyecek farklı ovaryan rezerve sahip denekler çalışma dışı bırakıldı. POI modelini oluşturan deneklerden, 15 gün VCD enjeksiyonu sonrasında (G15), sakrifikasyon günü alınan kan örneklerinde

AMH değerlerinin normal ovaryan rezerv grubuna göre anlamlı düşük olduğu saptandı ($p=0,010$). VCD uygulamasıyla oluşturulan POI modelinde, VCD direkt AMH sentezinden sorumlu preantral folikülleri hedef alarak atreziye uğrattığı için (Bedenk ve ark., 2020), bu foliküller tarafından üretilen AMH değerlerinin düşmesi beklenen bir durumdur.

Grupların morfometrik analizinde, NOR grubuyla karşılaştırıldığında, AMH değerleri ile uyumlu olarak AMH üretiminden sorumlu preantral foliküllerin (unilaminar ve multilaminar primer foliküller) VCD grubunda anlamlı olarak azaldığı görüldü (sırasıyla $p<0,001$ ve $p=0,002$). Çalışmada normal rezerv grubu (NOR grubu) ve VCD grubu arasında sekonder folikül, graaf folikül ve korpus luteum sayılarında fark bulunmadı. Cao ve ark. (2020) çalışmasında, VCD enjeksiyonundan sonra fare ovaryumlarında zamana bağlı net etkiler gösterdiği raporlanmıştır. Araştırmacılar 15 günlük VCD maruziyetinden sonra, primordiyal foliküller ve primer foliküller de dahil olmak üzere farelerin ovaryumlarındaki erken foliküllerin sayısının önemli ölçüde azaldığını, son enjeksiyondan 10 gün sonra (25. gün), gelişme aşamasında çok az sayıda sekonder folikülün kaldığını ve son enjeksiyondan 20 gün sonra (35. gün), geri kalan olgun foliküllerin neredeyse tamamının tükendiğini bildirmişlerdir (Cao ve ark., 2020). Bu çalışmada da primordiyal folikül, unilaminar primer folikül ve multilaminar primer foliküllerde 15. günde literatürle uyumlu olarak azalma görülmüş, yine literatürle uyumlu olarak sekonder folikül, graaf folikül ve korpus luteum sayılarının değişmediği saptanmıştır. Atretik folikül sayılarının da bu süreçle uyumlu olarak VCD grubunda anlamlı oranda arttığı görülmüştür ($p<0,001$). Bu morfometrik veriler AMH değerleri ile desteklenerek POI modelinin oluşturulduğu sonucuna varılmıştır.

5.4.2. VCD grubu ve VCD+KOH grubunda ovaryan folikül sayıları ve AMH konsantrasyonlarına etkisi

Sıçan POI modeli oluşturulduğu kanıtlandıktan sonra, çalışmanın kontrol grubunu oluşturmak üzere deneklere GnRH long agonist protokolü uygulandı (VCD+KOH grubu). Çalışmada VCD grubunda 15. gün ile VCD sonrası KOH protokolü uygulanan deneklerde 65. gün alınan kan örneklerinde AMH değerleri karşılaştırıldığında VCD+KOH grubunda AMH değeri anlamlı daha düşük bulundu. Ovaryum dokusuna

invaziv uygulamaların yapıldığı deney gruplarıyla VCD+KOH grubu arasında AMH değerlerinde anlamlı fark saptanmadı. Deneklere POI modeli oluşturulduktan sonra 2 östrus döngüsü beklenmiş (yaklaşık 44 gün) ve ardından KOH protokolü uygulanmıştır. Bu süreçte AMH sentezleyen preantral foliküllerin büyük bölümü atreziye uğramıştır. Bununla birlikte büyümekte olan folikül sayılarının, VCD'nin geç dönem etkisinin sonucunda, azalmasıyla birlikte östrojenin AMH üzerindeki baskılayıcı etkisinin de azalmış olması nedeniyle AMH değerlerinde bir değişiklik olmaması beklenebilir (çalışma kapsamında KOH başlangıcında serum AMH ölçümü yapılmadığı için bu yorum veriyle desteklenememektedir). Deneklere KOH protokolü uygulandığında, ekzojen gonadotropin tedavisinin etkisiyle büyüyen foliküllerin sayısındaki artış ve buna bağlı olarak östrojen üretimindeki artış AMH değerinin tekrar düşmesine neden olmuştur (Bedenk ve ark., 2020).

VCD ve VCD+KOH gruplarında folikül sayıları değerlendirildiğinde; preantral foliküllerin sayısında anlamlı fark görülmemiştir. Klinikte POI olgularında primordiyal folikül havuzunun yaştan bağımsız hızla boşalması söz konusudur. Fakat az sayıda da olsa primordiyal folikül ve diğer preantral foliküllerin ovaryum korteksinde var olduğu bilinmektedir. Bu olgularda kalan foliküllerin ekzojen gonadotropinlere cevabı çok düşüktür. Bu nedenle adjuvan tedavilere başvurulmaktadır (Blumenfeld, 2020). Bu çalışmada VCD+KOH grubunda preantral folikül sayılarının değişmemesi gonadotropine cevabın yetersiz olmasının bir sonucu olarak düşünülebilir. Çalışmanın sonuçlarında VCD grubu ile VCD+KOH grubu arasında antral folikül sayıları karşılaştırıldığında, VCD grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p < 0,001$). POI modeli oluşturulan deneklere uygulanan KOH protokolü sonrasında, ovaryumda çok sayıda kistik folikül görülmüştür. Çalışmanın morfolometrik değerlendirmesi sürecinde kistik foliküller oositin varlığına göre ayrıca değerlendirilmiştir (Şekil 36). Oosit içeren foliküller graaf folikül olarak değerlendirilmiş, diğerleri ise kistik folikül olarak tanımlanmıştır. İki grup arasında oosit içermeyen kistik folikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0,003$). VCD+KOH grubundaki antral folikül sayılarının VCD grubuna göre anlamlı düşüklüğü kistik folikül artışının sonucu olarak yorumlanmıştır.

5.4.3. VCD+KOH gruplarında ovaryan folikül sayıları ve AMH konsantrasyonlarına etkisi

Çalışmanın deney gruplarını da KOH protokolü uygulanmadan önce ovaryum dokusuna uygulanan invaziv uygulamalar oluşturmaktadır. Sham grubunu deneğin sırt bölgesinden kesi uygulanarak ovaryumların pensetle pozisyonunun değiştirildikten sonra kesinin kapatıldığı (VCD+Cerrahi+KOH) grup, deney gruplarını ise boş enjektörle doku içine girilerek ovaryumun mekanik olarak uyarıldığı (VCD+Mekanik+KOH), ovaryum içine PRP enjekte edilen (VCD+PRP+KOH) ve ovaryum içine serum fizyolojik enjekte edilen (POI+SF+KOH) grupları oluşturmaktadır.

Kontrol grubuyla (VCD+KOH) karşılaştırıldığında, deney gruplarında sadece klinik pratikte preantral foliküller arasında tanımlanan primordiyal foliküller ve unilaminar primer foliküllerin istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturduğu saptanmıştır (sırasıyla $p=0,002$ ve $p=0,004$). Preantral folikül grubuna dahil edilen multilaminar primer foliküllerde, antral folikül grubu olarak tanımlanan sekonder ve graaf foliküllerin sayısında, korpus luteum sayısında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu veriler deney gruplarında gerçekleştirilen tüm uygulamaların (cerrahi açma-kapama, mekanik uyarım, intraovaryan SF ve PRP enjeksiyonu) primordiyal foliküllerin seçilimini (recruitment) arttırdığı, primordiyal foliküler aktivasyonun gerçekleştiği, fakat foliküler gelişimin ilerlemediği, antral folikül aşamasına geçemediği şeklinde yorumlanmıştır.

Grupların ikili karşılaştırmasında, preantral foliküllerde sadece mekanik uyarı yapılan grup ile SF enjekte edilen gruplar arasında mekanik uyarılan grup (VCD+Mekanik+KOH) lehine anlamlı farklılık saptandı ($p=0,024$). Preantral foliküllerin ayrı ayrı değerlendirmesi yapıldığında, mekanik uyarılan dokularda primordiyal foliküllerin sayısı diğer alt gruplara göre anlamlı yüksek bulundu. Benzer sonuçlar unilaminar primer foliküllerde de elde edildi. Antral foliküllerde (sekonder ve graaf foliküller) gruplar arasında anlamlı fark görülmedi. Bu bulgular VCD enjeksiyonu ile oluşan POI modelinin ovaryan folikül yapılanmasıyla uyumludur. VCD'nin hedef aldığı primordiyal folikül, unilaminar folikül ve multilaminar primer

foliküllerin sayılarındaki azalmaya, ovaryumların boş enjektörle mekanik olarak uyarılan dokular dışında diğer invaziv uygulamalar anlamlı bir etki göstermemiştir. Antral folikül sayılarında da iyileştirici bir etki oluşmamıştır. Gruplarda atretik folikül sayılarında da anlamlı bir azalma saptanmamıştır.

5.5. POI Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Ovaryan Folikül Sayıları ve Hippo Sinyal Yolağına Etkisi

5.5.1. VCD+KOH gruplarında ovaryan folikül sayıları ve hippo sinyal yolağına etkisi

Hippo sinyal yolağı organ boyutu kontrolü için önemli olan, bir serin kinaz kademesinde görev yapan ve sonuçta anahtar transkripsiyonel ortak aktifleştiricileri, Yes ile ilişkili proteini (YAP) ve PDZ bağlama motifli transkripsiyonel ortak aktifleştiriciyi (TAZ) fosforile eden ve etkisiz hale getiren birkaç negatif büyüme düzenleyicisinden oluşur. Hippo sinyal yolağı bozulduğunda, nükleer YAP, transkripsiyonel geliştirilmiş ortak alan (TEAD) transkripsiyonel faktörleriyle uyum içinde hareket ederek bağ dokusu büyüme faktörünü (CTGF) ve apoptoz inhibitörlerinin (NAIP) ekspresyonunu artırır (Malt, Georges, Silber, Zider, & Flagiello, 2013). Aktin, ökaryotik hücrelerdeki toplam çözünür proteinlerin %5 ile %10'unu oluşturur ve globüler aktinin (G-aktin) filamentli forma (F-aktin) polimerizasyonu, hücre şeklinin korunması, yapışma ve hareket için önemlidir. Hippo sinyalini bozabilen ve YAP'ın nükleer translokasyonunu teşvik eden anahtar genlerin çoğu aktin polimerizasyonunda rol oynar ve bu genler Hippo sinyalinin yukarı yöndeki düzenleyicileridir. Hippo sinyal yolağı folikül büyümesini kısıtlamakta ve ovaryum doku hasarından sonra hippo sinyal yolağının bozulması folikül büyümesini desteklemektedir. Ovaryumların kesilmesi, aktin polimerizasyonunda (G-aktin'den F-aktin'e) geçici bir artışa ve YAP fosforilasyonunun azalmasına neden olur. Bu da nükleer YAP seviyelerinin artmasına yol açar, ardından aşağı yönde büyüme faktörleri ve apoptoz inhibitörlerinin ekspresyonunu artırır (Hsueh, & Kawamura, 2020).

Bu çalışmada ovaryum dokusuna uygulanan invaziv girişimlerin primordiyal folikül ve primer foliküllerin aktivasyonuna etkisi ve bu etkideki hippo sinyal yolağının rolünü değerlendirmek amacıyla, hippo sinyal yolağında rol oynayan PDZ

bağlama motifli transkripsiyonel ortak aktifleştiriciyi (TAZ), NLR ailesi inhibitör protein (NAIP) ve bağ dokusu büyüme faktörü (CTGF) proteinlerinin ovaryan dokudaki ekspresyonlarına ELISA yöntemiyle bakılmıştır. TAZ ve CTGF ekspresyonlarının deney grupları arasında istatistiksel anlamlılık gösterdiği saptanmıştır (sırasıyla $p<0,001$ ve $p<0,001$). Deney gruplarının ikili karşılaştırmalarında, TAZ ve CTGF ekspresyonlarında PRP ve SF enjeksiyonu uygulanan gruplar lehine (VCD+PRP+KOH ve VCD+SF+KOH) anlamlı artış saptanmıştır ancak PRP ve SF grupları arasında bu proteinlerin ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Bu sonuçlar dikkate alındığında, eşit volümde SF veya PRP enjeksiyonu uygulaması sonucunda ovaryan dokuda hippo sinyal yolağının bozulduğu ve aktin polimerizasyonundaki artışla birlikte transkripsiyonel ortak aktifleştirici (TAZ) ve bağ dokusu büyüme faktörünün (CTGF) ekspresyonunun arttığı görülmektedir. Boş enjektörle doku içine girip çıkma şeklinde gerçekleştirilen mekanik uyarım (VCD+Mekanik+KOH grubu) sonucunda benzer etkinin görülmemesi, enjeksiyonun oluşturduğu mekanik uyarılmadan ziyade doku içine enjekte edilen eşit volümdeki sıvının (PRP veya SF) oluşturduğu mekanik etkinin (doku içindeki sıkıştırıcı etkinin) hippo sinyal yolağının bozulmasında daha etkin olduğu düşünülebilir. Fakat çalışmanın sonuçlarında hippo sinyal yolağının bozulması sonucunda apoptoz inhibitörlerinin aktivasyonunda beklenen artış (NAIP ekspresyonunda artış) gözlenmemiştir. Bu sonuç foliküllerin atreziye gidişinde deney grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı şeklinde yorumlanabilir. Çalışmanın morfolometrik sonuçlarında atretik foliküllerin gruplar arasında anlamlı bir fark göstermemesi de bu veriyi desteklemektedir. Ovaryum dokusuna uygulanan doku bütünlüğünü değiştiren invaziv uygulamaların foliküllerin atreziye gidişinde anlamlı bir etkisi görülmemiştir.

Çalışmada preantral ve antral foliküllerin morfolometrik sonuçlarına bakıldığında, sadece primordiyal folikül ve unilaminar primer foliküller deney grupları arasında anlamlı farklılık göstermiştir. Preantral foliküllerin antral foliküle ilerleyişinde gruplar arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. İkili karşılaştırmalarda; PRP enjeksiyonu, SF enjeksiyonu ile karşılaştırıldığında sadece primordiyal foliküllerin sayısında anlamlı bir artışa neden olmuştur ($p=0,027$). Burada primordiyal folikül sayısındaki artışın primordiyal foliküllerin apoptoza gidişindeki azalmanın bir sonucu

mu yoksa dormant halde kalışını arttırıcı etkinin bir sonucu mu olduğunu yorumlamak bu çalışmanın verileriyle mümkün olmamaktadır. Fakat mekanik uyarım uygulanan grup ile PRP enjeksiyonu yapılan grup arasında primordiyal folikül sayılarında anlamlı fark görülmemesi, folikül sayısındaki artışın PRP'nin büyüme faktörleri aracılığıyla oluşan iyileştirici etkinin bir sonucu olmadığını düşündürmektedir. Ayrıca unilaminar primer folikül sayılarının mekanik uyarılma yapılan grupta hem PRP hem de SF enjekte edilen gruba göre daha yüksek olması, mekanik uyarılmanın primordiyal folikül aktivasyonunun gerçekleşmesinde daha etkin olduğu şeklinde yorumlanabilir. Bu veriler hippo sinyal yolağında bulunan proteinlerin ekspresyon sonuçlarıyla çelişkilidir. Dolayısıyla primordiyal ve unilaminar primer foliküllerin mekanik uyarılma sonucunda artışının hippo sinyal yolağı dışında farklı bir mekanizma üzerinden oluştuğu düşüncesini akla getirmektedir.

Yapılan çalışmalarda kültürlenmiş insan kortikal fragmanları kullanılarak PI3K/Akt aktivatörlerinin, primordiyal folikül aktivasyonunu hızlandıran hippo sinyal yolağı ile sinerjik olarak etki ettiği doğrulanmıştır (Grosbois, & Demeestere, 2018). Ayrıca, transkripsiyonel ve histolojik analizler, primordiyal foliküllerdeki oositlerin, ekstraselüler matriks proteinleri salgılayan çevredeki granüloza hücreleri tarafından sıkıştırıldığında oluşan yüksek mekanik basıncın dormant durumuna yol açtığını ortaya çıkarmıştır (Nagamatsu, Shimamoto, Hamazaki, Nishimura, & Hayashi, 2019). Hsueh ve ark. (2020) çalışmasında, ovaryan dokunun fragmantasyon yaklaşımına benzer şekilde, primordiyal foliküllerin ekstraselüler matriksi parçalayan enzimlerle yapının gevşetilmesiyle aktive olduğunu ve ekzojen basınçla sıkıştırılarak foliküllerin tekrar dormant haline dönüştüğünü bildirilmiştir (Hsueh, & Kawamura, 2020). İn vitro ortamda, primordiyal foliküllerin dormant durumda kalmasını hipoksik bir durumun tetiklediğini bildiren çalışma da mevcuttur (Shimamoto ve ark., 2019). Çalışmadaki deney gruplarında preantral folikül sayılarına ait morfometrik değerler ve hippo sinyal yolağı proteinlerinin ekspresyon düzeylerindeki uyumsuzluk, primordiyal folikül aktivasyonunun hippo sinyal yolağı dışında, doku içine enjeksiyonun ovaryan medullada oluşturduğu hasara sekonder oluşabilecek inflamasyonun dokuda oluşturabileceği kısa süreli bir hipoksinin sonucu olabileceği sorusunu akla getirmektedir.

5.6. Sonuç

Sonuç olarak, sıçan deneysel prematür ovaryan yetmezlik modelinde kontrollü ovaryan hiperstimülasyon protokolü öncesi uygulanan intraovaryan PRP enjeksiyonu hippo sinyal yolağının bozulmasında serum fizyolojik enjeksiyonuyla benzer etki göstermiştir. Primordiyal foliküllerin aktivasyonunda doku içine mekanik uyarım ile PRP enjeksiyonunun etkilerinin benzer olması ve hippo sinyal yolağı proteinleriyle folikül aktivasyon düzeylerindeki uyumsuzluk mekanik uyarılmaya bağlı folikül artışında farklı mekanizmaların araştırılması gerekliliğini göstermiştir.



6. KAYNAKLAR

- Abulafia, O., & Sherer, D.M. (2000). Angiogenesis of the ovary. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 182(1 Pt 1):240-6. [https://doi.org/10.1016/s0002-9378\(00\)70519-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9378(00)70519-9)
- Ahmadian, S., Shespari, S., Pazhang, M., Bedate, A. M., Beheshti, R., Abbasi, M. M., Nouri, M., Rahbarghazi, R., & 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*, 5;18(1):78. <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*, 14:6:5. <https://doi.org/10.1186/s40738-020-00074-3>
- Aragona, M., Panciera, T., Manfrin, A., Giulitti, S., Michielin, F., Elvassore, N., Dupont, S., & Piccolo, S. (2013). A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors. *Cell*, 154(5):1047-1059. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.042>
- Baker, F.C., & Lee, K.A. (2022). Menstrual Cycle Effects on Sleep. *Sleep Medicine Clinics*, 17(2):283-294. <https://doi.org/10.1016/j.jsmc.2022.02.004>
- Baskind, N.E., & Balen, A.H. (2016). Hypothalamic-pituitary, ovarian and adrenal contributions to polycystic ovary syndrome. *Best Practise & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, :37:80-97. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.03.005>
- 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 & Gynecology and Reproductive Biology*, 203:30-4. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.05.027>
- Bedenk, J., Vrtačnik-Bokal, E., & Virant-Klun, I. (2020). The role of anti-Müllerian hormone (AMH) in ovarian disease and infertility. *Journal of Assisted Reproductive and Genetics*, 37(1):89-100. <https://doi.org/10.1007/s10815-019-01622-7>
- Blumenfeld, Z. (2020). What Is the Best Regimen for Ovarian Stimulation of Poor Responders in ART/IVF? *Frontiers in Endocrinology*, 17:11:192. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00192>
- Boubekri, A., Gernigon-Spychalowicz, T., Khammar, F., & Exbrayat, J.M. (2007). Histological and immunohistological aspects of the ovarian cycle of the Algerian wild sand rat, *Psammomys obesus* Cretzschmar, 1828. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, Suppl 1:S41-9. <https://doi.org/10.2478/4487>
- Callejo, J., Salvador, C., González-Nuñez, S., Almeida, L., Rodríguez, L., Marqués, L., Valls, A., & Laila, 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*, 7;6(1):33. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-6-33>
- Cakir, C., Kuspinar, G., Aslan, K., Bozyigit, C., Kasapoglu, I., Dirican, M., Uncu, G., & Avci, B. (2024). Dehydroepiandrosterone modulates the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway to alleviate 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced premature ovarian insufficiency in rats. *Experimental Animals*, <https://doi.org/10.1538/expanim.23-0179>
- Cakiroglu, Y., Saltik, A., Yuceturk, A., Karaosmanoglu, O., Yildirim Kopuk, S., Scott, R.T., Tiras, B., & Seli, E. (2020). Effects of intraovarian injection of autologous platelet rich plasma on ovarian reserve and IVF outcome parameters in women with primary ovarian insufficiency. *Aging*, 5;12(11):10211-10222. <https://doi.org/10.18632/aging.103403>
- Cao, L.B., Leung, C.K., Law, P.W.N., Lv, Y., Ng, C.H., Liu, H.B., Lu, G., Ma, J.L., & Chan, W.Y. (2020). Systemic changes in a mouse model of VCD-induced premature ovarian failure. *Life Sciences*, 1:262:118543. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118543>
- Cappellen, G.V. (1998). *Ovarian Follicle Dynamics In The Rat: Regulation and Flexibility.*, T.P. (2021).
- Carmichael, M.A., Thomson, R.L., Moran, L.J., & Wycherley, T.P. (2021). The Impact of Menstrual Cycle Phase on Athletes' Performance: A Narrative Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 9;18(4):1667. <https://doi.org/10.3390/ijerph18041667>
- Carson, S.A., & Kallen, A.N. (2021). Diagnosis and Management of Infertility: A Review. *Journal of the American Medical Association*, 6;326(1):65-76. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.4788>
- Chang, L., Azzolin, L., Biagio, D.D., Zanconato, F., Battilana, G., Xiccato, R.L., Aragona, M., Giulitti, S., Panciera, T., Gandin, A., Sigismondo, G., Krijgsveld, J., Fassan, M., Brusatin, G., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2018). The SWI/SNF complex is a mechanoregulated inhibitor of YAP and TAZ. *Nature*, 563(7730):265-269. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0658-1>
- Cheng, Y., Feng, Y., Jansson, L., Sato, Y., Deguchi, M., Kawamura, K., & Hsueh, A.J. (2015). Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. *The FASEB Journal*, 29(6):2423-30. <https://doi.org/10.1096/fj.14-267856>
- 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):616-21. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh668>
- Chimote, B.N., & Chimote, N.M. (2018). Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Its Sulfate (DHEA-S) in Mammalian Reproduction: Known Roles and Novel Paradigms. *Vitam Horm*, 108:223-250. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.02.001>
- Choe, S.A., Kim, M.J., Lee, H.J., Kim, J., Chang, E.M., Kim, J.W., Park, H.M., Lyu, S.W., Lee, W.S., Yoon, T.K., & 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>
- Chon, S.J., Umair, Z., & Yoon, M.S. (2021). Premature Ovarian Insufficiency: Past, Present, and Future. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10:9:672890.

- <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.672890>
- Cora, M.C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6):776-93. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- Cossigny, D.A., Findlay, J.K., & Drummond, A.E. (2012). The effects of FSH and activin A on follicle development in vitro. *Society for Reproduction and Fertility*, 143(2):221-9. <https://doi.org/10.1530/REP-11-0105>
- Dai, F., Wang, R., Deng, Z., Yang, D., Wang, L., Wu, M., Hu, W., & Cheng, Y. (2023). Comparison of the different animal modeling and therapy methods of premature ovarian failure in animal model. *Stem Cell Research & Therapy*, 18;14(1):135. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03333-4>
- 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):149-53. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2522-0>
- Doan, H.T., Quan, L.H., & Nguyen, T.T. (2017). The effectiveness of transdermal testosterone gel 1% (androgel) for poor responders undergoing in vitro fertilization. *Gynecological Endocrinology*, 33(12):977-979. <https://doi.org/10.1080/09513590.2017.1332586>
- Dong, J., Feldman, G., Huang, J., Wu, S., Zhang, N., Comerford, S.A., Gayyed, M.F., Anders, R.A., Maitra, A., & Pan, D. (2007). Elucidation of a universal size-control mechanism in Drosophila and mammals. *Cell*, 130(6):1120-33. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.019>
- Dovom, M.R., Noroozadeh, M., Mosaffa, N., Piryaei, A., Zadevakili, A., Abdollahifar, M.A., & Tehrani, F.R. (2022). Induction of a rat model of premature ovarian insufficiency using D-galactose feeding during the critical periods of development: A pilot study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, 23;20(4):319-330. <https://doi.org/10.18502/ijrm.v20i4.10904>
- Dudek, R.W. (2014). *Embryology*. 6th Edition.
- Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Digabel, J.L., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., & Piccolo, S. (2011). Role of YAP/TAZ in mechanotransduction. *Nature*, 474(7350):179-83. <https://doi.org/10.1038/nature10137>
- Eftekhari, M., Neghab, N., Naghshineh, E., & Khani, P. (2018). Can autologous platelet rich plasma expand endometrial thickness and improve pregnancy rate during frozen-thawed embryo transfer cycle? A randomized clinical trial. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 57(6):810-813. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.10.007>
- Eroschenko, V.P. (2012). *DiFiore's Atlas of Histology With Functional Correlations*. 12th [SEP]ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins
- Evans, A., Ibrahim, M., Pope, R., Mwangi, J., Botros, M., Johnson, S.P., Kassis, S.A. (2020). Treating hand and foot osteoarthritis using a patient's own blood: A systematic review and meta-analysis of platelet-rich plasma. *Journal of*

- Orthopaedics*, 28:18:226-236. <https://doi.org/10.1016/j.jor.2020.01.037>
- Fàbregues, F., Ferreri, J., Méndez, M., Calafell, J.M., Otero, J., & Farré, R. (2021). In Vitro Follicular Activation and Stem Cell Therapy as a Novel Treatment Strategies in Diminished Ovarian Reserve and Primary Ovarian Insufficiency. *Frontiers in Endocrinology*, 24:11:617704. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.617704>
- Faddy, M.J., Gosden, R.G., Gougeon, A., Richardson, S.J., & Nelson, J.F. (1992). Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Human Reproduction*, 7(10):1342-6. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137570>
- 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):318-27. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.067744>
- Field, S.L., Dasgupta, T., Cummings, M., & Orsi, N.M. (2014). Cytokines in ovarian folliculogenesis, oocyte maturation and luteinisation. *Molecular Reproduction & Development*, 81(4):284-314. <https://doi.org/10.1002/mrd.22285>
- Fitko, R., & Szlezzyngier, B. (1994). Role of thyroid hormone in controlling the concentration of luteinizing hormone/human chorionic gonadotropin receptors in rat ovaries. *European Journal of Endocrinology*, 130(4):378-80. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1300378>
- Flaws, J.A., Doerr, J.K., Sipes, I.G., & Hoyer, P.B. (1994). Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology*, 8(6):509-14. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0890-6238(94)90033-7)
- Fraidakis, M., Giannakakis, G., Anifantaki, A., Skouradaki, M., Tsakoumi, P., Bitzopoulou, P., Kourpa, S., Zervakis, A., & Kakouri, P. (2023). Intraovarian Platelet-Rich Plasma Injections: Safety and Thoughts on Efficacy Based on a Single Centre Experience With 469 Women. *Cureus*, 7;15(5):e38674. <https://doi.org/10.7759/cureus.38674>
- Frattarelli, J.L., McWilliams, G.D.E., Hill, M.J., Miller, K.A., & Scott Jr. R.T. (2008). Low-dose aspirin use does not improve in vitro fertilization outcomes in poor responders. *Fertility and Sterility*, 89(5):1113-1117. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.05.007>
- 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
- Fu, V., Plouffe, S.W., & Guan, K.L. (2017). The Hippo pathway in organ development, homeostasis, and regeneration. *Current Opinion in Cell Biology*, 49:99-107. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2017.12.012>
- Gao, J., Song, Y., Huang, X., Wang, D., & Wang, H. (2021). The expression of platelet-derived growth factor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor-II in patients with polycystic ovary syndrome and its correlation with pregnancy outcomes. *Annals of Palliative Medicine*, 10(5):5671-5678.

<https://doi.org/10.21037/apm-21-1003>

- Gat, I., Meija, S.B., Balakier, H., Librach, C.L., Claessens, A., & Ryan, E.A.J. (2016). The use of coenzyme Q10 and DHEA during IUI and IVF cycles in patients with decreased ovarian reserve. *Gynecological Endocrinology*, 32(7):534-7. <https://doi.org/10.3109/09513590.2015.1137095>
- Giulia, F., Cimadomo, D., Innocenti, F., Soscia, D., Vaiarelli, A., Ubaldi, F.M., Gennarelli, G., Garagna, S., Rienzi, L., & Zuccotti, M. (2023). Biomechanical forces and signals operating in the ovary during folliculogenesis and their dysregulation: implications for fertility. *Human Reproduction Update*, 29(1):1-23. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmac031>
- Gleicher, N., Weghofer, A., & Barad, D.H. (2011). Defining ovarian reserve to better understand ovarian aging. *Reproductive Biology and Endocrinology*, <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-23>
- Goldman, J.M., Murr, A.S., & Cooper, R.L. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research Part B Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2):84-97. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
- 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>
- Gonzalez, N.P., Tao, J., Rochman, N.D., Vig, D., Chiu, E., Wirtz, D., & Sun, S.X. (2018). Cell tension and mechanical regulation of cell volume. *Molecular Biology of the Cell*, 29(21):0. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-04-0213>
- Griesinger, G., Diedrich, K., Tarlatzis, B.C., & Kolibianakis, E.M. (2006). GnRH-antagonists in ovarian stimulation for IVF in patients with poor response to gonadotrophins, polycystic ovary syndrome, and risk of ovarian hyperstimulation: a meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, 13(5):628-38. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)60652-9](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)60652-9)
- Grosbois, J., & Demeestere, I. (2018). Dynamics of PI3K and Hippo signaling pathways during in vitro human follicle activation. *Human Reproduction*, 33(9):1705-1714. <https://doi.org/10.1093/humrep/dey250>
- Guigon, C.J., & Magre, S. (2006). Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary: Insights from Models of Germ Cell Depletion. *Biology of Reproduction*, 74(3):450-8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.047134>
- 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):443-9.
- Halder, G., & Johnson, R.L. (2011). Hippo signaling: growth control and beyond. *Development*, 138(1):9-22. <https://doi.org/10.1242/dev.045500>
- Hannezo, E., & Heisenberg, C.P. (2019). Mechanochemical Feedback Loops in Development and Disease. *Cell*, 178(1):12-25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.05.052>
- Heisenberg, C.P., & Bellaïche, Y. (2013). Forces in tissue morphogenesis and patterning. *Cell*, 153(5):948-62. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.008>
- Hoyer, P.B., & Sipes, I.G. (2007). Development of an animal model for ovotoxicity

- using 4-vinylcyclohexene: a case study. *Birth Defects Research. Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, 80(2):113-25. <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*, 19:11:50. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00050>
- Hsueh, A.J.W., & Kawamura, K. (2020). Hippo signaling disruption and ovarian follicle activation in infertile patients. *Fertility and Sterility*, 114(3):458-464. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.07.031>
- 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>
- Hu, X., Christian, P., Sipes, I.G., & Hoyer, P.B. (2001a). Expression and Redistribution of Cellular Bad, Bax, and Bcl-xL Protein Is Associated with VCD-Induced Ovotoxicity in Rats. *Biology of Reproduction*, 65(5):1489-95. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1489>
- Hu, X., Christian, P., Thompson, K.E., Sipes, I.G., & Hoyer, P.B. (2001b). Apoptosis Induced in Rats by 4-Vinylcyclohexene Diepoxide Is Associated with Activation of the Caspase Cascades. *Biology of Reproduction*, 65(1):87-93. <https://doi.org/10.1095/biolreprod65.1.87>
- 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>
- 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*, 1;32(3):544-555. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew360>
- Jin, X., Han, C.S., Zhang, X.S., Yuan, J.X., Hu, Z.Y., & Liu, Y.X. (2005). Signal transduction of stem cell factor in promoting early follicle development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 14;229(1-2):3-10. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.10.006>
- 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):1544-7. <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>
- Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Yorino, S., Takae, S., Ho, C., Kawamura, N., Tamura, M., Hashimoto, S., Sugishita, Y., Morimoto, Y., Hosoi, Y., Yoshioka, N., Ishizuka, B., & Hsueh, A.J. (2013). Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 22;110(43):17474-9. <https://doi.org/10.1073/pnas.1312830110>
- Kawamura, K., Kawamura, N., & Hsueh, A.J.W. (2016). Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 28(3):217-22.

<https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000268>

- 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):743-51. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087650>
- Keating, A.F., Mark, C.J., Sen, N., Sipes, I.G., & Hoyer, P.B. (2009). Effect of phosphatidylinositol-3 kinase inhibition on ovotoxicity caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide and 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene in neonatal rat ovaries. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1;241(2):127-34. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.08.012>
- Kotb, M.M.M., Hassan, A.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 & Gynecology and Reproductive Biology*, 200:11-5. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2016.02.009>
- Kuspınar, G. (2023), *Sıçan in vivo prematür ovaryan yetmezliği modelinde intraovaryan plateletten zengin plazma uygulamasının ovaryan foliküllerin gelişimine etkisi*. [Yayınlanmamış doktora tezi, Bursa Uludağ Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü] Erişim adresi: <https://tez.yok.gov.tr/UlusalTezMerkezi/TezGoster?key=r4I1HnmXxFOvUpyAyUmxLKtn6d7DFzt1rQJNqPcqPGr8hPd20Hh4i-EiUrsBzvX>
- Lee, H.N., & Chang, E.M. (2019). Primordial follicle activation as new treatment for primary ovarian insufficiency. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 46(2):43-49. <https://doi.org/10.5653/cerm.2019.46.2.43>
- Lee, H.N., Diaz, M.F., Price, K.M., Ozuna, J.A., Zhang, S., Sevic, Muraca, E.M., Hagan, J.P., & Wenzel, P.L. (2017). Fluid shear stress activates YAP1 to promote cancer cell motility. *Nature Communications*, 18:8:14122. <https://doi.org/10.1038/ncomms14122>
- Lekamge, D.N., Lane, M., Gilchrist, R.B., & Tremellen, K.P. (2008). Increased gonadotrophin stimulation does not improve IVF outcomes in patients with predicted poor ovarian reserve. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(11-12):515-21. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9266-6>
- Li, H., Liu, Y., Wang, Y., Zhao, X., & Qi, X. (2021). Hormone therapy for ovarian cancer: Emphasis on mechanisms and applications (Review). *Oncology Reports*, 46(4): 223. <https://doi.org/10.3892/or.2021.8174>
- Li, X., Wu, S., Cao, D., Li, M., Liu, J., Nie, G., Li, Y., & Yang, H. (2019). Huyang yangkun formula protects against 4-Vinylcyclohexene diepoxide- T induced premature ovarian insufficiency in rats via the Hippo-JAK2/STAT3 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 116:109008. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109008>
- Li, X.L., Wang, L., Lv, F., Huang, X.M., Wang, L.P., Pan, Y., & Zhang, X.M. (2017). The influence of different growth hormone addition protocols to poor ovarian responders on clinical outcomes in controlled ovary stimulation cycles: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (Baltimore)*, 96(12):e6443. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000006443>
- 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):2341-9. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.110.207522>

- Liu, T., Li, Q., Wang, S., Chen, C., & Zheng, J. (2016). Transplantation of ovarian granulosa-like cells derived from human induced pluripotent stem cells for the treatment of murine premature ovarian failure. *Molecular Medicine Reports*, 13(6):5053-8. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5191>
- 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*, 1;84(2):309-16. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvp205>
- Lów, P., Molnár, K., & Kriska, G. (2016). *Atlas of Animal Anatomy and Histology*. Anticancer research c. 36 sayı (8);, Cham: Springer International Publishing s.4371., <https://doi.org/10.1007/978-3-319-25172-1>
- Luo, S., Ruan, X., & Mueck, A.O. (2023). The effect of Kuntai capsule on ovarian function in cisplatin-induced premature ovarian insufficiency rats. *Frontiers in Endocrinology*, 19:13:1097165. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1097165>
- 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. *The Endocrine Society*, 27(2):170-207. <https://doi.org/10.1210/er.2005-0015>
- Maclaran, K., & Panay, N. (2015). Current concepts in premature ovarian insufficiency. *Women's Health (London)*, 11(2):169-82. <https://doi.org/10.2217/whe.14.82>
- Maged, A.M., Fahmy, R.M., Rashwan, H., Mahmood, M., Hassan, S.M., Nabil, H., Hany, A., Lotfy, R., Lasheen, Y.S., Dahab, S., & Darwish, M. (2019). Effect of body mass index on the outcome of IVF cycles among patients with poor ovarian response. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 144(2):161-166. <https://doi.org/10.1002/ijgo.12706>
- Magro-Lopez, E., & Muñoz-Fernández, M.Á. (2021). The Role of BMP Signaling in Female Reproductive System Development and Function. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 11927. <https://doi.org/10.3390/ijms222111927>
- Malt, A.L., Georges, A., Silber, J., Zider, A., & Flagiello, D. (2013). Interaction with the Yes-associated protein (YAP) allows TEAD1 to positively regulate NAIP expression. *FEBS Letters*, 587(19):3216-23. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.08.013>
- 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):130-8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016113>
- Mayer, L.P., Pearsall, N.A., Christian, P.J., Devine, P.J., Payne, C.M., McCuskey, M.K., Marion, S.L., Sipes, I.G., & Hoyer, P.B. (2002). Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology*, 16(6):775-81. [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., & Hsueh, A.J.W. (1998). Cell death and survival during ovarian follicle development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 25;140(1-2):15-8. [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. *The Endocrine Society, Endocrine Reviews*, 21(2):200-14. <https://doi.org/10.1210/edrv.21.2.0394>
- Mcgee, E.A., Perlas, E., LaPolta, 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):990-8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.5.990>
- Merviel, P., Lourdel, E., Boulard, V., Cabry, R., Claeys, C., Oliéric, M.F., Sanguinet, P., Brasseur, F., Henri, I., & Copin, H. (2008). Premature ovarian failure: which protocols? *Gynecologie Obstetrique and Fertilité*, 36(9):872-81. <https://doi.org/10.1016/j.gyobfe.2008.06.015>
- Moore, K.L., Persaud, T.V.N., & Torchia, M.G. (2015). *The Developing Human: Clinically Oriented Embryology*. 10th ed. Philadelphia: Saunders; 2019.
- Muhammad, F.S., Goode, A.K., Kock, N.D., Arifin, E.A., Cline, J.M., Adams, M.R., Hoyer, P.B., Christian, P.J., Isom, S., Kaplan, J.R., & Appt, S.E. (2009). Effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on peripubertal and adult Sprague-Dawley rats: ovarian, clinical, and pathologic outcomes. *Comparative Medicine*, 59(1):46-59.
- Nagamatsu, G., Shimamoto, S., Hamazaki, N., Nishimura, Y., & Hayashi, K. (2019). Mechanical stress accompanied with nuclear rotation is involved in the dormant state of mouse oocytes. *Science Advances*, 5(6):eaav9960. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9960>
- Neiderberger, C. ve ark. (2018). Forty years of IVF. *Fertility and Sterility*, 15;110(2):185-324.e5. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.06.005>
- Neunzig, J., & Bernhardt, R. (2014). Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) stimulates the first step in the biosynthesis of steroid hormones. *PLoS One*, 9(2):e89727. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089727>
- Orisaka, M., Mizutani, T., Tajima, K., Orisaka, S., Shukunami, K., Miyamoto, K., & Kotsuji, F. (2006). Effects of ovarian theca cells on granulosa cell differentiation during gonadotropin-independent follicular growth in cattle. *Molecular Reproduction & Development*, 73(6):737-44. <https://doi.org/10.1002/mrd.20246>
- Orvieto, R., Kruchkovich, J., Rabinson, J., Zohav, E., Anteby, E.Y., & Meltcer, 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):228-30. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.06.022>
- Ouni, E., Bouzin, C., Dolmans, M.M., Marbaix, E., Pyrdit Ruys, S., Vertommen, D., & Amorim, C.A. (2020). Spatiotemporal changes in mechanical matrisome components of the human ovary from prepuberty to menopause. *Human Reproduction*, 1;35(6):1391-1410. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa100>
- Oyola, M.G., & Handa, R.J. (2017). Hypothalamic-pituitary-adrenal and hypothalamic-pituitary-gonadal axes: sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*, 20(5):476-494. <https://doi.org/10.1080/10253890.2017.1369523>
- Pabalan, N., Trevisan, C.M., Peluso, C., Jarjanazi, H., Christofolini, D.M., Barbosa, C.P., & Bianco, B. (2014). Evaluating influence of the genotypes in the follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) Ser680Asn (rs6166) polymorphism on poor and hyper-responders to ovarian stimulation: a meta-analysis. *Journal of Ovarian Research*, 20:7:285. <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0122-2>
- Pan, H.A., Wu, M.H., Cheng, Y.C., Wu, L.H., & Chang, F.M. (2003). Quantification of ovarian Doppler signal in hyperresponders during in vitro fertilization treatment using three-dimensional power Doppler ultrasonography. *Ultrasound in Medicine and Biology*, 29(7):921-7. [https://doi.org/10.1016/s0301-5629\(03\)00901-3](https://doi.org/10.1016/s0301-5629(03)00901-3)

- Pandian, Z., McTavish, A.R., Aucott, L., Hamilton, MPR., Bhattacharya, S. (2010). Interventions for 'poor responders' to controlled ovarian hyper stimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF) (Review). *Cochrane Database Systematic Reviews*, 20:(1):CD004379. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD004379.pub3>
- Parker, G.A., & Picut, C.A. (2016). Atlas of Histology of the Juvenile Rat. 1st Edition. Cambridge, MA: Academic Press. 462 pp. US\$170.00. ISBN100128026820; ISBN-13:978-0128026823. *Toxicologic Pathology*, c. 44 sayı (8): s. 1170., <https://doi.org/10.1177/0192623316677069>
- Parrott, J.A., & Skinner, M.K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, 140(9):4262-71. <https://doi.org/10.1210/endo.140.9.6994>
- Pietrzak, W.S., & Eppley, B.L. (2005). Platelet rich plasma: biology and new technology. *Journal of Craniofacial Surgery*, 16(6):1043-54. <https://doi.org/10.1097/01.scs.0000186454.07097.bf>
- Pilehvari, S., ShahrokhTehranejad, 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.
- Plouffe, S.W., Hong, A.W., & Guan, K.L. (2015). Disease implications of the Hippo/YAP pathway. *Trends in Molecular Medicine*, 21(4):212-22. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2015.01.003>
- Qin, J., Chen, J., Xu, H., Xia, Y., Tang, W., Wang, W., Li, C., Tang, Y., & Wang, Y. (2022). Low-Intensity Pulsed Ultrasound Promotes Repair of 4-Vinylcyclohexene Diepoxide-Induced Premature Ovarian Insufficiency in SD Rats. *Journals of Gerontology: Biological Sciences and Medical Sciences*, 3;77(2):221-227. <https://doi.org/10.1093/gerona/glab242>
- Qin, J.C., Fan, L., & Qin, A.P. (2017). The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on women with diminished ovarian reserve (DOR) in IVF cycle: Evidence from a meta-analysis. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 46(1):1-7. <https://doi.org/10.1016/j.jgyn.2016.01.002>
- Rajah, R., Glaser, E.M., & Hirshfield, A.N. (1992). The Changing Architecture of the Neonatal Rat Ovary During Histogenesis. *Developmental Dynamics*, 194(3):177-92. <https://doi.org/10.1002/aja.1001940303>
- 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 & Joint Research*, 5(2):37-45. <https://doi.org/10.1302/2046-3758.52.2000540>
- Ross, M.H. & Pawlina, W. (2019). *Histology a Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology Psychological Science*. 6th Edition.
- Sadler, T.W. (2018). *Medical Embryology*. 14th Edition.
- Sahambi, S.K., Visser, J.A., Themmen, A.P.N., Mayer, L.P., & Devine, P.J. (2018). Correlation of serum anti-Müllerian hormone with accelerated follicle loss following 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced follicle loss in mice. *Reproductive Toxicology*, 26(2):116-22. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2008.07.005>
- Saharkhiz, N., Zademodares, S., Salehpour, S., Hosseini, S., Nazari, L., & Tehrani, H.G. (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*, 29:23:3.
https://doi.org/10.4103/jrms.JRMS_864_17
- Saksouk, F.A., & Johnson, S.C. (2004). Recognition of the ovaries and ovarian origin of pelvic masses with CT. *Radiographics*, 1:S133-46.
<https://doi.org/10.1148/rg.24si045507>
- Schoolcraft, W.B., Eric, S.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):151-6. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.02.013>
- Schuenke, M., Schulte, E., & Schumacher, U. (2020). *Atlas of Anatomy*, Volume 2 Internal Organs. 2nd Edition.
- Scully, D., Sfyri, P., Verpoorten, S., Papadopoulos, P., Muñoz-Turrillas, M.C., Mitchell, R., Aburima, A., Patel, K., Gutiérrez, L., Naseem, K.M., & 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):e13207.
<https://doi.org/10.1111/apha.13207>
- Scully, D., Sfyri, P., Wilkinson, H.N., Acebes-Huerta, A., Verpoorten, S., Muñoz-Turrillas, M.C., Parnell A., Patel, K., Hardman, M.J., Gutiérrez, L., & 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>
- Seckin, S., Ramadan, H., Mouanness, M., Kohansieh, M., & Merhi, Z. (2022). Ovarian response to intraovarian platelet-rich plasma (PRP) administration: hypotheses and potential mechanisms of action. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 39(1):37-61. <https://doi.org/10.1007/s10815-021-02385-w>
- Sfakianoudis, K., Simopoulou, M., Nitsos, N., Rapani, A., Pappas, A., Pantou, A., Chronopoulou, E., Deligeoroglou, E., Koutsilieris, M., & Pantos, K. (2019). Autologous Platelet-Rich Plasma Treatment Enables Pregnancy for a Woman in Premature Menopause. *Journal of Clinical Medicine*, 20;8(1):1.
<https://doi.org/10.3390/jcm8010001>
- Shen, J., Sampietro, S., Wu, J., Tang, J., Gupta, S., Matzko, C.N., Tang, C., Yu, Y., Brass, L.F., Zhu, L., & Stalker, T.J. (2017). Coordination of platelet agonist signaling during the hemostatic response in vivo. *Blood Advances*, 21;1(27):2767-2775. <https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2017009498>
- Shimamoto, S., Nishimura, Y., Nagamatsu, G., Hamada, N., Kita, H., Hikabe, O., Hamazaki, N., & Hayashi, K. (2019). Hypoxia induces the dormant state in oocytes through expression of Foxo3. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 116(25):12321-12326. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817223116>
- 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>
- Sirtadis, 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>
- Springer, L.N., Flaws, J.A., Sipes, I.G., & Hoyer, P.B. (1996a). Follicular mechanisms

- associated with 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Reproductive Toxicology*, 10(2):137-43. [https://doi.org/10.1016/0890-6238\(95\)02056-x](https://doi.org/10.1016/0890-6238(95)02056-x)
- Springer, L.N., McAsey, M.E., Flaws, J.A., Tilly, J.L., Sipes, I.G., & Hoyer, P.B. (1996b). 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>
- St John, M.A., Tao, W., Fukumoto, R., Carcangiu, M.L., Brownstein, D.G., Parlow, A.F., McGrath, J., & Xu, T. (1999). Mice deficient of Lats1 develop soft-tissue sarcomas, ovarian tumours and pituitary dysfunction. *Nature Genetics*, 21(2):182-6. <https://doi.org/10.1038/5965>
- Su, K., Bai, Y., Wang, J., Zhang, H., Liu, H., & Ma, S. (2018). Comparison of hyaluronic acid and PRP intra-articular injection with combined intra-articular and intraosseous PRP injections to treat patients with knee osteoarthritis. *Clinical Rheumatology*, 37(5):1341-1350. <https://doi.org/10.1007/s10067-018-3985-6>
- Sunkara, S.K., Rittenberg, V., Raine-Fenning, N., Bhattacharya, S., Zamora, J., & Coomarasamy, A. (2011). Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: an analysis of 400 135 treatment cycles. *Human Reproduction*, 26(7):1768-74. <https://doi.org/10.1093/humrep/der106>
- Suttie, A.W., Boorman, G.A., Leininger, J.R., Eustis, S.L., Elwell, M.R., MacKenzie, W.F., & Bradley, A. (2017). *Boorman's Pathology of the Rat*, Reference and Atlas. 2nd Edition.
- Takada, K., Melnikov, V.G., Kobayashi, R., Komine-Aizawa, S., Tsuji, N.M., & Hayakawa, S. (2023). Female reproductive tract-organ axes. *Frontiers in Immunology*, 14:1110001. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1110001>
- Thoma, M.E., McLain, A.C., Louis, J.F., King, R.B., Trumble, A.C., Sundaram, R., & 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):1324-1331.e1. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.037>
- Thomasy, S.M., Morgan, J.T., Wood, J.A., Murphy, C.J., & Russell, P. (2013). Substratum stiffness and latrunculin B modulate the gene expression of the mechanotransducers YAP and TAZ in human trabecular meshwork cells. *Experimental Eye Research*, 113:66-73. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.05.014>
- Thorne, J.T., Segal, T.R., Chang, S., Jorge, S., Segars, J.H., & Leppert, P.C. (2015). Dynamic reciprocity between cells and their microenvironment in reproduction. *Biology of Reproduction*, 92(1):25. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121368>
- Treuting, P.M., Dintzis, S.M., & Montine, K.S. (2017). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, And Human Atlas*. 2nd Edition.
- Turner, N., & Grose, R. (2010). Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nature Reviews Cancer*, 10(2):116-29. <https://doi.org/10.1038/nrc2780>
- Tülek, F., & Kahraman, A. (2022). The effects of intra-ovarian autologous platelet rich plasma injection on IVF outcomes of poor responder women and women with premature ovarian insufficiency. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*, 8;23(1):14-21. <https://doi.org/10.4274/jtgga.galenos.2021.2021.0134>
- 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*, 28(6):1688-1696. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00528-z>
- Van Kempen, T.A., Milner, T.A., & Waters, E.M. (2011). Accelerated Ovarian Failure: a novel, chemically-induced animal model of menopause. *Brain Research*, 16:1379:176-87. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.12.064>
- Van Wely, M., Kwan I., Burt, A.L., Thomas, J., Vail, A., Van der Veen, F., & Al-Inany, H.G. (2011). Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. *Cochrane Database Systematic Reviews*, 6;2011(2):CD005354. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005354.pub2>
- 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*, 25;122(4):580-9. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-04-491688>
- Woodruff, T.K., & Shea, L.D. (2011). A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 28(1):3-6. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9478-4>
- Wu, Z., & Guan, K.L. (2021). Hippo Signaling in Embryogenesis and Development. *Trends in Biochemical Sciences*, 46(1):51-63. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2020.08.008>
- Xiong, Y., Liu, T., Wang, S., Chi, H., Chen, C., & Zheng, J. (2017). Cyclophosphamide promotes the proliferation inhibition of mouse ovarian granulosa cells and premature ovarian failure by activating the lncRNA-Meg3-p53-p66Shc pathway. *Gene*, 5:596:1-8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.10.011>
- Xu, J., Gou, L., Zhang, P., & Qiu, S. (2020). Platelet-rich plasma and regenerative dentistry. *Australian Dental Journal*, 65(2):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*, 27;16(1):29. <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., Chen, Q., Nie, X., Hao, Q., Hou, D., & 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>
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., & Nishikawa, S.I. (1997). Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology*, 1;184(1):122-37. <https://doi.org/10.1006/dbio.1997.8503>
- 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 M., Niu, W., Wang, Y., Xu, J., Bao, X., Wang, L., Du, L., & Sun, Y. (2016). Dehydroepiandrosterone treatment in women with poor ovarian response undergoing IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(8):981-91. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0713-5>
- Zhang, T., Yan, D., Yang, Y., Ma, A., Li, L., Wang, Z., Pan, Q., & Sun, Z. (2016). The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81:223-232. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.09.002>
- Zhao, B., Wei, X., Li, W., Udan, R.S., Yang, Q., Kim, J., Xie, J., Ikenoue, T., Yu, J., Li, L., Zheng, P., Ye, K., Chinnaiyan, A., Halder, G., Lai, Z.C., & Guan, K.L. (2007). Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes & Development*, 21(21):2747-61. <https://doi.org/10.1101/gad.1602907>
- Zheng, S., Ma, M., Chen, Y., & Li, M. (2022). Effects of quercetin on ovarian function and regulation of the ovarian PI3K/Akt/FoxO3a signalling pathway and oxidative stress in a rat model of cyclophosphamide- induced premature ovarian failure. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*, 130(2):240-253. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13696>

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Antrum
ADP	: Adenozin difosfat
aER	: agranüler Endoplazmik retikulum
AFC	: Antral folikül sayısı
AKT	: Protein kinaz B
AMH	: anti-Müllerian hormon
ATP	: Adenozin trifosfat
BIRC	: Bakuloviral apoptoz inhibitörleri tekrarını içeren protein ailesi
CCN	: Hücresel iletişim ağı protein ailesi
CoQ10	: Koenzim Q10
CTGF	: Bağ dokusu büyüme faktörü
CTX	: Siklofosamid
DENHAB	: Bursa Uludağ Üniversitesi Deneysel Hayvanları Yetiştirme ve Araştırma Birimi
DMSO	: Dimetil sülfoksit
DNA	: Deoksiriboz nükleik asit
DOR	: Düşük over rezervi
E2	: Östrojen
ECM	: Ekstraselüler matriks
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
EDTA	: Etilendiamin tetraasetik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunoSorbent assay
F-aktin	: Fibriler aktin
FGF-1/FGF-2	: Fibroblast büyüme faktörü 1/2
FH	: Folikül hücreleri
FOXO	: Forkhead box O
FOXO3a	: Forkhead box O3
FSH	: Folikül stimulan hormon
G-aktin	: Globüler aktin
GAL	: Galaktoz
GALE	: UDP-galaktoz 4-epimeraz
GALK	: Galaktokinaz
GALT	: Galaktoz 1-fosfat üridiltransferaz
GDP	: Guanozin difosfat
GH	: Büyüme hormonu
GH	: Granüloza hücreleri
GL	: Granüloza lutein hücreleri
GnRH	: Gonadotropin salgılayıcı hormon
GTP	: Guanozin trifosfat
H&E	: Hematoksilen-Eozin
hCG	: İnsan koryonik gonadotropin
HPG	: Hipotalamik pitüiter gonadal eksen
IGF-1/IGF-2	: İnsülin benzeri büyüme faktörü 1/2
IVF	: İn vitro fertilizasyon
KIT	: Tirozin kinaz
KITLG	: Tirozin kinaz ligantı

KL	: Korpus luteum
KO	: Kumulus ooforus
KOH	: Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon
LH	: Luteinize edici hormon
mRNA	: haberci RNA
N	: Nükleus
NAIP	: NLR ailesi apoptoz inhibitör protein
NOR	: Normal ovaryan rezerv
NOV	: Nöroblastoma aşırı eksprese eden büyüme faktörü
OGC	: Ovaryum granüloza hücreleri
OMI	: Oosit matürasyon inhibitörü
oxLDL	: oksitlenmiş düşük yoğunluklu lipoprotein
PDEGF	: Trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü
PDK	: Fosfatidilinositol bağımlı kinaz 1
PI3K	: Fosfatidilinositol-3-kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol-4,5-bifosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat
PMSG	: Gebe kısrak serum gonadotropin
POI	: Prematür ovaryan yetmezlik
PRP	: Plateletten zengin plazma
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog
pYAP	: Fosforillenmiş YAP
RNA	: Ribonükleik asit
SF	: Serum fizyolojik
SG	: Stratum granülozum
SRY	: Y kromozomundaki seks belirleyici bölge
TAZ	: PDZ-bağlama motifli transkripsiyonel koaktivatör
TBF	: Testis belirleyici faktör
TE	: Teka eksterna
TEAD	: TEA/ATTS DNA bağlanma alanını içeren transkripsiyon faktörü
TEM	: Transmisyon elektron mikroskobu
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü-β
Tİ	: Teka interna
TL	: Teka lutein hücreleri
VCD	: 4-vinilsikloheksen diepoksit
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
YAP	: Evet-ilişkili protein
Yp11	: Y kromozomu kısa kolunun 11. lokalizasyonu
ZP	: Zona pellusida
ZP1 / ZP2 / ZP3	: Zona pellusida 1,2,3 proteinleri

8. EKLER

EK-1

Deney Hayvanları Etik Kurul Onayı

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

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN ADI	<i>Siçan In Vivo Prematür Ovaryan Yetmezliği Modelinde Ovaryan Mekanik Uyarılmanın Foliküler Aktivasyona Etkisi; Intraovaryan İğne ve PRP Enjeksiyonunun Karşılaştırmalı Analizi</i>
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ KURUMU	Prof. Dr. Berrin AVCI BUÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji AD
	YARDIMCI ARAŞTIRICILAR	Yüksek Lisans Öğr. Gizem KURT Araş. Gör. Dr. Cihan ÇAKIR Araş. Gör. Dr. Goktan KUŞPINAR Doç. Dr. Işıl KASAPOĞLU
	ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Gizem KURT'un Yüksek Lisans Tez Projesi
	ARAŞTIRMANIN SÜRESİ	01.04.2023 – 30.10.2023
KULLANILACAK HAYVAN TURU VE SAYISI	45 Adet Dişi Siçan	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BELGELER	Belge Adı	Tarihi
		ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No : 2023 - 04 / 07	Tarih: 28.02.2023
		Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma projesi gerekçe, amaç ve yöntemler dikkate alınarak görüşüldü ve ilgili belgeler incelendi. Projenin etik açıdan uygun olduğuna, çalışmanın aşağıdaki hususlar dikkate alınarak yürütülmesine ve sorumlu araştırmacıya iletilmesine oy birliği/oy çokluğu ile karar verildi. 1) Projede herhangi bir değişiklik gerektiğinde kurulumuzdan onay alınması, 2) Projede çalışacağı bildirilen araştırmacılarda değişiklik olduğunda kurulumuzdan onay alınması, 3) Deney hayvanları üzerinde yapılacak girişimin başlangıç ve bitiş tarihinin bildirilmesi, 4) Çalışma süresinde tamamlanamaz ise ek süre talebinde bulunulması, 5) Çalışma tamamlandığında sonuç raporunun gönderilmesi.

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

9. TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Üreme Biyolojisi ve Klinik Embriyoloji Bilim Dalı'nda aldığım yüksek lisans eğitimim süresince bilgisi ve tecrübesiyle bana akademik olarak yol gösterip akıl hocalığımı yapan, maddi ve manevi desteği, anaçlığı ve sabrıyla her zaman yanımda olduğunu hissettiren çok değerli danışmanım Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Berrin AVCI'ya teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübeleriyle beni akademik hayata hazırlayan ve benden manevi desteklerini esirgemeyen Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Semiha ERSOY ve diğer Öğretim Üyeleri Prof. Dr. F. Zehra MİNBAY, Prof. Dr. Özhan EYİGÖR, Doç. Dr. Sema SERTER KOÇOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Duygu GÖK YURTSEVEN ve Uzm. Dr. Cihan ÇAKIR'a teşekkür ve saygılarımı sunarım.

İhtiyacım olduğunda yardım ve desteklerini esirgemeyen Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı'ndaki tüm asistan arkadaşlarıma ve çalışanlarına teşekkür ederim.

Bilgi birikimlerini benimle paylaşan, tezimin her aşamasında büyük emekleri olan ve yardıma ihtiyacım olduğunda daima destek veren Uzm. Dr. Cihan ÇAKIR ve Arş. Gör. Dr. Gökten KUŞPINAR'a teşekkür ederim.

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Başkanı ve Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi Sorumlusu Prof. Dr. Gürkan UNCU, Doç. Dr. Işıl KASAPOĞLU ve Doç. Dr. Kiper ASLAN başta olmak üzere ÜYTE Merkezi'nin tüm değerli çalışanlarına ve özellikle manevi desteğiyle daima yanımda olan Biyolog İlknur YAVAŞ'a eğitimim süresince verdikleri desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez sürecimde laboratuvar imkanlarını esirgemeyen ve tecrübeleriyle yol gösteren Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Ana Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Gökhan GÖKTALAY ve Prof. Dr. Mehmet CANSEV'e teşekkür ederim. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Ana Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Ayşen ÇAKIR'a destek ve emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez sürecim boyunca özel hayatımda yaşadığım zor dönemlerde hayata tutunmamı sağlayan, varlıklarıyla güç veren, manevi desteklerini esirgemeyen kıymetli teyzem Sülbiye BAYRAKTUTAN, çok sevdiğim yakın arkadaşlarım Yasemin SEVGİLİ, Eda MEMİŞOĞLU, Gözde BİLGİN AÇIKGÖZ, Selin TÜFEKÇİ, Huri ATİKER MALEK, Barış DAĞDEMİR, Ömüray EMİNAĞAOĞLU, Merve KARAKUŞ ve manevi ablam gibi hissettiren İlknur YAVAŞ'a teşekkür ederim.

Son olarak, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, eğitim hayatımın tüm süreçlerinde ellerinden gelenin daha fazlasını yapan, kalpleri ve insanlıklarıyla rol modeli edindiğim çok sevdiğim ve çok özlediğim kıymetlilerim rahmetli annem Necla KURT ve rahmetli babam Ahmet KURT'a teşekkür ederim.

10. ÖZGEÇMİŞ

■■■■■■■■■■ tarihinde ■■■■ ili, ■■■■ ilçesinde doğdu. İlköğretim öğrenimini 2011 yılında Bursa ili, Hasan Ali Yücel İlköğretim Okulu'nda tamamladı. Lise öğrenimini 2015 yılında Artvin ili, Artvin Fen Lisesi'nde tamamladı. 2015-2019 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'nde lisans eğitimini tamamladı. 2017-2022 yılları arasında Anadolu Üniversitesi Açıköğretim Fakültesi Sağlık Yönetimi Bölümü'nde ikinci lisans eğitimini tamamladı. 2018-2019 yılları arasında Bursa Uludağ Üniversitesi Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Sertifika Programı'nı tamamladı. 2019 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Üreme Biyolojisi ve Klinik Embriyoloji Bilim Dalı ve Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Ana Bilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkezi'nde özel öğrenci olarak bulundu. 2020 yılında Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı Üreme Biyolojisi ve Klinik Embriyoloji Bilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı.