T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ

İSTANBUL KANUNİ SULTAN SÜLEYMAN
SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM KLİNİĞİ

# DENEYSEL OLARAK SİKLOFOSFAMİD İLE OVARYAN YETMEZLİK OLUŞTURULAN RATLARDA İNTRAOVARYAN PRP VE EKSOZOM UYGULAMASININ OVER DOKUSU VE SERUM AMH, FSH, TAS VE TOS DÜZEYİ ÜZERİNE ETKİSİ

**Dr. Aycan Örler**

**(TIPTA UZMANLIK TEZİ)**

**İSTANBUL**

**2026**

**T.C.**
**SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ**
**İSTANBUL KANUNİ SULTAN SÜLEYMAN**
**SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ**
**KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM KLİNİĞİ**

# DENEYSEL OLARAK SİKLOFOSFAMİD İLE OVARYAN YETMEZLİK OLUŞTURULAN RATLARDA İNTRAOVARYAN PRP VE EKSOZOM UYGULAMASININ OVER DOKUSU VE SERUM AMH, FSH, TAS VE TOS DÜZEYİ ÜZERİNE ETKİSİ

**Dr. Aycan Örler**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Merve Aldıkaçtıoğlu Talmaç**
**Yardımcı Tez Danışmanı: Op. Dr. Mustafa Göksu**

**(TIPTA UZMANLIK TEZİ)**

**İSTANBUL**
**2026**

# İTHAF

Bilime, akla ve eğitime adanmış bir yaşamın ilham kaynağı olan, fikirleriyle hâlâ yolumuzu aydınlatan **Ulu Önder Gazi Mustafa Kemal Atatürk'e** saygı, minnet ve özlemle…

# TEŞEKKÜR

Uzmanlık tezimin hazırlanmasında emeği geçen ve bana her anlamda destek olan tüm kişi ve kurumlara teşekkür ederim.

Öncelikle tez çalışmam süresince bilimsel bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her aşamada destek olan ve teşvik eden, cerrahi tecrübesine hayranlık duyduğum değerli tez danışmanım jinekolojik onkoloji klinik şefi ve eğitim şefimiz Doç. Dr. Merve Aldıkaçtıoğlu Talmaç'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlık eğitimim boyunca akademik desteğini ve içten yönlendirmelerini esirgemeyen idari şefimiz ama en çok da ablamız Doç. Dr. Ayşegül Bestel'e, bana olan güvenini her zaman hissettiren yolumu çizmemde önemli dokunuşları olan yardımcı tez danışmanım Op. Dr. Mustafa Göksu'ya, tezimde bana desteklerini esirgemeyen değerli hocam patolog Doç.Dr. Taşkın Erkinüresin'e ve ameliyathanede yaptığı, öğrettiği, anlattığı, gösterdiği her şeye minnettar olduğum abim Op. Dr. Cem Erdoğan'a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımı gerçekleştirme fırsatı bulduğum İÜC Nanoteknoloji ve Biyoteknoloji Enstitüsü – DETALAB ekibine ve deneysel süreçte heran yanımda olan Araştırma Görevlisi Veteriner Hekim Şima Kılıç ile Veteriner Hekim Nazlı Gül İyigün'e, hayvan bakıcıları Ali Bey ve Tugay Bey'e teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni koşulsuz destekleyen akademik ve sosyal anlamda bugünlere gelmemi sağlayan bana güç veren sevgili aileme en özel teşekkürlerimi iletmek isterim. Disiplinine, azmine hayran olduğum bana dik durmayı öğreten babam Necmi Örler'e, düştüğümde kalkmayı öğreten her daim karşılıksız sevgisini veren güzel annem Ayten Örler'e ve her daim güvende hissetmemi sağlayan biricik abim Alican Örler'e, güzel eşi ablam Nur Örler ve 'haha-sı' olduğum için çok şanslı olduğum yakışıklım Aybars Örler'e minnettarım.

Beni ben yapan her anın şahidi, sadece tez sürecimde değil hayatımın her anında imdadıma koşacağına emin olduğum dostum, sırdaşım, kız kardeşim Elvide Nur Mısırcı'ya sonsuz teşekkür ederim. Birbirimize yaslanacak bir omuz olduğumuz beraber büyüdüğümüz lise arkadaşlarım Nurseda Kurşun Fırın, Tuğba Dağ, Gülçe Gönül, Bilgehan Şahpaz'a, üniversitenin ilk gününden beri yanımda olan, yargılamadan dinlemeyi öğreten, hekimliğine ve azmine hayran olduğum sevgili arkadaşlarım Şevval Güçlü ve Candan Bayiskit'e teşekkür ederim.

Ayrıca, bu yoğun ve zorlu asistanlık dönemimde gece gündüz beraber çalıştığımız başarılarından her zaman gurur duyduğum, alo sana ihtiyacım var dediğimde düşünmeden koşup gelen, dostluğun ve dayanışmanın en güzel örnekleri eşkıdemlerim Dr. Büşra Burcu Baran, Dr. Sinem Uçak, Dr. Hacer Yıldız, Dr. Deniz Adak, Dr. Gamze Öztaş' a gönülden teşekkür ederim. Bir teşekkürüm de zor zamanlarımızda ve en güzel anılarımızda yer alan enerjisiyle en büyük destekçilerimden Dr Melike Nur Bedir'e.

Beraber nöbet tuttuğum, hekimlik sanatının inceliklerini öğreten, tecrübelerini paylaşan ve her zaman desteğini esirgemeyen Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesinin değerli hocaları ve tüm uzman abi ve ablalarıma, destekleriyle işleri kolaylaştıran ebe ve hemşire arkadaşlarıma, personel ve tüm sağlık çalışanlarına teşekkür ederim. Rehberliğinizde ilerlediğim bu yolda öğrettikleriniz kendi meslek hayatım boyunca her zaman kulağıma küpe olacak.

Cerrahinin usta-çırak ilişkisi ile öğrenildiğinin her zaman bilincinde olup; bildiğim, yaptığım, sahip olduğum tüm becerilerin mimarı çok kıymetli kıdemli abi ve ablalarıma sonsuz teşekkür ederim. Bilgi ve tecrübelerini paylaşan, beraber öğrendiğimiz tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim. Onlar sayesinde bu süreç çok daha anlamlı ve verimli geçti.

Ve son olarak en özel teşekkürüm hayatımın her anında olduğu gibi bu zorlu tez sürecinde de sabrıyla, sevgisiyle ve inancıyla yanımda olan hayat arkadaşım Atagün Sarıuşak'a**.** Yorulduğumda beni motive eden, umudumu kaybettiğimde elimi tutan, her başarımı kendi başarısı gibi paylaşan varlığı için minnettarım. Onun desteği olmasaydı, bu yolculuk bu kadar anlamlı ve güçlü bir şekilde tamamlanamazdı.

Dr Aycan Örler
Şubat 2026

# İÇİNDEKİLER

İTHAF ..... iii
TEŞEKKÜR ..... iv
İÇİNDEKİLER ..... vii
TABLOLAR LİSTESİ ..... x
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... xii
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... xiv
ÖZET ..... xvi
ABSTRACT ..... xviii
1.GİRİŞ VE AMAÇ ..... 1
2. GENEL BİLGİLER ..... 4
2.1. OVER ..... 4
2.1.1. Over Anatomisi ..... 4
2.1.1.1. Ovaryan kan dolaşımı ..... 5
2.1.1.2. Ovaryan sinir innervasyonu ..... 5
2.1.2 Over Histolojisi ..... 6
2.1.3 Over Embriyolojisi ..... 7
2.1.4 Oogenezis ..... 8
2.1.4.1. Primer oosit oluşumu ..... 8
2.1.4.2. Folikülogenezis ..... 8
2.1.4.3. Sekonder oosit oluşumu ve olgunlaşma ..... 9
2.2. OVARYAN SİKLUS ..... 10
2.2.1. Hipotalamus – Hipofiz – Over Aksı ..... 11
2.2.1.1. Hipotalamusun rolü ..... 11
2.2.1.2. Hipofiz ön lobunun rolü ..... 12
2.2.1.3. Overlerin rolü ..... 12
2.2.1.4. HHO aksında görülen bozukluklar ..... 12
2.3. RAT OVERİ VE ÖSTRUS ..... 13
2.3.1. Östrus Döngüsü ..... 14
2.4. OVER REZERVİ ..... 15
2.4.1. Fizyolojik Temel ..... 15
2.4.2. Over Rezervinin Değerlendirilmesi ..... 16
2.4.3. Klinik Önemi ..... 17

2.5. PRİMER OVER YETMEZLİĞİ ..... 17
2.5.1. Epidemiyoloji ..... 17
2.5.2. Patofizyoloji ve Etiyoloji ..... 17
2.5.2.1. Folikül sayısında azalma ..... 18
2.5.2.2. Folikül fonksiyon kusurları ..... 18
2.5.2.3. Genetik etkenler ..... 18
2.5.2.4. Otoimmün ve iyatrojenik etkenler ..... 18
2.5.3. Klinik Bulgular ..... 18
2.5.4. Tanı Kriterleri ..... 19
2.5.5. Tedavi ve Yönetim ..... 19
2.5.5.1. Hormon replasman tedavisi (HRT) ..... 19
2.5.5.2. Fertilite yönetimi ..... 20
2.5.5.3. Osteoporoz ve kemik sağlığının korunması ..... 21
2.5.5.4. Kardiyovasküler sağlık yönetimi ..... 21
2.5.5.5. Psikososyal destek ve danışmanlık ..... 21
2.6. SİKLOFOSFAMİD VE OVARYAN TOKSİSİTE ..... 21
2.6.1. Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması ..... 21
2.6.2. Siklofosfamid Metabolitleri ve Oosit Hasarı ..... 22
2.6.3. Oksidatif Stres Mekanizması ve Folikül Kayıpları ..... 23
2.6.4. Deneysel Modellerde Siklofosfamid Kullanımı ..... 24
2.7. OKSİDATİF STRES ve ANTİOKSİDAN SİSTEM ..... 25
2.7.1. Tanım ve Biyolojik Önemi ..... 25
2.7.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Hasar Mekanizmaları ..... 26
2.7.3. Antioksidan Savunma Sistemi ..... 27
2.7.3.1. Enzimatik antioksidanlar ve Total Antioksidan Kapasite/Total Oksidan Kapasite ..... 28
2.7.3.2. Non-enzimatik antioksidanlar ..... 29
2.7.4. Over Fonksiyonunda Oksidatif Stresin Rolü ..... 30
2.8. PLATELET RICH PLASMA ..... 32
2.8.1. Platelet-Rich Plasma Tanımı ve Bileşimi ..... 32
2.8.2. Platelet-Rich Plasma Hazırlama Yöntemleri ..... 33
2.8.3. Platelet-Rich Plasma'nın Etki Mekanizması ve Büyüme Faktörleri ..... 33
2.8.4. Reprodüktif Tıpta Platelet-Rich Plasma Kullanımı ..... 34
2.8.5. Deneysel Çalışmalarda İntraovaryan Platelet-Rich Plasma Uygulamaları ..... 34
2.9. EKSOZOM ..... 35
2.9.1. Eksozom Tanımı ve Biyogenezi ..... 35
2.9.2. Eksozomların Hücrelerarası İletişimde Rolü ..... 36

2.9.3. Eksozomların İçerdiği Biyomoleküller ..... 36
2.9.4. Eksozomların Over Fonksiyonları Üzerine Etkileri ..... 37
2.9.5. Rejeneratif Tıpta Eksozom Kullanımı ..... 38
3. GEREÇ VE YÖNTEM ..... 39
3.1. DENEY GRUPLARI ..... 40
3.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME ..... 43
3.2.1. Kan Örneklerinin Alınması ..... 43
3.2.2. Platelet-Rich Plasma Hazırlığı ..... 44
3.2.3. Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELİSA) ..... 45
3.2.4. Kolorimetrik Test ..... 47
3.2.5. Oksidatif Stres İndeksi Hesaplaması ..... 48
3.3. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME ..... 48
3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME ..... 49
4. BULGULAR ..... 50
4.1. DENEY HAYVANLARININ VÜCUT AĞIRLIKLARI ..... 50
4.2. OVARYAN HİSTOLOJİK BULGULAR ..... 51
4.2.1. Primordial Folikül Sayıları ..... 52
4.2.2. Primer Folikül Sayıları ..... 52
4.2.3. Sekonder Folikül Sayıları ..... 52
4.2.4. Antral Folikül Sayıları ..... 53
4.3. SERUM AMH BULGULARI ..... 54
4.3.1.Gruplar Arası Karşılaştırmalar ..... 54
4.3.2. Zaman İçinde AMH Değişimleri ..... 55
4.4. SERUM FSH BULGULARI ..... 57
4.4.1. Gruplar Arası Karşılaştırmalar ..... 58
4.4.2. Zaman İçinde FSH Değişimleri ..... 59
4.5. OKSİDATİF STRES BULGULARI ..... 61
4.5.1 TAS DÜZEYİ ..... 61
4.5.2. TOS DÜZEYİ ..... 63
4.5.3. OSI DÜZEYİ ..... 65
4.6. DEĞİŞİM ANALİZLERİ ..... 67
5. TARTIŞMA ..... 70
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER ..... 74
KAYNAKLAR ..... 76
EKLER ..... **Error! Bookmark not defined.**

# TABLOLAR LİSTESİ

**Tablo 1:** Foliküllerin adlandırılması ..... 48

**Tablo 2:** Deney gruplarının farklı zaman noktalarındaki vücut ağırlıklarının tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırılması ..... 50

**Tablo 3:** Deney gruplarında over dokusuna ait histolojik folikül sayımlarının (primordial, primer, sekonder ve antral) karşılaştırılması ..... 51

**Tablo 4:** Kontrol ve deney grupları arasında primordial folikül sayılarının Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması ..... 52

**Tablo 5:** Kontrol ve deney grupları arasında antral folikül sayılarının Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması ..... 53

**Tablo 6:** Deney gruplarında zaman içinde serum AMH düzeylerindeki değişimin karşılaştırılması ..... 54

**Tablo 7:** Kontrol ve deney grupları arasında T1 ve T2 zaman noktalarında serum AMH düzeylerinin Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması ..... 55

**Tablo 8:** Deney gruplarında serum AMH düzeylerinin T0, T1 ve T2 zaman noktaları arasındaki grup içi karşılaştırmaları için Dunn's çoklu karşılaştırma testi sonuçları ..... 56

**Tablo 9:** Deney gruplarında zaman içinde serum FSH düzeylerindeki değişimin karşılaştırılması ..... 57

**Tablo 10:** Kontrol ve deney grupları arasında T2 zaman noktasında serum follikül stimülan hormon (FSH) düzeylerinin Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması ..... 58

**Tablo 11:** Deney gruplarında serum FSH düzeylerinin T0, T1 ve T2 zaman noktaları arasındaki grup içi karşılaştırmaları için Dunn's çoklu karşılaştırma testi sonuçları ..... 60

**Tablo 12:** Deney gruplarında zaman içinde serum TAS düzeylerindeki değişimin değerlendirilmesi ..... 61

**Tablo 13:** Kontrol ve deney grupları arasında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında serum TAS düzeylerinin Tukey çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması ..... 62

**Tablo 14:** CYP+PRP+Eksozom grubunda serum TAS düzeylerinin zamana bağlı değişimi için Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi sonuçları ..... 62

Tablo 15: Deney gruplarında zaman içinde serum TOS düzeylerindeki değişimin değerlendirilmesi..... 63

**Tablo 16:** Kontrol ve deney grupları arasında T0 zaman noktasında serum TOS düzeylerinin Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması ..... 64

**Tablo 17:** Deney gruplarında zaman içinde OSI düzeylerindeki değişimin değerlendirilmesi ..... 65

**Tablo 18:** Kontrol ve deney grupları arasında T0 zaman noktasında OSI değerlerinin Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması ..... 66

**Tablo 19:** CYP grubunda OSI değerlerinin T0, T1 ve T2 zaman noktaları arasındaki grup içi karşılaştırmaları için Dunn's çoklu karşılaştırma testi sonuçları ..... 66

**Tablo 20:** Kontrol ve deney gruplarında serum AMH, FSH, TAS, TOS ve OSI değerlerinin T0'a göre değişimleri (ΔT1–T0, ΔT2–T0) ve gruplar arası karşılaştırılması .....69

# ŞEKİLLER LİSTESİ

**Şekil 2.1:** Kadın üreme sistemi.....4

**Şekil 2.2:** Overin kanlanması .....5

**Şekil 2.3:** Over histolojik yapısı ……. 7

**Şekil 2.4:** Oogenezis, sekonder oosit oluşumu..... 9

**Şekil 2.5:** Memelilerde gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) pulsatil üretimini kontrol eden varsayımsal mekanizmanın şematik gösterimi. .....11

**Şekil 2.6:** Normal menstrüel siklusta salgılanan hormonların serumda ölçülen değişiklikleri …….. 13

**Şekil 2.7:** Rat dişi üreme sistemi ……14

**Şekil 3.1:** Yaklaşık 2 cm'lik median insizyonla laparotomi yapılan ratta bikornu uterus (sol) ve sol adneksiyal yapıların (sağ) gösterilmesi ……....41

**Şekil 3.2:** İntraovaryan PRP (sağ) ve Eksozom (sol) uygulaması ……. 41

**Şekil 3.3:** Ratların operasyona hazırlık (1), 2cm'lik median insizyonun anatomiye uygun kapatılması (2), operasyon sonunda insizyonun görüntüsü (3) ……. 42

**Şekil 3.4:** Ratlarda subklavian kan alımı ……43

**Şekil 3.5:** PRP hazırlığı şematizasyonu ……. 44

**Şekil 3.6:** Biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere santrifüj sonrası elde edilen serum örneklerinin Eppendorf tüplerdeki görünümü …… 45

**Şekil 3.7:** Deneysel çalışma kapsamında kullanılan cihazların laboratuvar ortamındaki görünümü …… 46

**Şekil 4.1:** Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom gruplarında vücut ağırlıkları (Ort±SS) ……...…. 51

**Şekil 4.2:** Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom gruplarında primordial, primer, sekonder ve antral folikül sayıları (Ort±SS) …… 53

**Şekil 4.3:** Kontrol ve deney gruplarında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında serum AMH (pg/ml) düzeylerinin değişimi ……. 57

**Şekil 4.4:** Kontrol ve deney gruplarında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında serum FSH (ng/ml) düzeylerinin değişimi ……. 60

**Şekil 4.5:** Kontrol ve deney gruplarında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında serum TAS (mmol/L) düzeylerinin değişimi ……. 63

**Şekil 4.6:** Kontrol ve deney gruplarında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında serum TOS (μmol/L) düzeylerinin değişimi ……. 65

**Şekil 4.7:** Kontrol ve deney gruplarında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında OSI değerlerinin değişimi …….. 67

# SİMGELER VE KISALTMALAR

**4-OHCP :** 4-hidroksisiklofosfamid

**AFC :** Antral folikül sayımı

**AMH :** Anti-Müllarian Hormon

**CAT :** Katalaz

**CoQ10 :** Koenzim Q10

**CYP :** Siklofosfamid

**EGF :** Epidermal growth factor

**ESCRT :** Endosomal ayırma kompleksleri

**EV :** Ekstrasellüler vezikül

**FRM :** Fosforamid mustard

**FSH :** Folikül Stimülan Hormon

**GnRH :** Gonadotropin Serbestleştirici Hormon

**GnRHa :** Gonadotropin Serbestleştirici Hormon Agonistleri

**GPx :** Glutatyon Peroksidaz

**GSH :** Glutatyon

**GSSG :** Glutatyon disülfür

**$H_2O_2$ :** Hidrojen peroksit

**HHO :** Hipotalamus-Hipofiz-Over

**HRP :** Horseradish Peroksidaz

**HRT :** Hormon replasman tedavisi

**IGF-1 :** Insulin-like growth factor-1

**ILV :** İntralüminal vezikül

**ISEV :** International Society for Extracellular Vesicles

**IVF** : InVitro Fertilizasyon

**KNDy** : Kisspeptin, nörokinin B ve dynorphin nöronları

**KT** : Kemoterapi

**LH** : Luteinleştirici Hormon

**MDA** : Malondialdehit

**MISEV** : Minimal information for studies of extracellular vesicles

**MSC** : Mezenkimal kök hücre

**MVB** : Multivesicular bodies

**OD** : Optik yoğunluk

**OSI** : Oksidatif Stres İndeksi

**PGH** : Primordial Germ Hücreleri

**PKOS** : Polikistik Over Sendromu

**PMF** : Primordial Folikül

**POY** : Primer Over Yetmezliği

**PDGF** : Platelet-derived growth factor

**PRP** : Platelet Rich Plasma

**RT** : Radyoterapi

**ROS** : Reactive oxygen species

**Small EV:** Küçük ekstrasellüler vezikül

**SOD** : Süperoksit Dismutaz

**TAS** : Total Antioksidan Kapasite

**TGF-β** : Transforming growth factor-β

**TOS** : Total Oksidan Kapasite

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor

**YÜT** : Yardımcı Üreme Teknikleri

# DENEYSEL OLARAK SİKLOFOSFAMİD İLE OVARYAN YETMEZLİK OLUŞTURULAN RATLARDA İNTRAOVARYAN PRP VE EKSOZOM UYGULAMASININ OVER DOKUSU VE SERUM AMH, FSH, TAS VE TOS DÜZEYİ ÜZERİNE ETKİSİ

## ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmanın amacı, kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan alkilleyici kemoterapi ajanlarından biri olan siklofosfamidin (CYP) over dokusu üzerinde oluşturduğu toksik etkileri ortaya koymak ve bu hasarın rejeneratif biyoterapi yaklaşımları ile azaltılabilirliğini araştırmaktır. Özellikle kemoterapiye sekonder over yetmezliği gelişen genç kadınlarda ve adölesan yaş grubundaki hastalarda doğurganlığın korunmasına yönelik yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi güncel bir gereksinimdir. Bu kapsamda deneysel olarak siklofosfamid ile over hasarı oluşturulmuş dişi sıçan modelinde intraovaryen Platelet Rich Plasma (PRP) ve eksozom uygulamalarının over fonksiyonu, doku bütünlüğü ve oksidatif stres parametreleri üzerindeki olası koruyucu ve iyileştirici etkilerinin değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada toplam 39 adet, Sprague-Dawley cinsi, yaklaşık 8-10 haftalık sağlıklı, gebe olmayan, 155-215 gr ağırlığındaki dişi ratlar kullanıldı. Ratlar rastgele seçilerek 5 gruba ayrıldı; kontrol grubu (n=8), CYP grubu (n=8), CYP + PRP grubu (n=7), CYP + eksozom grubu (n=8), CYP + PRP + eksozom grubu (n=8). Over yetmezliği modeli tek doz intraperitoneal 200 mg/kg CYP ile oluşturuldu. Zaman çizelgesine göre Gün 0'da tüm gruplardan subklavian veninden bazal kan örneği alındı ilgili gruplara intraperitoneal CYP uygulandı. Gün 14'te over yetmezliği modelinin değerlendirilmesi amacıyla subklavian veninden 2. kan örneği alındı. Gün 21'de PRP uygulanacak gruplardan otolog tam kan alımı ile PRP hazırlandı ve tüm gruplar laparotomiye alındı. Kontrol grubu ve CYP grubunda adneksler inspeksiyon ile değerlendirildi ve cerrahi prosedür sonlandırıldı. CYP + PRP grubunda bilateral intraovaryen yaklaşık 200 µL PRP enjekte edildi. CYP + Eksozom grubunda bilateral intraovaryen yaklaşık 100 µL Eksozom enjekte edildi. CYP + PRP + Eksozom grubunda bilateral intraovaryen yaklaşık 200 µL PRP ve 100 µL Eksozom enjekte edildi. Tüm gruplara insizyondan 30-60 dk önce tek doz Cefazolin 20-25 mg/kg IM uygulandı.

Gün 28 de tüm gruplara laparotomi ile kardiyak ponksiyon ile 3. kan örneği alındı ve bilateral ooferektomi sonrası yüksek doz anestezik ile sakrifiye edildi. Biyokimyasal incelemede serumda Folikül Stimülan Hormon (FSH), Anti-Müllarian Hormon (AMH), Total Antioksidan Kapasite (TAS) ve Total Oksidan Kapasite (TOS) düzeyleri ELİSA yöntemi ile değerlendirildi. Over dokuları histolopatolojik inceleme için hematoksilen&eozin ile boyandı. Işık mikroskobunda primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer(antral) foliküllerin sayımı yapıldı.

**Bulgular:** Bu çalışmada, CYP ile oluşturulan ovaryan yetmezlik modelinde intraovaryan PRP, eksozom ve PRP+eksozom uygulamalarının ovaryan histoloji, serum AMH ve FSH düzeyleri ile oksidatif stres parametreleri (TAS, TOS, OSI) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. CYP uygulaması sonrasında primordial ve antral folikül sayılarında anlamlı azalma ile birlikte serum AMH düzeylerinde düşüş ve FSH düzeylerinde artış saptanmıştır. İntraovaryan PRP uygulamasının primordial ve antral folikül kaybını sınırladığı ve özellikle oksidatif stres parametreleri üzerinde iyileştirici etki gösterdiği belirlenmiştir. Eksozom uygulamasının ise serum AMH düzeylerinde belirgin artış sağlayarak ovaryan rezervin biyokimyasal göstergeleri üzerinde daha güçlü ve nispeten kalıcı bir iyileşme oluşturduğu saptanmıştır. PRP ve eksozomun birlikte uygulanması, CYP grubuna kıyasla histolojik ve biyokimyasal iyileşme sağlamakla birlikte, PRP ve eksozom monoterapisine üstünlük göstermemiştir.

**Sonuç:** PRP ve eksozom uygulamalarının kemoterapiye bağlı ovaryan hasar üzerinde farklı ancak tamamlayıcı biyolojik mekanizmalarla etkili olduğu; eksozom temelli yaklaşımların ovaryan rezervin korunması açısından daha belirgin bir potansiyele sahip olduğu kanaatine varılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Siklofosfamid, over yetmezliği, PRP, eksozom, AMH, FSH, TAS, TOS, OSI

# AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE EFFECTS OF INTRAOVARIAN PRP AND EXOSOME ADMINISTRATION ON OVARIAN TISSUE AND SERUM AMH, FSH, TAS, AND TOS LEVELS IN RATS WITH CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED OVARIAN FAILURE

## ABSTRACT

**Aim:** The aim of this study is to demonstrate the toxic effects of cyclophosphamide (CYP), one of the alkylating chemotherapeutic agents frequently used in cancer treatment, on ovarian tissue, and to investigate the potential mitigation of this damage through regenerative biotherapy approaches. The development of novel treatment strategies to preserve fertility in young women and adolescent patients who experience chemotherapy-induced ovarian failure has become an important contemporary need. In this context, the present experimental study aims to evaluate the possible protective and restorative effects of intraovarian Platelet-Rich Plasma (PRP) and exosome administration on ovarian function, tissue integrity, and oxidative stress parameters in a female rat model with cyclophosphamide-induced ovarian injury.

**Materials and Methods:** A total of 39 healthy, non-pregnant female Sprague-Dawley rats, aged approximately 8–10 weeks and weighing 155–215 g, were used in this study. The rats were randomly divided into five groups: Control group (n=8), CYP group (n=8), CYP + PRP group (n=7), CYP + Exosome group (n=8), and CYP + PRP + Exosome group (n=8). The ovarian failure model was induced by a single intraperitoneal dose of cyclophosphamide (200 mg/kg). According to the experimental timeline, on Day 0, baseline blood samples were obtained from the tail vein of all rats, followed by intraperitoneal administration of CYP in the respective groups. On Day 14, a second blood sample was collected from the tail vein to assess the establishment of the ovarian failure model. On Day 21, autologous whole blood was collected from rats in the PRP treatment groups to prepare PRP, and all rats underwent laparotomy. In the Control and CYP groups, adnexal tissues were inspected and the surgical procedure was terminated. In the CYP + PRP group, approximately 200 μL of PRP was injected bilaterally into the ovaries. In the CYP + Exosome group, approximately 100 μL of exosome was injected bilaterally. In the CYP + PRP + Exosome group, 200 μL of PRP and 100 μL of exosome were bilaterally injected into

the ovaries. All groups received a single intramuscular dose of cefazolin (20–25 mg/kg) 30–60 minutes before the incision. On Day 28, a third blood sample was collected via cardiac puncture under laparotomy, followed by bilateral oophorectomy and sacrifice with a high-dose anesthetic. For biochemical analysis, serum Follicle Stimulating Hormone (FSH), Anti-Mullarian Hormone (AMH), Total Antioksidant Status (TAS) and Total Oksidant Status (TOS) levels were measured using the ELISA method. Ovarian tissues were stained with hematoxylin and eosin for histopathological evaluation. Under light microscopy, primordial, primary, secondary and tertiary (antral) follicles were counted.

**Results:** In this study, the effects of intraovarian PRP, exosome, and PRP+exosome applications on ovarian histology, serum AMH and FSH levels, and oxidative stress parameters (TAS, TOS, OSI) were evaluated in an ovarian insufficiency model created with CYP. Following CYP administration, a significant decrease in primordial and antral follicle numbers was observed, along with a decrease in serum AMH levels and an increase in FSH levels. Intraovarian PRP application was found to limit primordial and antral follicle loss and to have a particularly beneficial effect on oxidative stress parameters. Exosome application was found to cause a marked increase in serum AMH levels, resulting in a stronger and relatively more persistent improvement in biochemical markers of ovarian reserve. The combined application of PRP and exosomes provided histological and biochemical improvement compared to the CYP group but did not show superiority over PRP and exosome monotherapy.

**Conclusion:** It has been concluded that PRP and exosome applications are effective on chemotherapy-induced ovarian damage through different but complementary biological mechanisms; exosome-based approaches have a more pronounced potential in terms of preserving ovarian reserve.

**Key Words:** Cyclophosphamide, ovarian failure, PRP, Exosome, AMH, FSH, TAS, TOS, OSI

# 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Yumurtalıklar kadın üreme sisteminde hem hormon üretimi hem de oosit depolanması ve olgunlaşması açısından hayati bir organdır. Kadınlarda doğuştan sahip olunan primordial folikül (PMF) havuzu yumurtalık rezervi olarak ifade edilir(1). Bu havuzda primordial germ hücreleri genital çıkıntıları kolonize eder ve gebeliğin ortalarına kadar yaklaşık 7 milyon oosit üretmek üzere çoğalır. Bunların yaklaşık %85'i doğumdan önce kaybedilir. Folikül sayısı yaşam boyunca azalmaya devam eder ve bunlardan sadece yaklaşık 450'si yumurtlamaya ulaşırken geri kalanı atreziye uğrar(2). Yumurtalık rezervinin sağlıklı olması fertilite açısından önemlidir.

Over fonksiyonunun 40 yaşından önce kaybı ya da ciddi derecede bozulması şeklinde tanımlanan primer over yetmezliği (POY), kadın üreme sağlığı açısından giderek artan bir önem taşımaktadır. Dünya genelinde yapılan sistematik derleme ve meta-analiz çalışmalarına göre POY prevalansının yaklaşık %3,5 düzeyinde olduğu bildirilmektedir. Örneğin iatrojenik nedenli POY'de %11,2'ye kadar ulaşabildiği raporlanmıştır. (3,4) Başka bir güncel incelemede ise küresel prevalansın yaklaşık %3,7 olduğu belirtilmiştir(5). Bu bağlamda, POY'nin toplum düzeyindeki görülme sıklığının vurgulanması kadın sağlığı bakımından erken tanı, koruyucu yaklaşımlar ve yenilikçi tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi açısından kritik önemdedir.

Genetik yatkınlık, kromozomal anomaliler (örneğin X kromozom defektleri), otoimmünite, iatrojenik nedenler (kemoterapi (KT), radyasyon), toksinlerle karşılaşma, sigara kullanımı ve düşük parite sayısı POY gelişimindeki risk faktörleri olarak tanımlanmıştır.(6,7). KT ve diğer gonadotoksik tedavilerin kadın üreme sağlığı üzerindeki olumsuz etkileri günümüzde giderek daha fazla görünür hâle gelmiştir. Özellikle alkilleyici ajanlar, platinyum bazlı tedaviler ve yüksek dozdaki kombinasyon kemoterapileri PMF sayısında gerilemeye, folliküler havuzun hızla tükenmesine ve bunun sonucunda POY gelişimine neden olmaktadır(7,8). Örneğin; CYP gibi ajanların doğrudan foliküler DNA'da çift sarmal kırıkları oluşturduğu, apoptoz ve oksidatif stres yoluyla over rezervini azalttığı literatürde belirtilmiştir(9).

İatrojenik POY, yalnızca fertilite kaybı riski taşımamakta olup aynı zamanda erken menopoza bağlı kemik sağlığı, kardiyovasküler, metabolik ve psikoseksüel olumsuzlukları da beraberinde getirmektedir(6,10) . Bu nedenle KT ilişkili over yetmezliği kadın üreme sağlığı açısından özel bir öncelik alanı olarak kabul edilmektedir. Koruyucu yaklaşımlar arasında en yaygın uygulananlardan biri KT süresince geçici olarak ovaryan fonksiyonun baskılanmasıdır. Özellikle gonadotropin–serbestleştirici hormon agonistleri (GnRHa) kullanımı bu amaçla araştırılmıştır. Ortalama menopoz öncesi kadınlarda, KT öncesi veya sırasında GnRHa uygulanmasının POY riskini azaltabileceğine dair randomize çalışmalar mevcuttur(11,12). Klinik veriler KT alan premenopozal kadınlarda GnRHa desteğinin menstrüel döngünün geri dönüşünü artırdığını göstermektedir(12,13). Bununla birlikte koruyucu etkinlik yaşa, KT dozuna, ajan tipine ve Luteinleştirici Hormon (LH)/FSH rezervine göre değişkenlik göstermektedir(11). Bir diğer araştırma konusu da onko-fertilite alanında embriyo, oosit ve over dokusu kriyoprezervasyonu gibi yöntemler üzerine olmuştur(14). Bu stratejiler, KT öncesinde kadınlara uygulanabilir ve fertilite koruma planlarının merkezinde yer alır.

Over dokusu onarımına yönelik yenilikçi yaklaşımlar olarak preklinik çalışmalarda; örneğin mezenkimal kök hücre terapileri, eksozom veya sekretom uygulamaları, anti-apoptotik ajanlar ve oksidatif stres inhibitörleri, KT kaynaklı over rezervi kaybını azaltma potansiyeli göstermektedir(15). Örneğin, Ozcan ve ark. kendi hayvan modeli çalışmalarında PRP uygulamasının CYP ile indüklenen over hasarında AMH düzeylerini ve PMF sayısını iyileştirdiği bildirilmiştir(16).

Mevcut literatür KT'ye bağlı gelişen iatrojenik over yetmezliğinde hem mekanizmal düzeyde hem de koruyucu-onarıcı tedavi stratejilerinde hâlâ önemli boşluklar bulunduğunu göstermektedir. Özellikle siklofosfamid gibi alkilleyici ajanların neden olduğu oksidatif stres, foliküler apoptoz ve stromal hasarın geri dönüşü konusunda standart bir tedavi protokolü geliştirilememiştir. Bu noktada rejeneratif tıp yaklaşımları arasında öne çıkan PRP ve eksozom uygulamaları içeriklerindeki büyüme faktörleri, sitokinler ve parakrin etkiler aracılığıyla over mikroçevresinin yeniden yapılandırılması ve folikül canlılığının korunması açısından dikkat çekici bir potansiyele sahiptir.

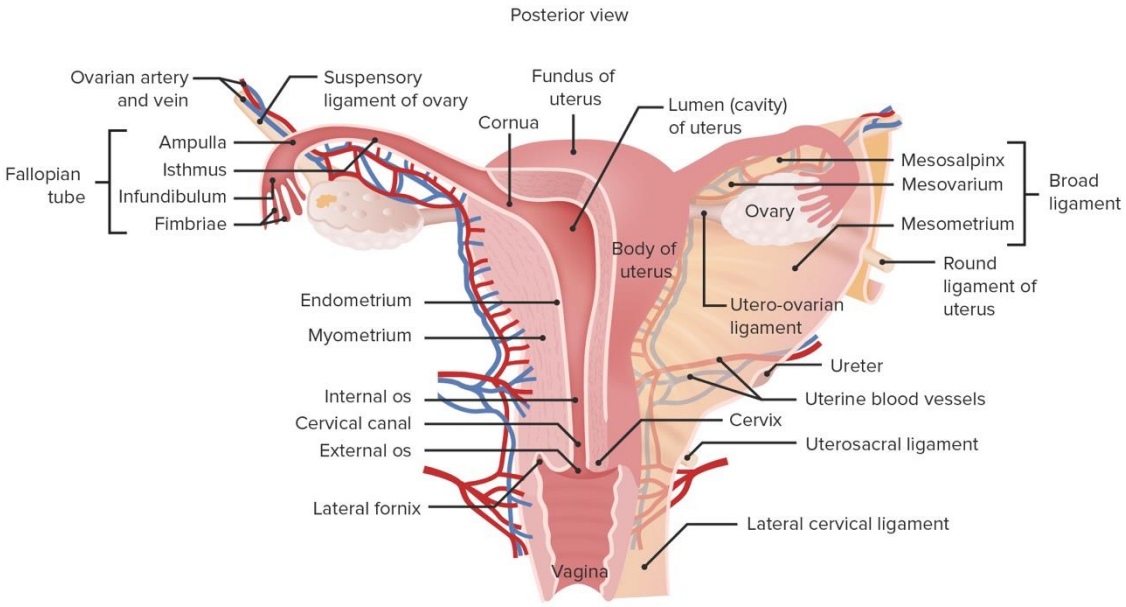
Literatürde PRP veya eksozomun tek başına kullanıldığı çeşitli deneysel çalışmalar bulunsa da, bu iki biyolojik ürünün kombine kullanımının siklofosfamid ile indüklenen over yetmezliği modeli üzerindeki etkileri yeterince aydınlatılamamıştır. Bu nedenle "Deneysel olarak siklofosfamid ile ovaryan yetmezlik oluşturulan ratlarda intraovaryan PRP ve eksozom uygulamasının over dokusu ve serum AMH, FSH, TAS ve TOS düzeyi üzerine etkisi" başlıklı çalışmamız hem gonadotoksik hasarın patofizyolojisini daha iyi anlamayı hem de gelecekte KT sonrası fertilite kaybının önlenmesine yönelik yeni biyolojik tedavi seçeneklerinin geliştirilmesine bilimsel dayanak oluşturmayı hedeflemektedir.

# 2. GENEL BİLGİLER

## 2.1. OVER

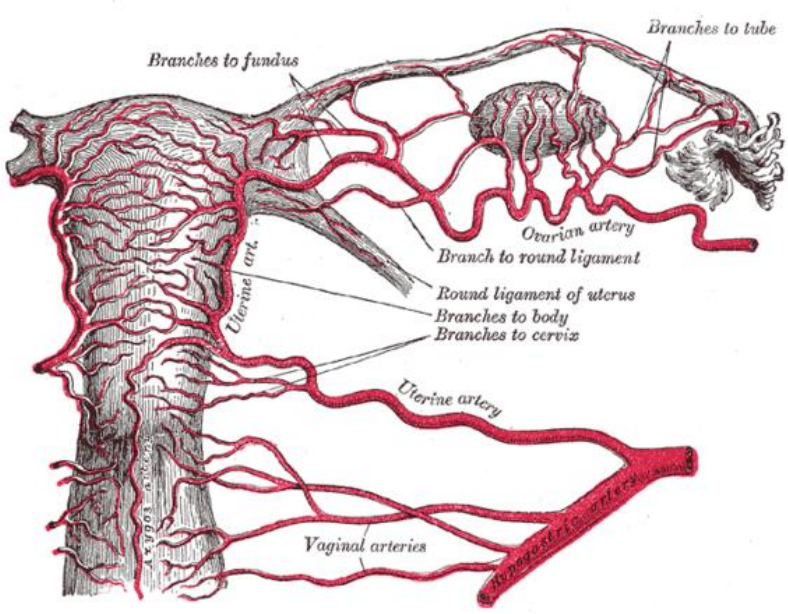
### 2.1.1. Over Anatomisi

Overler kadın genital sisteminde bilateral yerleşimli, gonad fonksiyonu taşıyan ve hem endokrin hem de germ hücre üretiminde görev alan çift organlardır. Pelvik duvar ile uterus arasında yerleşmişlerdir. Overlerin üst ucu infundibulopelvik ligament (ligamentum suspensorium ovarii) ile pelvik duvara, alt ucu ise ligamentum ovarii proprium ile uterusun lateraline bağlanır. Mezovaryum olarak adlandırılan periton uzantısı üzerinden ligamentum latum'un posterior yaprağına tutunur. Anteriorunda medial umblikal ligament, posteriorunda üreter ve internal iliak arter bulunur. Ortalama boyutları erişkin bir kadında yaklaşık 3x1.5x1 cm'dir.(17)




**Şekil 2.1:** Kadın üreme sistemi(18)

**2.1.1.1. Ovaryan kan dolaşımı:** Overin arteriyel kanlanması esas olarak aortadan çıkan arteria ovarica ve arteria uterina'nın over dalları aracılığıyla sağlanır. Arteria ovarica, renal arterin altında veya L2 civarında abdominal aorttan kaynaklanır. Ligamentum suspensorium ovariden geçer ve ardından mezovaryuma girer. Arteria uterinanın ovarian dalları ile broad ligamanı içinde anastomoz yapar(19)




**Şekil 2.2:** Overin kanlanması(20)

Venöz dönüş sağda vena ovarica ile direkt olarak vena cava inferiora, solda ise vena renalis yoluyla sağlanır. Lenfatik drenaj çoğunlukla paraaortik lenf nodlarına olur. Araştırmacıların saptadığı yollardan biri lateral damarlar aracılığıyla hipogastrik nodlara ve ardından paraaortik nodlara drenaj, bir diğeri de round ligamentin yakınındaki damarları takip ederek eksternal iliak ve inguinal lenf nodlarına drenajdır.(21)

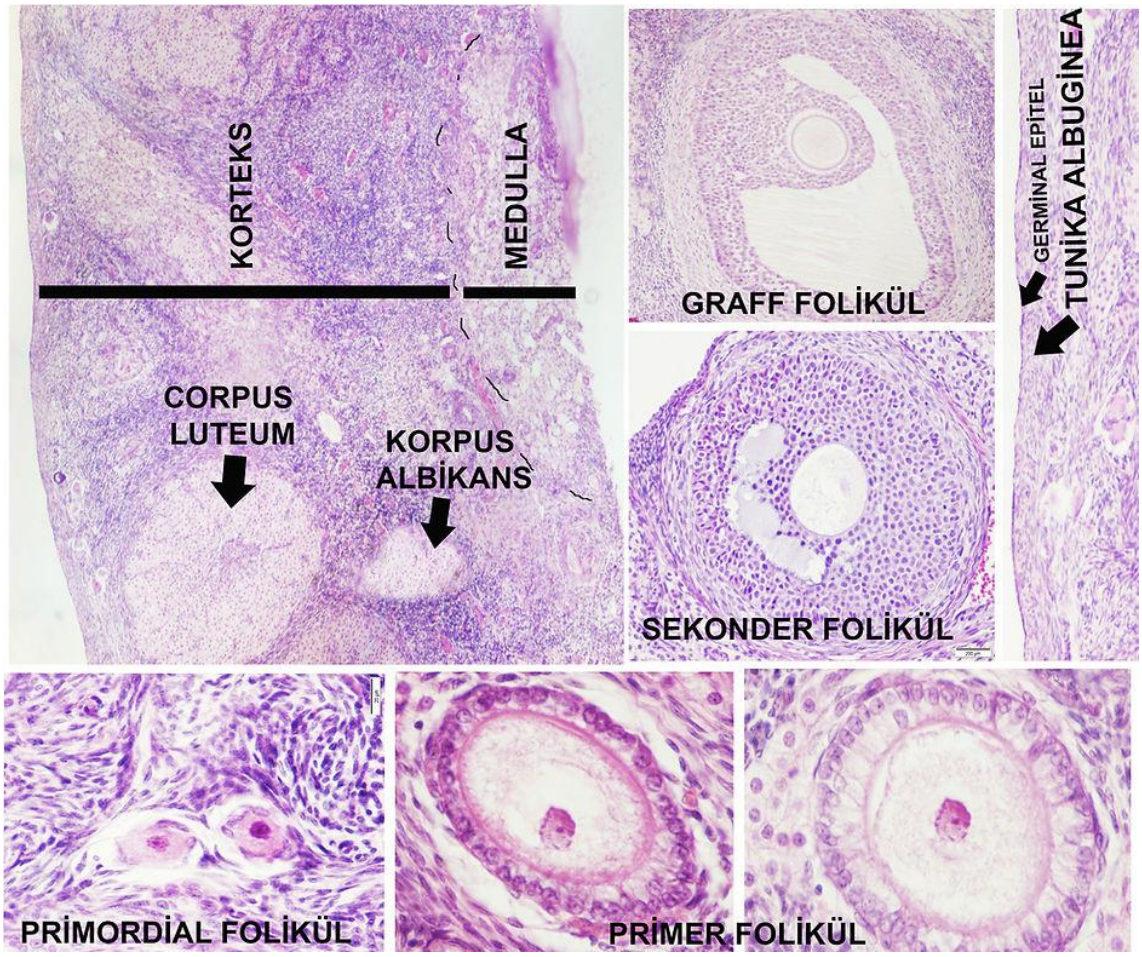
**2.1.1.2. Ovaryan sinir innervasyonu:** Overin sinirsel uyarımı hem sempatik hem parasempatik yollarla gerçekleşir. Sempatik innervasyonun iki kaynağı vardır. 1) Ovarian pleksus 2) Superior ovarian sinir. Ovarian pleksus renal pleksustan kaynaklanır. Superior ovarian sinir ovarian ligament aracılığıyla taşınır. Parasempatik innervasyon pelvik splanknik sinirlerden kaynaklanan pelvik pleksusundan gelir.(17)

### 2.1.2 Over Histolojisi

Histolojik olarak overler dıştan içe doğru dört ana tabakadan oluşur: (1) yüzey epiteli (2) tunika albuginea, (3) korteks ve (4) medulla. Yüzey epiteli; tek katlı kübik epitel hücrelerinden oluşur. Tunika albuginea; bu epitelyal tabakanın hemen altında yer alan ince fakat yoğun fibröz bağ dokusudur. Bu sıkı bağ dokusu overe rengini verir. Korteks; foliküllerin ve over stromasının bulunduğu bölgedir. Bu bölgede farklı evrelerdeki foliküller (primordial, primer, sekonder, antral ve Graafian), atretik foliküller, korpus luteum ve korpus albikans yer alır. Korpus luteum ovulasyondan sonra graff folikülün yerinde şekillenen sarı cisimdir. Stromal hücreler, endokrin işlev görür ve androjen üretiminde görev alırlar. Medulla; daha gevşek bağ dokusundan oluşur ve bol miktarda kan damarı, lenfatik damar ve sinir lifleri içerir. Overin hormonal cevabı bu yapılar arasındaki etkileşimlerle şekillenir ve özellikle granüloza ile teka hücrelerinin sinyal mekanizmaları üzerinden düzenlenir. Bu histolojik organizasyon üreme fonksiyonlarının sürdürülebilmesi açısından kritik öneme sahiptir.(22)

Histolojik olarak;

- PMF; primer oosit tek katlı yassı foliküler hücre tarafından çevrilmiştir.
- Primer folikül; primer oosit kübik veya prizmatik foliküler hücre tarafından çevrilmiştir.
- Sekonder folikül; primer oosit granüloza hücreleri olarak isimlendirilen foliküler hücreler tarafından sarılmıştır. Zona pellucida oluşur. Stromal hücreler iki adet yapı oluşturur; teka interne ve teka externa
- Tersiyer folikül; granüloza hücreleri likör foliküliyi salgılar, antrum oluşur. Oositi çevreleyen granüloza hücreleri cumulus oophorus olarak adlandırılır. Korona radiyata oluşur. Stratum granülozum oluşur.
- Graffian folikül; en gelişmiş foliküldür. Ovaryum yüzeyinde dışa doğru çıkıntı yapar.




**Şekil 2.3:** Over histolojik yapısı

### 2.1.3 Over Embriyolojisi

Over gelişimi; intermediate mezoderm kökenli olan genital (gonadal) kretler üzerinde başlar. Gonadlar embriyolojik olarak 4. haftada genital kretlerin belirginleşmesi ve epitel ile alttaki mezankimin proliferasyonu ile şekillenmeye başlar. Primordial germ hücreleri (PGH) yolk kesesi yakınındaki endodermden köken alır ve 4.-6. Haftalar arasında dorsal mezenter boyunca göç ederek gelişen gonadal kretlere ulaşır. Bu hücrelerin kretlere ulaşması gonad gelişiminin başlaması için gereklidir.

XX kromozomlu embriyolarda SRY geninin olmaması gonadın ovaryen yönde farklılaşmasını sağlar. Bu süreçte primer seks kordonları dağılır, regresyona uğrar ve yerlerine medüller stroma oluşur. Overin yüzey epiteli ise proliferasyonunu sürdürerek kortikal kordonları oluşturur ve bunlar içerisinde oogonyumlar yer alır.

Fetal dönemde ilerleyen gelişim sürecinde oogonyumlar mitotik aktivite ile çoğalarak sayıca artar. Fakat intrauterine dönemin sonuna doğru büyük çoğunluğu atreziye uğrar. Böylece insan overi doğuma kadar ovaryen korteks, PMF ve giderek gerileyen medulla yapısı ile karakterize hale gelir.(23)

### 2.1.4 Oogenezis

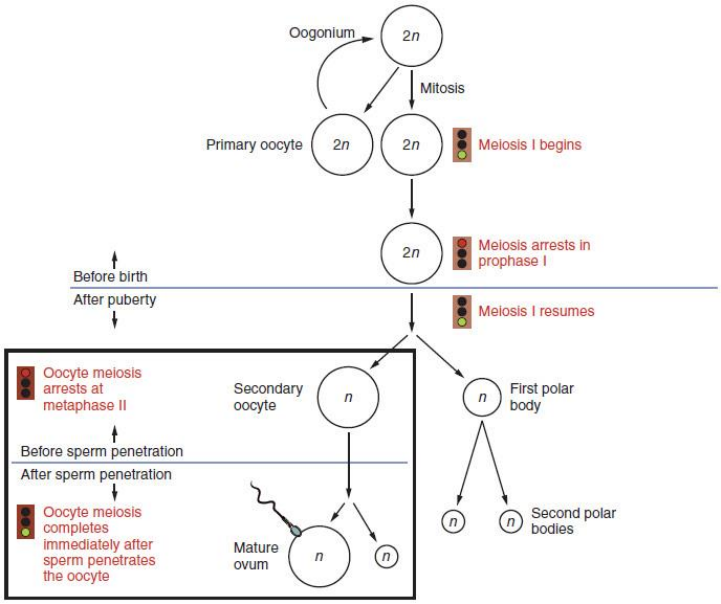
Oogenezis; dişi gonadında ovum oluşumunu ve olgunlaşmasını sağlayan biyolojik süreçtir. Bu süreç; germ hücre soyundan başlayarak mitoz ve mayoz bölünmeler, ardından folikül gelişimi ile birlikte ilerler. Sonuçta fertilizasyon için olgun bir yumurta hücresi elde edilir. Oogenezis spermatogeneze kıyasla çok farklıdır. Erkekte sperm üretimi yaşam boyu devam ederken, kadınlarda yumurta rezervi çoğu zaman doğum öncesinde belirlenir ve erişkinlik boyunca yavaş yavaş tükenir. Oosit gelişimi yalnızca kromozom sayısını yarıya indirmeyi değil; aynı zamanda sitoplazmik komponentlerin (mitokondri, organeller, besin rezervleri, maternal mRNA ve proteinler) biriktirilmesini de içerir. Bu, döllenme sonrası embriyogenez için hayati öneme sahiptir. Oogenezisin düzenlenmesi internal faktörler (epigenetic düzenlemeler, maternal effect genleri vb) ve hormonlar (FSH, LH, östrojen, diğer parakrin faktörler) aracılığıyla olur.(24–26)

**2.1.4.1. Primer oosit oluşumu:** Embriyonal dönemde PGH'i gonadlara göç eder ve burada mitoz ile çoğalarak oogonia adı verilen dişi öncül hücreleri oluşturur. Bu oogonia hücreleri de mitotik olarak bölünerek sayılarını arttırır. İnsanlarda oogoniaların bir kısmı mitotik bölünmeyi sonlandırır ve mayoz I'e girer. Bu aşamada oogonia primer oosite dönüşür. Bu dnüşüm genellikle doğum öncesinde tamamlanır. Primer oositler mayoz I'in profaz safhasında duraklar ve bu duraklama pubertaya kadar sürebilir. İnsanlarda bazı oositlerin bu evrede 30-50 yıl kadar profazda beklediği bildirilmiştir.(27–29)

**2.1.4.2. Folikülogenezis:** Folikülogenezis, PMF'den başlayarak ovulasyona hazır dominant folikülün gelişimine kadar uzanan, hormonal ve hücresel düzeyde düzenlenen dinamik bir süreçtir. PMF puberteye kadar inaktif halde bulunur ve puberte sonrası FSH etkisi ile primer, sekonder ve antral folikül aşamalarından geçerek gelişirler. Bu süreçte oositin büyümesi; granüloza ve teka hücre tabakalarının farklılaşması ve folikül içi antral boşluğun oluşumu temel morfolojik değişikliklerdir.

Folikül seçilimi aşamasında tek bir folikül yüksek FSH duyarlılığı sayesinde dominant folikül haline gelir ve ovulasyona ulaşır, geri kalanlar ise atreziye uğrar. Gonadotropinler, intraovaryan büyüme faktörleri, AMH ve steroid hormonlar sürecin düzenlenmesinde kritik rol oynar. Bu mekanizmaların koordinasyonu kadın üreme kapasitesinin sürekliliği için hayati öneme sahiptir.(23,30,31)

**2.1.4.3. Sekonder oosit oluşumu ve olgunlaşma:** Olgun bir folikülde primer oosit mayoz I'i tamamlayarak iki hücre oluşturur; büyük hacimli sitoplazmaya sahip bir hücre olan sekonder oosit (oosit II) ve çok küçük, sitoplazması kısıtlı bir birinci kutup hücresi (first polar body). Sekonder oosit mayoz II'ye başlar fakat metafaz II'de ovulasyona kadar duraklar.(31,32) Bu aşamada olgun folikül (Graafian folikülü) ovulasyona hazır hale gelir. Ovulasyon sırasında folikül duvarı çatlar, stigma olarak adlandırılan alandan sekonder oosit ve çevresindeki granüloza hücreleri ile birlikte serbest bırakılır. Sekonder oosit, fallop tüpünün fimbriae adı verilen bölümünden yakalanır ve tüp içine alınır. Eğer bu sekonder oosite bir sperm girerse mayoz II tamamlanır; böylece haploid kromozom setine sahip olgun bir ovum oluşur ve aynı anda ikinci kutup hücresi (second polar body) oluşur. Polar cisimcikler çok az sitoplazma taşır ve döllenmeden sonra dejenere olur; bu sayede bir primer oositten yalnızca tek bir olgun yumurta hücresi elde edilir.(30,31,33)




**Şekil 2.4:** Oogenezis, sekonder oosit oluşumu

Özetle; sekonder oosit, primer oositin mayoz I'i tamamlamasıyla oluşan ve ovulasyonla yumurtalıktan dışarı atılan ve mayoz II'i tamamlamadan metafaz II'de bekleyen hücredir. Olgun bir yumurta yalnızca spermle döllenme gerçekleştiğinde ortaya çıkar.

## 2.2. OVARYAN SİKLUS

Ovaryan siklus; kadın üreme sisteminin overde gerçekleşen ve folikül gelişimi, ovulasyon ve luteal faz döngülerini içeren bir süreçtir. Bu siklus, hipotalamus-hipofiz-over (HHO) aksı tarafından düzenlenmektedir. Siklusun temel görevi, her ay olgun bir oosit geliştirmek ve fertilizasyon için uygun hormonal ortamı oluşturmaktadır.(30)

- Foliküler Faz: Siklusun başlangıcı olan menstruasyonun ilk günü ile başlar ve ovulasyona kadar devam eder. Bu dönemde hipofizden salgılanan FSH düzeylerinin artması, overde PMF'in gelişimini uyarır. Foliküllerin granüloza hücrelerinden östrojen salınımı giderek artar ve bu durum endometriumda proliferatif değişikliklere neden olur.(34) Bu fazın sonunda östrojen seviyesinin kritik bir eşiğin üzerine çıkması, LH'da ani ve yüksek bir artış oluşturarak ovulasyonun tetiklenmesini sağlar. Buna LH piki denir.(35)

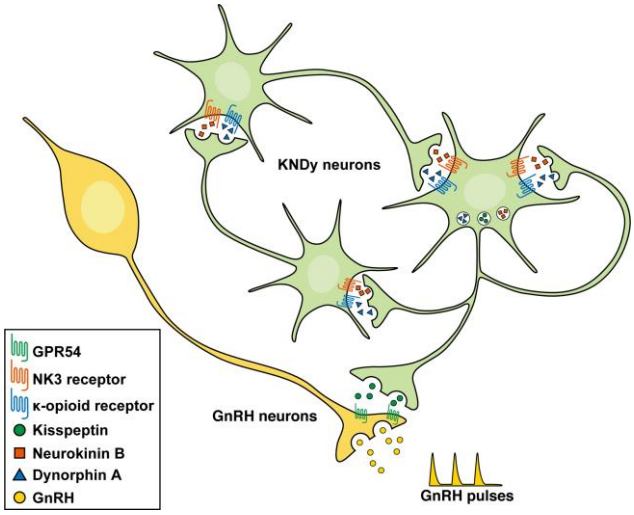
- Ovaryan Siklus: LH pikini takiben yaklaşık 36 saat içinde dominant folikül çatlar ve olgun oosit peritoneal boşluğa salınır. Bu olay siklusun en kısa dönemidir ve fertilizasyonun gerçekleşebileceği zaman aralığını temsil eder.(36)

- Luteal Faz: Ovulasyon sonrası kalan folikül dokusu corpus luteuma dönüşerek yüksek miktarda progesteron ve daha az oranda östrojen salgılar. Progesteron hormonunun artışı endometriumu sekresyon fazına geçirir ve implantasyon için elverişli hale getirir(30) Eğer fertilizasyon gerçekleşmezse corpus luteum gerileyerek corpus albicans oluşur ve progesteron ile östrojen seviyeleri düşer. Bunun sonucunda endometrium dökülerek menstruasyon başlar ve yeni bir siklus başlamış olur.(34)

### 2.2.1. Hipotalamus – Hipofiz – Over Aksı

HHO aksı; kadın üreme fizyolojisinin temel nöroendokrin düzenleyici mekanizmasıdır. Menstruasyon döngüsü, ovulasyon, fertilite ve hormon dengesinin koordinasyonundan sorumludur.(37) Aks boyunca hormon salınımı feed-back mekanizmalarıyla hassas bir şekilde kontrol edilmekte ve bu dinamik yapı üreme fonksiyonlarının sürekliliğini sağlamaktadır.(38) HHO aksındaki disfonksiyonlar hem hipotalamik hem hipofizer hem de over kaynaklı patolojilere yol açarak menstruasyon düzensizlikleri, infertilite ve endokrin bozuklukları gibi klinik sonuçlara neden olabilmektedir.(39)

**2.2.1.1. Hipotalamusun rolü:** Hipotalamus, arkuat çekirdek ve preoptik bölgedeki GnRH üreten nöronları aracılığıyla üreme sisteminin üst düzey control merkezini oluşturur.(40) GnRH'ın pulsatil yapıda salınımı, hipofiz ön lobundan FSH ve LH salgısını belirleyen temel faktördür. Salınım frekansı ve amplitüdündeki değişiklikler gonadotropinlerin oranlarını ve biyolojik etkilerini doğrudan şekillendirir.(37) Bu pulsatil salınımın düzenlenmesinde özelllikle kisspeptin, nörokinin B ve dynorphin (KNDy nöronları) anahtar rol oynar ve kisspeptin sinyali puberte başlangıcının ana tetikleyicisi olarak kabul edilmektedir.(41) Enerji dengesi, leptin düzeyleri, stress hormonları ve çevresel faktörler de hipotalamik GnRH salınımını etkileyerek üreme fonksiyonlarını düzenler.(42)

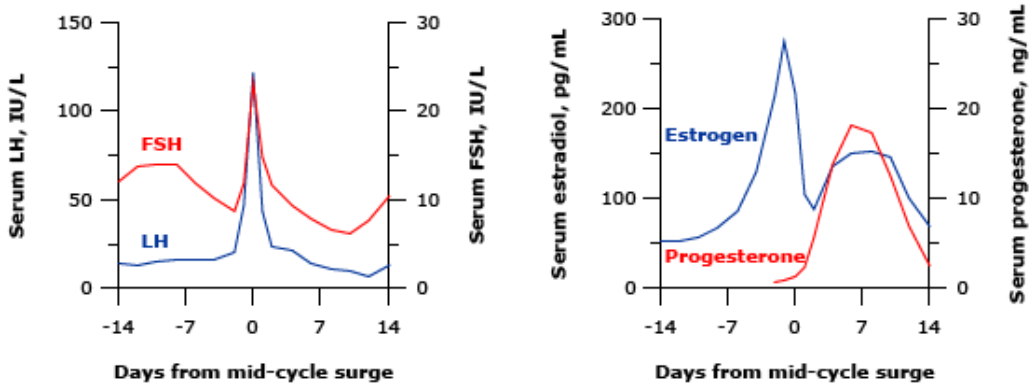



**Şekil 2.5:** Memelilerde gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) pulsatil üretimini kontrol eden varsayımsal mekanizmanın şematik gösterimi.(41)

**2.2.1.2. Hipofiz ön lobunun rolü:** Hipofiz ön lobunda yer alan gonadototrof hücreler, hipotalamustan pulsatil olarak gelen GnRH uyarısına yanıt olarak LH ve FSH sentezler ve dolaşıma salgılar.(38) LH, overlerin teka hücrelerinde androjen üretimini uyararak dolaylı olarak östrojen sentezinde rol oynar. (40) FSH ise granüloza hücrelerinde folikül gelişimini hızlandırır, aromataz aktivitesini artırarak androjenlerin östrojene dönüşümünü sağlar ve dominant folikülün seçilmesinde kritik rolü vardır.(37) Gonadotropin salınımı, steroid hormonlar ve inhibin tarafından sürekli geri bildirilmekte ve bu feed-back döngüleri ile menstruasyon döngüsü boyunca değişkenlik göstermektedir.(42)

**2.2.1.3. Overlerin rolü:** Overler hem gamet üretimi hem de steroid sentezi açısından HHO aksının periferik son basamağını oluşturur. Granüloza vet eka hücreleri tarafından sentezlenen östrojen, progesterone ve inhibin hormonları hem hipotalamus hem de hipofiz üzerine feed-back yaparak gonadotropin salınımını düzenler.(38) Östrojen, foliküler faz boyunca hipotalamik GnRH ve hipofizer FSH/LH salınımını baskılayan negatif feed-back etkisi gösterirken, ovulasyon öncesinde yükselen östrojen düzeyleri pozitif feed-back oluşturarak LH zirvesini tetikler.(42) Ovulasyonu takiben ortaya çıkan korpus luteum progesteron salgılar ve progesteronun negatif feed-back etkisi ile hem GnRH pulsatil salınımını hem de gonadotropin salınımını baskılar.(37) Ayrıca inhibin A, inhibin B ve FSH düzeylerinin döngü boyunca kontrol edilmesini sağlayan hassas bir feed-back mekanizması sunar.(40)

**2.2.1.4. HHO aksında görülen bozukluklar:** HHO aksındaki bozukluklar üreme sağlığını doğrudan etkileyen endokrinopatilerle ilişkilidir. Hipotalamik seviyede ortaya çıkan yetersiz GnRH salınımı, aşırı egzersiz, stress ve düşük enerji alımı vb sebeplerle ilişkili olan fonksiyonel hipotalamik amenoreye yol açabilir.(42) Hipofiz düzeyinde prolaktinoma gibi patolojiler gonadotropin salınımını baskılayarak ovulasyon bozukluklarına sebep olabilir.(37) Over düzeyindeki bozukluklardan en yaygın olanı polikistik over sendromudur (PKOS); bu sendromda kronik anovulasyon, hiperandrojenemi ve bozulmuş LH/FSH oranı ile karakterize bir HHO aks disfonksiyonu söz konusudur.(39) Ayrıca önemli bir diğer klinik tablo da over rezervinin azalması ve yetersiz östrojen sentezi ile aksın feed-back mekanizmalarının bozulduğu erken over yetmezliğidir.(38)



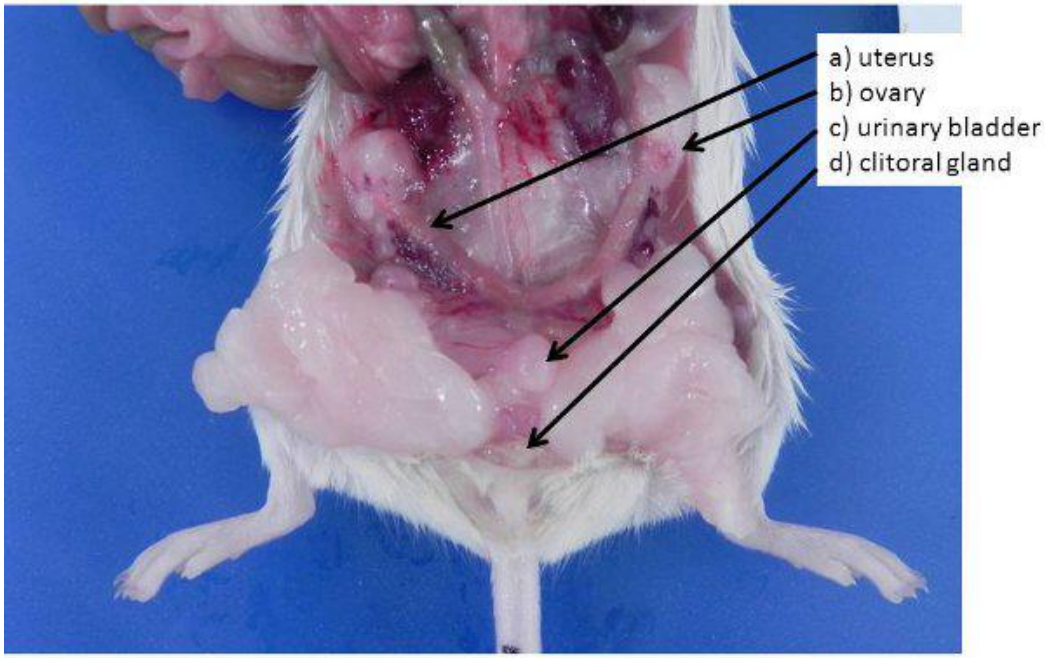

**Şekil 2.6:** Normal menstrüel siklusta salgılanan hormonların serumda ölçülen değişiklikleri (Uptodate)

## 2.3. RAT OVERİ VE ÖSTRUS

Dişi ratlarda overler böbreklerin kraniyal kutbunda yer alan, mezovaryum ve ligamentum ovarii proprium ile karın boşluğuna tutunmuş çift yapılı organlardır. Ratlarda puberte yaklaşık 4. haftada başlar ve bu dönemden önce overler fonksiyonel olarak aktif değildir. Postnatal gelişim neonatal, infantil, jüvenil ve peripubertal dönemler olarak sınıflandırılır. Özellikle infantil dönemde FSH ve LH etkisiyle foliküler gelişim başlamaktadır.

Over histolojisi, korteks ve medulla olarak iki ana bölgeden oluşur. Korteks bölgesinde farklı gelişim aşamalarındaki primordial, primer, sekonder, ve antral foliküller ile ovulasyon sonrası korpus luteum yapıları bulunur. Granüloza hücreleri FSH reseptörleri taşır ve östrojen, inhibin ve ovulasyon öncesi progesteron salınımından sorumludur. Teka hücreleri ise LH reseptörlerine sahiptir ve androjen-prekürsör steroidlerin sentezine katılır.

Embriyolojik olarak over; genital kabartıdan gelişir ve primordial germ hücreleri kortikal bölgede konumlanır. Doğum sonrası dönemine sınırlı ama fonksiyonel bir folikül popülasyonu kalır. Jüvenil dönemde foliküller östrojen üretmeye başlar ve peripubertal dönemde LH salınımının ritmik artışı ile üreme döngüsü düzenli hale gelir.(43,44)




**Şekil 2.7:** Rat dişi üreme sistemi (45)

### 2.3.1. Östrus Döngüsü

Dişi ratlar mevsimden bağımsız poliöstrik hayvanlardır ve puberteden sonra yaklaşık 4-5 gün süren düzenli östrus döngüleri gösterirler. Döngü dört fazdan oluşur: proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus. Bu fazlar hipotalamus-hipofiz-over aksının hormone salınımına bağlı olarak şekillenir.

- **Proöstrus;** foliküler gelişimin hızlandığı ve östradiolün öğleden sonra belirgin bir pik yaptığı dönemdir. Artan östrojen LH yükselişini tetikler ve ovulasyon için hazırlık oluşturur. Vajinal sitolojide piknotik nukleuslu hücreler görülmesi bu evreye özgüdür.
- **Östrus** fazı dişinin çiftleşmeye en istekli olduğu dönemdir. Bu evrede ovulasyon gerçekleşir ve smearde anükleer keratinize epitel hücreleri baskındır. Büyük foliküller proöstrus-östrus döneminde belirginleşir ve ovulasyondan hemn sonra kaybolur.
- **Metöstrus;** ovulasyon sonrası kısa luteal başlangıç dönemidir. Lökositlerin arttığı bir vajinal sitoloji paterni izlenir ve korpus luteumun ilk oluşum evresini temsil eder.

- **Diöstrus;** döngünün en uzun fazıdır ve iki alt evreye ayrılır. Bu ever boyunca korpus luteum maksimum büyüklüğe ulaşır. Uterus histolojik olarak dinlenme ve yenilenme fazındadır. Döngü sonunda östrojen düzeylerinin tekrar yükselmesiyle yeni bir proöstrus başlar.

Vajinal smear değerlendirmesi ratlarda östrus fazlarının belirlenmesinde temel yöntem olup; sık smear alımının epitelde kornifikasyon artışı ve yalancı gebelik oluşturabileceği bildirilmiştir.(43,44)

### 2.4. OVER REZERVİ

Over rezervi; kadınlarda üreme potansiyelini belirleyen en temel biyolojik unsurlardan biridir ve yumurtalıklarda bulunan oositlerin hem sayısını hem de fonksiyonel kalitesini ifade eder. Kadın fetüsünde yaklaşık 6-7 milyon olan primordial folikül havuzu doğumda 1-2 milyona düşer, ergenlik döneminde ise bu sayı yaklaşık 300-500 bine iner. Reprodüktif yaşam boyunca her menstrual döngüde binlerce folikül atreziye uğrar ve bu doğal süreç menopoz dönemine dek devam eder.(46)

Dolayısıyla over rezervi yalnızca solikül sayısını değil, aynı zamanda oosit kalitesinin yaşla beraber azalmasını da kapsar. Bu azalma fertilite potansiyelini, gebelik oranlarını ve yardımcı üreme tekniklerindeki yanıtı doğrudan etkilediği için klinik açıdan kritik öneme sahiptir. Over rezervinin azalması erken menopoz riski, üreme planlaması ve infertilite tedavilerinin başarı oranlarının öngörülmesi açısından değerlidir.

#### 2.4.1. Fizyolojik Temel

Over rezervinin biyolojik temeli ‘’foliküler havuz ‘’ üzerine kuruludur. PMF’ler over korteksinde inaktif halde bulunur ve yaşam boyunca sınırlı sayıda folikül büyüme sürecine girer. Bu rezerv dış etkenlerle de etkilenebilir; örneğin kemoterapi, radyoterapi, genetik faktörler, otoimmün hastalıklar, endometriozis ve cerrahi girişimler over rezervinin hızla azalmasına neden olabilir.(47)

Güncel literatürde over rezervi iki alt başlıkta sınıflandırılmaktadır:

1. Doğal (gerçek) over rezervi: PMF havuzunu temsil eder ancak klinik olarak doğrudan ölçülemez
2. Fonksiyonel over rezervi: Serum hormon düzeyleri ve ultrason bulguları ile değerlendirilir.

Fonksiyonel rezerin değerlendirilmesi özellikle infertilite kliniklerinde ve InVitro Fertilizasyon (IVF) planlamasında yaygın olarak kullanılır.(48)

### 2.4.2. Over Rezervinin Değerlendirilmesi

Over rezervini kesin olarak ölçmek mümkün değildir; bu nedenle klinik pratikte dolaylı belirteçler kullanılmaktadır. Bu belirteçlerin her birinin avantajları, sınırlılıkları ve klinik kullanım alanları bulunmaktadır.

- Anti-Müllerian Hormon; küçük preantral ve antral foliküllerdeki granüloza hücreleri tarafından üretilir ve over rezervinin en güvenilir biyokimyasal göstergelerinden biri kabul edilir. Yaşla birlikte azalır. İnvaziv olmayan bir testtir ve siklusun herhangi bir gününde ölçülebilir. Moolhuijsen ve arkadaşlarının (2020) PubMed'de yayımlanan derlemesine göre AMH, hem oosit sayısını hem de stimülasyon yanıtını tahmin etmede Antral folikül sayımı (AFC) ile benzer doğrulukta sonuçlar sağlar.(46)
- Antral Folikül Sayımı; transvajinal ultrasonografi ile 2-10 mm arasındaki foliküllerin sayılması esasına dayanır. Siklusun erken foliküler fazında ölçülmesi önerilir. IVF yanıtının öngörülmesinde yaygın olarak kullanılır. AMH ile birlikte kullanıldığında tahmin gücü artmaktadır. Vrontikis ve arkadaşları (2010), AFC'nin düşük over rezervi tanısında önemli bir prediktör olduğunu bildirmiştir.(49)
- FSH, Estradiol ve İnhibin B belirteçleri geçmişte daha sık kullanılsa da yüksek değişkenlik ve siklusa bağımlılık nedeniyle gümümüzde AMH ve AFC'ye göre zayıf prediktörler olarak kabul edilmektedir.(47) FSH yüksekliği azalmış rezervi düşündürür ancak tek başına yeterli değildir. Estradiol düzeyleri FSH ölçümünü etkileyebilir. İnhibin B düşük rezervde azalır ancak klinikte yaygın kullanılmamaktadır.
- Yaş; over rezervinin ve oosit kalitesinin en güçlü bağımsız belirleyicisidir. Biyobelirteçler değerlendirilirken yaş mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır.

### 2.4.3. Klinik Önemi

Over rezervi değerlendirmesi; infertilite tanısı, IVF stimülasyon protokolünün planlanması, üreme öngörüsü, kemoterapi (KT) öncesi fertilite koruma kararları, erken over yetmezliği risk değerlendirmesi gibi birçok klinik durumda yol göstericidir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar AMH ve AFC'nin IVF başarı oranlarını doğrudan öngörmediğini, ancak yumurtalık cevabını güçlü şekilde tahmin ettiklerini göstermektedir.(50) Bu nedenle over rezervi testleri fertilite danışmanlığında yardımcıdır ancak gebelik potansiyelini tek başına belirleyemez.

## 2.5. PRİMER OVER YETMEZLİĞİ

POY, kaadınlarda 40 yaşından önce yumurtalık fonksiyonlarının azalması veya kaybı ile karakterize edilen, üreme ve hormone dengesini etkileyen önemli bir klinik tablodur. Bu durum, adet düzensizliği veya amenore ile birlikte yüksek FSH ve düşük östradiol düzeyleri ile tanımlanır. POY, fizyolojik menopozdan farklıdır çünkü hastalarda ara sıra ovülasyon hatta spontan gebelik görülebilir. Bu nedenle '' kesin menopoz '' yerine '' insufficiency (yetmezlik) '' terimi tercih edilmektedir. Uzun dönem hormon eksikliği kemik sağlığı, klardiyovasküler risk ve yaşam kalitesi üzerinde belirgin etkiler oluşturabilir.(51)

### 2.5.1. Epidemiyoloji

POY, üreme çağındaki kadınlarda nadir görülmekle birlikte toplumda yaklaşık %1 oranında izlenir. 30 yaşın altındaki kadınlarda görülme sıklığı %0.1 civarına, 20 yaşından küçüklerde ise %0.01 düzeyine düşmektedir. Bu nedenle durumgenç kadınlarda öenmli fakat göreceli olarak nadir bir sağlık problemidir.(51)

### 2.5.2. Patofizyoloji ve Etiyoloji

POY'un ortaya çıkışı farklı biyolojik mekanizmalarla ilişkilidir ve çoğu zaman çok faktörlü yapıya sahiptir.

**2.5.2.1. Folikül sayısında azalma:** Bazı kadınlarda yumurtalık rezervi genetik veya gelişimsel nedenle normalden daha azdır ya da foliküller yaşam boyunca hızlı bir şekilde tükenir. Bu durum çoğunlukla konjenital anomaliler veya kromozomal bozukluklarla ilişkilendirilir. Genetik sentromer eksikliği veya gen mutasyonları gibi konjenital bozukluklar bu mekanizmaya örnektir (52,53)

**2.5.2.2. Folikül fonksiyon kusurları:** Mevcut foliküllerin hormon üretme veya olgunlaşma kapasitesindeki yetersizlikler POY'e yol açabilir. Örneğin FSH reseptörleriyle ilgili mutasyonlar folikül yanıtını bozabilir.(54)

**2.5.2.3. Genetik etkenler:** POY'un önemli bir kısmında genetic etkenler rol oynar. FMR1 geni premutasyonu taşıyan bireylerde '' Fragile X'e bağlı over yetmezliği (FXPOI) '' gelişebilir.(55) Ayrıca NOBOX, FIGLA ve NR5A1 gibi genlerdeki varyasyonlar da risk arttırıcı kabul edilmektedir.(56)

**2.5.2.4. Otoimmün ve iyatrojenik etkenler:** Bağışıklık sisteminin yumurtalık dokusuna karşı reaksiyon göstermesi veya KT, radyoterapi gibi tedavilere bağlı ovaryan hasar da POY'un önemli nedenleri arasındadır. Adrenal yetmezlik (Addison hastalığı), hipotiroidizm (Hashimoto tiroiditi), romatoid artrit, sistemik lupus eritematozus, tip1 diyabet, atipik konjenital adrenal hiperplazi, miyastenia gravis ve inflamatuar bağırsak hastalığı gibi otoimmün hastalıklar POY ile ilişkilendirilmiştir.(51)

Birçok olguda kesin neden tespit edilemez; bu durum hastalığın heterojen yapısını yansıtmaktadır.(57)

### 2.5.3. Klinik Bulgular

POY hastalarında en sık karşılaşılan belirtiler; amenore veya seyrek adet görme, sıcak basması, terleme, vajinal kuruluk gibi östrojen eksikliğine bağlı şikayetler, infertilite, uzun vadede osteoporoz ve kardiyovasküler risk artışıdır. Doğal menopoza kıyasla, POY'da zaman zaman geçici yumurtalık aktivitesi ve ovülasyon epizodları görülebilir. Bu nedenle hastalarda küçük de olsa spontan gebelik olasılığı vardır.(5,58)

### 2.5.4. Tanı Kriterleri

POY tanısı koyulurken dikkate alınan temel unsurlar;

- 40 yaş altında üç ay veya daha uzun süredir devam eden adet düzensizliği/amenore
- En az iki ölçümde yüksek FSH düzeyleri (menopozal aralıkta- >20 mIU/ml)
- Düşük östradiol seviyeleri (<30 pg/ml)

Tanı sonrasında genetik analiz özellikle (FMR1 premutasyonu), otoimmun testler ve endokrin değerlendirmeler önerilir. (59)

### 2.5.5. Tedavi ve Yönetim

POY tedavisi, yalnızca hormonal eksikliklerin giderilmesine yönelik bir yaklaşım değil; hastaların uzun dönem sağlık risklerini azaltan, fertilite hedeflerini değerlendiren ve psikososyal ihtiyaçlarını gözeten multidisipliner bir yönetim sürecidir. Tedavi hastanın yaşı, semptomları, eşlik eden hastalıkları ve gebelik beklentilerine göre bireyselleştirilmelidir.(51,60)

**2.5.5.1. Hormon replasman tedavisi (HRT):** HRT'nin temel hedefleri; östrojen eksikliğine bağlı vazomotor semptomların azaltılması, vajinal atrofinin önlenmesi, kemik mineral yoğunluğunun korunması ve osteoporoz riskinin azaltılması, kardiyometabolik komplikasyonların azaltılması, genç yaşta östrojen kaybının yol açtığı uzun dönem sağlık etkilerinin düzeltilmesidir. POY'da hormon replasmanı fizyolojik menopozdan farklı olarak kesin kontraendikasyon olmadıkça güçlü bir şekilde önerilir, çünkü doğal menopoz yaşına (yaklaşık 50 yaş) gelene kadar östrojen eksikliği patolojik kabul edilir.(5) HRT, POY tedavisinin temelini oluşturur ve kontraendikasyon yoksa tanı konulduktan sonra mümkün olan en kısa sürede başlatılmalı ve doğal menapozun ortalama yaşına kadar devam ettirilmelidir.(61)

- Östrojen preparatları: En sık tercih edilen seçenekler; transdermal östrojen (östradiol yamaları veya jelleri), oral östradiol, konjuge östrojenlerdir. Transdermal östrojenler tromboemboli riski en düşük seçeneklerden biridir. Olumlu metabolik profili nedeniyle transdermal 17β-östrodiol (75-100 µg) tercih edilir. Dozlar fizyolojik düzeyleri teklit edecek şekilde

planlanır. Genellikle 100 µg transdermal östradiol veya eşdeğer oral dozlar (östradiol valerat 2-4 mg/gün) kullanılır.(51,61) İkincil cinsel özelliklerin tam olarak gelişmediği ve hala büyüme evresinde olan ergenlerde östrojen düşük dozlarda başlatılmalı ve kademeli olarak yetişkin seviyelerine titre edilmelidir.

- Progesteron eklenmesi: Uterusu bulunan hastalara endometrium hiperplazisinin önlenmesi ve endometriyal kanser riskini önlemek amacıyla progesteron eklenmelidir. Sürekli kombine veya ardışık rejimler tercih edilebilir. Örneğin; 200 mg oral progesteron ayda 10-14 gün boyunca her gün veya ayda 14 gün, günde 2 kez 0.25 mg transdermal norethisterone kullanılır.(51) Seçenekler arasında mikronize progesteron, medroksiprogesteron asetat, noretindron asetat, dihidrogesteron veya levonorgestrel salgılayan rahim içi sistemler bulunur.

**2.5.5.2. Fertilite yönetimi:** POY, ovaryan rezervin ciddi düzeyde azalmış olduğu bir durum olsa da tamamen fertilite kaybı anlamına gelmez. Hastaların yaklaşık %5-10'unda spontan ovülasyon ve gebelik görülebilir.(58) Kendi ovülasyon potansiyeli düşük olan hastalar için yardımcı üreme teknikleri en etkili seçenekler arasındadır. Risk altındaki popülasyonlarda (örneğin kanser hastaları) doğurganlığın korunması çok önemlidir. Oosit dondurma işlemi ergenlik sonrası hastalar için önerilirken, yumurtalık dokusu dondurma işlemi ergenlik öncesi hastalar veya acil gonadotoksik tedavi gerektiğinde bir seçenektir.

- Yardımcı Üreme Teknikleri (YÜT): Oosit donasyonu, embriyo donasyonu, over doku nakli ve deneysel yöntemler vardır.

a) Oosit donasyonu: POY'da gebelik elde etmede en yüksek başarı oranına sahip yöntemdir. IVF yöntemiyle donor oosit kullanımı birçok ülkede altın standart kabul edilmektedir.

b) Embriyo donasyonu: Çiftin kendi gametlerini kullanamadığı durumlarda tercih edilebilir.

c) Over doku nakli ve deneysel yöntemler: Henüz rutin klinik kullanıma girmemiş olmakla birlikte; over dokusu kriyoprezervasyonu, kök hücre temelli rejeneratif yöntemler üzerine araştırmalar devam etmektedir.(61)

- Fertilitenin korunması: KT veya RT öncesi tanı alan hastalarda oosit/embriyo dondurma veya over korteks dokusu dondurma seçenekleri göz önüne alınır.

**2.5.5.3. Osteoporoz ve kemik sağlığının korunması:** Östrojen eksikliği, genç yaşta kemik kaybı riskini artırır. Tarama ve tedaviye yanıt izleminde Dual-Energy X-ray Absorptiometry (DEXA) ölçümü kullanılmaktadır. Önlem olarak ve tedavide kalsiyum ve D vitamini takviyesi, düzenli egzersizler önerilir. Gerekirse antiresorptif tedaviler (bisfosfonatlar) verilebilir ancak fertilite planı olan genç kadınlarda dikketle değerlendirilmelidir.

**2.5.5.4. Kardiyovasküler sağlık yönetimi:** Erken östrojen eksikliği endotel fonksiyon bozukluğu, artmış LDL, metabolic sendrom riski ile ilişkilidir. Bu nedenle; kan basıncı, lipit profili ve HbA1c düzenli izlenmeli, sigara kullanımı bırakılmalıdır. (60) HRT, kardiyovasküler risk azaltıcı etkiye katkıda bulunabilir.

**2.5.5.5. Psikososyal destek ve danışmanlık**: POY tanısı, kadınların üreme potansiyeli, vücut algısı, menopozla ilişkili toplumsal beklentiler üzerinde önemli psikolojik etkilere yol açabilir. Bu nedenle; psikolojik danışmanlık gerekirse psikiyatri desteği, multidisipliner fertilite danışmanlığı hastalara önerilmelidir.(60)

## 2.6. SİKLOFOSFAMİD VE OVARYAN TOKSİSİTE

CYP, hematolojik ve solid malignitelerin tedavisinde ve bazı otoimmün hastalıklarda sık kullanılan bir alkilleyici ajandır. Özellikle üreme çağındaki kadınlarda en önemli yan etkilerinden biri de PMF havuzunda geri dönüşümsüz olarak kayba yol açıp POY riskini artırmasıdır. CYP'ye bağlı ovaryan toksisite; doz, uygulama süresi, yaş ve bireysel duyarlılığa bağlı olarak değişmekle birlikte, primordial ve büyüyen foliküllerde DNA hasarı, oksidatif stres ve apoptpz yolakları üzerinden gerçekleşmektedir.(62)

### 2.6.1. Kimyasal Yapısı ve Etki Mekanizması

CYP, azot hardal türevi bir oksazafosforin bileşiğidir. Kendisi inaktif bir pro-ilaç olup, biyolojik aktivitesini karaciğerde sitokrom p450 enzimleri (özellikle CYP2B6, CYP2C9 vb.) aracılığıyla gerçekleşen oksidatif biyotransformasyon sonrası kazanır.(63)

Karaciğerde CYP önce 4-hidroksisiklofosfamid (4-OHCP) ve bunun taotomerik formu olan aldofosfamide dönüştürülür. Aldofosfamid daha sonra iki ana ürün oluşturacak şekilde parçalanır. Bunlar fosforamid mustard (FRM) ve akroleindir. FRM, DNA ile kovalent bağlar oluşturan ve antineoplastic etkiden sorumlu aktif alkilleyici metabolittir. Akrolein, özellikle mesane ve diğer dokularda toksisiteye yol açan son derece reaktif bir aldehittir.(64,65) FRM, DNA'nın başlıca guanin N7 pozisyonunu alkilleyerek aynı zincirde ve zincirler arası çapraz bağlar oluşturur. Bu durum replikasyon çatalının durmasına, çift sarmal kırıklarına ve sonuçta hücre döngüsü duraklaması ile apoptoza yol açar. Özellikle hızla bölünen hücreler (granüloza hücreleri, oosit çevresindeki somatik hücreler vb) bu etkiden daha fazla etkilenmektedir.(65)

Son yıllarda yapılan çalışmalarda 4-OHCP ve FRM oluşumu sırasında ortaya çıkan reaktif oksijen türlerinin de CYP'nin sitotoksik ve ovaryotoksik etkisine katkıda bulunduğu, bu süreçte DNA hasarı yanıtı, p53 aktivasyonu ve mitokondriyal yolağın önemli rol oynadığı gösterilmiştir.(66,67)

### 2.6.2. Siklofosfamid Metabolitleri ve Oosit Hasarı

CYP'nin ovaryan toksisitesinden hangi metabolitlerin sorumlu olduğu, deneysel ve klinik çalışmalarda uzun yıllardır araştırılmaktadır. Plowchalk ve ark.'nın klasik çalışmasında, sıçan modelinde FRM'nin akroleine kıyasla ovaryan toksisiteden esas sorumlu metabolit olduğu gösterilmiştir.(68) Bu çalışma, CYP'nin metabolic aktivasyonu sırasında oluşan DNA-alkilleyici türlerin doğrudan oosit ve granüloza hücrelerinde hasara neden olduğunu desteklemektedir.

CYP'nin metabolizmasında yer alan başlıca reaktif ara ürün ve metabolitler;(69)

- 4-OHCP: Kararsız ancak yüksek reaktiviteye sahip ara metabolittir. Lipid peroksidasyonu ve DNA hasarına doğrudan katkıda bulunabilir.
- Aldofosfamid: 4-OHCP'nin aldehit formu; β-eliminasyonla fosforamid mustard ve akroleine dönüşür.
- Fosforamid mustard: Oosit ve granüloza hücrelerinde DNA çapraz bağları oluşturur. Bu durum replikasyon çatalının durmasına, çift sarmal kırıklarına ve sonuçta hücre döngüsü duraklaması ile apoptoza yol açar.

- Akrolein: Protein ve lipidlerle reaktif DNA adüktleri oluşturur. Antioksidan savunma sistmini baskılar, dolaylı olarak ovaryan dokuda oksidatif stress ve inflamasyonu artırır.

Oosit ve foliküler hücrelerde CYP metabolitlerine bağlı hasar; DNA hasarı yanıt yolaklarının (ATM/ATR, Chk1/Chk2, p53) aktivasyonu, mitokondriyal membrane potansiyelinin bozulması, sitokrom-c salınımı ve kaspaz 3/9 aktivasyonu üzerinden apoptoz ile sonuçlanmaktadır.(67,70)

Ayrıca yaşa bağlı duyarlılığın da önem taşıdığı; prepubertal deneysel modellerde primordial foliküllerin CYP'ye karşı yetişkinlere göre daha hassas olduğu, daha fazla DNA hasarı ve folikül kaybı oluştuğu gösterilmiştir.(71,72)

### 2.6.3. Oksidatif Stres Mekanizması ve Folikül Kayıpları

CYP'nin ovaryan toksisitesinde oksidatif stress merkezi bir mekanizma olarak kabul edilmektedir. CYP'nin biyotransformasyonu sırasında hem fosforamid mustard hem de özellikle acrolein aracılığıyla reaktif oksijen türleri (süperoksit, hidrojen peroksit, hidroksil radikali) ve reaktif azot türleri oluşur.(69,73)

Deneysel çalışmalarda CYP uygulamasını takiben ovaryan dokuda malondialdehit (MDA) ve diğer lipid peroksidasyon ürünlerinde artış, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon düzeylerinde azalma, nükleer ve mitokondriyal DNA hasarı göstergelerinde artış rapor edilmiştir.(74) Bu oksidatif dengenin bozulması sonucunda; granüloza hücre apoptozu artmakta, oosit çevresindeki mikrosistem bozulmakta, PMF'de geri dönüşsüz kayıp ortaya çıkmaktadır.(66,67,70)

Chen ve ark.'nın fare modelinde CYP tedavisi ile belirgin PMF kaybı ve büyüyen foliküllerde apoptoz artışı gösterilmiş, bunun sonucunda ovaryan rezervin ciddi şekilde azaldığı bildirilmiştir. (70) Benzer şekilde Feng ve ark., CYP'ye bağlı PMF kaybının granüloza hücre apoptozu ve AMH düzeylerinde azalma ile ilişkili olduğunu; melatonin tedavisinin oksidatif stress ve apoptozu baskılayarak bu kaybı azalttığını göstermiştir.(75)

Oksidatif stresin ovaryan toksisitedeki rolü bir dizi antioksidan ve sitoprotektif ajanla yapılan çalışmalarda da desteklenmektedir. Örneğin;

- Diosmin; oksidatif stress ve inflamasyon belirteçlerini azaltarak CYP'ye bağlı prematür ovaryan yetmezlik modelinde folikül kaybını ve hormonal bozuklukları hafifletmiştir.(76)
- Timoquinon; CYP'ye bağlı oksidatif ve inflmatuar ovaryan hasarı azaltmış, MDA düzeylerini düşürürken antioksidan enzimleri artırmıştır.(74)
- Spirulina, borik asit, PRP, kurkumin, kapsaisin, Koenzim Q10 (CoQ10) gibi ajanların kullanıldığı modellerde de benzer şekilde oksidatif stress parametrelerinde düzelme ve folikül kayıplarında azalma bildirilmiştir.(73,77–80)

Bu bulgular; CYP'nin ovaryan toksisitesinin sadece DNA alkilasyonu ile değil, aynı zamanda oksidatif stres ve inflamatuvar yanıt aracılığıyla da şekillendiğini ve antioksidan tedavilerin ovaryan fonksiyonun korunmasında potansiyel rol taşıdığını göstermektedir.

### 2.6.4. Deneysel Modellerde Siklofosfamid Kullanımı

CYP ile deneysel ovaryan toksisite/prematür ovaryan yetmezlik modelleri, mekanizmaların aydınlatılması ve koruyucu tedavi stratejilerinin araştırılması açısından önemli bir yer tutmaktadır. Bu modellerde genellikle sıçan ve fareler üzerinde farklı doz ve uygulama şemaları kullanılmaktadır.

a) Akut yüksek doz modelleri: Birçok çalışmada tek doz veya kısa süreli yüksek doz CYP uygulanarak (örneğin; tek doz 50-200 mg/kg i.p) kısa sürede belirgin PMF kaybı ve POY tablosu oluşturulmaktadır. Bu modeller, özellikle CYP'ye bağlı akut DNA hasarı, Dna hasar yanıt yolu aktivasyonu ve erken apoptoz yanıtını incelemek için tercih edilmektedir.(67,70)

Song ve ark., CYP ile indüklenen fare POY modelinde DNA hasarı yanıtı bileşenlerinin (γH2AX, p-ATM, p-Chk2) aktivasyonunu göstermiş ve follikül kaybının bu yanıtla paralel seyrettiğini bildirmiştir.(67) Chen ve ark. ise CYP tedavisi sonrası kısa sürede belirgin PMF kaybı ve artmış granüloza hücre apoptozu göstererek akut ovaryan hasarı detaylı biçimde tanımlamıştır.

b) Kronik/tekrarlayan doz modelleri: Klinik pratiği daha iyi taklit etmek amacıyla bir diğer yaklaşım, düşük dozların tekrarlayan uygulamalarıdır.

Yıldız ve ark., sıçanlarda 6 mg/kg/gün CYP'yi dört hafta boyunca ağızdan uygulayarak kronik ovaryan hasar modeli oluşturmuş; bu modelde CoQ10 tedavisinin histopatolojik ve biyokimyasal iyileşme sağladığını göstermiştir.(78) Abogresha ve ark., CYP ile POY modeli oluşturup diosmin'in koruyucu etkilerini değerlendirmiş; hem tek doz hem de tekrarlayan doz şemalarının ovaryan rezerv ve hormonal profil üzerine etkilerini incelemiştir.(76)

c) Koruyucu/ tedavi edici ajanların test edildiği modeller: CYP'ye bağlı ovaryan toksisiteyi azaltmaya yönelik çok sayıda ajan aynı deneysel altyapı üzerinde değerlendirilmiştir.

Antioksidanlar ve antiinflamatuvarlar (timoquinon, kurkumin, diosmin, CoQ10, Spirulina, borik asit vb.) ile yapılan çalışmalar; CYP verilen kontrol gruplarına kıyasla daha yüksek folikül sayıları, daha iyi ovaryan stromal yapı, düşük MDA ve yüksek antioksidan enzim düzeyleri bildirmiştir.(73,74,76,78) Biyolojik ajanlar (PRP, büyüme faktörleri vb.) içeren modellerde, CYP'ye bağlı POY tablosunda folikül sayısında artış, granüloza hücre proliferasyonunda ve AMH düzeylerinde düzelme gözlenmiştir.(77,80) Hormon ve nöromodülatörler (ör. melatonin) içeren çalışmalarda, CYP'ye bağlı PMF kaybının azaltıldığı ve AMH ekspresyonunun korunduğu gösterilmiştir.(75)

Bu deneysel modeller; CYP'nin ovaryan toksisite mekanizmalarını (DNA hasarı, oksidatif stres, inflamasyon, apoptoz ve yaşa bağlı duyarlılık) ayrıntılı biçimde ortaya koymanın yanı sıra, olası koruyucu tedavilerin klinik uygulamaya aktarılabilmesi için de önemli bir temel oluşturmaktadır.

## 2.7. OKSİDATİF STRES ve ANTİOKSİDAN SİSTEM

### 2.7.1. Tanım ve Biyolojik Önemi

Oksidatif stres, reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species (ROS)) ile antioksidan savunma sistemleri arasındaki dengenin oksidanlar lehine bozulması sonucu biyomoleküllerde hasara yol açan durum olarak tanımlanmaktadır.(81,82) Normal fizyolojik koşullarda ROS oluşumu ile bunları detoksifiye eden antioksidan mekanizmalar arasındaki denge "redoks homeostazı" nı sağlar.

ROS; hücre sinyal iletiminde, inflamasyon yanıtında, hücre proliferasyonu ve farklılaşmasının düzenlenmesinde, immün yanıtın modülasyonunda önemli roller üstlenmekte, bu yönüyle "oksidatif östroton" veya "fizyolojik redoks sinyali" nin bir parçası olarak kabul edilmektedir. (81–83)

Redoks dengesinin bozulması halinde oluşan oksidatif stres; lipitler, proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitler gibi temel biyomoleküllerde oksidatif modifikasyonlara yol açarak hücresel fonksiyon bozukluğu, apoptoz veya nekroz ile sonuçlanabilir. Oksidatif hasar, ateroskleroz, nörodejeneratif hastalıklar, diyabet, kronik böbrek hastalığı, kanser ve yaşlanma süreçleri gibi pek çok kronik hastalığın patogenezinde merkezi bir mekanizma olarak tanımlanmaktadır.(81,84)

Kadın üreme sistemi özelinde oksidatif stres; folikülogenez, ovulasyon, korpus luteum fonksiyonu ve fertilizasyon süreçlerinde hem fizyolojik hem de patolojik düzeylerde etkili olmaktadır. Fizyolojik sınırlardaki ROS düzeyleri ovulasyon için gerekli sinyallerin oluşumunda ve steroidogenezde rol oynarken, aşırı ROS üretimi oosit kalitesinde bozulma, foliküler atrezinin artması, endometriyal reseptivitenin azalması ve infertilite ile ilişkilendirilmektedir.(85–87)

### 2.7.2. Reaktif Oksijen Türleri ve Hasar Mekanizmaları

Reaktif oksijen türleri; süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$), hidrojen peroksit ($H_2O_2$), hidroksil radikali ($^{\bullet}OH$), singlet oksijen ($^1O_2$), peroksil ve alkoksil radikalleri gibi, moleküler oksijene göre daha reaktif oksijen kökenli molekülleri ifade eden geniş bir gruptur.(81,82,84) Bu moleküller çoğunlukla mitokondriyal elektron transport zinciri, NADPH oksidazlar, ksantin oksidaz, peroksizomlar ve endoplazmik retikulum gibi hücresel kaynaklardan oluşur.

Başlıca ROS ve biyolojik etkileri şu şekilde özetlenebilir:

- Süperoksit anyonu ($O_2^{\bullet -}$): Özellikle mitokondride elektron kaçakları sonucu oluşur. Kendisi göreceli olarak daha az reaktif olmakla birlikte, dismutasyonla $H_2O_2$'ye dönüşmesi ve nitrik oksit ile reaksiyona girerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturması nedeniyle önemlidir.(81,82)

- Hidrojen peroksit ($H_2O_2$): Serbest radikal olmasa da membranlardan difüze olabilen ve Fenton reaksiyonu ile son derece reaktif hidroksil radikaline dönüşebilen bir oksidandır. Düşük konsantrasyonlarda sinyal molekülü olarak görev yapar, yüksek düzeylerde ise oksidatif hasara neden olur.(81,83)
- DNA hasarı: ROS, baz modifikasyonları (özellikle 8-hidroksi-2'-deoksiguanozin), tek ve çift zincir kırıkları ve DNA–protein çapraz bağları oluşturarak mutagenez, genomik instabilite ve tümör gelişimine zemin hazırlayabilir.

Bu hasar süreçleri, hücrenin onarım kapasitesini aştığında; p53 aracılı apoptoz, nekroz, inflamatuvar yanıt aktivasyonu ve fibrozis gibi sonuçlarla ilişkili, çok sayıda sistemik ve organ-spesifik patolojiyi tetiklemektedir.(81–84)

### 2.7.3. Antioksidan Savunma Sistemi

Oksidatif stresin zararlı etkilerini sınırlamak ve redoks homeostazını sürdürmek amacıyla organizma, birbirini tamamlayan enzimatik ve non-enzimatik bileşenlerden oluşan karmaşık bir antioksidan savunma sistemi geliştirmiştir.(84,88,89)

Bu sistem genel olarak üç basamakta değerlendirilebilir:

1) ROS oluşumunu sınırlayan veya başlangıçta yok eden birinci basamak savunma (SOD, CAT, GPx vb.)

2) Oluşan ROS'un neden olduğu lipit peroksidasyonu ve diğer zincir reaksiyonlarını kıran ikinci basamak savunma (E vitamini, karotenoidler vb.)

3) Hasar görmüş biomoleküllerin onarım veya uzaklaştırılmasından sorumlu üçüncü basamak savunma mekanizmaları (DNA onarım enzimleri, proteazlar vb.) (88,89)

Ayrıca plazma ve hücre içi ortamlarda yer alan antioksidan moleküllerin toplam etkisini değerlendirmek amacıyla TAS, oksidan moleküllerin toplam yükünü belirlemek için ise TOS kavramları geliştirilmiştir. TAS ve TOS arasındaki oranın hesaplanmasıyla elde edilen Oksidatif Stres İndeksi (OSI), bireyin genel oksidatif denge durumunu yansıtan bütüncül bir parameter olarak kullanılmaktadır.(90,91)

**2.7.3.1. Enzimatik antioksidanlar ve Total Antioksidan Kapasite/Total Oksidan Kapasite:** "Birinci basamak" antioksidan savunma sistemi olarak 3 enzim tanımlanmakta ve oksidatif stresin önlenmesinde temel rol oynamaktadır. (88,89)Bunlar;

- Süperoksit dismutaz (SOD): $O_2^{\bullet -}$ radikalini $H_2O_2$ ve $O_2$'ye dönüştüren, oksidatif savunma hattının ilk ve en önemli enzimlerinden biridir. Sitoplazmik Cu/Zn-SOD (SOD1), mitokondriyal Mn-SOD (SOD2) ve ekstrasellüler SOD (SOD3) olmak üzere başlıca üç izoformu tanımlanmıştır. SOD aktivitesindeki azalma, mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ve artmış oksidatif hasarla ilişkili bulunmuştur.
- Katalaz (CAT): Özellikle peroksizomlarda yoğun olarak bulunan katalaz, $H_2O_2$'yi su ve oksijene dönüştürerek hidroksil radikal oluşumunu engeller. Yüksek kapasitesi sayesinde ani $H_2O_2$ artışlarının tamponlanmasında kritik rol oynar.
- Glutatyon peroksidaz (GPx): $H_2O_2$ ve organik peroksitleri, indirgenmiş glutatyon (GSH) kullanarak detoksifiye eden selenoprotein yapısında bir enzimdir. GSH/Glutatyon disülfür (GSSG) oranı, hücre içi redoks durumunun önemli göstergelerinden biri olup, GPx–glutatyon redüktaz döngüsü ile yakından ilişkilidir.

TAS/TOS ve OSI: Antioksidan ve oksidan parametrelerin tek tek ölçülmesi, zaman ve maliyet açısından pratik olmadığından, plazma veya serum örneklerinde tüm antioksidanların toplam etkisini gösteren TAS ve tüm oksidanların toplam etkisini yansıtan TOS ölçüm yöntemleri geliştirilmiştir. Erel tarafından tanımlanan tam otomatik kolorimetrik yöntemde; TAS, stabil bir serbest radikal katyonunun (örn. $ABTS^{\bullet +}$) antioksidanlar tarafından nötralize edilmesine bağlı renk azalmasının ölçülmesi prensibine dayanırken, TOS ölçümünde serumdaki oksidanlar, belirli bir demir–dianisidin kompleksini oksitleyerek renk artışı oluşturur ve bu artış spektrofotometrik olarak değerlendirilir.(92)

TAS genellikle mmol Trolox eşdeğeri/L, TOS ise μmol $H_2O_2$ eşdeğeri/L cinsinden ifade edilir. Bu iki parametreden OSI şu formül ile hesaplanmaktadır: OSI (arbitrar birim) = (TOS [μmol $H_2O_2$ eşd. /L] / TAS [mmol Trolox eşd. /L]) × 100

OSI değerinin artması, oksidatif stres yükünün antioksidan kapasiteye göre arttığını göstermektedir.(92,93)

Çeşitli klinik ve deneysel çalışmalarda TAS, TOS ve OSI; kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom, inflamatuvar ve otoimmün hastalıkların yanı sıra, kadın infertilitesi ve over fonksiyonu ile ilişkili patolojilerde de sistemik ve lokal oksidatif dengeyi değerlendirmek amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır.(94–96)

Bu tez çalışmasında da, oksidatif stres ve antioksidan sistemin bütüncül değerlendirilmesi amacıyla TAS ve TOS düzeylerinin ölçülmesi ve OSI'nin hesaplanması planlanmakta; böylece hastaların oksidatif denge durumunun kantitatif olarak ortaya konulması hedeflenmektedir.

**2.7.3.2. Non-enzimatik antioksidanlar:** Non-enzimatik antioksidanlar, serbest radikalleri doğrudan süpürerek veya metal iyonlarını şelatlayarak zincir reaksiyonlarını kıran, geniş bir molekül grubunu kapsar. Başlıca non-enzimatik antioksidanlar şu şekilde sıralanabilir;(84,88)

- Vitaminler:

a) Vitamin E (α-tokoferol): Lipofilik yapısı sayesinde biyolojik membranlarda yer alır ve lipit peroksidasyon zincir reaksiyonlarını durduran başlıca antioksidan vitamindir.

b) Vitamin C (askorbik asit): Suda çözünen güçlü bir antioksidandır; serbest radikalleri doğrudan nötralize eder, okside olmuş E vitaminini yeniden indirgenmiş forma geri çevirebilir.

c) Vitamin A ve karotenoidler: Özellikle singlet oksijen süpürücü özellikleri ile membran koruyucu etki gösterirler.

- Glutatyon (GSH): Tripeptid yapıda, hücre içi ortamdaki en önemli non-enzimatik antioksidanlardan biridir. Sülfhidril grubu sayesinde ROS ve reaktif metabolitleri bağlayarak detoksifikasyona katkı sağlar; ayrıca GPx için kofaktör görevi görür.

- Endojen antioksidan moleküller: Ürik asit, bilirubin, albumin, seruloplazmin ve transferrin gibi moleküller; hem serbest radikal süpürücü özellikleri hem de geçiş metalleri ($Fe^{2+}$, $Cu^{2+}$ vb.) için şelatlayıcı etkileri ile antioksidan savunmaya katkıda bulunur.
- Diyetle alınan polifenoller: Flavonoidler, resveratrol, kateşinler ve diğer bitkisel polifenoller; hem doğrudan serbest radikal süpürücü etkileri hem de endojen antioksidan enzim ekspresyonunu artırmaları nedeniyle önem taşımaktadır.

Plazma TAS düzeyi, bu non-enzimatik antioksidanların tamamının kümülatif etkisini yansıtır; özellikle vitaminler, GSH, ürik asit ve protein bağlı antioksidanların değişimi TAS ölçümlerine doğrudan yansımaktadır.(90,92)

### 2.7.4. Over Fonksiyonunda Oksidatif Stresin Rolü

Over dokusu; yoğun mitokondriyal aktiviteye sahip oositler, steroid hormon sentezleyen granüloza ve teka hücreleri, foliküler sıvı ve zengin vasküler yapı nedeniyle oksidatif stres açısından hassas bir organdır. Fizyolojik düzeydeki ROS, ovulasyonun inflamatuvar benzeri sürecinde, folikül rüptürü ve luteinizasyon için gerekli sinyal yollarında rol oynamakta; buna karşılık artmış ROS düzeyleri oosit kalitesinde azalma ve infertilite ile ilişkilendirilmektedir.(85–87)

Over yaşlanması ve rezerv azalması: Deneysel ve klinik çalışmalar, oksidatif stresin over yaşlanmasının etyolojisinde temel faktörlerden biri olduğunu göstermektedir. Zamanla artan ROS yükü, oosit mitokondrilerinde DNA hasarı ve fonksiyon kaybına neden olmakta; bu durum oosit kalitesinde bozulma, folikül havuzunda azalma ve sonuçta over rezervinin düşmesi ile sonuçlanmaktadır. Oksidatif stresin azaltılması veya antioksidan kapasitenin desteklenmesinin, deneysel modellerde over fonksiyonunu ve folikül sayısını kısmen koruduğu bildirilmiştir.(85,87)

Oosit kalitesi ve fertilite: Oksidatif stresin oosit kalitesi ve infertilite üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarda, artmış ROS düzeylerinin ve yetersiz antioksidan yanıtın; düşük embriyo kalitesi, implantasyon oranlarında azalma ve gebelik oranlarında düşüklük ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.(86,97)Foliküler sıvıda ölçülen TAS düzeyi ile klinik gebelik oranları arasında pozitif korelasyon bildiren çalışmalar bulunmaktadır.(86,95,98)

Foliküler sıvıda TAS/TOS ve OSI: Özellikle yardımcı üreme teknikleri (YÜT/IVF) uygulanan infertil kadınlarda, serum ve folikül sıvısında TAS, TOS ve OSI ölçümleri ile klinik sonuçlar arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalar artmaktadır. Çeşitli çalışmalarda; foliküler sıvıda TOS artışı ve TAS azalmasının oosit sayısı ve kalitesinde azalma ile ilişkili olabileceği, daha yüksek TAS ve daha düşük veya dengeli OSI değerlerinin ise daha iyi embriyo kalitesi ve daha yüksek klinik gebelik oranları ile birlikte seyredebileceği, serum ve folikül sıvısındaki TAS/TOS düzeylerinin, infertilite etyolojisine ve vücut kitle indeksi gibi hasta özelliklerine göre farklılık gösterebildiği bildirilmiştir.(94–96)

Örneğin Aydın ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon sikluslarında farklı zaman noktalarında ölçülen serum TAS, TOS ve OSI değerleri ile klinik gebelik gelişimi karşılaştırılmış; gebelik elde edilen olgularda siklus boyunca TAS düzeylerinin daha yüksek, bazı zaman noktalarında ise TOS ve OSI değerlerinin farklı seyrettiği bildirilmiştir.(95) Diğer bir çalışmada ise infertil hastalarda serum ve folikül sıvısında TAS, TOS ve OSI düzeyleri ile embriyo kalitesi ve IVF başarısı arasındaki ilişki değerlendirilmiş, OSI artışının oksidatif stres yükünü yansıttığı ve klinik sonuçlarla ilişkili olabileceği vurgulanmıştır.(94)

Oksidatif stresin; PKOS, endometriozis, açıklanamayan infertilite ve primer over yetmezliği gibi birçok jinekolojik durumda da rol oynadığı, bu durumlarda artmış oksidatif yük ve azalmış antioksidan kapasitenin hem foliküler mikroçevreyi hem de endokrin yanıtı olumsuz etkileyerek gebelik şansını azalttığı gösterilmiştir.(87,99,100)

Bu bağlamda TAS, TOS ve OSI ölçümleri; over fonksiyonu ve infertilite ile ilişkili oksidatif denge bozukluklarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayan pratik ve kantitatif parametreler olup, özellikle YÜT uygulanan hastalarda hem prognostik açıdan hem de olası antioksidan tedavi stratejilerinin değerlendirilmesi açısından önemli görünmektedir.(94–96)

## 2.8. PLATELET RICH PLASMA

### 2.8.1. Platelet-Rich Plasma Tanımı ve Bileşimi

PRP, kişinin kendi tam kanından elde edilen; trombositlerin plazma içinde fizyolojik düzeyin üzerinde konsantre edildiği otolog bir biyolojik üründür. PRP'nin temel amacı; trombositlerin özellikle α-granüllerinde depolanan biyolojik olarak aktif molekülleri (büyüme faktörleri, kemokinler ve sitokinler) hedef dokuya yüksek yoğunlukta ulaştırarak doku onarımı ve rejenerasyonu desteklemektir. PRP, uygulama amacına ve hazırlama protokolüne göre değişmekle birlikte; plazma proteinleri (fibrinojen vb.), değişken miktarda lökosit (lökositten zengin/lökositten fakir PRP) ve nadiren az miktarda eritrosit kontaminasyonu içerebilir. Bu biyolojik heterojenlik, klinik sonuçların farklılaşmasında önemli bir belirleyici olarak kabul edilmektedir.(101)

PRP kavramı ve tanımı kökenini hematoloji alanından almaktadır. Hematologlar, 1970'li yıllarda trombositopeni tanısı olan hastaların tedavisinde transfüzyon amacıyla kullanılan ve periferik kana kıyasla daha yüksek trombosit konsantrasyonu içeren plazmayı tanımlamak için "platelet-rich plasma (PRP)" terimini ortaya koymuşlardır. Bunu izleyen yaklaşık on yıllık süreçte PRP, fibrin matriks yapısından yararlanılarak geliştirilen platelet-rich fibrin (PRF) formu ile özellikle maksillofasiyal cerrahi alanında uygulanmaya başlanmıştır. Fibrinin adezyon ve hemostaz üzerindeki belirgin etkilerine karşın PRP'nin anti-inflamatuvar özellikleri sayesinde hücresel proliferasyonu uyarıcı potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir. Daha sonraki dönemlerde PRP, özellikle spor yaralanmaları başta olmak üzere kas-iskelet sistemi patolojilerinde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Profesyonel sporcularda uygulanmasıyla birlikte medyada geniş yer bulmuş ve bu durum PRP'nin klinik kullanımının hızla artmasına katkı sağlamıştır. Günümüzde ise PRP; kardiyovasküler cerrahi, pediatrik cerrahi, jinekoloji, üroloji, plastik cerrahi ve oftalmoloji gibi birçok farklı tıp disiplininde araştırılan ve uygulanan bir biyolojik tedavi yöntemi haline gelmiştir.(102)

### 2.8.2. Platelet-Rich Plasma Hazırlama Yöntemleri

PRP hazırlığında temel yaklaşım tam kandan trombositleri ayırmak ve konsantre etmektir. Klinik pratikte en yaygın yöntem santrifüj temelli sistemlerdir ve genel olarak iki ana protokol öne çıkar:

- Tek aşamalı (single-spin) santrifüj: Daha kısa ve pratik olmakla birlikte trombosit konsantrasyonu ve lökosit içeriği daha değişken olabilir.
- İki aşamalı (double-spin) santrifüj: İlk santrifüjde eritrositler ayrılır; ikinci santrifüjde trombositler daha yüksek yoğunlukta toplanır. Bu yöntemle hedeflenen trombosit dozu daha kontrollü ayarlanabilir.

Bunlara ek olarak kapalı sistem ticari kitler de (özellikle standardizasyon ihtiyacı nedeniyle) sık kullanılmaktadır; ancak farklı cihazlar ve protokoller trombosit dozu, lökosit oranı, aktivasyon durumu ve hacim gibi parametreleri anlamlı ölçüde değiştirebildiğinden çalışmalar arası karşılaştırılabilirlik kısıtlıdır. Ayrıca bazı protokollerde PRP kalsiyum klorür veya trombin gibi ajanlarla aktive edilerek büyüme faktörü salınımının hızlandırılması hedeflenebilir. PRP'nin "doz" kavramının yalnız hacim değil, trombosit sayısı/uygulanan toplam trombosit yükü üzerinden ele alınması gerektiği özellikle vurgulanmaktadır.(101)

### 2.8.3. Platelet-Rich Plasma'nın Etki Mekanizması ve Büyüme Faktörleri

PRP'nin klinik etkileri büyük ölçüde trombosit aktivasyonu sonrası salınan büyüme faktörleri ve biyomoleküller ile ilişkilidir. Literatürde en sık vurgulananlar; PDGF (platelet-derived growth factor), TGF-β (transforming growth factor-β), VEGF (vascular endothelial growth factor), EGF (epidermal growth factor), IGF-1 (insulin-like growth factor-1) ve farklı sitokin/kemokinlerdir. Bu mediatörler üzerinden PRP'nin başlıca biyolojik etkileri:

- Kemotaksi ve hücresel göç: Onarım sürecinde hücrelerin hasarlı alana çekilmesini destekler.
- Anjiyogenez ve mikrodolaşımın desteklenmesi: Özellikle VEGF aracılığıyla yeni damar oluşumu ve doku perfüzyonu artışı hedeflenir.
- İnflamasyonun modülasyonu: PRP'nin lökosit içeriğine bağlı olarak pro/anti-inflamatuvar etkiler değişebilir.

- Proliferasyon ve doku yeniden yapılanması: Fibroblast aktivitesi, ekstraselüler matriks düzenlenmesi ve epitelizasyon süreçleri üzerinde etkiler bildirilmiştir.

Buna karşın PRP'nin etkisinin tek bir mekanizma ile açıklanamayacağı; hazırlama protokolü (lökosit içeriği, aktivasyon, trombosit dozu) ve hedef dokunun biyolojisinin klinik sonucu belirgin biçimde etkilediği belirtilmektedir.(101)

### 2.8.4. Reprodüktif Tıpta Platelet-Rich Plasma Kullanımı

Reprodüktif tıpta PRP, ağırlıklı olarak iki alanda değerlendirilmiştir:

- İntrauterin PRP uygulamaları (ince endometrium, tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve endometrial patolojiler)
- İntraovaryan PRP uygulamaları (azalmış over rezervi / poor ovarian response / prematür ovaryan yetmezlik spektrumu)

İntrauterin PRP uygulaması için yapılan sistematik derlemeler ve meta-analizler, özellikle tekrarlayan implantasyon başarısızlığı olgularında PRP'nin klinik gebelik ve canlı doğum gibi sonlanımları iyileştirebileceğini göstermiştir ancak kanıt kalitesinin çalışmaların heterojenliği nedeniyle sınırlı olduğunu bildirmektedir.(103) Benzer şekilde endometriumun rejenerasyonuna yönelik biyoteknolojik yaklaşımları inceleyen geniş kapsamlı bir derleme, PRP'yi asellüler rejeneratif tedaviler arasında konumlandırmış; Asherman sendromu/intrauterin adezyonlar ve ince endometrium gibi durumlarda PRP'nin farklı uygulama biçimleriyle denendiğini, ancak yöntemsel çeşitliliğin standart bir protokol geliştirmeyi zorlaştırdığını vurgulamıştır.(104)

### 2.8.5. Deneysel Çalışmalarda İntraovaryan Platelet-Rich Plasma Uygulamaları

İntraovaryan PRP uygulamaları, bazı çalışmalarda "ovarian rejuvenation" kavramı çerçevesinde ele alınmakta olup, özellikle azalmış ovaryan yanıt ve azalmış yumurta rezervi tanısı bulunan olgularda gündeme gelmiştir. Bu yaklaşımın temelinde, PRP'nin over dokusu üzerinde folikül gelişim sürecini uyarabileceği, ovaryan stromanın mikrodolaşımını iyileştirebileceği ve lokal büyüme faktörü mikroçevresini destekleyerek over fonksiyonlarını olumlu yönde modüle edebileceği yönündeki biyolojik hipotezler yer almaktadır.

Bu alandaki güncel kanıtlar heterojen ve kısmen çelişkilidir:

- Randomize kontrollü kanıt: 2024 tarihli çift-kör randomize kontrollü bir çalışma, intraovaryan PRP enjeksiyonunun toplanan oosit sayısını artırabildiğini ancak gelişen blastosistlerin kalitesi gibi bazı kalite ölçütlerinde artışın net olmadığını bildirmiştir.(105)
- Negatif randomize kontrollü çalışma bulgusu: Başka bir randomize çalışmada (özellikle <38 yaş POY popülasyonu), intraovaryan PRP'nin MII oosit verimi ve bazı IVF çıktıları üzerinde anlamlı iyileşme sağlamadığı rapor edilmiştir; ayrıca PRP preparatlarının standart olmaması genellenebilirliği kısıtlayan bir unsur olarak belirtilmiştir.(106)
- Gözlemsel veri: Prospektif kohort verilerinde AFC artışı ve oosit sayısında artış gibi parametrelerde iyileşmeler bildirilmekle birlikte gebelik oranlarına etkide tutarlılık sınırlıdır.(107)
- Meta-analizler: 2024 tarihli meta-analizler; PRP sonrası AFC artışı, bazı hormon parametrelerinde iyileşme ve toplanan oosit/embriyo sayısında artış gibi bulgular rapor ederken; çalışmaların çoğunun gözlemsel olması nedeniyle kesin klinik öneri için daha fazla, iyi tasarlanmış randomize kontrollü çalışma gerektiğini vurgular.(108,109)

## 2.9. EKSOZOM

### 2.9.1. Eksozom Tanımı ve Biyogenezi

Eksozomlar; hücrelerin endozomal yolak üzerinden oluşturduğu ve çok veziküllü cisimciklerin (multivesicular bodies, MVB) plazma membranı ile kaynaşıp içerdiği intralüminal vezikülleri hücre dışına salmasıyla oluşan, genellikle küçük ekstrasellüler vezikül (small EV) aralığında yer alan nano-boyutlu veziküllerdir. Eksozom terimi sıklıkla kullanılsa da, biyogenez temelli kesin ayrımın pratikte her zaman gösterilememesi nedeniyle International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)'in Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV) kılavuzları, mümkün olduğunda "EV/small EV" gibi daha temkinli terminoloji ve ayrıntılı karakterizasyon önermektedir.(110)

Biyogenez sürecinde temel adımlar:

1) Erken endozom → geç endozom/MVB olgunlaşması,

2) MVB içinde intralüminal vezikül (ILV) oluşumu ve kargo seçimi,

3)MVB'nin lizozomal yıkıma yönlenmesi veya plazma membranıyla füzyon yaparak ILV'leri eksozom olarak salmasıdır. Bu süreçte endosomal ayırma kompleksleri (ESCRT-0/I/II/III), ALIX–syntenin ekseni, tetraspaninler (CD9, CD63, CD81) ve küçük GTPazlar (örn. Rab ailesi) biyogenez, kargo yükleme ve salınımda rol oynar.(111–113)

### 2.9.2. Eksozomların Hücrelerarası İletişimde Rolü

Eksozomlar; taşıdıkları protein, lipid ve nükleik asit kargoları aracılığıyla hedef hücrelerde reseptör–ligand etkileşimi, membran füzyonu veya endositoz, fagositoz gibi yollarla sinyal iletimini düzenler. Bu nedenle eksozomlar, fizyolojik süreçlerde (immün modülasyon, anjiyogenez, doku homeostazı) ve patolojik durumlarda (enflamasyon, tümör mikroçevresi, fibrozis vb.) dolaşımsal organlar arası iletişimi de kapsayacak şekilde etkili biyolojik haberci sistemler olarak görülmektedir.(114,115)

Özellikle foliküler mikroçevre (oosit–granüloza–teka hücreleri–stroma) yoğun parakrin iletişim gerektirir; bu nedenle EV aracılı iletişim, folikülogenez ve oosit olgunlaşması gibi süreçlerde önemli bir katman olarak değerlendirilmektedir.(116)

### 2.9.3. Eksozomların İçerdiği Biyomoleküller

Eksozom kargosu hücre tipine, fizyolojik duruma ve uyarana bağlı olarak değişmekle birlikte genel olarak:

- Proteinler: tetraspaninler (CD9/CD63/CD81), ısı şok proteinleri, adezyon molekülleri, enzimler, sinyal proteinleri
- Nükleik asitler: mRNA, miRNA ve diğer küçük ncRNA'lar, bazı koşullarda DNA fragmanları
- Lipitler: sfingomiyelin, kolesterol, seramid gibi membran bütünlüğü ve sinyal iletiminde kritik lipidler
- Metabolitler içerebilir.(115,117)

Kargo seçimi pasif paketlenme değildir; RNA-bağlayıcı proteinler, endozomal membran düzenleyicileri ve ESCRT ve tetraspanin ilişkili mekanizmalarla seçici yükleme gerçekleşebilir. Bu seçicilik, eksozomların biyobelirteç potansiyelini ve hedefe yönelik tedavi taşıyıcısı olarak kullanımını güçlendiren temel biyolojik dayanaklardan biridir.(118)

### 2.9.4. Eksozomların Over Fonksiyonları Üzerine Etkileri

Over; oositin geliştiği, steroidogenezin yürütüldüğü ve ovulasyonla sonuçlanan dinamik bir organdır. Folikül içi mikroçevrede granüloza ve teka hücreleri ile oosit arasında çift yönlü iletişim; büyüme faktörleri, steroidler ve parakrin sinyallerin yanında EV aracılı transfer ile de desteklenir. (116,119)

Literatür, granüloza hücre eksozomlarının:

- Folikül gelişimi ve foliküler homeostaz (hücre proliferasyonu/apoptoz dengesi, ekstrasellüler matriks düzenlenmesi),
- Steroidogenez ve endokrin yanıtların modülasyonu,
- Oosit olgunlaşması ve kompetens (dolaylı/kompartmanlar arası sinyal düzenlenmesi),

  gibi süreçlerde rol oynayabileceğini vurgular. (119)

Klinik olarak önemli iki jinekolojik patolojide de EV profillerinin değişebildiğine dair kanıtlar birikmektedir:

- PKOS: foliküler mikroçevrede EV içeriği ve sinyal ağlarında değişimlerin foliküler disfonksiyonla ilişkili olabileceği,
- Endometriozis: inflamasyon ve fibrozis ekseninde EV'lerin hastalık biyolojisine katkı sunabileceği özetlenmiştir.(116)

Bu bulgular; over hastalıklarında EV'in biyobelirteç (örn. foliküler sıvı/serum EV içerikleri) ve gelecekte tedavi hedefi olma potansiyelini desteklemektedir. Ancak klinik uygulamaya geçiş için standardizasyon ve nedensellik kanıtları gereklidir.(110,116)

### 2.9.5. Rejeneratif Tıpta Eksozom Kullanımı

Rejeneratif tıpta eksozomlar, özellikle mezenkimal kök hücre (MSC) kaynaklı eksozomlar üzerinden; anti-enflamatuvar etki, anjiyogenez, immün modülasyon ve doku onarımını destekleyen parakrin mekanizmaların hücresiz (cell-free) terapi yaklaşımıyla taşınabilmesi nedeniyle ilgi görmektedir.

Eksozom temelli yaklaşımlar şu avantajlarla tartışılmaktadır:

- Canlı hücre tedavilerine kıyasla daha düşük tümörijenite/embolizasyon riski beklentisi,
- Biyolojik bariyerleri geçebilme ve doğal taşıyıcılık,
- Yüzey modifikasyonu veya yükleme stratejileriyle hedefli ilaç/nükleik asit taşıma potansiyeli.(120)

Bununla birlikte, klinik translasyonda temel sınırlılıklar öne çıkmakta. Bunlar;

- Üretimde GMP, saflaştırma ve parti-bazlı standartlaşma zorlukları,
- Dozlama, potentlik testleri ve uzun dönem güvenlilik verilerinin sınırlılığı,
- Eksozom iddiasının biyogenez düzeyinde her zaman doğrulanamaması nedeniyle terminoloji gereksinimidir. (121)

# 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nca 26.09.2025 tarihinde görüşülerek 2025/92 numaralı Etik Kurul onayı alınarak İÜC Nanoteknoloji ve Biyoteknoloji Enstitüsü – DETALAB'da yapılmıştır. Gerekli hayvanlar DETALAB bünyesinde temin edilmiştir.

Çalışmada toplam 40 adet, Sprague-Dawley cinsi, yaklaşık 8-10 haftalık sağlıklı, gebe olmayan, 155-215 gr ağırlığındaki dişi ratlar kullanıldı. Deney protokolü boyunca ratlar 21 ± 2 oda sıcaklığında, iyi havalandırılan %60-65 rölatif nem oranına sahip odalarda ,12 saat ışık ve 12 saat karanlık döngüsünde 4'erli gruplar halinde 30x60x30 cm kafeslerde barındırıldı. Standart pellet yemi ve arıtma suyu ad libitum olarak verildi. Çalışmada Helsinki Bildirgesi'nde belirtilen hayvan deneyleri için gerekli kurallara uyulmuş olup 3R Kuralı (Replacement, Reduction, Refinement) dikkate alındı. Çalışma 40 adet rat ile başladı ancak gün 14'te kan alımı sırasında 8 numaralı rat anestezi ve kan alımını takiben spontan solunum depresyonuna bağlı ex oldu ve 39 rat ile çalışmaya devam edildi. Çalışmada bütün işlemler genel anestezi altında ve steril koşullarda yapıldı. Genel anesteziyi sağlamak amacıyla her bir sıçana 80 mg/kg ketamin hidroklorür (KETALAR®, Pfizer) ve 8 mg/kg dozunda ksilazin hidroklorür (Alfazyne %2, Ege Vet, Türkiye) intraperitoneal uygulanmıştır. Tüm gruplara zaman çizelgesine göre gün 21'de laparotomi insizyonundan 30-60 dk önce tek doz Cefazolin 20-25 mg/kg (Sefazol 1000mg, GENSENTA, İstanbul) IM ve postoperatif tek doz Meloksikam 1-2 mg/kg (MELOX 15 mg/1,5 mL, NOBEL İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş.) uygulandı. Laparotomi sonrası batın katları anatomiye uygun olarak 3/0 Keskin poli glikolid-ko-kaprolakton (PGCL) (Tekmon, DOĞSAN Tıbbi Malzeme Sanayi A.Ş.) ile primer kapatıldı. İlgili gruplara over yetmezliği modeli tek doz intraperitoneal 200 mg/kg CYP (Endoxan, Eczacıbaşı) ile oluşturuldu. Subklavian kan alımları 25G insulin enjektörü ile yapılırken, intraovaryan uygulamalar 26G insulin enjektörü kullanılarak yapıldı. Kardiyak kan alımı ise 21G enjektör ile laparotomide yapıldı. Deney protokolü tamamlandıktan sonra tüm ratlar kardiyak kan boşaltımı ve yüksek doz anestezik (80 mg/kgx4 Ketamin + 8mg/kgx4 Ksilazin) ile sakrifiye edildi.

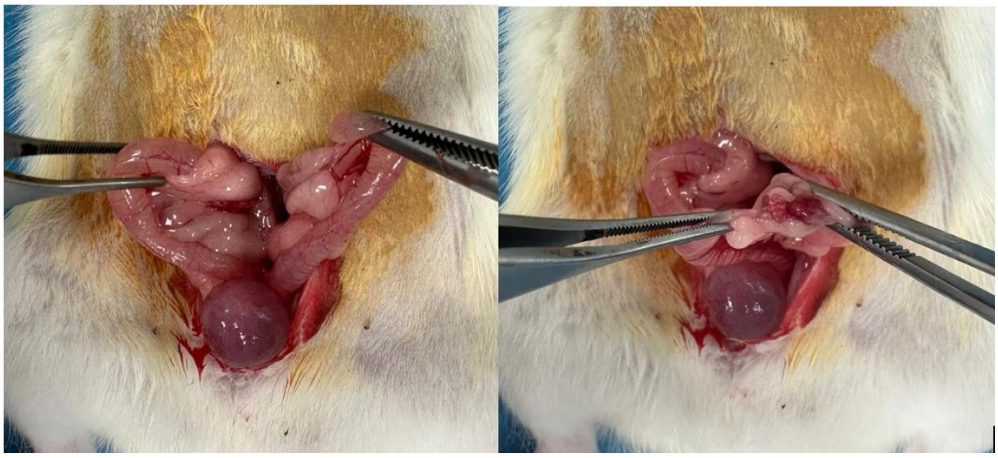
### 3.1. DENEY GRUPLARI

Ratlar rastgele seçilerek 5 gruba ayrıldı;

- kontrol grubu (n=8)
- CYP grubu (n=8)
- CYP + PRP grubu (n=7). (Gün 14'te kan alımı sırasında 8 numaralı rat anestezi ve kan alımını takiben spontan solunum depresyonuna bağlı ex olmuştur.)
- CYP + eksozom grubu (n=8)
- CYP + PRP + eksozom grubu (n=8).

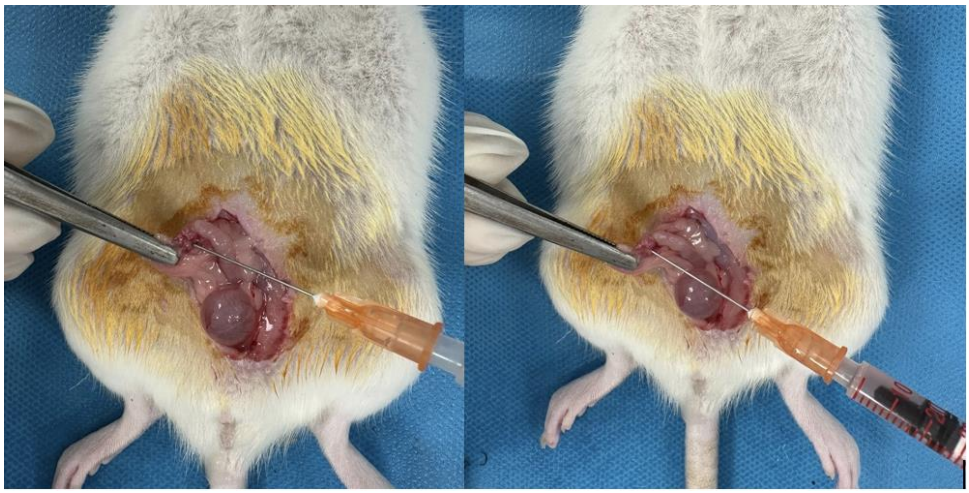
**Kontrol Grubu:** Bu grupta bazal değerlerin elde edilmesi amacıyla zaman çizelgesine göre gün 0, gün 14'te sedasyonda subklavian venden kan alımı yapıldı. Gün 21'de anesteziyi takiben operasyon masasına alınarak sırtüstü pozisyonda karın cildi traş edildikten sonra yaklaşık 2 cm'lik median insizyon ile laparotomi yapılarak adneksler değerlendirildi. Batın katları anatomiye uygun kapatıldı. Gün 28 de aynı insizyon hattından laparotomi ile bilateral ooferektomi yapıldı ve kardiyak ponksiyon ile 3. kan örneği alımı sonrasında usulüne uygun sakrifiye edildi.

**CYP Grubu:** Bu grupta over yetmezliği modeli değerlendirmesi amacıyla CYP uygulaması dışında intraovaryan bir işlem yapılmamıştır. Zaman çizelgesine göre Gün 0'da subklavian veninden bazal kan örneği alındı ve akabinde tek doz intraperitoneal 200 mg/kg CYP uygulandı. Gün 14'te over yetmezliği modelinin değerlendirilmesi amacıyla subklavian veninden 2. kan örneği alındı. Gün 21'de anesteziyi takiben operasyon masasına alınarak sırtüstü pozisyonda karın cildi traş edildikten sonra yaklaşık 2 cm'lik median insizyon ile laparotomi yapılarak adneksler değerlendirildi. Batın katları anatomiye uygun kapatıldı. Gün 28 de aynı insizyon hattından laparotomi ile bilateral ooferektomi yapıldı ve kardiyak ponksiyon ile 3. kan örneği alımı sonrasında usulüne uygun sakrifiye edildi.



**Şekil 3.1:** Yaklaşık 2 cm'lik median insizyonla laparotomi yapılan ratta bikornu uterus (sol) ve sol adneksiyal yapıların (sağ) gösterilmesi

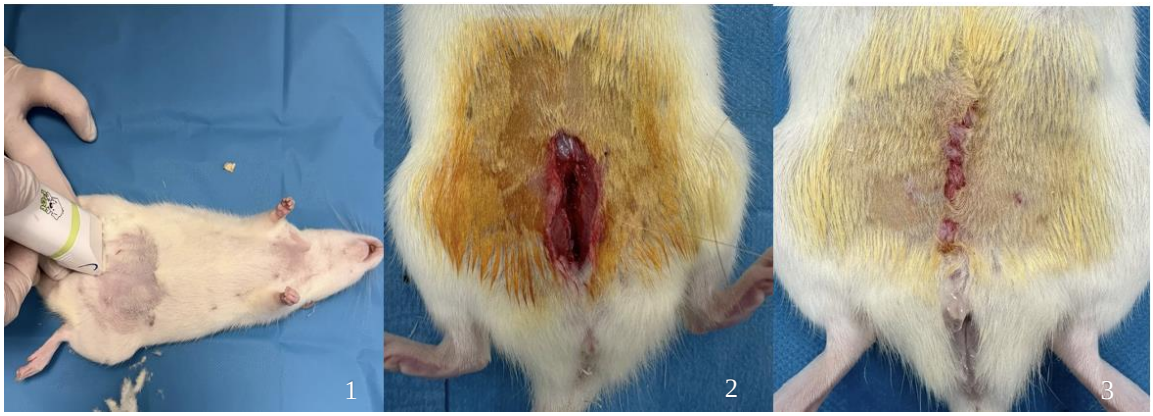
**CYP+PRP Grubu:** Bu grupta intraovaryan PRP uygulamasının etkileri araştırıldı. Zaman çizelgesine göre Gün 0'da subklavian veninden bazal kan örneği alındı ve akabinde tek doz intraperitoneal 200 mg/kg CYP uygulandı. Gün 14'te over yetmezliği modelinin değerlendirilmesi amacıyla subklavian veninden 2. kan örneği alındı. Gün 21'de anesteziyi takiben subklavian venden alınan kan ile iki aşamalı santrifüj yapılarak PRP hazırlandı. Ratlar operasyon masasına alınarak sırtüstü pozisyonda karın cildi traş edildikten sonra yaklaşık 2 cm'lik median insizyon ile laparotomi yapılarak adneksler değerlendirildi ve bilateral intraovaryan yaklaşık 200 µL PRP enjekte edildi. Batın katları anatomiye uygun kapatıldı. Gün 28 de aynı insizyon hattından laparotomi ile bilateral ooferektomi yapıldı ve kardiyak ponksiyon ile 3. kan örneği alımı sonrasında usulüne uygun sakrifiye edildi.



**Şekil 3.2:** İntraovaryan PRP (sağ) ve Eksozom (sol) uygulaması

**CYP+Eksozom Grubu:** Bu grupta intraovaryan Eksozom uygulamasının etkileri araştırıldı. Zaman çizelgesine göre Gün 0'da subklavian veninden bazal kan örneği alındı ve akabinde tek doz intraperitoneal 200 mg/kg CYP uygulandı. Gün 14'te over yetmezliği modelinin değerlendirilmesi amacıyla subklavian veninden 2. kan örneği alındı. Gün 21'de anesteziyi takiben ratlar operasyon masasına alınarak sırtüstü pozisyonda karın cildi traş edildikten sonra yaklaşık 2 cm'lik median insizyon ile laparotomi yapılarak adneksler değerlendirildi ve bilateral intraovaryan yaklaşık 100 µL Eksozom (Stembio Exocell®, Türkiye) enjekte edildi. Batın katları anatomiye uygun kapatıldı. Gün 28 de aynı insizyon hattından laparotomi ile bilateral ooferektomi yapıldı ve kardiyak ponksiyon ile 3. kan örneği alımı sonrasında usulüne uygun sakrifiye edildi.

**CYP+PRP+Eksozom Grubu:** Bu grupta intraovaryan PRP ve Eksozomun beraber uygulamasının etkileri araştırıldı. Zaman çizelgesine göre Gün 0'da subklavian veninden bazal kan örneği alındı ve akabinde tek doz intraperitoneal 200 mg/kg CYP uygulandı. Gün 14'te over yetmezliği modelinin değerlendirilmesi amacıyla subklavian veninden 2. kan örneği alındı. Gün 21'de anesteziyi takiben subklavian venden alınan kan ile iki aşamalı santrifüj yapılarak PRP hazırlandı. Ratlar operasyon masasına alınarak sırtüstü pozisyonda karın cildi traş edildikten sonra yaklaşık 2 cm'lik median insizyon ile laparotomi yapılarak adneksler değerlendirildi ve bilateral intraovaryan ilk olarak yaklaşık 200 µL PRP ardından 100 µL Eksozom (Stembio Exocell®, Türkiye) enjekte edildi. Batın katları anatomiye uygun kapatıldı. Gün 28 de aynı insizyon hattından laparotomi ile bilateral ooferektomi yapıldı ve kardiyak ponksiyon ile 3. kan örneği alımı sonrasında usulüne uygun sakrifiye edildi.




**Şekil 3.3:** Ratların operasyona hazırlık (1), 2cm'lik median insizyonun anatomiye uygun kapatılması (2), operasyon sonunda insizyonun görüntüsü (3)

### 3.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME

Biyokimyasal incelemede serumda Folikül Stimülan Hormon (FSH), Anti-Müllarian Hormon (AMH), Total Antioksidan Kapasite (TAS) ve Total Oksidan Kapasite (TOS) düzeyleri ELİSA yöntemi ile değerlendirildi.

#### 3.2.1. Kan Örneklerinin Alınması

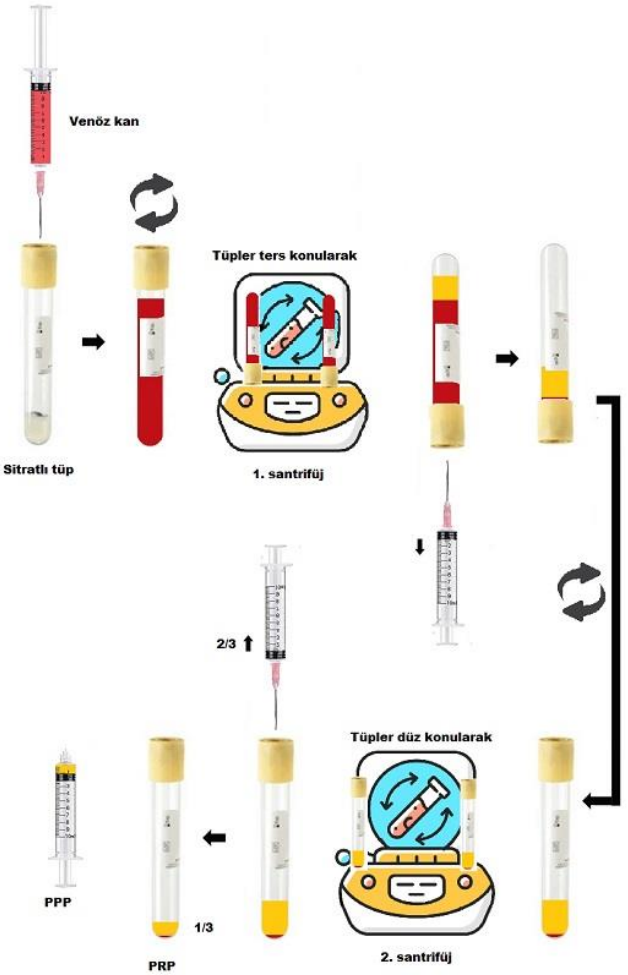
Zaman çizelgesine göre tüm ratlardan gün 0 ve gün 14'te subklavian venden 25G insulin enjektörü ile yaklaşık 0,8cc -1cc kadar kan örneği ve gün 28 de laparotomide bilateral ooferektomi yapıldıktan sonra intrakardiyak 21G enjektör ile yaklaşık 5 cc kan örneği alınarak sarı kapaklı jelli pıhtı aktivatörlü biyokimya tüplerine (BD Vacutainer®, UK) alındı. Örnekler 3000 x g de 10 dakika santrifüj edildikten sonra elde edilen serumlar pipet yardımıyla eppendorflara alındı. Örnekler biyokimya analizleri yapılana kadar -80 °C' de saklandı.



**Şekil 3.4:** Ratlarda subklavian kan alımı

### 3.2.2. Platelet-Rich Plasma Hazırlığı

Bu çalışmada PRP elde edilmesi amacıyla tek tüp – çift santrifüjyöntemi kullanılmıştır. PRP hazırlığı, steril koşullar altında ve standart protokole uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.




**Şekil 3.5:** PRP hazırlığı şematizasyonu

Steril, vakumlu ve önceden asit sitrat dekstroz-A (ACD-A) içeren tüplere venöz kan alınmıştır. Alınan kan örnekleri, tüpün kapak kısmı aşağı gelecek şekilde yerleştirilerek düşük devirde (200 g x 10 dk) birinci santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Birinci santrifüj sonrasında, tüp içerisinde tabakalaşma oluşmuş; kapak kısmından itibaren sırasıyla eritrositler, buffy coat (lökosit ve trombositten zengin ara tabaka) ve üstte plazma fazı gözlenmiştir. Tüpün kapağı açılmadan, buffy coat seviyesine kadar olan eritrositlerden zengin alt kısım, steril bir enjektör yardımıyla dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Ardından tüp, hücresel bileşenlerin homojen dağılımını sağlamak amacıyla hafifçe çalkalanmıştır. Takiben tüpler, bu kez kapak kısmı yukarı gelecek şekilde yerleştirilerek yüksek devirde (600 g x 10 dk) ikinci santrifüj işlemine alınmıştır. İkinci santrifüj sonrası, plazmanın üst 2/3'lük kısmında trombositten fakir plazma (P-PRP) oluşmuş ve bu kısım steril enjektör ile uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan alt 1/3'lük kısım, trombositten zengin fraksiyonu içermekte olup, nazikçe homojenize edilerek enjeksiyona hazır PRP elde edilmiştir.

Bu yöntemle elde edilen PRP, çalışmada planlanan uygulamalar için kullanılmıştır.

### 3.2.3. Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELİSA)



**Şekil 3.6:** Biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere santrifüj sonrası elde edilen serum örneklerinin Eppendorf tüplerdeki görünümü.




**Şekil 3.7:** Deneysel çalışma kapsamında kullanılan cihazların laboratuvar ortamındaki görünümü.

Çalışmada kullanılacak RAT AMH ELİSA KİT'inin (Elabscience - katolog no: E-EL-R3022) çalışma prensibi; sandviç ELISA yöntemine dayanmaktadır. Kit içerisinde yer alan mikro ELISA plakası, sıçan AMH'ye özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standart çözeltiler veya test edilecek numuneler, mikro plaka kuyucuklarına eklenerek bu özgül antikor ile bağlanmaları sağlanır. Daha sonra, sıçan AMH'ye özgü biyotin ile işaretlenmiş tespit antikoru ve Avidin–Horseradish Peroksidaz (HRP) konjugatı her bir kuyucuğa sırasıyla ilave edilerek inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonrasında, bağlanmamış bileşenler yıkama işlemleriyle uzaklaştırılır. Ardından her kuyucuğa substrat çözeltisi eklenir. Yalnızca sıçan AMH, biyotinli tespit antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklarda enzim-substrat reaksiyonu sonucunda mavi renk oluşur. Reaksiyonun durdurma çözeltisi ile sonlandırılmasıyla birlikte renk sarıya dönüşür. Oluşan renk yoğunluğu, 450 nm ± 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Ölçülen optik yoğunluk (OD) değeri, numunedeki sıçan AMH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Numunelerdeki AMH düzeyleri, elde edilen OD değerlerinin standart eğri ile karşılaştırılması yoluyla hesaplanır.

Çalışmada kullanıacak RAT FSH ELISA KİT'inin (Elabscience - katolog no: E-EL-R3022) çalışma prensibi; sandviç ELISA prensibine dayalı olarak çalışmaktadır. Kit kapsamında yer alan mikro ELISA plakası, sıçan FSH'a özgü bir antikor ile önceden kaplanmıştır. Standart çözeltiler veya analiz edilecek numuneler mikro plaka kuyucuklarına eklenerek, hedef antijenin bu özgül antikor ile bağlanması sağlanır. Bunu takiben, sıçan FSH'ye özgü biyotin ile işaretlenmiş tespit antikoru ve Avidin–HRP konjugatı her bir kuyucuğa ardışık olarak ilave edilir ve uygun koşullarda inkübe edilir. İnkübasyon süresi sonunda, bağlanmamış ve serbest bileşenler yıkama adımları ile uzaklaştırılır. Daha sonra her kuyucuğa substrat çözeltisi eklenir. Sadece sıçan FSH, biyotinli tespit antikoru ve Avidin-HRP konjugatı içeren kuyucuklarda enzim-substrat reaksiyonu sonucunda mavi renk oluşur. Reaksiyon, durdurma çözeltisinin eklenmesiyle sonlandırılır ve renk sarıya dönüşür. Oluşan renk yoğunluğu, 450 nm ± 2 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülür. Elde edilen OD değerleri, numunedeki sıçan FSH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Numunelerdeki FSH düzeyleri, OD değerlerinin standart eğri ile karşılaştırılması yoluyla hesaplanır.

### 3.2.4. Kolorimetrik Test

TAS seviyeleri, ticari olarak temin edilebilen kitler (Relassay, Türkiye, katolog no: RL0017) kullanılarak ölçülmüştür. Yeni otomatik yöntem, daha kararlı bir ABTS (2,2 ′ - Azino-bis (3-etilbenzotiyazolin-6-sülfonik asit)) radikal katyonunun karakteristik renginin antioksidanlar tarafından ağartılmasına dayanmaktadır. Analiz, %3'ten düşük mükemmel hassasiyet değerlerine sahiptir. Sonuçlar mmol Trolox eşdeğeri/L olarak ifade edilmiştir.

TOS seviyeleri, ticari olarak temin edilebilen kitler (Relassay, Türkiye, katolog no: RL0024) kullanılarak ölçülmüştür. Yeni yöntemde, örnekte bulunan oksidanlar, demir (II) iyonu-o-dianisidin kompleksini demir (III) iyonuna oksitlemiştir. Oksidasyon reaksiyonu, reaksiyon ortamında bol miktarda bulunan gliserol molekülleri tarafından artırılmıştır. Demir (III) iyonu, asidik ortamda ksilenol turuncu ile renkli bir kompleks oluşturmuştur. Spektrofotometrik olarak ölçülebilen renk yoğunluğu, örnekte bulunan toplam oksidan molekülü miktarıyla ilişkilidir. Analiz, hidrojen peroksit ile kalibre edilmiş ve sonuçlar mikromolar hidrojen peroksit eşdeğeri/litre (μmol H2O2 eşdeğeri/L) cinsinden ifade edilmiştir.

### 3.2.5. Oksidatif Stres İndeksi Hesaplaması

TAS mmol Trolox eşdeğeri/L, TOS ise μmol $H_2O_2$ eşdeğeri/L cinsinden ifade edilmiştir ve bu iki parametreden OSI şu formül ile hesaplanmıştır;

OSI (arbitrar birim) = (TOS [μmol $H_2O_2$ eşd. /L] / TAS [mmol Trolox eşd. /L]) ×100

## 3.3. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

Over dokularının histolopatolojik inceleme için %10'luk formaldehit ile fiksasyonu yapıldı. Ardından dokular dik olacak şekilde parafin bloklara gömülerek mikrotom cihazıyla 3 mikrometre kalınlığında 550 mikrometre aralıklar olacak şekilde 10 kesit alındı. Alınan kesitler hematoksilen&eozin ile boyandı. Işık mikroskobunda (ZEISS Axio Scope A1) kesitlerde primordiyal, primer, sekonder, tersiyer(antral) foliküllerin toplam sayımı yapıldı. Foliküller aşağıda verilen tablodaki kriterlere göre tanımlandı ve sayıldı;

**Tablo 1:** Foliküllerin adlandırılması

| | |
|---|---|
| Primordial Folikül | Oosit etrafında tek katlı yassı granüloza hücreleri ile çevrili foliküller |
| Primer Folikül | Oosit etrafında tek katlı kübik granüloza hücreleri ile çevrili foliküller |
| Sekonder Folikül | Oosit tek tabakadan fazla kübik granüloza hücreleri ile çevrili ve antral boşluğu bulunmayan foliküller |
| Antral (Graaf) Folikül | Oositin etrafı çok katlı kübik granüloza hücreleriyle çevrili, antrum boşluğu ve muhtemelen kumulus ooforus, teka tabakası bulunan foliküller |

### 3.4. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada istatistiksel analizler NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007 Statistical Software (Utah, USA) paket programı ile yapılmıştır.

Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotların (ortalama, standart sapma, median, interquartil range) yanı sıra Shapiro-Wilk normallik testi ile değişkenlerin dağılımına bakılmış, normal dağılım gösteren değişkenlerin zaman karşılaştırmalarında eşlendirilmiş tek yönlü varyans analizi, alt grup karşılaştırmalarında Newman Keuls çoklu karşılaştırma testi, gruplar arası karşılaştırmalarında tek yönlü varyans analizi, alt grup karşılaştırmalarında Tukey çoklu karşılaştırma testi, normal dağılım göstermeyen değişkenlerin zaman karşılaştırmalarında Friedman Testi, alt grup karşılaştırmalarında Dunn's çoklu karşılaştırma testi, gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi, alt grup karşılaştırmalarında Dunn's çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Sonuçlar, anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

# 4. BULGULAR

## 4.1. DENEY HAYVANLARININ VÜCUT AĞIRLIKLARI

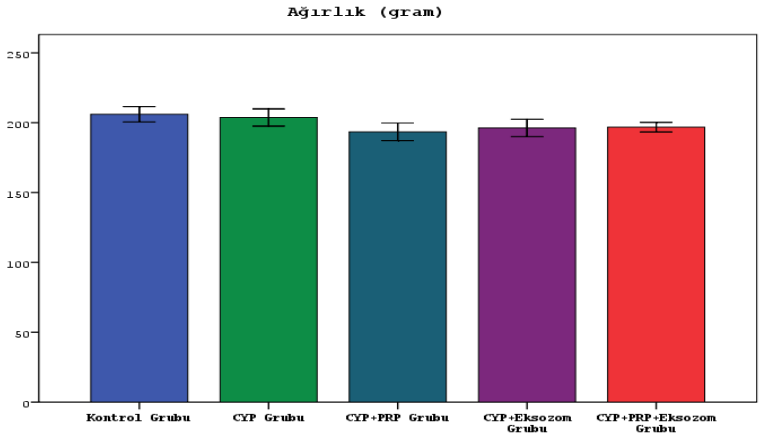
**Tablo 2:** Deney gruplarının farklı zaman noktalarındaki vücut ağırlıklarının tek yönlü varyans analizi ile karşılaştırılması

| **Ağırlık (gr)** | | T0 | T1 | T2 |
|---|---|---|---|---|
| **Kontrol Grubu (n=8)** | Ort±SS | 198,13±11,93 | 211,88±13,08 | 208,13±11,63 |
| **CYP Grubu (n=8)** | Ort±SS | 191,25±18,27 | 205±24,79 | 205±12,82 |
| **CYP+PRP Grubu (n=7)** | Ort±SS | 197,14±9,51 | 206±20,00 | 200,71±15,66 |
| **CYP+Eksozom Grubu (n=8)** | Ort±SS | 192,5±13,63 | 199,5±17,11 | 201,75±11,88 |
| **CYP+PRP+Eksozom Grubu (n=8)** | Ort±SS | 189,38±14,99 | 195,5±14,39 | 200,13±11,32 |
| **p*** | | 0,098 | 0,257 | 0,385 |

*Tek yönlü varyans analizi

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Deney süresince tüm gruplara ait vücut ağırlıkları T0, T1 ve T2 zaman noktalarında değerlendirilmiştir. Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom gruplarının T0, T1 ve T2 vücut ağırlık ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (T0: p=0,098; T1: p=0,257; T2: p=0,385; Tek Yönlü Varyans Analizi). Bu bulgu, deney süresince gruplar arasında sistemik ağırlık değişikliği açısından homojenitenin korunduğunu göstermektedir.




**Şekil 4.1:** Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom gruplarında vücut ağırlıkları (Ort±SS)

## 4.2. OVARYAN HİSTOLOJİK BULGULAR

**Tablo 3:** Deney gruplarında over dokusuna ait histolojik folikül sayımlarının (primordial, primer, sekonder ve antral) karşılaştırılması

| | | Primordial Folikül | Primer Folikül | Sekonder Folikül | Antral Folikül |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrol Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 46±16,45 | 24,75±11,37 | 33,50±10,13 | 9,88±5,67 |
| | **Median (IQR)** | 49,5 (33-58,25) | 23,5 (15,25-32) | 34,5 (23,75-43,25) | 9,5 (5-13,5) |
| **CYP Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 29,13±8,25 | 21,5±4,38 | 38,38±4,34 | 3,00±1,51 |
| | **Median (IQR)** | 29 (21,5-35,75) | 21 (17,75-26,25) | 36 (36-41,5) | 3 (2-3,75) |
| **CYP+PRP Grubu (n=7)** | **Ort±SS** | 42,43±10,25 | 26,43±5,03 | 44,14±14,02 | 8,43±3,78 |
| | **Median (IQR)** | 38 (34-51) | 27 (26-31) | 48 (32-58) | 9 (4-12) |
| **CYP+Eksozom Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 47,88±11,78 | 31,75±9,25 | 48,13±12,8 | 6,50±2,93 |
| | **Median (IQR)** | 50,5 (39,75-55,5) | 31 (25-40) | 47 (36,75-59,75) | 6 (3,5-9) |
| **CYP+PRP+Eksozom Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 57,00±21,02 | 34,38±15,66 | 44,88±13,08 | 8,63±4,14 |
| | **Median (IQR)** | 58 (37,5-75,5) | 31,5 (20,5-43,75) | 45,5 (31,25-56,5) | 8,5 (4,25-12,75) |
| **P*** | | **0,016** | 0,101 | 0,166 | **0,009** |

***Kruskal Wallis testi**
Veriler ortalama ± standart sapma (Ort±SS) ve medyan (interquartile range, IQR) olarak sunulmuştur.

### 4.2.1. Primordial Folikül Sayıları

Gruplar arasında primordial folikül sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0,016; Kruskal Wallis testi). Yapılan Dunn's çoklu karşılaştırma testi sonucunda, CYP grubunun primordial folikül sayılarının kontrol, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir (sırasıyla p=0,031; p=0,017; p=0,007; p=0,009). Tedavi grupları ile kontrol grubu arasında primordial folikül sayıları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0,05).

**Tablo 4:** Kontrol ve deney grupları arasında primordial folikül sayılarının Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması

| Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi | Primordial Folikül |
|---|---|
| **Kontrol Grubu / CYP Grubu** | **0,031** |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP Grubu** | 0,685 |
| **Kontrol Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,874 |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,246 |
| **CYP Grubu / CYP+PRP Grubu** | **0,017** |
| **CYP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | **0,007** |
| **CYP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | **0,009** |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,297 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,182 |
| **CYP+Eksozom Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,226 |

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Dunn's çoklu karşılaştırma testi, Kruskal–Wallis testi sonrası post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.

### 4.2.2. Primer Folikül Sayıları

Primer folikül sayıları bakımından kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır. (p=0,101; Kruskal Wallis testi-).

### 4.2.3. Sekonder Folikül Sayıları

Sekonder folikül sayıları incelendiğinde, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p=0,166; Kruskal Wallis testi).

### 4.2.4. Antral Folikül Sayıları

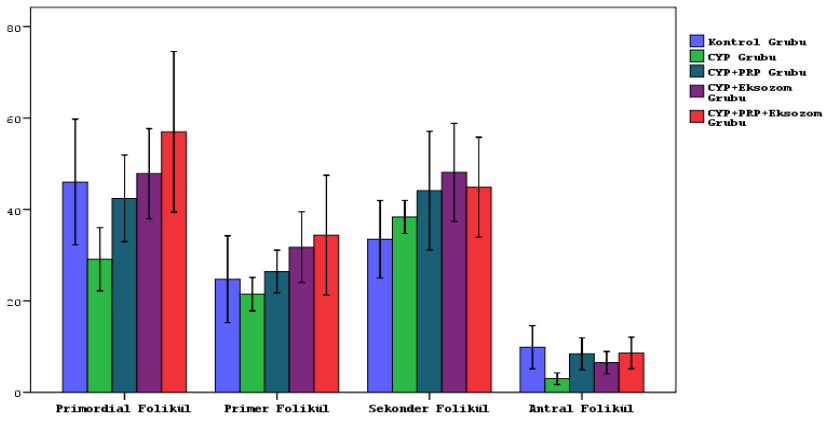
Antral folikül sayıları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (p=0,009; Kruskal Wallis testi). Dunn's çoklu karşılaştırma testine göre CYP grubunun antral folikül sayılarının kontrol, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olduğu belirlenmiştir (sırasıyla p=0,010; p=0,007; p=0,014; p=0,003). Diğer gruplar arasında antral folikül sayıları açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır (p>0,05).

**Tablo 5:** Kontrol ve deney grupları arasında antral folikül sayılarının Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması

| Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi | Antral Folikül |
|---|---|
| **Kontrol Grubu / CYP Grubu** | **0,01** |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP Grubu** | 0,684 |
| **Kontrol Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,206 |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,792 |
| **CYP Grubu / CYP+PRP Grubu** | **0,007** |
| **CYP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | **0,014** |
| **CYP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | **0,003** |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,294 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,771 |
| **CYP+Eksozom Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,268 |

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Dunn's çoklu karşılaştırma testi, Kruskal–Wallis testi sonrası post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.




**Şekil 4.2:** Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom gruplarında primordial, primer, sekonder ve antral folikül sayıları (Ort±SS)

### 4.3. SERUM AMH BULGULARI

**Tablo 6:** Deney gruplarında zaman içinde serum AMH düzeylerindeki değişimin karşılaştırılması

| AMH (pg/ml) | | T0 | T1 | T2 | p† |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrol Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 1629,32±565,11 | 1479,31±154,77 | 1337,79±257,97 | 0,882 |
| | **Median (IQR)** | 1533,11 (1155,98-2045,6) | 1475,65 (1348,49-1550,55) | 1357,63 (1209,67-1552,14) | |
| **CYP Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 1399,11±650,66 | 704,97±409,32 | 871,74±279,65 | **0,009** |
| | **Median (IQR)** | 1314,77 (824,75-2003,93) | 666,14 (355,1-1065,66) | 824,36 (650,74-1150,13) | |
| **CYP+PRP Grubu (n=7)** | **Ort±SS** | 1420,76±677,19 | 764,34±282,21 | 2071,93±414,79 | **0,004** |
| | **Median (IQR)** | 1214,36 (1015,18-1738,69) | 835,89 (559,68-972,32) | 2176,7 (1683,29-2448,5) | |
| **CYP+Eksozom Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 1928,46±453,95 | 866,2±370,37 | 2821,7±729,86 | **0,002** |
| | **Median (IQR)** | 1963,12 (1463,16-2247,82) | 810,75 (554-1192,39) | 3007,67 (2005,15-3417,12) | |
| **CYP+PRP+ Eksozom Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 1603,05±397,53 | 816,96±372,05 | 2047,2±420,43 | **0,005** |
| | **Median (IQR)** | 1459,31 (1321,26-1763,64) | 762,39 (485,81-1094,47) | 2051,56 (1602,02-2427,14) | |
| **p‡** | | 0,271 | **0,003** | **0,0001** | |

**‡Kruskal Wallis testi †Friedman testi**
Veriler ortalama ± standart sapma (Ort±SS) ve medyan (interquartile range, IQR) olarak sunulmuştur.
*p: Kruskal–Wallis testi (gruplar arası karşılaştırma), †p: Friedman testi (grup içi zaman karşılaştırması).

#### 4.3.1.Gruplar Arası Karşılaştırmalar

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T0 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,271).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T1 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,003). Kontrol grubunun T1 AMH (pg/ml) ortalamaları CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T1 AMH (pg/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,003, p=0,001), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T2 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,003). Kontrol grubunun T2 AMH (pg/ml) ortalamaları CYP Grubunun T2 AMH (pg/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,005), Kontrol grubunun T2 AMH (pg/ml) ortalamaları CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T2 AMH (pg/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,001), CYP+Eksozom grubunun T2 AMH (pg/ml) ortalamaları CYP+PRP+Eksozom Grubunun T2 AMH (pg/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,036), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

**Tablo 7:** Kontrol ve deney grupları arasında T1 ve T2 zaman noktalarında serum AMH düzeylerinin Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması

| Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi | T1 | T2 |
|---|---|---|
| **Kontrol Grubu / CYP Grubu** | **0,002** | **0,005** |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP Grubu** | **0,001** | **0,008** |
| **Kontrol Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | **0,003** | **0,001** |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | **0,003** | **0,006** |
| **CYP Grubu / CYP+PRP Grubu** | 0,602 | **0,001** |
| **CYP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,401 | **0,001** |
| **CYP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,345 | **0,001** |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,728 | 0,064 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,999 | 0,908 |
| **CYP+Eksozom Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,834 | **0,036** |

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Dunn's çoklu karşılaştırma testi, Kruskal–Wallis testi sonrası post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.

### 4.3.2. Zaman İçinde AMH Değişimleri

Kontrol Grubunun T0, T1 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,882).

CYP Grubunun T0, T1 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,009). T0 AMH (pg/ml) ortalamaları T1 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,018, p=0,047), T1 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,093).

CYP+PRP Grubunun T0, T1 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,004). T1 AMH (pg/ml) ortalamaları T0 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,018), T0 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,063).

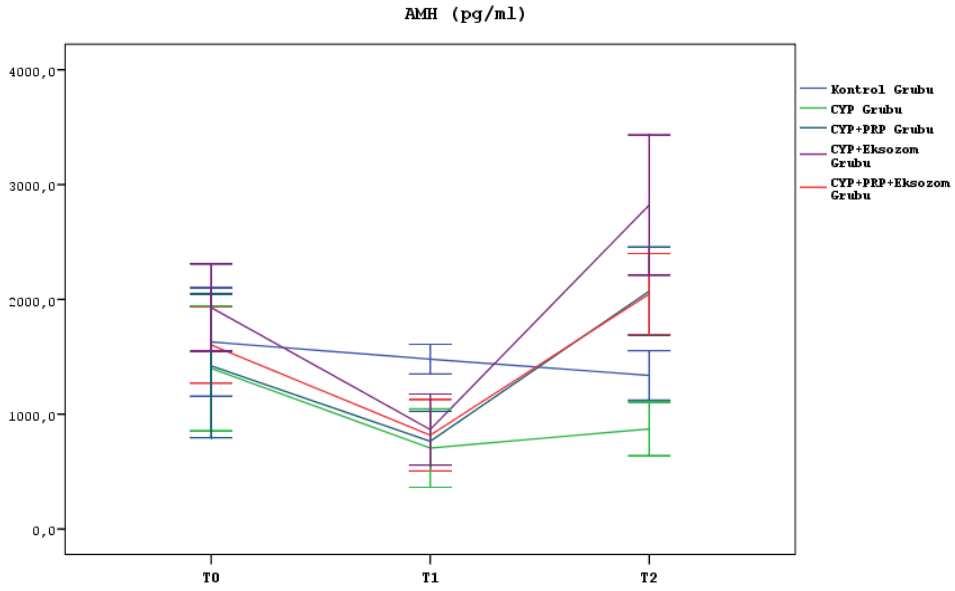
CYP+Eksozom Grubunun T0, T1 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,002). T2 AMH (pg/ml) ortalamaları T0 ve T1 AMH (pg/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,012, p=0,036), T0 AMH (pg/ml) ortalamaları T1 AMH (pg/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p=0,012).

CYP+PRP+Eksozom Grubunun T0, T1 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,005). T1 AMH (pg/ml) ortalamaları T0 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,017, p=0,012), T0 ve T2 AMH (pg/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,093).

**Tablo 8:** Deney gruplarında serum AMH düzeylerinin T0, T1 ve T2 zaman noktaları arasındaki grup içi karşılaştırmaları için Dunn's çoklu karşılaştırma testi sonuçları

| Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi | CYP Grubu (n=8) | CYP+PRP Grubu (n=7) | CYP+Eksozom Grubu (n=8) | CYP+PRP+Eksozom Grubu (n=8) |
|---|---|---|---|---|
| **T0 / T1** | **0,018** | **0,018** | **0,012** | **0,017** |
| **T0 / T2** | **0,047** | 0,063 | **0,036** | 0,093 |
| **T1 / T2** | 0,093 | **0,018** | **0,012** | **0,012** |

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.
Dunn's çoklu karşılaştırma testi, Friedman testi sonrası post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.




**Şekil 4.3:** Kontrol ve deney gruplarında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında serum AMH (pg/ml) düzeylerinin değişimi

### 4.4. SERUM FSH BULGULARI

**Tablo 9:** Deney gruplarında zaman içinde serum FSH düzeylerindeki değişimin karşılaştırılması

| FSH (ng/ml) | | T0 | T1 | T2 | p† |
|---|---|---|---|---|---|
| Kontrol Grubu (n=8) | Ort±SS | 65,88±43,22 | 36,78±30,3 | 22,66±30,07 | **0,044** |
| | Median (IQR) | 72,36 (19,04-108,1) | 24,3 (18,07-55,76) | 9,07 (6,75-25,84) | |
| CYP Grubu (n=8) | Ort±SS | 35,9±23,67 | 9,9±8,88 | 48,3±50,93 | **0,030** |
| | Median (IQR) | 39,01 (10,74-56,64) | 7,46 (4,37-10,74) | 31,92 (18,29-53,85) | |
| CYP+PRP Grubu (n=7) | Ort±SS | 40,77±40,48 | 11,79±9,56 | 55,32±27,34 | **0,018** |
| | Median (IQR) | 24,08 (16,69-62,74) | 7,17 (4,32-22,87) | 44,09 (28,32-85,12) | |
| CYP+Eksozom Grubu (n=8) | Ort±SS | 59,7±34,89 | 23,95±19,06 | 70,48±38,09 | **0,035** |
| | Median (IQR) | 57,05 (29,85-93,13) | 20,68 (6,66-44,73) | 57,24 (39,97-111,67) | |
| CYP+PRP+ Eksozom Grubu (n=8) | Ort±SS | 29,17±20,05 | 13,36±6,96 | 57,61±52,03 | **0,030** |
| | Median (IQR) | 29,97 (10,6-36,52) | 12,6 (7,49-20,13) | 42,22 (18,45-87,46) | |
| p‡ | | 0,249 | 0,104 | **0,030** | |

**‡Kruskal Wallis testi †Friedman testi**
Veriler ortalama ± standart sapma (Ort±SS) ve medyan (interquartile range, IQR) olarak sunulmuştur.
*p: Kruskal–Wallis testi (gruplar arası karşılaştırma), †p: Friedman testi (grup içi zaman karşılaştırması).

### 4.4.1. Gruplar Arası Karşılaştırmalar

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T0 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,249).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T1 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,104).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,030). Kontrol grubunun T2 FSH (ng/ml) ortalamaları CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T2 FSH (ng/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,012, p=0,036), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

**Tablo 10:** Kontrol ve deney grupları arasında T2 zaman noktasında serum FSH düzeylerinin Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması

| Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi | T2 |
|---|---|
| **Kontrol Grubu / CYP Grubu** | **0,027** |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP Grubu** | **0,021** |
| **Kontrol Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | **0,012** |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | **0,036** |
| **CYP Grubu / CYP+PRP Grubu** | 0,298 |
| **CYP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,115 |
| **CYP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,713 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,418 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,643 |
| **CYP+Eksozom Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,345 |

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Dunn's çoklu karşılaştırma testi, Kruskal–Wallis testi sonrası post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.

### 4.4.2. Zaman İçinde FSH Değişimleri

Kontrol Grubunun T0, T1 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,044). T0 FSH (ng/ml) ortalamaları T1 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,043), T1 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,208).

CYP Grubunun T0, T1 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,030). T1 FSH (ng/ml) ortalamaları T0 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,017, p=0,025), T0 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,779).

CYP+PRP Grubunun T0, T1 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,018). T1 FSH (ng/ml) ortalamaları T0 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,049, p=0,018), T0 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,499).

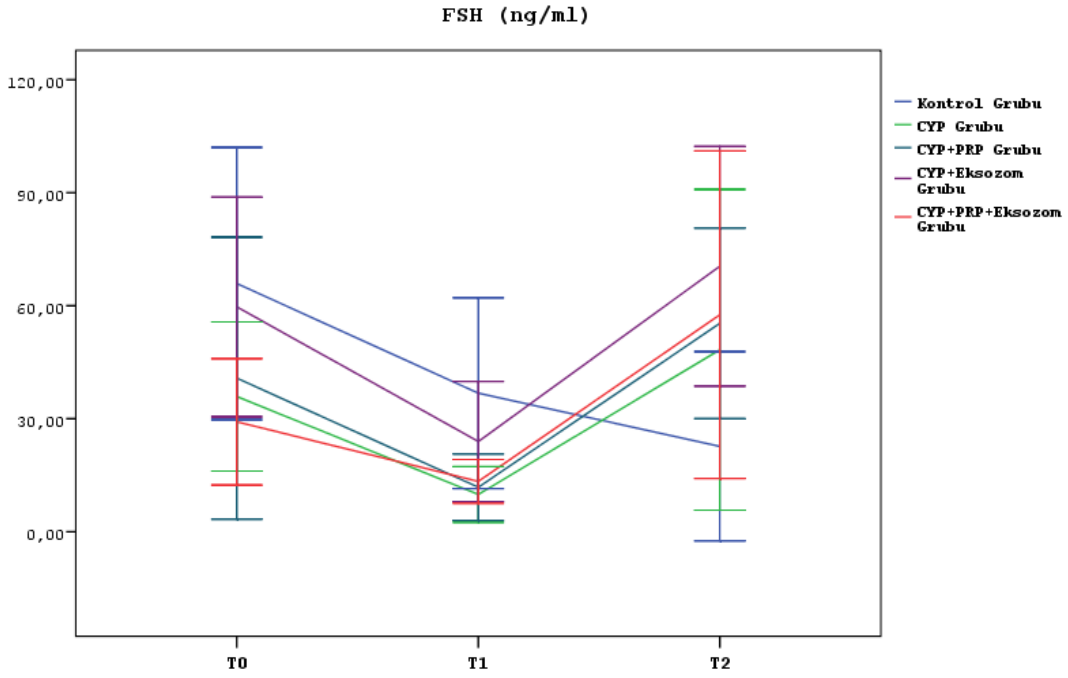
CYP+Eksozom Grubunun T0, T1 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,035). T1 FSH (ng/ml) ortalamaları T0 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,036, p=0,012), T0 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,998).

CYP+PRP+Eksozom Grubunun T0, T1 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,030). T1 FSH (ng/ml) ortalamaları T0 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,036, p=0,017), T0 ve T2 FSH (ng/ml) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,093).

**Tablo 11:** Deney gruplarında serum FSH düzeylerinin T0, T1 ve T2 zaman noktaları arasındaki grup içi karşılaştırmaları için Dunn's çoklu karşılaştırma testi sonuçları

| Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi | Kontrol Grubu (n=8) | CYP Grubu (n=8) | CYP+PRP Grubu (n=7) | CYP+Eksozom Grubu (n=8) | CYP+PRP+ Eksozom Grubu (n=8) |
|---|---|---|---|---|---|
| **T0 / T1** | **0,043** | **0,017** | **0,049** | **0,036** | **0,036** |
| **T0 / T2** | **0,043** | 0,779 | 0,499 | 0,998 | 0,093 |
| **T1 / T2** | 0,208 | **0,025** | **0,018** | **0,012** | **0,017** |

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.
Dunn's çoklu karşılaştırma testi, Friedman testi sonrası post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.




**Şekil 4.4:** Kontrol ve deney gruplarında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında serum FSH (ng/ml) düzeylerinin değişimi

## 4.5. OKSİDATİF STRES BULGULARI

### 4.5.1 TAS DÜZEYİ

**Tablo 12:** Deney gruplarında zaman içinde serum TAS düzeylerindeki değişimin değerlendirilmesi

| **TAS (mmol/L)** | | **T0** | **T1** | **T2** | **p#** |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrol Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 2,41±0,33 | 2,21±0,15 | 2,19±0,13 | 0,102 |
| **CYP Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 2,22±0,12 | 2,10±0,28 | 2,15±0,29 | 0,679 |
| **CYP+PRP Grubu (n=7)** | **Ort±SS** | 2,02±0,11 | 1,86±0,22 | 2,01±0,14 | 0,214 |
| **CYP+Eksozom Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 2,19±0,12 | 2,13±0,21 | 2,11±0,35 | 0,727 |
| **CYP+PRP+Eksozom Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 2,06±0,10 | 1,88±0,12 | 2,10±0,21 | **0,027** |
| **p*** | | **0,001** | **0,004** | 0,653 | |

***Tek Yönlü Varyans Analizi (ANOVA) #Eşlendirilmiş Tek Yönlü Varyans Analizi**
Veriler ortalama ± standart sapma (Ort±SS) olarak sunulmuştur.
*p: tek yönlü varyans analizi (gruplar arası karşılaştırma), #p: eşlendirilmiş tek yönlü varyans analizi (grup içi zaman karşılaştırması).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T0 TAS (mmol/L) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,001). Kontrol grubunun T0 TAS (mmol/L) ortalamaları CYP+PRP ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T0 TAS (mmol/L) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,002, p=0,004), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T1 TAS (mmol/L) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,004). Kontrol grubunun T1 TAS (mmol/L) ortalamaları CYP+PRP ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T1 TAS (mmol/L) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,015, p=0,019), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T2 TAS (mmol/L) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,653).

**Tablo 13:** Kontrol ve deney grupları arasında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında serum TAS düzeylerinin Tukey çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması

| Tukey Çoklu Karşılaştırma testi | T0 | T1 | T2 |
|---|---|---|---|
| **Kontrol Grubu / CYP Grubu** | 0,231 | 0,812 | 0,996 |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP Grubu** | **0,002** | **0,015** | 0,569 |
| **Kontrol Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,140 | 0,938 | 0,960 |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | **0,004** | **0,019** | 0,944 |
| **CYP Grubu / CYP+PRP Grubu** | 0,228 | 0,165 | 0,775 |
| **CYP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,999 | 0,998 | 0,998 |
| **CYP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,435 | 0,209 | 0,995 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,349 | 0,089 | 0,914 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,989 | 0,999 | 0,934 |
| **CYP+Eksozom Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,600 | 0,113 | 0,999 |

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tukey çoklu karşılaştırma testi, tek yönlü varyans analizi (ANOVA) sonrası post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom Gruplarının T0, T1 ve T2 TAS (mmol/L) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (sırasıyla; p=0,102, p=0,679, p=0,214, p=0,727).

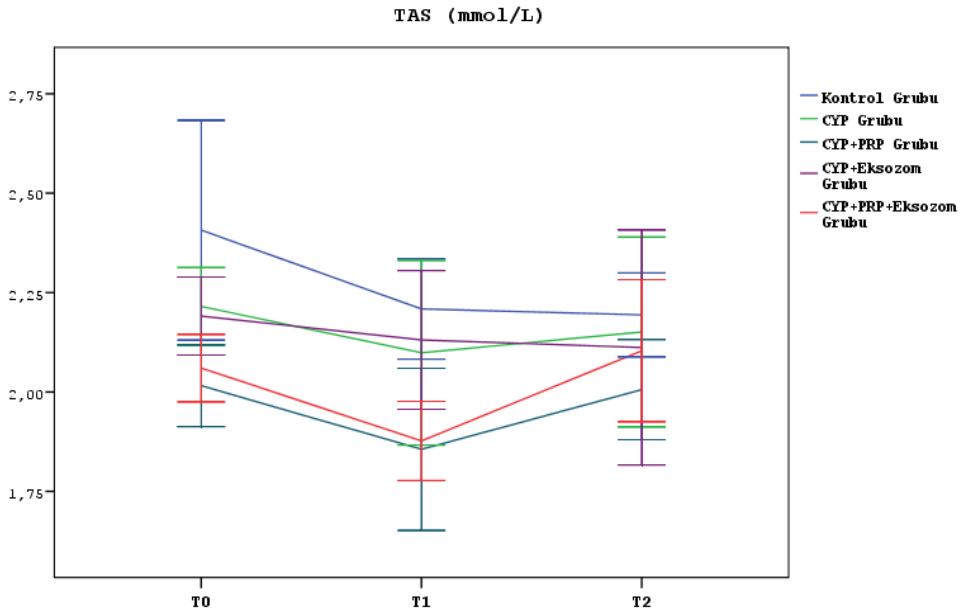
CYP+PRP+Eksozom Grubunun T0, T1 ve T2 TAS (mmol/L) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmiştir (p=0,027). T1 TAS (mmol/L) ortalamaları T0 ve T2 TAS (mmol/L) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,028, p=0,018), T0 ve T2 TAS (mmol/L) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (p=0,643).

**Tablo 14:** CYP+PRP+Eksozom grubunda serum TAS düzeylerinin zamana bağlı değişimi için Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi sonuçları

| Newman Keuls Çoklu Karşılaştırma testi | CYP+PRP+Eksozom Grubu |
|---|---|
| **T0 / T1** | **0,018** |
| **T0 / T2** | 0,643 |
| **T1 / T2** | **0,028** |

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Newman–Keuls çoklu karşılaştırma testi, grup içi zaman karşılaştırmaları için post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.




**Şekil 4.5:** Kontrol ve deney gruplarında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında serum TAS (mmol/L) düzeylerinin değişimi

### 4.5.2. TOS DÜZEYİ

Tablo 15: Deney gruplarında zaman içinde serum TOS düzeylerindeki değişimin değerlendirilmesi

| TOS (µmol/L) | | T0 | T1 | T2 | p† |
|---|---|---|---|---|---|
| Kontrol Grubu (n=8) | Ort±SS | 9,80±4,58 | 4,21±2,81 | 7,31±5,08 | 0,223 |
| | Median (IQR) | 8,89 (5,76-14,44) | 2,77 (2,1-7,41) | 7,47 (2,26-11,05) | |
| CYP Grubu (n=8) | Ort±SS | 10,81±3,39 | 5,78±3,74 | 5,99±3,83 | 0,072 |
| | Median (IQR) | 11,84 (7,37-13,24) | 4,73 (3,16-8,34) | 5,09 (3,15-7,18) | |
| CYP+PRP Grubu (n=7) | Ort±SS | 5,15±2,44 | 8,66±5,21 | 5,94±3,29 | 0,180 |
| | Median (IQR) | 4,64 (3,33-7,87) | 7,51 (3,42-11,59) | 5,88 (2,95-8,67) | |
| CYP+Eksozom Grubu (n=8) | Ort±SS | 7,86±4,47 | 9,57±8,85 | 10,16±6,3 | 0,607 |
| | Median (IQR) | 6,82 (4,22-10,4) | 6,9 (2,57-18,4) | 8 (6,33-14,81) | |
| CYP+PRP+ Eksozom Grubu (n=8) | Ort±SS | 9,04±2,8 | 4,41±4,39 | 8,46±5,61 | 0,072 |
| | Median (IQR) | 9,22 (8,05-10,93) | 3,59 (1,2-5,96) | 7,8 (3,31-14,22) | |
| p‡ | | **0,039** | 0,236 | 0,645 | |

**‡Kruskal Wallis testi †Friedman testi**
Veriler ortalama ± standart sapma (Ort±SS) ve medyan (interquartile range, IQR) olarak sunulmuştur.
*p: Kruskal–Wallis testi (gruplar arası karşılaştırma), †p: Friedman testi (grup içi zaman karşılaştırması).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom, CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T0, T1 ve T2 TOS (µmol/L) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı değişim gözlenmemiştir (sırayla; p=0,223, p=0,072, p=0,182, p=0,607, p=0,072).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T0 TOS (µmol/L) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,039). CYP+PRP grubunun T0 TOS (µmol/L) ortalamaları Kontrol, CYP ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T0 TOS (µmol/L) ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,037, p=0,005), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T1 TOS (µmol/L) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,236).

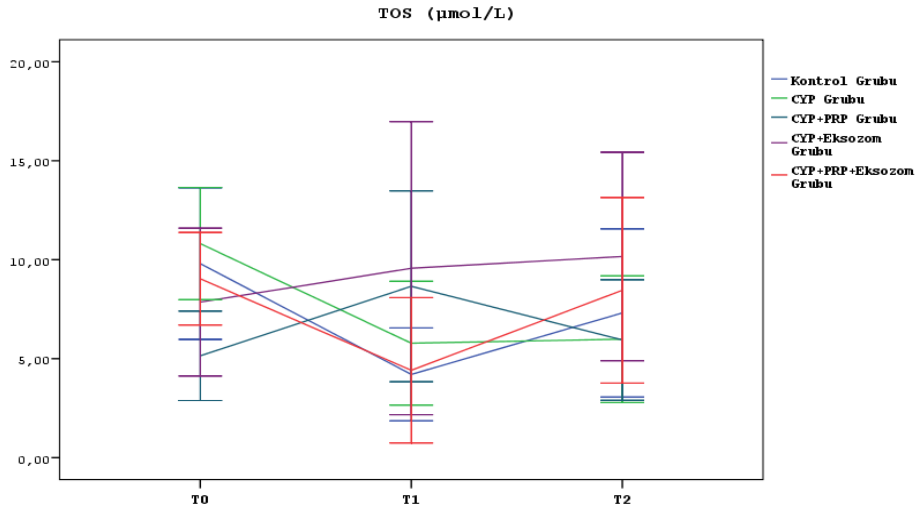
Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T2 TOS (µmol/L) ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,645).

**Tablo 16:** Kontrol ve deney grupları arasında T0 zaman noktasında serum TOS düzeylerinin Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması

| **Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi** | **T0** |
|---|---|
| **Kontrol Grubu / CYP Grubu** | 0,916 |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP Grubu** | **0,037** |
| **Kontrol Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,529 |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,834 |
| **CYP Grubu / CYP+PRP Grubu** | **0,005** |
| **CYP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,074 |
| **CYP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,115 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,105 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | **0,037** |
| **CYP+Eksozom Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,401 |

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Dunn's çoklu karşılaştırma testi, Kruskal–Wallis testi sonrası post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.




**Şekil 4.6:** Kontrol ve deney gruplarında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında serum TOS (µmol/L) düzeylerinin değişimi

### 4.5.3. OSI DÜZEYİ

**Tablo 17:** Deney gruplarında zaman içinde OSI düzeylerindeki değişimin değerlendirilmesi

| OSI | | T0 | T1 | T2 | p† |
|---|---|---|---|---|---|
| **Kontrol Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 0,52±0,43 | 0,19±0,12 | 0,33±0,23 | |
| | **Median (IQR)** | 0,42 (0,26-0,56) | 0,13 (0,1-0,31) | 0,33 (0,1-0,51) | 0,093 |
| **CYP Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 0,49±0,14 | 0,27±0,17 | 0,28±0,16 | |
| | **Median (IQR)** | 0,55 (0,34-0,58) | 0,22 (0,14-0,39) | 0,23 (0,16-0,37) | **0,030** |
| **CYP+PRP Grubu (n=7)** | **Ort±SS** | 0,26±0,13 | 0,47±0,28 | 0,3±0,17 | |
| | **Median (IQR)** | 0,22 (0,17-0,42) | 0,36 (0,18-0,77) | 0,28 (0,16-0,44) | 0,066 |
| **CYP+Eksozom Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 0,36±0,2 | 0,43±0,36 | 0,47±0,27 | |
| | **Median (IQR)** | 0,29 (0,2-0,47) | 0,33 (0,13-0,79) | 0,42 (0,3-0,77) | 0,607 |
| **CYP+PRP+ Eksozom Grubu (n=8)** | **Ort±SS** | 0,44±0,13 | 0,23±0,23 | 0,4±0,25 | |
| | **Median (IQR)** | 0,46 (0,41-0,52) | 0,19 (0,07-0,31) | 0,38 (0,18-0,64) | 0,075 |
| **p‡** | | **0,041** | 0,154 | 0,498 | |

**‡Kruskal Wallis testi †Friedman testi**

Veriler ortalama ± standart sapma (Ort±SS) ve medyan (interquartile range, IQR) olarak sunulmuştur. *p: Kruskal–Wallis testi (gruplar arası karşılaştırma), †p: Friedman testi (grup içi zaman karşılaştırması).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T0 OSI ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,041). CYP+PRP grubunun T0 OSI ortalamaları Kontrol, CYP ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T0 OSI ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,044, p=0,005), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının T1 ve T2 OSI ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla; p=0,154 ve p=0,498).

**Tablo 18:** Kontrol ve deney grupları arasında T0 zaman noktasında OSI değerlerinin Dunn's çoklu karşılaştırma testi ile ikili karşılaştırılması

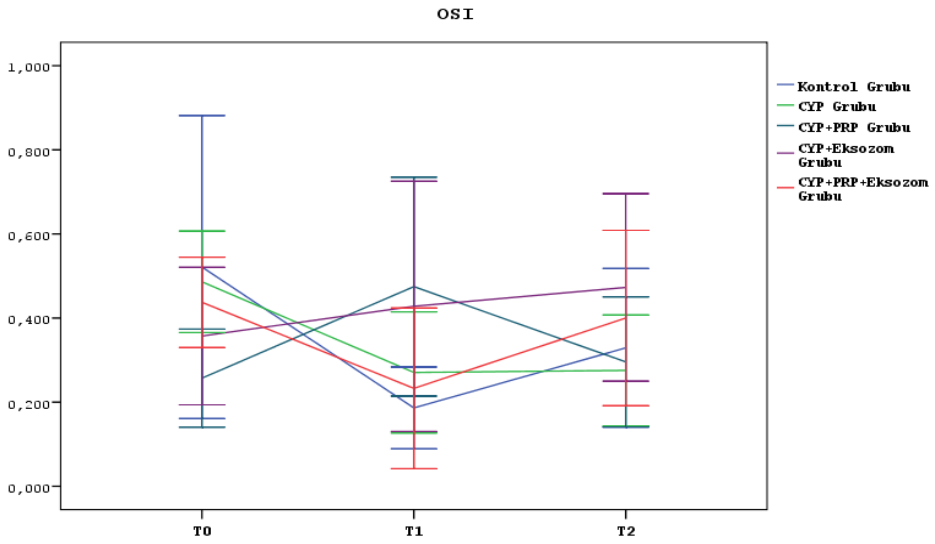
| **Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi** | **T0** |
|---|---|
| **Kontrol Grubu / CYP Grubu** | 0,401 |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP Grubu** | **0,044** |
| **Kontrol Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,294 |
| **Kontrol Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,834 |
| **CYP Grubu / CYP+PRP Grubu** | **0,005** |
| **CYP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,093 |
| **CYP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,172 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+Eksozom Grubu** | 0,203 |
| **CYP+PRP Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | **0,028** |
| **CYP+Eksozom Grubu / CYP+PRP+Eksozom Grubu** | 0,401 |

p<0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.
Dunn's çoklu karşılaştırma testi, Kruskal–Wallis testi sonrası post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.

**Tablo 19:** CYP grubunda OSI değerlerinin T0, T1 ve T2 zaman noktaları arasındaki grup içi karşılaştırmaları için Dunn's çoklu karşılaştırma testi sonuçları

| **Dunn's Çoklu Karşılaştırma testi** | **CYP Grubu** |
|---|---|
| **T0 / T1** | **0,049** |
| **T0 / T2** | **0,036** |
| **T1 / T2** | 0,674 |

p <0,05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.
Dunn's çoklu karşılaştırma testi, Friedman testi sonrası post-hoc analiz olarak uygulanmıştır.




**Şekil 4.7:** Kontrol ve deney gruplarında T0, T1 ve T2 zaman noktalarında OSI değerlerinin değişimi

### 4.6. DEĞİŞİM ANALİZLERİ

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT1-T0 AMH ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,018). Kontrol grubunun ΔT1-T0 AMH ortalamaları CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT1-T0 AMH ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,049, p=0,003), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT2-T0 AMH ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,018). Kontrol grubunun ΔT2-T0 AMH ortalamaları, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT2-T0 AMH ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,037, p=0,016), CYP grubunun ΔT2-T0 AMH ortalamaları, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT2-T0 AMH ortalamaları ΔT2-T0 AMH ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuş (p=0,021, p=0,002), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT1-T0 ve ΔT2-T0 FSH ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla p=0,821ve p=0,058).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT1-T0 ve ΔT2-T0 TAS ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (sırasıyla p=0,844 ve p=0,584).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT1-T0 TOS ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,024). CYP+PRP grubunun ΔT1-T0 TOS ortalamaları Kontrol, CYP ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT1-T0 TOS ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,011, p=0,005), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT2-T0 TOS ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,341).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT1-T0 OSI ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmiştir (p=0,029). CYP+PRP grubunun ΔT1-T0 OSI ortalamaları Kontrol, CYP ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT1-T0 OSI ortalamalarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuş (p=0,017, p=0,005), diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p>0,05).

Kontrol, CYP, CYP+PRP, CYP+Eksozom ve CYP+PRP+Eksozom Gruplarının ΔT2-T0 OSI ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir (p=0,256).

**Tablo 20:** Kontrol ve deney gruplarında serum AMH, FSH, TAS, TOS ve OSI değerlerinin T0'a göre değişimleri (ΔT1–T0, ΔT2–T0) ve gruplar arası karşılaştırılması

| | | | Kontrol Grubu (n=8) | CYP Grubu (n=8) | CYP+PRP Grubu (n=7) | CYP+Eksozom Grubu (n=8) | CYP+PRP+Eksozom Grubu (n=8) | p‡ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AMH | ΔT1-T0 | Ort±SS | -150,01±456,47 | -694,14±557,61 | -656,41±551,45 | -1062,26±440,55 | -786,09±536 | |
| | | Median (IQR) | -82,9 (-545,85-265,67) | -622,69 (-993,69--308,06) | -455,5 (-766,37--338,66) | -990,13 (-1553,06--680,9) | -915,8 (-1023,7--399,55) | **0,018** |
| | ΔT2-T0 | Ort±SS | -291,53±604,23 | -527,37±601 | 651,17±814,12 | 893,25±835,59 | 444,14±621,13 | |
| | | Median (IQR) | -190,3 (-748,85-102,77) | -436,51 (-1133,46--200,35) | 852,17 (-402,33-1433,32) | 1172,25 (-74,37-1463,82) | 375,38 (-32,51-1024,59) | **0,003** |
| FSH | ΔT1-T0 | Ort±SS | -29,11±39,4 | -26±23,81 | -28,98±39,78 | -35,75±42,9 | -15,81±16,23 | |
| | | Median (IQR) | -23,68 (-57,58-7,33) | -22,05 (-45,94--5,09) | -18,72 (-58,73--5,6) | -43,77 (-66,78-8,92) | -18,39 (-23,07--2,95) | 0,821 |
| | ΔT2-T0 | Ort±SS | -43,22±61,48 | 12,4±67,44 | 14,55±39,41 | 10,78±52,67 | 28,44±43,94 | |
| | | Median (IQR) | -63,93 (-87,79--11,97) | -9,37 (-32,48-37,6) | 8,86 (-18,65-62,08) | -2,11 (-32,13-32,6) | 24,6 (-11,53-73,94) | 0,058 |
| TAS | ΔT1-T0 | Ort±SS | -0,2±0,38 | -0,12±0,29 | -0,16±0,27 | -0,06±0,19 | -0,18±0,17 | |
| | | Median (IQR) | -0,06 (-0,63-0,16) | -0,01 (-0,45-0,14) | -0,07 (-0,52-0,03) | -0,06 (-0,11-0,03) | -0,22 (-0,33--0,06) | 0,844 |
| | ΔT2-T0 | Ort±SS | -0,21±0,3 | -0,06±0,31 | -0,01±0,24 | -0,08±0,35 | 0,05±0,25 | |
| | | Median (IQR) | -0,16 (-0,51-0,05) | -0,02 (-0,36-0,2) | -0,03 (-0,16-0,19) | -0,19 (-0,38-0,28) | 0,05 (-0,09-0,28) | 0,584 |
| TOS | ΔT1-T0 | Ort±SS | -9,35±12,32 | -5,03±5,54 | 3,51±5,91 | 1,71±10,65 | -4,63±3,89 | |
| | | Median (IQR) | -6,5 (-12,03--0,34) | -6,91 (-8,78--2,02) | 2,28 (0,54-8,26) | -0,34 (-5,89-9,64) | -5,56 (-7,67--2,67) | **0,024** |
| | ΔT2-T0 | Ort±SS | -6,24±17,17 | -4,83±4,12 | 0,8±4,38 | 2,3±7,96 | -0,58±7,28 | |
| | | Median (IQR) | -2,74 (-10,15-6,52) | -5,46 (-8,4--0,54) | -0,42 (-2,7-3,31) | 3,58 (-5,89-8,49) | -1,22 (-6,93-6,76) | 0,341 |
| OSI | ΔT1-T0 | Ort±SS | -0,34±0,38 | -0,21±0,25 | 0,22±0,3 | 0,07±0,44 | -0,21±0,22 | |
| | | Median (IQR) | -0,31 (-0,42--0,03) | -0,27 (-0,42--0,1) | 0,14 (0,03-0,46) | 0 (-0,27-0,38) | -0,24 (-0,36--0,12) | **0,029** |
| | ΔT2-T0 | Ort±SS | -0,19±0,6 | -0,21±0,2 | 0,04±0,23 | 0,12±0,34 | -0,04±0,32 | |
| | | Median (IQR) | -0,08 (-0,4-0,28) | -0,21 (-0,42--0,03) | -0,01 (-0,13-0,15) | 0,2 (-0,25-0,36) | -0,07 (-0,29-0,24) | 0,256 |

‡Kruskal Wallis testi

# 5. TARTIŞMA

Bu deneysel çalışmada, CYP ile oluşturulan ovaryan yetmezlik modelinde intraovaryan PRP, Eksozom ve PRP+Eksozom uygulamalarının ovaryan histoloji, serum AMH ve FSH düzeyleri ile oksidatif stres parametreleri (TAS, TOS, OSI) üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Çalışmanın temel bulguları; CYP'nin primordial ve antral folikül havuzunda belirgin kayba ve serum AMH düzeylerinde anlamlı azalmaya yol açtığını, eksozom uygulamasının AMH düzeylerini belirgin biçimde artırdığını, PRP'nin ise oksidatif stres göstergeleri üzerinde etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda CYP grubunda primordial ve antral folikül sayılarının anlamlı derecede azalması ile birlikte serum AMH düzeylerinde düşüş ve FSH düzeylerinde artış izlenmiştir. Bu bulgular, kemoterapi ajanlarının ovaryan rezerv üzerindeki yıkıcı etkisini tanımlayan Özcan ve ark. yaptığı deneysel çalışmalarla uyumludur.(16)

CYP'nin özellikle PMF aktivasyonunu tetikleyerek "folikül burn-out" mekanizmasına yol açtığı ve granüloza hücre apoptozisini artırdığı daha önce gösterilmiştir.(122) Bu bağlamda, çalışmamızda gün 14'te elde edilen biyokimyasal bozulmalar, kullanılan CYP dozunun ve zamanlamanın etkin bir ovaryan yetmezlik modeli oluşturduğunu desteklemektedir.

PRP uygulanan gruplarda primordial ve antral folikül sayılarının CYP grubuna kıyasla korunmuş olması, PRP'nin ovaryan mikroçevre üzerinde yapısal bir koruyucu etki sağlayabileceğini düşündürmektedir. Literatürde PRP'nin VEGF, PDGF, TGF-β ve IGF-1 gibi büyüme faktörleri aracılığıyla anjiyogenezi artırdığı, stromal mikrosirkülasyonu iyileştirdiği ve granüloza hücre canlılığını desteklediği bildirilmektedir.(123)

Çalışmamızda PRP grubunda AMH düzeylerinde iyileşmenin sınırlı kalması, PRP'nin etkisinin daha çok erken dönem doku yanıtı ve oksidatif stresin baskılanması ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir. Nitekim PRP grubunda TOS ve OSI değerlerinde azalma izlenmesi, PRP'nin akut antioksidan ve antiinflamatuvar etki potansiyelini desteklemektedir. Benzer şekilde, PRP'nin kemoterapiye bağlı gonadal hasarda oksidatif stresi azalttığı önceki çalışmalarda bildirilmiştir.(16)

Çalışmamızın en dikkat çekici bulgularından biri, CYP+Eksozom grubunda T2 zaman noktasında serum AMH düzeylerinin hem CYP grubuna hem de diğer tedavi gruplarına kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmasıdır. Bu bulgu, eksozomların ovaryan rezervin biyokimyasal göstergeleri üzerinde güçlü ve nispeten kalıcı bir etki oluşturabileceğini düşündürmektedir. Park ve ark. çalışmalarında mezenkimal kökenli eksozomların, granüloza hücre apoptozisini baskılayan, mitokondriyal fonksiyonu destekleyen ve PI3K/AKT ile SMAD gibi sinyal yolaklarını modüle eden mikroRNA ve proteinler içerdiği göstermiştir ve bu çalışmada kemoterapi ile oluşturulan POI modelinde eksozom tedavisinin AMH ve FSH düzeylerini anlamlı biçimde iyileştirdiğini ve histolojik olarak folikül kaybını azalttığını bildirmiştir. (122) Benzer şekilde, eksozom dozunun artırılmasıyla ovaryan fonksiyonel iyileşmenin daha belirgin hale geldiği deneysel çalışmalarda vurgulanmıştır. Çalışmamızda eksozom uygulamasının intraovaryan ve tek doz şeklinde yapılmasına rağmen AMH düzeylerinde belirgin artış sağlanması, bu tedavi yaklaşımının ovaryan rezerv üzerine doğrudan etkisini desteklemektedir.

Bu çalışmada CYP uygulanan grupta primordial ve antral folikül sayılarının belirgin şekilde azalması, KT'nin hem ovaryan rezerv havuzu hem de fonksiyonel folikül gelişimi üzerinde olumsuz etki oluşturduğunu göstermektedir. CYP'nin PMF'de erken aktivasyon ve artmış atreziye yol açarak rezerv kaybını hızlandırdığı daha önce deneysel çalışmalarda bildirilmiştir. Çalışmamızda CYP grubunda PMF sayısının anlamlı derecede azalması bu mekanizma ile uyumludur. PRP, eksozom ve kombine tedavi gruplarında primordial folikül sayılarının CYP grubuna kıyasla korunmuş olması, bu uygulamaların rezervi artırmaktan ziyade mevcut primordial havuzun kaybını sınırlayıcı etki gösterebileceğini düşündürmektedir. Dehghani ve ark., CYP ile indüklenen ovaryan yetmezlik modelinde PRP uygulamasının primordial ve preantral folikül kaybını azalttığını bildirmiştir.(124) Çalışmamızın bulguları da bu sonuçları desteklemektedir.

Antral folikül sayıları açısından değerlendirildiğinde, CYP grubunda belirgin azalma izlenirken; PRP, eksozom ve kombine tedavi gruplarında antral folikül sayılarının yüksek bulunması, bu tedavilerin mevcut foliküllerin gelişimini desteklediğini göstermektedir. Literatürde PRP'nin lokal anjiyogenezi ve büyüme faktörü ortamını iyileştirerek antral folikül gelişimini desteklediği, eksozomların ise granüloza hücre apoptozisini baskılayıcı etkileri sayesinde ileri evre folikül gelişimi üzerinde belirgin rol

oynadığı bildirilmektedir.(122,123) Bu bulgular, çalışmamızda tedavi gruplarında antral folikül sayılarındaki artışın biyolojik olarak anlamlı olduğunu desteklemektedir ve rejeneratif tedavilerin kemoterapiye bağlı antral folikül kaybını önlemede koruyucu bir etki gösterdiğini düşündürmektedir.

PRP+Eksozom grubunda histolojik ve biyokimyasal parametrelerde CYP grubuna kıyasla iyileşme izlenmesine rağmen, bu iyileşmenin eksozom monoterapisinden üstün olmaması dikkat çekicidir. Literatürde Huang ve ark., PRP'nin G-CSF ile mobilize PBMC'lerle kombinasyonunda belirgin sinerjik etki bildirmiştir.(123) Ancak PRP-eksozom kombinasyonuna ait veriler sınırlıdır ve bu iki biyolojik ürünün etki mekanizmalarının zamanlama ve doz açısından farklılık gösterebileceği düşünülmektedir. PRP'nin daha çok erken inflamatuvar ve vasküler yanıtları modüle ettiği, eksozomların ise hücre içi onarım ve sinyalizasyon üzerinden etki gösterdiği göz önüne alındığında, aynı seansta ardışık uygulamanın beklenen sinerjiyi sınırlamış olabileceği değerlendirilmektedir.

Çalışmamızda T1 zaman noktasında tüm gruplarda serum FSH düzeylerinde gözlenen düşüş eğilimi, CYP uygulamasını takiben ortaya çıkan akut sistemik stres yanıtı ve hipotalamus-hipofiz-over aksında gelişen geçici baskılanma ile açıklanabilir. Bu erken dönemde gonadotropin salınımının, granüloza hücrelerinden salınan östrojen ve inhibin aracılı negatif geri bildirim mekanizmaları ile geçici olarak baskılandığı düşünülmektedir. Nitekim FSH düzeylerindeki bu düşüş, ovaryan rezerv kaybının henüz endokrin düzeyde tam olarak yansımadığı erken fazı temsil ederken; T2 zaman noktasında rezerv kaybının belirginleşmesi ile birlikte FSH düzeylerinde kompansatuvar artış izlenmiştir. Bu bulgular, FSH'nın ovaryan yetmezliğin geç bir belirteci olduğunu ve AMH gibi erken rezerv göstergeleri ile birlikte değerlendirilmesi gerektiğini desteklemektedir.

Çalışmamızda PRP grubunda OSI ve TOS değerlerinde azalma izlenmesi, PRP'nin antioksidan savunma sistemleri üzerindeki hızlı etkisini desteklemektedir. Buna karşılık eksozom grubunda oksidatif stres parametrelerindeki değişimin sınırlı kalması, eksozomların daha çok hücresel onarım ve hormonal regülasyon yoluyla etki gösterdiğini düşündürmektedir. Serum TOS düzeyleri değerlendirildiğinde, grupların kendi içinde zamanla anlamlı bir değişim izlenmemiştir. Ancak gruplar arası karşılaştırmada yalnızca T0 zaman noktasında anlamlı fark saptanmıştır. Dunn's çoklu karşılaştırma testi, bu farkın özellikle CYP grubundan kaynaklandığını ve PRP ile kombine tedavi gruplarında

oksidatif yükün daha düşük olduğunu göstermiştir. T1 ve T2 zaman noktalarında gruplar arasındaki farkın ortadan kalkması, oksidatif stresin zamanla kompanse edildiğini düşündürmektedir. Bu bulgular, PRP ve eksozomların ovaryan hasar üzerinde farklı fakat tamamlayıcı biyolojik mekanizmalarla etki ettiğini ortaya koymaktadır.

Çalışmamızda T0 zaman noktasında kontrol grubunun TAS düzeylerinde anlamlı fark olup buna karşı T2 zaman noktasında gruplar arasında TAS düzeyleri açısından anlamlı fark izlenmemesi, antioksidan savunma sisteminin zamanla dengeye ulaştığını düşündürmektedir. Özellikle PRP ve eksozom uygulamalarının lokal antioksidan kapasiteyi desteklemesiyle, CYP'ye bağlı oksidatif stresin kısmen kompanse edildiği değerlendirilmektedir. Zaman içi analizde yalnızca CYP+PRP+Eksozom grubunda TAS düzeylerinde anlamlı değişim saptanması, kombine tedavinin antioksidan sistem üzerinde daha güçlü ve sürdürülebilir bir etki oluşturduğunu düşündürmektedir.

# 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu deneysel çalışmada, CYP ile oluşturulan ovaryan yetmezlik modelinde hem histolojik hem de biyokimyasal düzeyde belirgin ovaryan hasar geliştiği gösterilmiştir. CYP uygulaması sonrası primordial ve antral folikül sayılarında anlamlı azalma ile birlikte serum AMH düzeylerinde düşüş ve FSH düzeylerinde artış saptanmış olup, bu bulgular kullanılan modelin ovaryan rezerv ve fonksiyon kaybını etkin biçimde yansıttığını ortaya koymaktadır. İntraovaryan PRP uygulamasının, KT'ye bağlı gelişen ovaryan hasar sonrası primordial ve antral folikül kaybını sınırladığı ve özellikle oksidatif stres parametreleri üzerinde iyileştirici etki gösterdiği belirlenmiştir. Buna karşılık, intraovaryan eksozom uygulamasının serum AMH düzeylerinde anlamlı artış sağlayarak ovaryan rezervin biyokimyasal göstergeleri üzerinde daha belirgin ve nispeten kalıcı bir iyileşme oluşturduğu saptanmıştır. PRP ve eksozomun birlikte uygulanması, siklofosfamid grubuna kıyasla histolojik ve biyokimyasal iyileşme sağlamakla birlikte, PRP ve eksozom monoterapisine üstünlük göstermemiştir. Elde edilen veriler, PRP ve eksozom uygulamalarının ovaryan hasar üzerinde farklı fakat tamamlayıcı biyolojik mekanizmalar aracılığıyla etkili olduğunu; PRP'nin daha çok erken dönemde oksidatif stres ve mikrosirkülasyon üzerinde, eksozomların ise hücresel onarım ve hormonal regülasyon süreçleri üzerinden rol oynadığını düşündürmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen bulgular doğrultusunda, kemoterapiye bağlı ovaryan yetmezliğin önlenmesi ve tedavisine yönelik rejeneratif yaklaşımların daha ayrıntılı biçimde değerlendirilmesi gerektiği kanaatine varılmıştır. PRP ve eksozom uygulamalarının etkinliğinin daha net ortaya konabilmesi için farklı doz, uygulama sıklığı ve zamanlama protokollerini içeren ileri deneysel çalışmaların planlanması önerilmektedir. Özellikle PRP ve eksozom kombinasyonlarının potansiyel sinerjik etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, eş zamanlı uygulamalar yerine zamana yayılmış veya ardışık uygulama modellerinin araştırılması faydalı olabilir. Ayrıca uzun dönem takipli çalışmalar ile elde edilen histolojik ve biyokimyasal iyileşmenin sürdürülebilirliğinin ortaya konması önem arz etmektedir. Oksidatif stres, apoptoz ve hücresel sinyal yolaklarını hedef alan moleküler düzeyde analizlerin eklenmesi, etki mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına katkı sağlayacaktır.

Preklinik veriler ışığında, özellikle eksozom temelli hücresiz rejeneratif yaklaşımların kemoterapi sonrası fertilite korunmasına yönelik klinik uygulamalara geçiş potansiyelinin ileri faz çalışmalarda değerlendirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

# KAYNAKLAR


1. Houeis L, Donnez J, Dolmans M.M. Premature Ovarian Insufficiency and Diminished Ovarian Reserve: From Diagnosis to Current Management and Treatment. J Clin Med [Internet]. 2025 Oct 22;14(21):7473. Available from: https://www.mdpi.com/2077-0383/14/21/7473
2. Wallace W.H.B, Kelsey T.W. Human ovarian reserve from conception to the menopause. PLoS One. 2010 Jan 27;5(1).
3. Golezar S, Ramezani Tehrani F, Khazaei S, Ebadi A, Keshavarz Z. The global prevalence of primary ovarian insufficiency and early menopause: a meta-analysis. Climacteric. 2019 Aug;22(4):403–11.
4. Li M, Zhu Y, Wei J, Chen L, Chen S, Lai D. The global prevalence of premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis. Climacteric. 2023 Apr;26(2):95–102.
5. Federici S, Rossetti R, Moleri S, Munari E V., Frixou M, Bonomi M, et al. Primary ovarian insufficiency: update on clinical and genetic findings. Vol. 15, Frontiers in Endocrinology. Frontiers Media SA; 2024.
6. Overbeek A, van den Berg M.H, van Leeuwen F.E, Kaspers G.J.L, Lambalk C.B, van Dulmen-den Broeder E. Chemotherapy-related late adverse effects on ovarian function in female survivors of childhood and young adult cancer: A systematic review. Vol. 53, Cancer Treatment Reviews. W.B. Saunders Ltd; 2017. p. 10–24.
7. Meirow D, Nugent D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction.
8. Morgan S, Anderson R.A, Gourley C, Wallace W.H, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? Vol. 18, Human Reproduction Update. 2012. p. 525–35.
9. Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout "; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. Sci Transl Med. 2013 May 15;5(185).
10. Hamy A.S, Porcher R, Cuvier C, Giacchetti S, Schlageter M.H, Coussieu C, et al. Ovarian reserve in breast cancer: Assessment with anti-Müllerian hormone. Reprod Biomed Online. 2014 Nov 1;29(5):573–80.
11. Del Mastro L, Ceppi M, Poggio F, Bighin C, Peccatori F, Demeestere I, et al. Gonadotropin-releasing hormone analogues for the prevention of chemotherapy-induced premature ovarian failure in cancer women: Systematic review and meta-analysis of randomized trials. Vol. 40, Cancer Treatment Reviews. W.B. Saunders Ltd; 2014. p. 675–83.
12. Lambertini M, Ceppi M, Poggio F, Peccatori FA, Azim HA, Ugolini D, et al. Ovarian suppression using luteinizing hormonereleasing hormone agonists during chemotherapy to preserve ovarian function and fertility of breast cancer patients: A meta-analysis of randomized studies. Annals of Oncology. 2015 Dec 1;26(12):2408–19.
13. Moore H.C.F, Unger J.M, Phillips K.A, Boyle F, Hitre E, Porter D, et al. Goserelin for Ovarian Protection during Breast-Cancer Adjuvant Chemotherapy. New England Journal of Medicine. 2015 Mar 5;372(10):923–32.

14. Donnez J, Dolmans M.M. Fertility Preservation in Women. New England Journal of Medicine. 2017 Oct 26;377(17):1657–65.
15. Cui X, Li H, Huang X, Xue T, Wang S, Zhu X, et al. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair ovarian function by suppressing NLRP3-mediated pyroptosis in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure. Journal of Ovarian Research. 2025 Dec 1;18(1).
16. Ozcan P, Takmaz T, Tok O.E, Islek S, Yigit E.N, Ficicioglu C. The protective effect of platelet-rich plasma administrated on ovarian function in female rats with Cy-induced ovarian damage. J Assist Reprod Genet. 2020 Apr 1;37(4):865–73.
17. Gibson E, Mahdy E. Anatomy Abdomen and Pelvis, Ovary. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545187/?utm_: StatPearls; 2023.
18. Lecturio. https://cdn.lecturio.com/assets/Gross-anatomy-of-the-female-reproductive-system-1200x658.jpg. 2025. Gross anatomy of the female reproductive system.
19. Ying J, Feng J, Hu J, Wang S, Han P, Huang Y, et al. Can ovaries be preserved after an ovarian arteriovenous disconnection? One case report and a review of surgical treatment using da Vinci robots for aggressive ovarian fibromatosis. J Ovarian Res. 2019 Jun 7;12(1).
20. Wikipedia contributors. Wikipedia, The Free Encyclopedia. 2025. Ovarian artery.
21. Hallas-Potts A, Dawson J.C, Herrington C.S. Ovarian cancer cell lines derived from non-serous carcinomas migrate and invade more aggressively than those derived from high-grade serous carcinomas. Sci Rep. 2019 Dec 1;9(1).
22. Yetgin H, Ünal M.S, Kabukçu C, Tufan A.Ç. Histological structure and functional properties of the tunica albuginea of the ovary. Vol. 18, Pamukkale Medical Journal. Pamukkale University; 2025. p. 460–73.
23. Sadler T.W. Lagman's Medical Embryology, 14th Edition. 2019.
24. Ducreux B, Ferreux L, Patrat C, Fauque P. Overview of Gene Expression Dynamics during Human Oogenesis/Folliculogenesis. Int J Mol Sci. 2024 Jan 1;25(1).
25. Hillier S.G, Smitz J, Eichenlaub-Ritter U. Folliculogenesis and oogenesis: From basic science to the clinic. Vol. 16, Molecular Human Reproduction. 2010. p. 617–20.
26. Krajnik K, Mietkiewska K, Skowronska A, Kordowitzki P, Skowronski MT. Oogenesis in Women: From Molecular Regulatory Pathways and Maternal Age to Stem Cells. Vol. 24, International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
27. Zhai F, Ma X, Yan L, Qiao J. Human Reproductive and Prenatal Genetics - Chapter 6-The molecular genetics of oogenesis. Second Edition. 2023. 145–163 p.
28. Boundless. https://bio.libretexts.org/@go/page/14124. LibreTexts-Biology 43.3C: Gametogenesis (Spermatogenesis and Oogenesis).
29. Sánchez F, Smitz J. Molecular control of oogenesis. Vol. 1822, Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease. 2012. p. 1896–912.
30. Guyton A, Hall J. Tıbbi Fizyoloji. İstanbul; 2021.
31. Kuyucu Y, Tap Ö. Oosit Olgunlaşma Süreci ve Düzenleyic, Faktörler . Arşiv Kaynak Tarama Dergisi. 2009 Dec 1;18(4):227–40.
32. Gilbert S. Developmental Biology - Oogenesis. 6th edition. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10008/: Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2000.

33. https://courses.lumenlearning.com/suny-mcc-ap2/chapter/anatomy-and-physiology-of-the-female-reproductive-system/? [Internet]. 2025. Anatomy and Phsiology of the Female Reproductive System.
34. Hoffman B.L, Schorge J.O, Bradshaw K.D, Halvorson L.M, Schaffer J.I, Corton M.M. Williams Jinekoloji. 3. Nobel Tıp Kitabevleri Tic.LTD.ŞTİ.; 2020. 342–354 p.
35. Moore K.L, Persaud T.V.N, Torchia M.G. The Developing Human-Clinically Oriented Embryology. 11. Edinburgh: Saunders; 2019.
36. Marieb E.N, Hoehn K. Human Anatomy and Physiology. 11th ed. Pearson; 2021.
37. Holt E.H, Lupsa B, Lee G.S, Bassyouni H, Peery H.E. Goodmans's Basic Medical Endocrinology. 5th ed. 2021. 433–472 p.
38. Strauss J.F, Barbieri R.L. Yen&Jaffe's Reproductive Endocrinology- Physiology, Pathophysiology and Clinical Management. 8th ed. 2019. 473–519 p.
39. Rosenfield RL, Ehrmann DA. The Pathogenesis of Polycystic Ovary Syndrome (PCOS): The hypothesis of PCOS as functional ovarian hyperandrogenism revisited. Vol. 37, Endocrine Reviews. Endocrine Society; 2016. p. 467–520.
40. Plant T.M, Zeleznik A.J. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 4th ed. Elsevier/Academic Press; 2015.
41. Uenoyama Y, Nagae M, Tsuchida H, Inoue N, Tsukamura H. Role of KNDy Neurons Expressing Kisspeptin, Neurokinin B, and Dynorphin A as a GnRH Pulse Generator Controlling Mammalian Reproduction. Vol. 12, Frontiers in Endocrinology. Frontiers Media S.A.; 2021.
42. Christensen A, Bentley G.E, Cabrera R, Ortega H.H, Perfito N, Wu T.J, et al. Hormonal regulation of female reproduction. Vol. 44, Hormone and Metabolic Research. 2012. p. 587–91.
43. Yiğit A, Böyük G, Kabakçi R, Üniversitesi K, Fakültesi V, Anabilim Dalı F, et al. Dişi Ratlarda Üreme Fizyolojisi [Internet]. Available from: http://www.dicle.edu.tr/veteriner-fakultesi-dergisi
44. Boyd K.L, Muehlenbachs A, Rendi M.H, Garcia R.L, Gibson-Corley K.N. Female Reproductive System. In: Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas, Second Edition. Elsevier; 2017. p. 303–34.
45. Parkinson C.M, O'Brien A, Albers T.M, Simon M.A, Clifford C.B, Pritchett-Corning K.R. Diagnostic necropsy and selected tissue and sample collection in rats and mice. Journal of Visualized Experiments. 2011 Aug;(54).
46. Moolhuijsen L.M.E, Visser J.A. Anti-Müllerian Hormone and Ovarian Reserve: Update on Assessing Ovarian Function. Vol. 105, Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. Endocrine Society; 2020.
47. Penzias A, Azziz R, Bendikson K, Falcone T, Hansen K, Hill M, et al. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: a committee opinion. Fertil Steril. 2020 Dec 1;114(6):1151–7.
48. Ulrich N.D, Marsh E.E. Ovarian Reserve Testing: A Review of the Options, Their Applications, and Their Limitations. Clin Obstet Gynecol. 2019 Jun 1;62(2):228–37.
49. Vrontikis A, Chang P.L, Kovacs P, Lindheim S.R. Antral follice counts (AFC) predict ovarian response and pregnancy outcomes in oocyte donation cycles. J Assist Reprod Genet. 2010 Jul;27(7):383–9.
50. Liu Y, Pan Z, Wu Y, Song J, Chen J. Comparison of anti-Müllerian hormone and antral follicle count in the prediction of ovarian response: a systematic review and meta-analysis. J Ovarian Res. 2023 Dec 1;16(1).

51. Sopiarz N, Sparzak P. Primary Ovarian Insufficiency. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025.
52. Shelling AN. Premature ovarian failure. Vol. 140, Reproduction. 2010. p. 633–41.
53. Nelson L.M. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. N Engl J Med [Internet]. 2009 Feb 5;360(6):606–14. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19196677
54. Bhartiya D, Patel H. An overview of FSH-FSHR biology and explaining the existing conundrums. Vol. 14, Journal of Ovarian Research. BioMed Central Ltd; 2021.
55. Fink D.A, Nelson L.M, Pyeritz R, Johnson J, Sherman S.L, Cohen Y, et al. Fragile X Associated Primary Ovarian Insufficiency (FXPOI): Case Report and Literature Review. Vol. 9, Frontiers in Genetics. Frontiers Media S.A.; 2018.
56. Chon S.J, Umair Z, Yoon M.S. Premature Ovarian Insufficiency: Past, Present, and Future. Vol. 9, Frontiers in Cell and Developmental Biology. Frontiers Media S.A.; 2021.
57. International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (ISUOG- Premature Ovarian Insufficiency or POI-July 2022.
58. Bidet M, Bachelot A, Bissauge E, Golmard JL, Gricourt S, Dulon J, et al. Resumption of ovarian function and pregnancies in 358 patients with premature ovarian failure. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. 2011 Dec;96(12):3864–72.
59. The American College of Obstetricians and Gynecologists – Commite Opinion Primary Ovarian Insufficiency in Adolescents and Young Women, Number 605, July 2014
60. Panay N, Anderson R.A, Bennie A, Cedars M, Davies M, Ee C, et al. Evidence-based guideline: premature ovarian insufficiency. Hum Reprod Open. 2024;2024(4).
61. Pravatta-Rezende G, Benetti-Pinto CL, Yela DA, Rosa e Silva ACJ de S, Nácul AP, Marcos dos Reis F, et al. Premature ovarian insufficiency: Updated concepts in diagnosis and hormonal treatment strategies. Vol. 80, Clinics. Universidade de Sao Paulo. Museu de Zoologia; 2025.
62. Takenaka M, Takase H.M, Suzuki N, Saigo C, Tamotsu T, Furui T, et al. Age-Related Mechanisms of Ovarian Toxicity Resulting from Cyclophosphamide focused on the Quality of Primordial follicles. Reprod Biomed Online. 2023;47.
63. International Agency for Research on Cancer. Lyon (FR): 2012. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Pharmaceuticals.
64. Jeelani R, Khan S.N, Shaeib F, Kohan-Ghadr H.R, Aldhaheri S.R, Najafi T, et al. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. Free Radic Biol Med. 2017 Sep 1;110:11–8.
65. Dabbish E, Scoditti S, Shehata M.N.I, Ritacco I, Ibrahim M.A.A, Shoeib T, et al. Insights on cyclophosphamide metabolism and anticancer mechanism of action: A computational study. J Comput Chem. 2024 Apr 15;45(10):663–70.
66. Sharata E.E, Bakry T, Atta H.G, Mohammed H.A, Diab N.S, Atef R.A, et al. Molecular mechanisms underlying cyclophosphamide-induced ovarian injury and protective strategies. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2025.
67. Song Y, Guo Z, Song L, Ma J xiu, Ma Y qing, Shang L na, et al. Role of DNA damage response in cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in mice. Journal of Obstetrics and Gynaecology Research. 2024 Sep 1;50(9):1655–66.

68. Plowchalk D.R, Mattison D.R, R M.D. Phosphoramide Mustard Is Responsible for the Ovarian Toxicity of Cyclophosphamide Phosphor-amide Mustard Is Responsible for the Ovarian Toxicity of Cyclophosphamide. PLOW-CHALK. Vol. 107, Toxıcology and Applıed Pharmacology.
69. Jeelani R, Khan S.N, Shaeib F, Kohan-Ghadr H.R, Aldhaheri S.R, Najafi T, et al. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. Free Radic Biol Med. 2017 Sep 1;110:11–8.
70. Chen X.Y, Xia H.X, Guan H.Y, Li B, Zhang W. Follicle loss and apoptosis in cyclophosphamide-treated mice: What's the matter? Int J Mol Sci. 2016 Jun 1;17(6).
71. Takenaka M, Takase H.M, Suzuki N, Saigo C, Takeuchi T, Furui T, et al. Age-Related Mechanisms of Ovarian Toxicity Resulting from Cyclophosphamide focused on the Quality of Primordial follicles. Reprod Biomed Online. 2023;47.
72. Hao X, Reyes Palomares A, Anastácio A, Liu K, Rodriguez-Wallberg KA. Evidence of apoptosis as an early event leading to cyclophosphamide-induced primordial follicle depletion in a prepubertal mouse model. Front Endocrinol (Lausanne). 2024;15.
73. Cengiz M, Sahinturk V, Yildiz S.C, Şahin I.K, Bilici N, Yaman S.O, et al. Cyclophosphamide induced oxidative stress, lipid per oxidation, apoptosis and histopathological changes in rats: Protective role of boron. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. 2020 Dec 1;62.
74. Colluoglu C, Balci S, Gundogdu B, Coban TA, Bulut S, Suleyman H. Effect of thymoquinone on cyclophosphamide-induced oxidative and inflammatory ovarian damage in rat. Bangladesh J Pharmacol. 2022 Sep 6;17(3):72–8.
75. Feng J, Ma W.W, Li H.X, Pei X.Y, Deng S.L, Jia H, et al. Melatonin prevents cyclophosphamide-induced primordial follicle loss by inhibiting ovarian granulosa cell apoptosis and maintaining AMH expression. Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Aug 3;13.
76. Abogresha N.M, Mohammed S.S, Hosny M.M, Abdallah H.Y, Gadallah A.M, Greish S.M. Diosmin mitigates cyclophosphamide induced premature ovarian insufficiency in rat model. Int J Mol Sci. 2021 Mar 2;22(6):1–20.
77. İlgen O, Yılmaz F, Kurt S. Protective and/or therapeutic effects of berberine in a model of premature ovarian failure induced by cyclophosphamide in rats. Turk J Obstet Gynecol. 2023 Sep 1;20(3):227–33.
78. Yildiz M, Kosal V, Keles OF, Sendag S, Wehrend A. Protective effects of coenzyme Q10 against cyclophosphamide induced ovarian damage in rats. Sci Rep. 2025 Nov 25;
79. Yener N.A, Sinanoglu O, Ilter E, Celik A, Sezgin G, Midi A, et al. Effects of spirulina on cyclophosphamide-induced ovarian toxicity in rats: Biochemical and histomorphometric evaluation of the ovary. Biochem Res Int. 2013;
80. Zhao T, Xiao X, Li L, Wei Y, Shi H, Yang G, et al. Mechanism of platelet-rich plasma in improving cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in rats. Stem Cell Research and Therapy. 2025 Dec 1;16(1).
81. Murphy M.P, Bayir H, Belousov V, Chang CJ, Davies KJA, Davies MJ, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. Nat Metab. 2022 Jun 1;4(6):651–62.
82. De Almeida A.J.P.O, De Oliveira J.C.P.L, Da Silva Pontes L.V, De Souza Júnior J.F, Gonçalves T.A.F, Dantas S.H, et al. ROS: Basic Concepts, Sources, Cellular Signaling,

and its Implications in Aging Pathways. Vol. 2022, Oxidative Medicine and Cellular Longevity. Hindawi Limited; 2022.
83. Averill-Bates D. Reactive oxygen species and cell signaling. Review. Vol. 1871, Biochimica et Biophysica Acta- Molecular Cell Research. Elsevier B.V.; 2024.
84. Kunter I, Zabib N, Kosar M. A review of oxidants and antioxidants in biological systems. 2020; Available from: https://dergipark.org.tr/emujpharmsci
85. Yan F, Zhao Q, Li Y, Zheng Z, Kong X, Shu C, et al. The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. Vol. 15, Journal of Ovarian Research. BioMed Central Ltd; 2022.
86. Zaha I, Muresan M, Tulcan C, Huniadi A, Naghi P, Sandor M, et al. The Role of Oxidative Stress in Infertility. J Pers Med. 2023 Aug 1;13(8).
87. Yang L, Chen Y, Liu Y, Xing Y, Miao C, Zhao Y, et al. The Role of Oxidative Stress and Natural Antioxidants in Ovarian Aging. Vol. 11, Frontiers in Pharmacology. Frontiers Media S.A.; 2021.
88. Ighodaro O.M, Akinloye O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria Journal of Medicine. 2018 Dec 1;54(4):287–93.
89. Jomova K, Alomar S.Y, Alwasel S.H, Nepovimova E, Kuca K, Valko M. Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants. Vol. 98, Archives of Toxicology. Springer Science and Business Media Deutschland GmbH; 2024. p. 1323–67.
90. Motor S, Ozturk S, Ozcan O, Gurpinar A.B, Can Y, Yuksel R, et al. Evaluation of total antioxidant status, total oxidant status and oxidative stress index in patients with alopecia areata. IntJClinExpMed www.ijcem.com/I. 2014 Apr;7(4):1089–93.
91. Koksal H, Kurban S. Total oxidant status, total antioxidant status, and paraoxonase and arylesterase activities during laparoscopic cholecystectomy. Clinics. 2010;65(3):285–90.
92. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. Clin Biochem. 2004 Apr;37(4):277–85.
93. Kurku H, Yavuz C. Evaluation of Total Oxidant Status, Antioxidant Status and Oxidative Stress Index in Patients with Recurrent Aphthous Stomatitis. Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi. 2022 Mar 21;8(1):88–91.
94. Okuducu U, Bayhan G, Karatopuk D.U. An assessment of total antioxidant and oxidant parameters and their correlation with embryo quality in in-vitro fertilization patients. Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia. 2025;47.
95. Aydin Y, Ozatik O, Hassa H, Ulusoy D, Ogut S, Sahin F. Relationship between oxidative stress and clinical pregnancy in assisted reproductive technology treatment cycles. J Assist Reprod Genet. 2013 Jun;30(6):765–72.
96. Ozturk E, Oge T, Aydin Y, Isiklar O, Hassa H. Assessment of serum and follicular fluid total oxidant and total antioxidant levels in In Vitro Fertilization (IVF) cases. Zeynep Kamil Tıp Bülteni. 2018 Apr 4;49(1):136–9.
97. Ismat Ara B. Oxidative stress: Oocyte quality and infertility. Reproductive Toxicology. 2025 Oct;137.

98. Chen Y, Yang J, Zhang L. The Impact of Follicular Fluid Oxidative Stress Levels on the Outcomes of Assisted Reproductive Therapy. Vol. 12, Antioxidants. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
99. Xia P, Chen X, Lin R, Shi X, Yang Y, Lin L. The role of oxidative balance lifestyle factors in reducing female infertility risk: insights from a population-based study. Front Endocrinol (Lausanne). 2025;16.
100. Yu HU, Wang W, Wenqing MA, Wang W, Wu REN, Wang S, et al. Impact of psychological stress on ovarian function: Insights, mechanisms and intervention strategies (Review). Vol. 55, International Journal of Molecular Medicine. Spandidos Publications; 2025.
101. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K. Platelet-rich plasma: New performance understandings and therapeutic considerations in 2020. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2020.
102. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. Vol. 4, Skin Appendage Disorders. S. Karger AG; 2018. p. 18–24.
103. Liu K, Cheng H, Guo Y, Liu Y, Li L, Zhang X. Autologous platelet-rich plasma intrauterine perfusion to improve pregnancy outcomes after implantation failure: A systematic review and meta-analysis. J Obstet Gynaecol Res. 2022 Dec;48(12):3137–51.
104. Rodríguez-Eguren A, Bueno-Fernandez C, Gómez-Álvarez M, Francés-Herrero E, Pellicer A, Bellver J, et al. Evolution of biotechnological advances and regenerative therapies for endometrial disorders: a systematic review. Vol. 30, Human Reproduction Update. Oxford University Press; 2024. p. 584–613.
105. Barrenetxea G, Celis R, Barrenetxea J, Martínez E, De Las Heras M, Gómez O, et al. Intraovarian platelet-rich plasma injection and IVF outcomes in patients with poor ovarian response: a double-blind randomized controlled trial. Human Reproduction. 2024 Apr 1;39(4):760–9.
106. Herlihy N.S, Cakiroglu Y, Whitehead C, Reig A, Tiras B, Scott R.T, et al. Effect of intraovarian platelet-rich plasma injection on IVF outcomes in women with poor ovarian response: The PROVA randomized controlled trial. Human Reproduction. 2024 Jul 1;39(7):1495–503.
107. Devenutto L.M, Valzacchi G.R, Ercolano M, Etchegoyen O. Intraovarian platelet-rich plasma injection in poor responders. J Bras Reprod Assist. 2024 Jul 1;28(3):450–6.
108. Vahabi Dastjerdi M, Sheibani S, Taheri M, Hezarcheshmeh F.K, Jahangirian J, Jazayeri M, et al. Efficacy of intra-ovarian injection of autologous platelet-rich plasma in women with poor responders: a systematic review and meta-analysis. Arch Gynecol Obstet. 2024 Apr;309(6):2323–38.
109. Éliás M, Kónya M, Kekk Z, Turan C, das Virgens IPA, Tóth R, et al. Platelet-rich plasma (PRP) treatment of the ovaries significantly improves fertility parameters and reproductive outcomes in diminished ovarian reserve patients: a systematic review and meta-analysis. Journal of Ovarian Research . 2024 Dec 1;17(1).
110. Théry C, Witwer K.W, Aikawa E, Alcaraz M.J, Anderson J.D, Andriantsitohaina R, et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. J Extracell Vesicles. 2018 Jan 1;7(1).

111. Krylova S V., Feng D. The Machinery of Exosomes: Biogenesis, Release, and Uptake. Vol. 24, International Journal of Molecular Sciences. MDPI; 2023.
112. Arya SB, Collie SP, Parent CA. The ins-and-outs of exosome biogenesis, secretion, and internalization. Vol. 34, Trends in Cell Biology. Elsevier Ltd; 2024. p. 90–108.
113. Lau N.C.H, Yam J.W.P. From Exosome Biogenesis to Absorption: Key Takeaways for Cancer Research. Vol. 15, Cancers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
114. Di Bella M.A. Overview and Update on Extracellular Vesicles: Considerations on Exosomes and Their Application in Modern Medicine. Biology (Basel) [Internet]. 2022;2022:804. Available from: https://doi.org/10.3390/biology
115. Chen Y.F, Luh F, Ho YS., Yen Y. Exosomes: a review of biologic function, diagnostic and targeted therapy applications, and clinical trials. Vol. 31, Journal of Biomedical Science. BioMed Central Ltd; 2024.
116. Duval C, Wyse B.A, Tsang B.K, Librach C.L. Extracellular vesicles and their content in the context of polycystic ovarian syndrome and endometriosis: a review. Vol. 17, Journal of Ovarian Research. BioMed Central Ltd; 2024.
117. Huang Z, Zhao X, Wen W, Shi R, Liang G. Exosome miRNA sorting controlled by RNA-binding protein-motif interactions. Vol. 6, Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids. OAE Publishing Inc.; 2025. p. 470–98.
118. Lee Y.J, Shin K.J, Chae Y.C. Regulation of cargo selection in exosome biogenesis and its biomedical applications in cancer. Vol. 56, Experimental and Molecular Medicine. Springer Nature; 2024. p. 877–89.
119. Zhou R, Liu D. The function of exosomes in ovarian granulosa cells. Cell Tissue Res. 2023 Aug;394:257–67.
120. Moghassemi S, Dadashzadeh A, Sousa M.J, Vlieghe H, Yang J, León-Félix C.M, et al. Extracellular vesicles in nanomedicine and regenerative medicine: A review over the last decade. Vol. 36, Bioactive Materials. KeAi Communications Co.; 2024. p. 126–56.
121. Wang Y, Zhu J, Ma Q, Zhou W, Yang L, Sheng S, et al. Trends in mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles clinical trials 2014–2024: is efficacy optimal in a narrow dose range? Vol. 12, Frontiers in Medicine. Frontiers Media SA; 2025.
122. Park H soo, Chugh R.M, Seok J, Cetin E, Mohammed H, Siblini H, et al. Comparison of the therapeutic effects between stem cells and exosomes in primary ovarian insufficiency: as promising as cells but different persistency and dosage. Stem Cell Res Ther. 2023 Dec 1;14(1).
123. Huang Q, Liu B, Jiang R, Liao S, Wei Z, Bi Y, et al. G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells combined with platelet-rich plasma accelerate restoration of ovarian function in cyclophosphamide-induced POI rats. Biol Reprod. 2019 Jul 1;101(1):91–101.
124. Dehghani F, Aboutalebi H, Esmaeilpour T, Panjehshahin MR, Bordbar H. Effect of platelet-rich plasma (PRP) on ovarian structures in cyclophosphamide-induced ovarian failure in female rats: a stereological study. Toxicol Mech Methods. 2018 Nov 22;28(9):653–9.