T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RATLARDA SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ (POF) MODELİNDE MELATONİN VE RESVERATROL'ÜN ETKİSİ

KÜBRA ŞEVGİN

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. SALİME PELİN ERGÜVEN

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ
TEMMUZ/2023

İTHAF

“Eliz’ime ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (2022/068, BAP) tarafından desteklenmiştir.

Bu tezde anlatılan çalışmaya bir şekilde katkıda bulunan herkese teşekkür etmek istiyorum.

Bana bu projenin yapılmasında destek olan danışmanım Doç. Dr. Salime Pelin ERGÜVEN'e özel teşekkürlerimi iletmek istiyorum. Eğitimim boyunca kendisine cömert desteği, koçluğu ve motivasyonu için minnettarım. Onun rehberliği, bu tezin yazılması da dahil olmak üzere, doktora eğitimim boyunca bana her zaman yardımcı oldu. Bilgi ve deneyimlerini benimle çok cömertçe paylaşan bir danışmanım olduğu için kendimi şanslı hissediyorum. Ayrıca, bu tezin oluşumu sırasındaki sonsuz ve nitelikli desteğinden dolayı Dr. Ögr. Üyesi Gulam HEKİMOĞLU'na şükranlarımı sunarım.

Tez komiteme en derin teşekkürlerimi sunarım; beni araştırmaya teşvik eden desteği, bana yardımcı olduğu ve bilimsel birikimini her zaman benimle paylaştığı için Dr. Tansel SAPMAZ'a; ve bu çalışmaya yeni bir bakış açısı kazandıran anlayışlı yorumları için Doç. Dr. Papatya KELEŞ'e teşekkür ederim.

Doktora öğrenciliği hayatımdaki desteklerinden dolayı Dr. Öğr. Üyesi Halime Tuba CANBAZ ve Dr. Öğr. Üyesi Esra ÇİKLER hocalarıma teşekkür ederim.

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji ABD'daki herkese de teşekkür etmek istiyorum. Hepsiyle bir laboratuvarı paylaşmak harika bir deneyim ve eğlenceliydi. Doktora hayatımın her anında destekleri için sevgili laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımda bana manevi ve duygusal destek sağlayan aileme minnettarım. Onlara ne kadar minnettar olduğumu kelimeler ifade edemez. Ebedi en iyi arkadaşım ve ruh eşim Ömer ŞEVGİN'e ve gözbebeğim Eliz'ime ilham kaynağım oldukları için sonsuz teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

İTHAF iv
TEŞEKKÜR v
İÇİNDEKİLER vi
TABLOLAR LİSTESİ viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ix
RESİMLER LİSTESİ x
SİMGELER VE KISALTMALAR xii
ÖZET xiv
ABSTRACT xvi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. OVER 5
2.1.1. Over Histolojisi 5
2.1.2. Folikülogenez 6
2.1.3. Oogenez 9
2.2. İNFERTİLİTE 10
2.3. PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ 10
2.3.1. Prematür Over Yetmezliği Patogenezi 10
2.3.2. Prematür Over Yetmezliği Sebepleri 12
2.3.2.1. Genetik sebepler 12
2.3.2.2. Otoimmün sebepler 13
2.3.2.3. Emzim eksikliği sebepleri 13
2.3.2.4. İyatrojenik sebepler 14
2.4. OVERDE SIRT1/FOXO3A MEKANİZMASI 16
2.5. PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ İÇİN KULLANILAN HAYVAN MODELLERİ 18
2.6. PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ TEDAVİ STRATEJİLERİ 19
2.7. MELATONİN 19
2.8. RESVERATROL 21
3. GEREÇ VE YÖNTEM 22
3.1. KULLANILAN KİMYASAL VE CİHAZLAR 22
3.2. HAYVAN BAŞINA DÜŞEN BARINMA ALANI VE BAKIM KOŞULLARI 24

3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI 24
3.4. SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI 26
3.5. PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ MODELİNİN OLUŞTURULMASI 26
3.6. ALINAN ÖRNEKLERİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ 27
3.6.1. Morfolojik Değerlendime 28
3.6.1.1. Vücut ve over ağırlığı 28
3.6.2. Histolojik Değerlendirme 28
3.6.2.1. Doku takibi ve rutin histolojik boyamalar 28
3.6.2.2. Folikül sayımı 32
3.6.2.3. Histopatolojik değerlendirme 32
3.6.2.4. İmmünfloresan boyama. 33
3.6.3. Moleküler Değerlendirme 34
3.6.3.1. RT-PCR 34
3.6.4. Biyokimyasal Değerlendirme 38
3.6.4.1. Serum östrojen seviyesinin belirlenmesi 38
3.7. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ 38
4. BULGULAR 40
4.1. MORFOLOJİK BULGULAR 40
4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR 43
4.2.1. Tüm Gruplara Ait Over Folikül Sayıları 43
4.2.2. Hematoksilen & Eozin Bulguları 47
4.2.3. Histopatolojik Bulgular 49
4.2.4. Periyodik Asit-Schiff & Masson Trikrom Bulguları 51
4.2.5. İmmün-floresan Bulgular 54
4.3. MOLEKÜLER BULGULAR 70
4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR 73
5. TARTIŞMA 74
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 95
KAYNAKLAR 98
EK 105

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3.1: Deney grupları 25

Tablo 3.2: Kriyo doku takibi prosedürü 29

Tablo 3.3: Hematoksilen&Eozin boyama prosedürü 30

Tablo 3.4: Periyodik asit schiff &Masson trikrom boyama prosedürü 31

Tablo 3.5: İmmünfloresan boyama prosedürü 33

Tablo 3.6: TRıpure ile total RNA izolasyon prosedürü 35

Tablo 3.7: cDNA sentezi prosedürü 36

Tablo 3.8: RT-PCR prosedürü 36

Tablo 3.9: Primer dizileri 37

Tablo 4.1: Tüm deney gruplarında 1., 6. ve 11. gün vücut ağırlıkları 41

Tablo 4.2: Tüm deney gruplarında over ağırlıkları ve over ağırlık indeksi 42

Tablo 4.3: Tüm gruplardaki serum östrojen hormonu seviyeleri 73

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Over histolojisinin genel yapısı (19) 6

Şekil 2.2: Folikülogenezde görülen folikül gelişim aşamaları (21) 7

Şekil 2.3: Normal ve prematür over yetmezliği görülen overlerde folikülogenez ve ovulasyon (26) 11

Şekil 2.4: Hidrolitik prosedür ve sisplatinin hücreler içindeki potansiyel moleküler hedefleri (48) 15

Şekil 2.5: Melatonin ve resveratrol'ün kimyasal yapısı 20

Şekil 3.1: Uygulanan deneysel prosedür ve laboratuvar yöntemleri 27

Şekil 4.1: Tüm deney gruplarında vücut ağırlık değişimleri 41

Şekil 4.2: Gruplar arası primordiyal folikül sayısı karşılaştırılması 43

Şekil 4.3: Gruplar arası primer folikül sayısı karşılaştırılması 44

Şekil 4.4: Gruplar arası sekonder folikül sayısı karşılaştırılması 45

Şekil 4.5: Gruplar arası tersiyer folikül sayısı karşılaştırılması 45

Şekil 4.6: Gruplar arası atretik folikül sayısı karşılaştırılması 46

Şekil 4.7: Histopatolojik skorlamaların gruplar arası karşılaştırılması 50

Şekil 4.8: Gruplar arası kollajen miktarı yoğunluklarının karşılaştırılması 53

Şekil 4.9: Tüm gruplardaki pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 immunoreaktivite yoğunlukları 68

Şekil 4.10: Tüm gruplardaki SIRT1 mRNA ifadeleri 70

Şekil 4.11: Tüm gruplardaki FOXO3a mRNA ifadeleri 71

Şekil 4.12: Tüm gruplardaki Bcl2 mRNA ifadeleri 72

RESİMLER LİSTESİ

Resim 3.1: Ratlarda uygulanan deneysel prosedür 26

Resim 3.2: Alınan over dokularına uygulanan kriyotakip prosedürü 28

Resim 3.3: Over dokularına uygulanan RNA izolasyonu prosedürü. 34

Resim 4.1: Vajinal sürüntü örneklerinde metilen mavisi boyama 40

Resim 4.2: Deney gruplarında hematoksilen&eozin boyaması. PF: primordiyal folikül, PrF: Primer folikül, SF: Sekonder Folikül, AF: Atretik folikül, KD: Kan damarı, ok başı: apoptotik hücre 47

Resim 4.3: Deney gruplarında periyodik asit schiff & masson trikrom boyaması. PF: primordiyal folikül, PrF: Primer folikül, SF: Sekonder Folikül, AF: Atretik folikül, KD: Kan damarı, ok başı: apoptotik hücre 52

Resim 4.4: KONT grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları 54

Resim 4.5: POY grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları 55

Resim 4.6: MEL grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları 55

Resim 4.7: RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları 56

Resim 4.8: POY+MEL grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları 57

Resim 4.9: POY+RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları 57

Resim 4.10: POY+MEL+RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları 58

Resim 4.11: KONT grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 59

Resim 4.12: POY grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 59

Resim 4.13: MEL grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 60

Resim 4.14: RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 60

Resim 4.15: POY+MEL grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 61

Resim 4.16: POY+RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 62

Resim 4.17: POY+MEL+RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 62

Resim 4.18: KONT grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 63

Resim 4.19: POY grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 64

Resim 4.20: MEL grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 64

Resim 4.21: RES grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 65

Resim 4.22: POY+MEL grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 66

Resim 4.23: POY+RES grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 66

Resim 4.24: POY+MEL+RES grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları 67

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMH : Anti-Müllerian Hormon

AMHR2 : Anti-Müllerian Hormon Reseptorü 2

ART : Yardımcı Üreme Teknikleri

BCL2 : B Hücreli Lenfoma 2

BMP15 : Kemik Morfojenik Protein 15

BMPR2 : Kemik Morfojenik Protein Reseptörü 2

C-DNA : Komplementer DNA

CAT : Katalaz

DNA : Deoksiribonükleik Asit

E2 : Estradiol 2

FMR1 : Kırılgan X Sendromu 1

FOXL : Forkhead box Protein

FOXL2 : Forkhead Box L2

FOXO3a : Forkhead Box O3

FSH : Folikül Uyarıcı Hormon

FSHR : Folikül Uyarıcı Hormon Reseptör

GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GDF9 : Büyüme Farklılaşma Faktörü 9

GLUT : Glutatyon

GPX : Glutatyon Peroksidaz

H&E : Hematoksilen Eozin

HRT : Human Koryonik Gonadotropin

IVF : İn vitro Fertilizasyon

KONT : Kontrol

LH **:** Luteinizan Hormon

LHR **:** Luteinizan Hormon Reseptör

LHX8 **:** LIM Homeobox 8

MKH **:** Mezenkimal Kök Hücre

NOBOX **:** Yenidoğan Over Homeobox Proteini

NOBOX **:** Newborn Ovary Homeobox

NOS2 **:** Nitrik Oksit Sentaz 2

NR5A1 **:** Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1

OMI **:** Oosit Maturasyon İnhibitörü

PFA : Paraformaldehit

PGRMC1 **:** Progesterone Receptor Membrane Component 1

POF **:** Erken Over Yetmezliği

POI **:** Erken Over Yetmezliği

POLR3H **:** RNA Polymerase III Subunit H

RES **:** RES

ROS **:** Reaktif Oksijen Türleri

SOD **:** Süperoksit Dismutaz

SOHLH1 **:** Spermatogenesis And Oogenesis Specific Basic Helix–Loop–Helix 1

TNF-α **:** Tümör Nekroz Faktör-alfa

RATLARDA SİSPLATİN İLE OLUŞTURULAN DENEYSEL PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ (POF) MODELİNDE MELATONİN VE RESVERATROL'ÜN ETKİSİ

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada sisplatin (SİS) kaynaklı prematür over yetmezliği (POY) gelişen overlerde kombinasyon halinde melatonin (MEL) ve resveratrol (RES) tedavisinin; over fonksiyonu, fenotipi, hormon seviyesi ve hücre ölüm/savunma yolaklarını kontrol eden molekülleri hangi seviyede hedef aldığının incelenmesi amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Toplam 42 adet Sprague Dawley dişi rat 7 deney grubuna ayrıldı; Grup 1: KONT, Grup 2: POY, Grup 3: MEL, Grup 4: RES, Grup 5: POY+MEL, Grup 6: POY+RES, Grup 7: POY+MEL+RES. Histolojik inceleme için Hematoksilen&Eozin (H&E), PAS&Masson Trikrom (PAS&MT) boyamaları yapıldı. pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 protein ekspresyonu ve immün lokalizasyonu immünofloresan (İF) yöntemi ile belirlendi. SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 mRNA ekspresyonları gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile belirlendi. Serum östrojen (E2) hormonu seviyeleri ELISA yöntemi ile ölçüldü.

Bulgular: Histopatolojik bulgularda ve serum E2 seviyesinde ve primordiyal folikül sayısında POY+MEL+RES grubunda tekli tedavi gruplarına kıyasla farklılık görülmedi. POY+MEL+RES grubunda atretik folikül sayısındaki azalma hem POY+MEL hem de POY+RES grubuna kıyasla anlamlı idi ($p<0,002$). POY+MEL+RES grubunda protein seviyesinde pH2Ax, SIRT1, FOXO3a, Bcl2 ve mRNA seviyesinde SIRT1 ve Bcl2 ekspresyonu POY grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p<0,002$). POY+MEL ve POY+RES grubunda ise pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 protein ve mRNA ekspresyonunda anlamlı farklılık görülmedi. POY+MEL ve POY+RES grupları POY+MEL+RES grubu ile karşılaştırıldığında protein seviyesinde farklılık pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 ekspresyonunda görülürken; mRNA seviyesinde farklılık yalnızca SIRT1 ekspresyonunda görüldü ($p<0,002$).

Sonuç: POY+MEL+RES grubunda artan SIRT1 ekspresyonu, pH2AX/SIRT1 sinyalleşme yolu ve FOXO3a gibi yolak proteinlerinin SIRT1 aracılığıyla deasetilasyonu yoluyla folikül rezervindeki azalmanın ve hücre apoptozunun (Bcl2) engellenmesinde önemli rol oynayabilir.

Anahtar Kelimeler: Melatonin, Over, Prematür Over Yetmezliği, Resveratrol, Sisplatin

THE EFFECTS OF MELATONIN AND RESVERATROL IN CISPLATIN-INDUCED EXPERIMENTAL PREMATURE OVARIAN FAILURE (POF) MODEL IN RATS

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to investigate the extent to which melatonin (MEL) and resveratrol (RES) treatment in combination targets molecules that control ovarian function, phenotype, hormone levels and cell death/defense pathways in ovaries with cisplatin (CIS)-induced premature ovarian failure (POF).

Materials and Methods: A total of 42 female Sprague Dawley rats were divided into 7 experimental groups; Group 1: Control, Group 2: POY, Group 3: MEL, Group 4: RES, Group 5: POY+MEL, Group 6: POY+RES, Group 7: POY+MEL+RES. Hematoxylin & Eosin (H&E), PAS&Masson Trichrome (PAS&MT) staining were performed for histological examination. pH2Ax, SIRT1, FOXO3a and Bcl2 protein expression and immun-localization were determined by immunofluorescence (IF) method. SIRT1, FOXO3a and Bcl2 mRNA expressions were determined by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). Serum estrogen (E2) hormone levels were measured by ELISA.

Results: There was no difference in histopathologic findings, serum E2 level and number of primordial follicles in POY+MEL+RES group compared to single treatment groups. The decrease in the number of atretic follicles in POY+MEL+RES group was significant compared to both POY+MEL and POY+RES groups ($p<0.002$). The expression of pH2Ax, SIRT1, FOXO3a, FOXO3a, Bcl2 at protein level and SIRT1 and Bcl2 at mRNA level were significant in POY+MEL+RES group compared to POY group ($p<0.002$). In POY+MEL and POY+RES groups, no significant difference was observed in pH2Ax, SIRT1, FOXO3a and Bcl2 protein and mRNA expression. When POY+MEL and POY+RES groups were compared with POY+MEL+RES group, the difference in protein level was seen in pH2Ax, SIRT1, FOXO3a and Bcl2 expression, while the difference in mRNA level was seen only in SIRT1 expression ($p<0.002$).

Conclusion: Increased SIRT1 expression in POY+MEL+RES group may play an important role in preventing the decrease in follicle reserve and cell apoptosis (Bcl2) through SIRT1-mediated deacetylation of pathway proteins such as pH2AX/SIRT1 signaling pathway and FOXO3a.

Key Words: Melatonin, Ovary, Premature Ovarian Failure, Resveratrol, Cisplatin

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Prematür over yetmezliği (POY; premature ovarian failure: POF), kadın infertilitesinin nedenlerinden biridir. Kanserli kadın hastaların doğurganlığının korunması, kanser sağkalımından sonraki yaşamları için çok önemlidir. Bu nedenle, kemoterapi sırasında germ hücrelerini koruyan ve anti-kanser ilaçların etkinliğini artıran bir fertoprotektif ajan bulmak önemli hale gelmiştir. Sisplatin (SİS), platin bazlı bileşik olup ağır metal bileşimindedir ve deoksiribo nükleik asit (DNA) onarım mekanizmalarına müdahale eder. Aynı zamanda hücre bölünmesini bloke eden, DNA hasarına neden olan ve apoptotik hücre ölümünü tetikleyen bir DNA çapraz bağlama maddesi olarak görev yapar (1). SİS maruziyetinin foliküller üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar sıklıkla primordial foliküllerin kaybını bildirmektedir. SİS primordial folikül rezervinde düşüşe neden olur ve sonuçta POY'a yol açar (2).

Oksidatif stresin, SİS kaynaklı normal doku toksisitesinin önemli bir mekanizması olduğu öne sürülmüştür. Overde oksidatif stres, foliküler atrezi artışıyla sonuçlanabilecek bozulmuş foliküler gelişim ile ilişkilidir. Oksidatif stres altında, biriken reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species; ROS), FOXO3a'nın (Forkhead Box O3) translasyon sonrası modifikasyonları ile FOXO3a'nın aktivitesini ve işlevini düzenler (3). Oksidatif stres varlığında SIRT1 (Silent Information Regulators) geni, antioksidanların ifadesini uyarır, oksidatif stres tarafından hasar gören hücreleri onarır ve hücrelerin işlev bozukluğunu önler (4). Oksidatif stres varlığında SIRT1, ROS oluşumunu baskılar ve hücrelerde FOXO3a ile bir kompleks oluşturabilir, bu da FOXO3a'nın hücre döngüsünün durmasını ve hücre hayatta kalımını indükler. Son bulgular, bitki polifenolik bileşiği olan RES'in, SIRT1'i artırabileceğini ve overde oksidatif stresi azaltabileceği göstermiştir (5). Dolayısıyla foliküler gelişim açısından ROS, SIRT1 ve FOXO3a arasında ilişki bulunmaktadır ancak bu spesifik mekanizmanın açıklığa kavuşturulması gerekmektedir (6).

Nükleus-mitokondri arası iletişimde FOXO3a aktivitesi SIRT bağımlı deasetilasyon ile modüle edilir (7). SIRT1, granüloza hücrelerinde proliferasyon ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan Bax (BCL2 associated X) ve Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) ekspresyonunu doğrudan ve diğer sinyal yolaklarına katılarak dolaylı olarak düzenleyebilir (8) Deneysel POY modelinde SIRT1 inhibititör verilen

farelerde oluşturulan POY modelinde SIRT1 inhibitörü verilen farelerde SIRT1'in mitokondri yapısını ve işlevini etkileyerek, Bcl2 (B-cell lymphoma 2) artışı ile foliküler apoptozu inhibe ettiğini ve böylelikle primordial folikül sayısını artırarak over rezervini artırabileceğini göstermiştir (9).

Melatonin (MEL); epifiz bezi tarafından salgılanan bir hormondur. Uykunun düzenlenmesi, sirkadiyen ritim ve nöro-endokrin süreçler dahil olmak üzere çoklu fizyolojik fonksiyonların düzenlenmesinde rol alır. MEL'in süperoksit anyonu, hidrojen peroksit ve peroksil radikalini ortadan kaldırarak kemoterapinin olumsuz etkilerini azalttığı bilinmektedir (10). Yapılan çalışmalar, kemoterapi ile beraber uygulanan MEL'in gonadlardaki germ hücrelerini koruduğunu, testislerde SİS kaynaklı toksisiteyi önlediğini ve sperm hareketliliğini azalttığını göstermiştir (11). Aynı zamanda MEL'in doğrudan reaktif oksijen türevlerini temizleyerek SİS kaynaklı sitotoksisiteyi inhibe ettiği ve SİS'in neden olduğu böbrek sitotoksisitesini ve DNA parçalanmasını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir. Dişi üreme organları üzerinde etkisine bakıldığında MEL'in SİS ile kullanımının overlerde primordial folikül kaybını önemli ölçüde önlediği gösterilmiştir (12). Diğer yandan farelerde MEL'in over foliküllerini SİS kaynaklı hasarlardan koruyamadığı ve sürekli uygulanan SİS tedavisinin, primordial foliküllerde oosit ölümünü indüklediği belirtilmiştir. Ek olarak, overler MEL üretebilir ve büyüyen foliküllerdeki foliküler sıvı yüksek düzeyde MEL içerir. Oositlerin in vitro olgunlaşması için MEL takviyesinin, oosit kalitesini iyileştirdiği gösterilmiştir (13). Folikül sıvısı içerisindeki MEL oosit gelişimi için kritik olmasına rağmen, endojen MEL overde kemoterapi kaynaklı primordial folikül kaybını önlemek için yeterli değildir.

Resveratrol (RES); üzüm, dut ve diğer bitkilerde yaygın olarak bulunan bir tür doğal fitoaleksindir. Anti-tümör, bağışıklık düzenleyici, anti-inflamatuar, anti-oksidan ve anti-apoptotik etkileri dahil olmak üzere bir dizi farmakolojik etkiye sahiptir (14). Rat overlerinde RES tedavisi sonucunda foliküler hücrelerin SİS kaynaklı oksidatif toksisiteden korunduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar, RES'in over fonksiyonunu ve folikülleri iyileştirerek erken over yaşlanmasının önlenmesinde rol oynayabileceğini ve böylece foliküllerin hayatta kalmalarını sağlayabileceğini göstermektedir. Overler üzerindeki bu koruyucu etkilere rağmen, RES'in tek başına ve MEL ile kombinasyon halinde sağladığı antioksidan etkide yer alan sinyal

mekanizmaları bilinmemektedir. Bu nedenle bu çalışmada kullanılacak olan ekzojen antioksidan maddelerin overde meydana gelen oksidatif stres kontrol mekanizmasını olumlu şekilde etkileyeceği ve folikül rezervini ve over fenotipini koruyabileceği düşünüldü. POY modelinde vereceğimiz antioksidan etkenlerle, over folikül rezervi ve oksidan- antioksidan sistem üzerine en olumlu etkilere sahip olanı araştırarak organların korunması ve salınan oksidatif faktörlerin akciğer, böbrek ve benzeri organ sistemleri üzerine olabilecek zararlı etkilerin azaltması hedeflendi.

Yapılan çalışmalarda nöronlar üzerinde MEL'in RES, C vitamini veya alfa-lipoik asit ile kombine edildiğinde sinerjizm sergilediği bildirilmiştir. Bu sonuçlar, oksidatif strese bağlı patolojik durumları sınırlamak için MEL ve diğer antioksidanların birlikte tedavide kullanılmasının potansiyel farmakolojik avantajını ortaya koymaktadır. Ancak, MEL ve diğer antioksidanların sinerjik etkilerinin hücresel mekanizmaları yeterince tanımlanmamıştır (15).

Kombinasyon tedavisinin amacı, yan etkiler olmaksızın farklı etki mekanizmalarıyla çalışan ajanları kullanmaktır. Ancak kombinasyon tedavileri üzerine çok az çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada, SIRT aktivatörü olan MEL ve RES'in ile kombinasyon halinde uygulanması ile olası sinerjik etkileri araştırıldı. İşlevsel olarak RES, enerji korunumu ile ilişkili bir SIRT aktivatörü olarak histon deasetilaz aktivitesi gösterir, bu nedenle sitoprotektif niteliklere sahip olabilir ve hücre yaşamını teşvik edebilir. MEL'in de SIRT1'in bir indükleyicisi olduğu bilinmektedir (16). MEL ve RES'in overlerde SIRT1 aktivitesi üzerinde sinerjik etki sergileyebileceği düşünüldü. Bu potansiyel etkinin altında yatan mekanizmanın tam olarak aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bu nedenle bu çalışmada SİS ile oluşturulan POY modelinde MEL+RES kombinasyonunun (phospho-H2Ax) pH2Ax/SIRT1/FOXO3a/BCL2 yolağı üzerinden olası sinejik etkisi de araştırılmıştır.

Bu çalışmanın amacı, kombinasyon halinde MEL ve RES ile tedavinin, rat over fonksiyonu, fenotipi, östrojen (E2) hormon seviyesi üzerinde sinerjik etkiler sağlayıp sağlayamayacağını belirlemektir. Bu nedenle POY modeli geliştirilen ratlarda MEL ve RES'in overdeki etkisinin morfolojik, moleküler, biyokimyasal ve histolojik değişiklikleri incelenmesi amaçlandı. Histolojik incelemelerde over folikül rezervi ve morfolojisinin yanısıra overde hücresel dejenerasyon, vasküler konjesyon /hemoraji

ve inflamasyonu histopatolojik olarak gözlemlenmesi amaçlandı. SİS'e karşı kullanılabilecek fertoprotektanların, foliküllerde hücre ölüm yolaklarını (pH2Ax, SIRT1, FOXO3a, Bcl2) kontrol eden molekülleri hangi seviyede hedef aldığı incelendi.

Bu çalışmanın nihai hedefi kadın kanser hastalarında doğurganlığı korumak için adjuvanlar geliştirmesidir. Yapılan metaanaliz çalışmalarında erken over yetmezliğinin iskemik kalp hastalığı ve diğer tüm ölüm nedenleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (17). Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda klinikte over kaybı, infertilite, erken menopoza bağlı mortalite ve morbiditenin azaltılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OVER

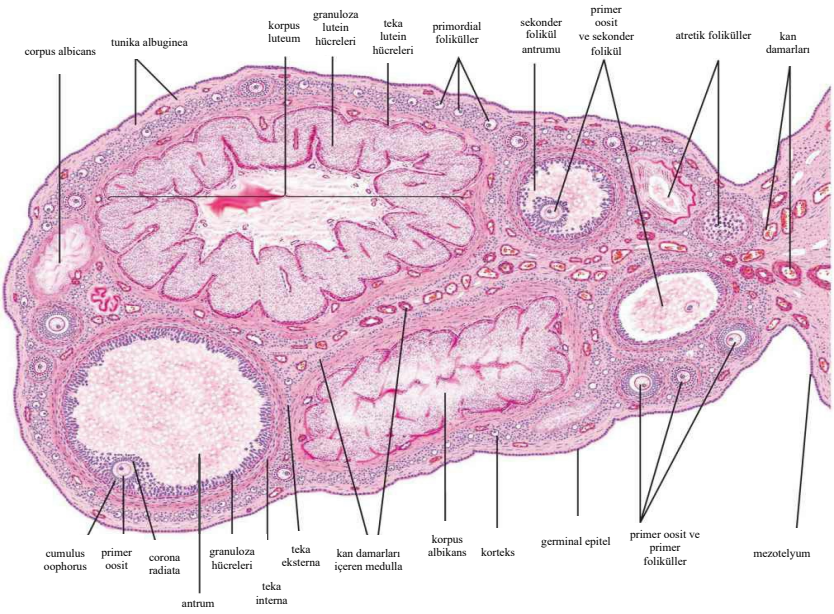
Overler, dişi üreme sisteminde uterusun her iki yanında pelvisin yan duvarına yakın yerde bulunan badem şeklindeki üreme bezleridir. Mestural siklus ve doğurganlıkta rol oynayan hormonları salgılarlar. Overler ayrıca ikincil cinsiyet özelliklerinin geliştirilmesinden ve hamileliğin düzenlenmesinden sorumlu hormonlar olan östrojen ve progesteron üretirler (18). Overler gametogenez ve steroidogenez olmak üzere iki temel fonksiyondan sorumludur (19).

Overlerin erken embriyonik gelişimi sırasında, primordial germ hücreleri yolk kesesinin dorsal endoderminden hücreler arka bağırsak boyunca gonadal sırta göç eder. Bu hücreler daha sonra mitozla çoğalır ve gonadal kabartıya ulaştıklarında oogonia olarak adlandırılırlar. Oogonia daha sonra hem peritondan hem de mezonefrozdan türeyen diğer somatik hücrelerle birleşmeye çalışırlar. Gelişim ilerler ve oogonia düzensiz bir şekilde bağ dokusu hücrelerinden (pre-granulosa hücreleri) oluşan bir tabaka ile tamamen çevrelenir böylelikle over foliküllerinin temelleri oluşur.

2.1.1. Over Histolojisi

Overler germinal epitel olarak adlandırılan genellikle tek katlı kübik yer yer tek katlı yassı ücrelerden oluşan yüzey epiteli ile kaplıdır. Germinal epitel altında tunika albugenia olarak adlandırılan düzensiz sıkı bağ dokusu vardır (19). Overler histolojik olarak korteks ve medulladan oluşur. Medulla veya medüller bölge, overin orta kısmında yer alır ve gevşek bağ dokusu, nispeten büyük çarpık kan damarları, lenf damarları ve sinirler içerir. Korteks veya kortikal bölge ise overin medullayı çevreleyen periferik kısmında bulunur. Korteks, zengin bir hücresel bağ dokusuna gömülü over foliküllerini içerir. Histolojik olarak, over korteksinde bulunan gelişim aşamasında üç tipte folikül bulunmaktadır; primordial foliküller, büyüyen foliküller (primer ve sekonder foliküller) ve olgun folikül (Graaf folikül) (20). Foliküllerin

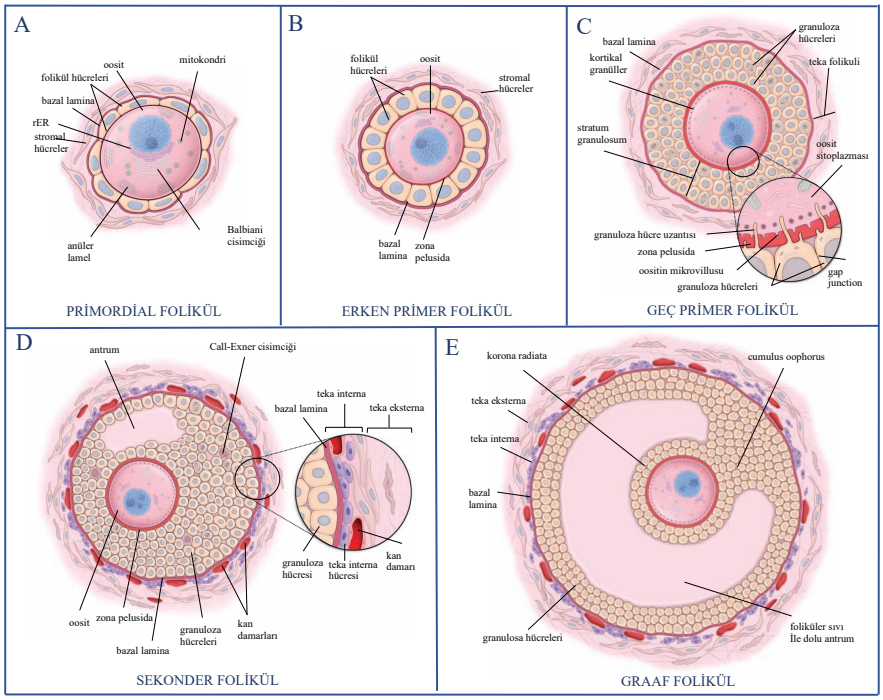
etrafındaki stromada dağınık düz kas lifleri bulunur. Medulla ve korteks arasındaki sınır belirsizdir (Şekil 2.1) (21).



Şekil 2.1: Over histolojisinin genel yapısı (19)

2.1.2. Folikülogenez

İlk olarak fetal gelişimin üçüncü ayında overlerde ortaya çıkan primordial foliküller, foliküler gelişimin en erken aşamasıdır. Primordial foliküllerin içerisinde birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde bekleyen oosit ve etrafında dizili tek katlı yassı folikül hücreleri bulunur. Folikül hücrelerinin dış yüzeyi ise bir bazal lamina ile çevrilidir. Bu evredeki foliküller yaklaşık olarak 30 µm çapında oosit içerir. Oosit sitoplazmasında (ooplazma) Balbiani cisimciği adı verilen golgi, endoplazmik retikulum, mitokondri ve lizozomların birlikte oluşturduğu yapılar bulunmaktadır. Oositi çevreleyen foliküller hücreler, çevre bağ dokusundan bazal laminaları ile ayrılır (Şekil 2.2) (21).



Şekil 2.2: Folikülogenezde görülen folikül gelişim aşamaları (21)

Primer foliküller, gelişim aşamasındaki foliküllerin ilk aşamasını oluşturur. Büyüyen folikülde oosit genişler, folikülü çevreleyen yassı folikül hücreleri kübik/ izoprizmatik hale gelir (Şekil 2.2). Folikül hücreleri kübik hale geldiğinde folikül artık primer folikül olarak adlandırılır. Büyüyen oosit 50 µm ila 80 µm çapa ulaştığında; oosit zona pelusida (ZP) adı verilen hücre dışı matriks proteinlerini (ZP-1, ZP-2 ve ZP-3) salgılamaya başlar. Oosit ile komşu folikül hücreleri arasında görülen ZP proteinlerinin en önemlisi spermatozoa bağlayıcı reseptör ve akrozom reaksiyonunun indükleyicisi olarak işlev gören ZP-3'tür. Folikül hücreleri, primer folikülün granüloza tabakasını oluşturmak için hızlı mitotik proliferasyon yoluyla çok katlı hale gelerek membrana granuloza (stratum granulosum) tabakasını oluşturur (Şekil 2.2). Bu evrede folikül hücreleri artık granüloza hücreleri olarak adlandırılır. Bağ dokusunda bulunan stromal hücreler, primer folikülün teka katmanlarını oluşturur. Teka tabakası teka interna ve teka eksterna tabakası olarak ikiye ayrılır. Teka interna steroid salgı yapacak şekilde özelleşmiş hücreleri içeren tabakadır. Lüteinize hormon (LH) reseptörü bulunduran bu hücreler, östrojenlerin öncüsü olan androjenleri sentezinde görev alırlar. Bunun yanı sıra teka interna tabakası fibroblastlar, kollajen lif demetleri ve bol kan damarı içerir. Dış tabakayı oluşturan teka eksternada düz kas hücreleri ve kollajen lif demetleri bulunur. Teka interna, teka ekstrena ve ovarium

stroması arasındaki sınırlar belirgin değildir fakat granuloza tabakası ve teka interna arasında belirgin bir bazal lamina bulunur. Oosit olgunlaşması primer folikül evresinde gerçekleşir. Olgunlaşma aşamasında oosit sitoplazmasında bulunan Balbiani cisimciğini oluşturan Golgi elementleri sitoplazmada dağılır ve oolemmanın hemen altında proteaz içeren kortikal granüller olarak bilinen özel salgı vezikülleri oluşur. Kortikal granüller, birçok omurgasız ve omurgalıda döllenmemiş oositlerin korteksinde bulunan membrana bağlı salgı organelleridir ve fertilizasyon sırasında polispermi bloğunun oluşturulmasında rol oynarlar. Oosit perivitellin boşluğa çok sayıda düzensiz mikrovilli çıkıntı yapar. Aynı zamanda, granüloza hücreleri de oosite doğru çıkıntı yapar (Şekil 2.2) (21).

Sekonder folikül, sıvı içeren bir antrum içerir. Gelişmeye devam eden primer folikül kortikalde daha derine iner. Stratum granulosum tabakası 6-12 hücre tabakası haline geldiğinde likör foliküli olarak adlandırılan hyaluronandan zengin sıvı granüloza hücreleri arasında birikmeye başlar. Folikül büyüdükçe biriken boşluklar sonunda antrum adı verilen ek bir boşluk oluşturur. Folikül artık sekonder/antral folikül olarak adlandırılır. Oosit 125 μm çapa ulaşır ve granuloza hücreleri tarafından salgılanan, oosit olgunlaşma inhibitörü (OMI) sayesinde artık büyüyemez. Oosit etrafında bulunan cumulus oophorus hücreleri oosit etrafına yerleşerek korona radiata tabakasını oluşturur. Korona radiatayı oluşturan hücreler oositin mikrovillileri ile oluklu bağlantılar (gap juntions) aracılığıyla iletişim kurar. Folikül büyüdükçe granüloza hücrelerinin yüzeyinde bulunan mikrovillus sayısı artar. Granüloza hücreleri arasında hyaluronan ve proteoglikan içeren Call-Exner cisimcikleri adı verilen ekstraselüler yapılar bulunur (Şekil 2.2) (21).

Sekonder oosit içeren olgun (Graaf) folikül çapı 10 mm ve üzerine ulaşır. Maksimum boyuta ulaşan folikülde granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Antrum büyümeye devam eder ve teka interna hücrelerinin sitoplazmasında steroid üreten hücrelerle ilişkili lipid damlacıkları görülmeye başlar (Figür 2E). LH, teka interna hücrelerinde androjen üretimini uyarır. Ancak, teka interna hücrelerinde üretilen androjen, aromataz enzimi eksikliği nedeniyle östrojen üretemez. Bu nedenle teka hücrelerinde üretilen androjenler, FSH'ye yanıt olarak, granuloza hücrelerinde bulunan aromataz enzimi ile östrojene çevirilir. Ovulasyon öncesinde hipofizden salgılanan LH artışı ile granüloza hücreleri artık östrojen üretmez. Primer oositin ilk

mayoz bölünmesi devam eder ve bunun sonucunda sekonder oosit oluşur. Ovulasyonla beraber granuloza ve teka hücreleri luteinizasyona uğrar ve progesteron üretmeye başlar (21).

Ovulasyon, Graaf folikülünden sekonder oositin salınmasıyla sonuçlanan hormon aracılı bir süreci kapsar. Ovulasyon sırasında oosit, germinal epitel de dahil olmak üzere tüm folikül duvarını geçer. Menstrüel siklusun ortasında gerçekleşen ovulasyonda foliküler sıvının hacminde ve basıncında artış gözlemlenir. Aynı zamanda aktive plazminojen ile foliküler duvarın enzimatik proteolizi, oosit-kümülüs kompleksi ve stratum granulosum arasında hormonal olarak yönlendirilen glikozaminoglikan birikimi ve prostaglandinler tarafından tetiklenen teka eksterna tabakasındaki düz kas liflerinin kasılması gibi fizyolojik süreçler rol oynar (21).

Ovulasyondan hemen önce, foliküler stigma olarak bilinen germinal epitel tabaka şişkinleşir. Graaf folikül içerisinde bulunan kümülüs oophorus hücreleri ile çevrili oosit, yırtılan folikülden salınır. Ovulasyon sırasında, uterus tüpünün fimbriaları over yüzeyine yaklaşır ve folikülden atılan oosit fimbrialar tarafından uterusa doğru süpürülür. Ovulasyon sonrasında sekonder oosit döllenmezse fallop tüpünden geçerken dejenere olur (21).

2.1.3. Oogenez

Oogenez oogonyumlardan olgun oosit oluşumudur. Oogenez doğumdan önce başlar ve pubertede sona erer. Fetal dönemde oogonyumlar hacimce büyüyerek primer oositleri oluştururlar. Oluşan primer ooist stroma hücreleri ile çevrelenerek primordial folikülü oluşturur. Primordial folikülerde bulunan primer oositler, ilk mayotik bölünmeye embriyonik dönemde başlar ancak bu mayoz bölünme profazın diploten aşamasında durur. Mayoz I ovulasyon öncesine kadar tamamlanmaz. Bu nedenle primer oositler 12-50 yıl boyunca mayoz I ‘in profaz aşamasında kalır. Graaf foliküllerde mayoz I tamamlandığında primer oositin her yavru hücresi eşit miktarda kromatin alır ancak sitoplazma miktarı eşit olarak bölünmez. Dolayısıyla bir hücre polar cisimcik olarak kalır, diğeri ise sekonder oosit olur. Korona radiata hücreleri tarafından çevrili sekonder oosit ovulasyon sırasında Graaf folikülü terk ederken, mayoz II devam eder. Mayoz II metafaz aşamasında durur ve ancak fertilizasyon devam ederse tamamlanır ve sekonder polar cisimcik oluşur. Fertilizasyonun gerçekleşmesiyle sekonder oositte mayoz II tamamlanır

ve 23 kromozomlu maternal pronukleus oluşur. Daha fazla gelişme yeteneğine sahip olmayan polar cisimcik ise apoptoza uğrar (21).

2.2. İNFERTİLİTE

Fertilite, kişilerin klinik gebelik oluşturma kapasitesidir. İnfertilite, 12 aylık düzenli, korunmasız ilişkiden sonra klinik gebelik oluşmamasıdır. Subfertilite, infertilite ile birbirinin yerine kullanılabilen terimlerdir (22). Polikistik over sendromu (Polycystic Ovarian Syndrome; PCOS), hipotalamik disfonksiyon, prematür over yetmezliği (POY) gibi ovulasyon bozuklukları, tubal bozuklular, endometriosis, servikal stenoz, polip ve tümör gibi bir çok neden kadın infertilitesine neden olabilmektedir (23).

2.3. PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ

Prematür over yetmezliği (POY), 40 yaşın altındaki kadınlarda folikül rezervinde azalmanın yanı sıra üreme ve endokrin organlarda işlev bozukluğu ile karakterizedir (24). Bu durum, menstrüel düzensizliklere ve gebelik başarısızlıklarına neden olan hipoöstrojenizm ile ilişkili olduğu için sıklıkla subfertilite veya infertilite ile sonuçlanmaktadır (25). POY aynı zamanda yüksek folikül uyarıcı hormon (FSH) ve düşük estradiol (E2) seviyeleri ile karakterizedir. POY, 40 yaşına ulaşmamış kadınların yaklaşık %1'inde görülmektedir (26). Östrojen eksikliği, POY görülen kadınlarda birincil over hormonu eksikliğidir. Hormon replasman tedavisi (HRT), normalde var olan ancak eksik salgılanan hormonların eksojen olarak verilmesidir. HRT tedavisi, menopozla ilişkili semptomlar, kemik mineral yoğunluğu kaybı, kırıklar ve kuru göz sendromu gibi bu durumdan kaynaklanan sağlık komplikasyonlarını iyileştirdiği için POY'un geleneksel yönetimi olarak kabul edilmektedir.

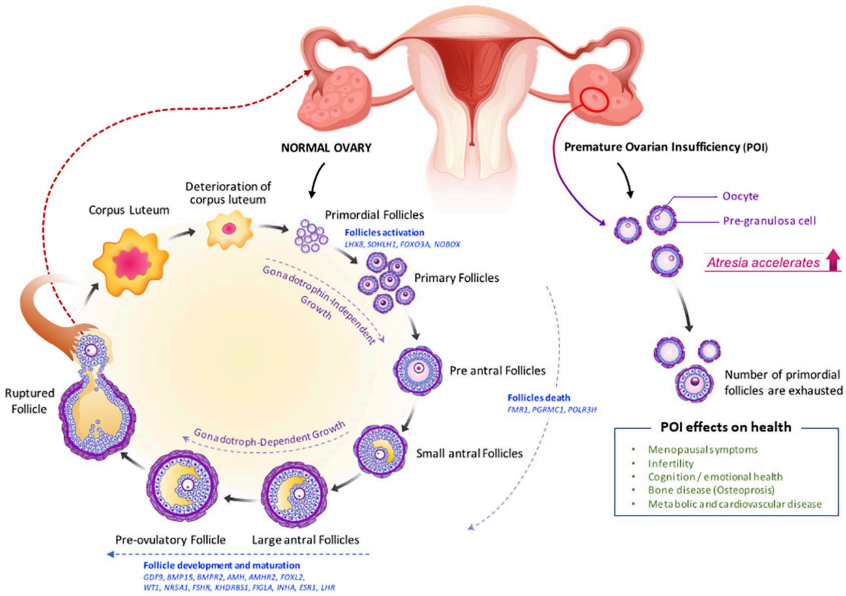
Ovulasyon görülebilen POY tanısı konulan kişilerin %25'inden sadece %5-10'u gebe kalabilmektedir. POY tanısı konulan kişilerde doğurganlığı korumak için oosit, over dokusu ve embriyonun dondurularak saklanması doğurganlığı koruma stratejileri uygun alternatifler arasındadır.

2.3.1. Prematür Over Yetmezliği Patogenezi

Prematür over yetmezliği gelişmesine neden olan çeşitli patojenik mekanizmalar bulunmaktadır. Embriyolojik gelişim sırasında primordiyal germ hücre migrasyonundaki problemler, puberte öncesi yetersiz primordial folikül rezervi, artan folikül atrezisi ve

olgunlaşamayan primordial foliküller POY patogenezinde rol oynamaktadır. POY tanısı konulan overlerde histolojik olarak folikül yapısı ve morfolojik değişiklikler incelenerek foliküler rezerv değerlendirilmektedir (27). Histolojik çalışmalara göre iki tip POY tanısı konulan over bulunmaktadır: folikülden yoksun küçük overler ve belirli foliküler olgunlaşma aşamasına gelen folikülleri içeren normal büyüklükteki overler. Küçük overlerde foliküler tipte atretik foliküller ve aktif primordial foliküller olmamasına rağmen, overde kollajenden zengin bir bağ dokusu kapsülü ile çevrili eozinofilik bir kütleden oluşan stroma ve corpora albicantia bulunur. Ayrıca, bu over histolojisinde birçok aktif primordial folikül bulunur. Lenfoplazmasitik infiltrasyon primordial foliküllerin çevresinde gözlenebilir (26).

İntraovaryan faktörlerin ve gonadotropinlerin regülasyonu ile primoridal foliküller, atreziye en duyarlı olan preantral ve erken antral foliküllere dönüşür (Şekil 2.3). Daha sonra, oosit salınımı ve korpus luteum oluşumu ile sonuçlanan preovulatuar foliküller haline gelir. Folikülogenezde görülen primordial foliküllerde azalma, atrezide artış ve foliküler olgunlaşmanın değişmesi gibi aksaklıklar POY'a neden olur (26)



Şekil 2.3: Normal ve prematür over yetmezliği görülen overlerde folikülogenez ve ovulasyon (26)

2.3.2. Prematür Over Yetmezliği Sebepleri

Prematür over yetmezliği, etiyolojisi çoğunlukla yeterince belirlenemediği için genellikle spontan veya idiyopatik olarak tanımlanmaktadır. POY'da folikül rezervinin azalması, foliküler olgunlaşmanın devam edememesi veya oosit rezervinin tahrip olması gibi süreçlerin dirençli over sendromu gibi altta yatan mekanizmalar tarafından kontrol edildiği öne sürülmüştür (28). Genetik nedenler çeşitli genetik anormallikleri beraberinde getirirken, genetik olmayan nedenler arasında otoimmün ve metabolik bozukluklar, enfeksiyonlar, çevresel faktörler ve iyatrojenik etkenler yer almaktadır. POY tanısı konulan kadınların %70'i bilinmeyen etiyolojiye sahipken, %15'i genetik ve otoimmün sebeplere sahiptir. Kemoterapi ve radyasyon POY'un en sık görülen iyatrojenik nedenleridir (29).

2.3.2.1. Genetik sebepler: POY'un genetik nedenleri oldukça heterojendir ve çeşitli genetik mutasyonların etkileşimlerini içermektedir. Kromozomal anormallikler, genetik polimorfizmler ve tek gen mutasyonları, POY'a neden olmaktadır (30) POY ile bağlantılı X-kromozom anomalikleri POY gelişimine neden olabilmektedir. X kromozomu anormallikleri, X kromozomunun duplikasyonları, delesyonları ve Turner sendromu çocukluk döneminde oosit kaybına neden olan X kromozomunun tamamen veya kısmen silinmesini içermektedir (31) Trizomi X, özellikle 47XXX genotipi, hipogonadotropik over yetmezliği ile ilişkilidir (31).

POY ile sonuçlanan diğer bir konjenital anormallik, FMR1 (Fragile X Messenger Ribonucleoprotein 1) geninde CGG (sitozin-guanin-guanin) tekrarlarının varlığıdır (32). NOBOX (newborn ovary homeobox) ve FIGLA (factor in germline alpha) genindeki değişiklikler de POY patogenezinde rol oynar. NOBOX gen mutasyonları doğumdan sonra oosit kaybına neden olurken, FIGLA mutasyonları ZP (zona pellusida) genlerinin düzenlenmesini bozarak primordial foliküllerde doğum sonrası kayıplara neden olur.

POY ile ilişkili diğer mutasyonlar FOXL2 (forkhead box L2), WT1 (Wilms tumor 1), NR5A1 (nuclear receptor subfamily 5 group A member 1)'de meydana gelen mutasyonlardır (33). BMP15 (bone morphogenetic protein 15), GDF-9 (growth differentiation factor 9), TGF-beta (transforming growth factor-b) genlerindeki mutasyonlar da POY oluşumuna sebep olmaktadır. FSH reseptörünün mutasyonları, FSH direnci ile ilişkili olduğu için POY hastalığına sebep olmakta ve hastalarda serum FSH

seviyesini yükseltmektedir. SF-1 geni (Steroidojenik faktör 1) gonadal farklılaşma için önemlidir ve hipotalamik-hipofiz-steroidogenez ekseninde görevli gen ekspresyonlarını düzenleyerek steroidogenezi kontrol eder. Yapılan araştırmalar, POY gelişimi ile SOHLH 1 (spermatogenesis and oogenesis-specific basic helix-loop-helix) ve SOHLH 2'ye özgü DNA bağlama faktörleri arasında bir bağlantı olduğunu göstermiştir. Bu mutasyonlar infertliliteye ve folikül kaybına neden olmaktadır (26) Kısaca, deneysel çalışmalarda BMP15, FOXL2, GDF9, NR5A1, NOBOX, LHR ve FSHR genlerinin POY patogenezinde rol oynadığı rapor edilse de bu genlerin hiçbiri henüz POY için klinik genetik belirteç olarak kabul edilmemektedir (34).

Proteinleri kodlamayan RNA'lar, epigenetik düzenleyiciler olarak işlev gören kodlanmayan ncRNA (non-coding RNA)'lar olarak adlandırılır (35,36). MikroRNA'lar (miRNA'lar) memeli overlerinde endojen olarak bulunur ve ekspresyon seviyeleri over gelişimi ve folikülogenez boyunca değişir (36). Çok sayıda çalışma, POY'un tanımlanmasında yeni klinik belirteç olarak kullanılabilecek nc-RNA'ların gen ekspresyonlarının azaldığını bildirmiştir (37).

2.3.2.2. Otoimmün sebepler: Otoimmünite kaynaklı problemler POY sebeplerinin %4-30'unu oluşturmaktadır. Sistemik pro-inflamatuar yanıt, foliküler ve over homeostazının değişmesine yol açar. Otoimmünite saldırısının ana hedefleri pre-ovulatuar foliküllerde ve korpora luteumdaki steroid üreten hücrelerdir. Hipotiroidizm, otoimmün adrenal yetmezlik, otoimmün poliglandüler sendrom ve otoimmün Addison hastalığı, POY ile ilişkili en yaygın otoimmün hastalıklardır. Hipotiroidi, vitiligo, otoimmün hemolitik anemi, romatoid artrit, sjögren sendromu gibi diğer otoimmün hastalıkların %2'sinde de POY görülme olasılığı tespit edilmiştir (38).

2.3.2.3. Enzim eksikliği sebepleri: Galaktozemi, galaktozun sindirilmesinde görevli enzimin üretilememesi ile ortaya çıkan bir hastalıktır. Galaktozemi, galaktoz 1-fosfat uridiltransferaz (GALT) enzim disfonksiyonu görülen otozomal resesif hastalıktır. Galaktoz ve metabolitleri, en önemlisi galaktoz 1 fosfat ve galaktitol, overlerde toksik hasar oluşturabilmektedir. Galaktozemi görülen kadınların %80-90'ında POY görülebilmektedir. Ancak galaktozemi görülen kişilerde POY oluşum mekanizması tam olarak aydınlatılamamıştır (39).

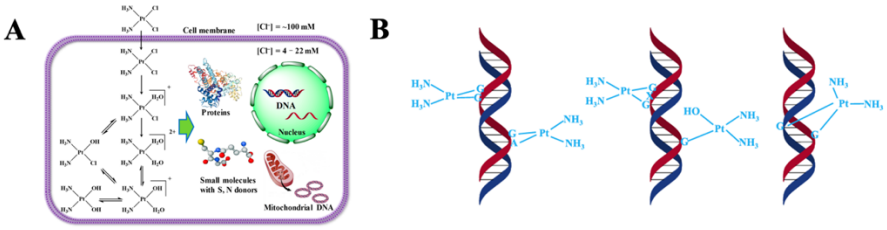
2.3.2.4. İyatrojenik sebepler

2.3.2.4.1. Çevresel sebepler: Sigara kullanımı ve kimyasal gibi çevresel faktörler, over fonksiyonunu önemli ölçüde etkileyebilmektedir. Literatürde yapılan çalışmalarda sigara kullanımının erken menopozu tetiklediği belirtilmiştir. Nikotin, polisiklik aromatik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve nitroz bileşikler ovaryum foliküllerinde apoptozu arttırarak foliküller atreziye sebep olmakta ve aromataz aktivitesini azaltarak östrojen seviyesini azaltmaktadırlar. Aynı zamanda sigara içen kadınların içemeyenlere göre 4 yıl erken menopoza girdikleri rapor edilmiştir (40).

2.3.2.4.2. Radyasyon: Dişi üreme sistemi ve fertilite üzerinde etkisi olduğu kanıtlanan radyasyon tedavisi, önemli POY etiyolojilerden biridir. Radyasyon dozu ve tipine bağlı olarak, radyasyon tedavisi geri dönüşümsüz over fonksiyon kaybı ile sonuçlanmaktadır. POY riski radyoterapiye maruz kalma yaşı, dozu ve lokasyonuna bağlıdır (41). Hayvanlar üzerine yapılan çalışmada 4.0 Gy radyasyon dozunun overde oksidatif hasar ve enflamatuar yanıtlara yol açtığı, P13k ve Akt ekspresyon seviyesini düşürdüğü ve FOXO3a ekspresyon seviyesini artırarak overde foliküler atreziye yol açtığı öne sürülmüştür (42).

2.3.2.4.3. Kemoterapi: Kemoterapi sonucunda görülen en yaygın yan etkilerden birisi POY ve devamında gelişen infertilitedir. Kemoterapide kullanılan kemoterapötik ajanlar, overde hücre fonksiyonlarını inhibe ederek hücre proliferasyonunu durdurur. Aynı zamanda bu ajanlar overde uyku halinde bulunan primordiyal foliküllerin anormal aktivasyonunu indükler. Yapılan çalışmalar, kemoterapinin çeşitli düzeylerde over hasarlarına neden olduğu ve infertiliteye neden olduğunu bildirmiştir (43) Kemoterapinin overler üzerindeki yan etki seviyesi yaş, doz, kemoterapötik ajan tipi ve maruz kalma miktarına göre değişkenlik göstermektedir. Aynı zamanda kullanılan kemoterapötik ajanlar tip ve etki mekanizmalarına göre sınıflandırılmaktadır. En çok kullanılan kemoterapik ajanlar alkilleyici ve platinyum temelli olan ajanlardır. Siklofosfamid, melfalan ve busulfan alkilleyici ajanlar arasında bulunurken sisplatin (SİS) platinyum temelli olan ajanlar sınıfında yer almaktadır (41). Kemoterapi ilaçları, doğum öncesi oogonia kaybı, primordial foliküllerin doğrudan kaybı, primordial foliküllerin hızlandırılmış aktivasyonu, foliküler atrezi, stromal doku hasarı, vaskülaritede hasar veya inflamasyonu indükleyerek over dokusuna zarar verebilir (44).

Sisplatin (SİS), platin bazlı kemoterapik ajandır. SİS'in hücre bölünmesini inhibe etme potansiyeli ilk olarak 1960 yılında tanımlanıp olup ve 1978 kanser tedavisinde kullanılması FDA tarafından onaylanmıştır (45) SİS ağır metal bileşimine sahiptir ve DNA onarım mekanizmalarına müdahale edip, hücre bölünmesini bloke eder. Böylelikle DNA hasarına neden olarak apoptotik hücre ölümünü tetikler. SİS toksisitesi özellikle hızlı hücre proliferasyonu görülen dokularda belirgindir. SIS'in hücrelerde birinci hedefi DNA olsa da birkaç farklı hücresel bileşenle etkileşime girebilir. SİS DNA üzerinde guanin ve adenin bazlarına bağlanarak DNA kırıklarına neden olur (46). SIS ile indüklenen DNA kırıkları, DNA hasar sinyalini kontrol eden çeşitli hasar tanıma proteinleri tarafından tanınır. SİS kaynaklı DNA hasarı, hücre döngüsü kontrol noktalarını aktive ederek hücre döngüsünün durmasına neden olur (46). Hücre döngüsü kontrol noktaları, DNA kırıklarının onarılması ve hücrenin hayatta kalmasını sağlayan hücre onarım mekanizmalarının kontrolünü sağlar. DNA hasarı küçük olduğunda, DNA onarım proteini olan PARP (Poly ADP-ribose polymerase) DNA zincir kırıklarının varlığını tespit eder ve DNA onarımını aktive eder. Ancak, DNA hasarı büyükse ve onarımı tamamlanmadıysa, PARP aktivasyonu apoptoz veya nekroz yoluyla hücre ölümünü başlatabilir. Ayrıca, SİS olumsuz toksik etkilere neden olabilen nükleer ve sitoplazmik proteinlere de bağlanabilir (Şekil 2.4) (47).



Şekil 2.4: Hidrolitik prosedür ve sisplatinin hücreler içindeki potansiyel moleküler hedefleri (48)

İnsan overinde SİS'in folikül sayısında azalmaya ve steroidojenik aktivitede azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (49). SİS'in over toksisitesine ilişkin bilgilerin çoğu, hayvan çalışmalarından elde edilmiştir. Fare ve rat overlerinde SİS maruziyetinin ardından over rezervinde azalma ve foliküler atrezide artış görülmüştür (50). SİS maruziyetinin foliküller üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar sıklıkla, hızlandırılmış

aktivasyon nedeniyle doğrudan ve/veya dolaylı olarak primordial folikül atrezisi yoluyla bu foliküllerin kaybını rapor etmektedir. Her iki durum da POY'a neden olmaktadır (51). Yapılan çalışmalar SİS'in dolaşımdaki AMH (Anti Müllerian Hormone) ve inhibin-α düzeylerini azalttığı, bunun da folikül yüzdesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (52).

Son zamanlarda primordial folikülerin artan aktivasyonunun kemoterapi kaynaklı azalan over rezervinin ikincil nedeni olduğu öne sürülmüştür. Yapılan çalışmalarda folikül aktivasyonu SİS kaynaklı oosit kaybının altında yatan birincil mekanizma olarak önerilmiştir (51,53). Buna karşılık, bazı eski çalışmalarda siklofosfamid hasarının sonucu olarak oositlerde doğrudan hasar meydana geldiği öne sürülmüştür (54) Bununla birlikte, kemoterapi aracılı DNA hasarı ve oosit ölümünün zaman seyrini, hücresel hedeflerini ve altında yatan mekanizmaları inceleyen kapsamlı bir in vivo çalışma yapılmamıştır. Genel olarak, SİS'in neden olduğu over folikül rezervindeki azalışın nedenini ortaya koyan kapsamlı bir açıklamanın olmaması ve over rezervinin tükenmesine neden olan bu iki varsayılan mekanizmanın (folikül aktivasyonu ve doğrudan oosit hasarı) her olası etkilerinden dolayı belirsizlik bugüne kadar çözülmemiştir. Bu nedenle, klinik onkofertilitede hedefe yönelik en uygun yaklaşımlar henüz tanımlanmamıştır.

2.4. OVERDE SIRT1/FOXO3A MEKANİZMASI

Overlerde fizyolojik olarak her ay birkaç primordiyal folikül gelişerek nihayetinde foliküler atreziye uğramaktadır. Bu nedenle foliküllerin çoğunluğu atrezi yoluyla hücre ölümüne gitmektedir. Normal fizyolojik süreç olarak görülen bu hücre ölümünün apoptoz olduğu bildirilmiştir (55). POY oluşumu da apoptoz ile yakından ilişkilidir. Oositlerin olgunlaşması, over ve foliküler mikro-ortamın homeostazının korunmasına dayanır. Apoptoz, oosit oluşumunun tüm aşamalarında ve ovulasyondan sonra germ hücrelerinin ortadan kaldırılmasında kritik rol oynar. Granuloza hücreleri, oositin büyümesi ve gelişimi için gerekli besin maddelerinin %85'ini sağlar. Granüloza hücrelerinin anormal apoptozu doğrudan anormal foliküler gelişimine yol açar. Granüler hücre apoptozu, foliküler atreziye yol açan önemli bir faktördür. Granuloza hücrelerinde apoptoz ≥ % 10'a ulaştığında foliküler atrezi ortaya çıkar. Granuloza hücrelerinde görülen apoptoz oosit apoptozuna neden olur. Bu nedenle foliküler atrezi hızlanır. Nomal metabolik hızdakinden daha hızlı gelişen foliküler atrezi overlerde POY gelişmesine

neden olur. Son çalışmalar, oksidatif stresin POY'nin ortaya çıkması ve gelişiminde önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmüştür (56). SİS, ROS'un artmasına ve over antioksidan kapasitesinin azalmasına yol açar. Yapılan çalışmalarda SİS'in overlerde folikül rezervinde azalmaya ve foliküler atrezide artışa neden olduğunu gösteren çok sayıda kanıt vardır (44).

Sirtuin ailesi, son zamanlarda vücut homeostazının temel metabolik sensörleri olarak öne sürülmektedir. SIRT ailesi metabolizma, enflamatuar sinyaller ve oksidatif strese yanıt verirler. Ayrıca hücre yaşlanması ve hücrelerin uzun süre yaşayabilmesi süreçlerinde önemli rolleri bulunmaktadır (57). SIRT1'in ekpresyonunun baskılanması, over rezervinin azalması ile ilişkilidir. SIRT1'in granüloza hücrelerinin proliferasyonunu ve apoptozunu düzenlediği bildirilmiştir (58). SIRT1 aktivatörü SIRT1720 veya RES'in kullanıldığı çalışmalar, SIRT1'in foliküler dinamiklerin düzenlenmesinde ana faktör olarak hedeflemenin over yaşlanmasının önlenmesi için umut verici bir strateji olabileceğini bildirmiştir (59).

Birçok transkripsiyon faktörü, Forkhead kutusu (FOXO) dahil olmak üzere SIRT1 ekspresyonunu düzenler (56). FOXO transkripsiyon faktörleri ailesi (FOXO1, 3, 4 ve 6), hücre döngüsü ilerlemesinin inhibisyonu, hematopoietik farklılaşma ve strese karşı dirençle ilişkili genlerin ekspresyonunu düzenler (60). FOXO3'ün hücrelerin uzun süre yaşayabilmesinin moleküler temelinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir (60). Sirtuin ailesi (SIRT1, 2 ve 3) üyeleri tarafından FOXO'nun deasetilasyonu FOXO aktivasyonuna yol açar (61). SIRT1, fare oositlerinde FOXO3 aktivitesini artırarak oksidatif strese karşı hücre tepkisini koordine eder. Zhang ve arkadaşları, SIRT1, 2 ve 3 yolunun reaktif oksijen türlerinin üretimini kontrol ederek ovulasyon sonrası oosit yaşlanmasında koruyucu etkisi olabileceğini bildirmiştir (62). FOXO regülasyonunun ana mekanizması hücre içi lokalizasyondaki değişikliklerle sağlanmasına rağmen, FOXO protein seviyesindeki değişiklikler de organizmada dramatik etkilere sahip olabilir. Hücrelerdeki FOXO protein seviyelerindeki değişiklikler, en az üç olası olayın sonucu olabilir: (1) FOXO proteinlerinin degredasyonu; (2) FOXO transkripsiyonu ve (3) FOXO genlerindeki mutasyon. Hızla tersine çevrilebilen hücre içi lokalizasyonundaki değişikliklerin aksine, FOXO protein seviyesindeki değişiklikler daha kalıcıdır ve bu da FOXO fonksiyonlarını etkileyebilir.

Oksidatif stres varlığında FOXO, SIRT1 ile etkileşime girebilir. SIRT1, FOXO'nun çeşitli hedef genlerini farklı şekilde düzenler. SIRT1, hücre döngüsü durdurma ve stres direnci genlerinin ekspresyonunu arttırırken FOXO'nun apoptotik genleri indükleme yeteneğini inhibe eder. SIRT1'e yanıt olarak FOXO hedef gen ekspresyonundaki fark, SIRT1'in FOXO'ya bağlanması veya FOXO deasetilasyonundan kaynaklanabilir. SIRT''in FOXO'ya bağlanması, bazı promotörlerde FOXO DNA bağlama bölgelerinin çevresindeki histonları deasetilleyerek kromatini susturabilirken, diğer promotörlerde FOXO'nun DNA'ya bağlanmasını doğrudan arttırır. Bu nedenle FOXO'daki asetillenmiş bölgelerin sayısı "moleküler kod" görevi görür. Yüksek seviye oksidatif stres, FOXO'nun apoptoz hedef genlerininin ekpresyonunun artmasına neden olurken, düşük seviye oksidatif stres, FOXO'nun DNA onarımı ve reaktif oksijen türleri detoksifikasyonu genlerinin ekspresyonunu tetikleyebilir. Bu nedenle SIRT1, FOXO faktörleri üzerindeki asetillenmiş lizinlerin miktarını belirleyerek FOXO'nun oksidatif stres seviyelerine karşı bir dengeleyici olarak hareket etmesinde rol oynar (63).

2.5. PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ İÇİN KULLANILAN HAYVAN MODELLERİ

Literatürde POY patogenezinde rol oynayan genetik ve moleküler mekanizmaların aydınlatılması ve yeni terapötiklerin geliştirilmesi için fare ve rat modelleri kullanılmıştır. Fare ve ratlar ovulasyon zamanı ve mono-poliovülasyon dahil olmak üzere bazı varyasyonlar ve fiziksel farklılıklar dışında over gelişim süreçleri ve işlevleri ve POY oluşum meknizması bakımından insanlar ile benzerlik göstermektedir. POY modeli oluşumunda kullanılan en yaygın hayvan modelleri intraperitoneal (i.p.) veya kuyruk damarı (intravenöz, i.v.) enjeksiyonu yoluyla uygulanan siklofosfamid, busulfan, SİS ile kimyasal indüksiyon yoluyla oluşturulmuştur. Over yetmezliği vajinal smear kullanılarak doğrulanabilir (64). Over fonksiyonunun erken yitirilmesi mekanizmalarını incelemek için doğal yaşlanma modeli de kullanılmıştır. 12-14 aylık fare ve ratlarda over yetmezliği ve foliküllerde azalma görülmüştür (65).

Farelerde POY ile ilgili genlerin çoğu, belirli bir fenotipik değişiklik göstermiştir. Bugüne kadar, insanlarda POY'a neden olduğu bildirilen NOBOX, FOXO gibi gen mutasyonların çoğu, POY modeli oluşturulan fare modellerinde de test edilmiştir (64). Yapılan çalışmalarda radyasyon ve kemoterapi de dahil olmak üzere ekzojen tedavilerin neden olduğu over yetmezliği bildirmiştir. Bu çalışmalar, kordon kanından veya farklı

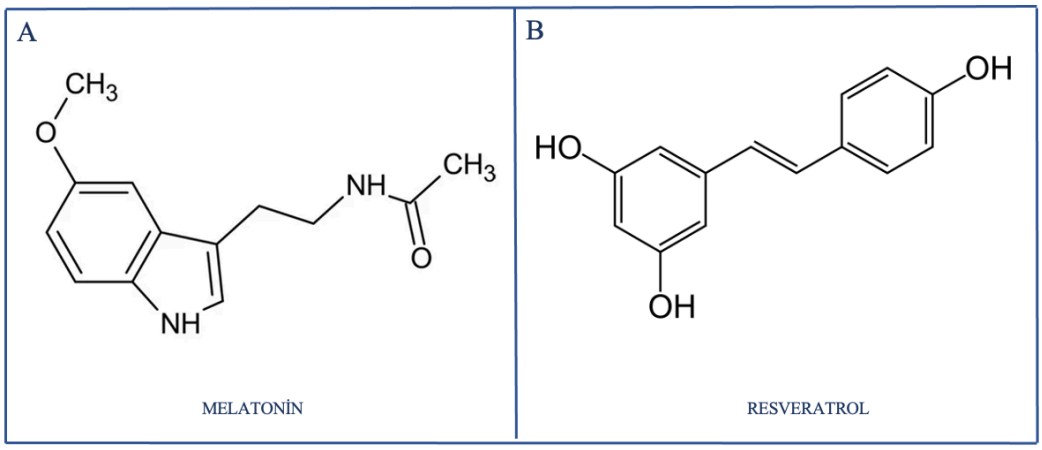
insan dokularından izole edilen eksozomlardan elde edilen insan mezenkimal kök hücrelerinin transplantasyonunun POY oluşturulan farelerde tedavi etkisinin olduğunu göstermiştir (66).

2.6. PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ TEDAVİ STRATEJİLERİ

Günümüzde POY için tamamen etkili bir tedavi yöntemi bulunamamıştır. Şimdiye kadar POY tedavisinde HRT, androjen kullanımı, diyet ve egzersiz, biyosentik hormonlar, kök hücre, donör oosit ve dehidroepiandrosteron tedavisi gibi alternatif metotlar uygulanmıştır (67). Dehidroepiandrosteron POY görülen kişilerde östrojen miktarını artırmak için tedavi olarak önerilmiştir (68). Otoimmün sebepli gelişen POY'da kortikosteroidler ve monoklonal antikorlarla immunmodülasyon tedavileri uygulanmaktadır. HRT kanser gelişme riski artmaktadır, bu nedenle alternatif tedavi stratejilerine gerek duyulmaktadır. Yapılan çalışmalarda MEL hormonu ile gonadotropin seviyesi düzenlenerek POY için tedavisel bir yaklaşım modeli uygulanmıştır (69).

2.7. MELATONİN

Melatonin (MEL) (N-asetil-5-metoksitriptamin) omurgalılarda epifiz bezi tarafından salınır. MEL aynı zamanda over ve plasenta gibi üreme dokuları dahil olmak üzere çeşitli dokularda da üretilen bir hormondur. Lipofilik yapıda olan MEL'in antioksidan ve serbest radikal giderici özellikleri bulunmaktadır (Şekil 2.5). MEL hücre proliferasyonu ve anjiyogenez dahil olmak üzere çeşitli hücresel mekanizmalarda rol oynamaktadır. MEL anti-kanser ajan olarak rol oynamaktadır. MEL, ATM (ataxia telangiectasia mutated) ekspresyonunu baskılayarak radyasyona bağlı DNA hasarını azaltabilmektedir. MEL aynı zamanda anjiyogenezi baskılayarak tümör büyümesini inhibe edebilir. Yapılan çalışmalarda, MEL'in endotelin dönüştürücü enzim-1'in ekspresyonunu azaltarak anjiyogenezi önlendiği gösterilmiştir. Ek olarak, MEL T-lenfosit, makrofaj, dalak, lenf nodu ve kemik iliği hücrelerini aktive edebilir.



Şekil 2.5: Melatonin ve resveratrol'ün kimyasal yapısı

Melatonin, hücrelerde oksidatif stresin neden olduğu serbest radikal oluşumunu önleyen güçlü bir antioksidan olarak görev görür. Oksidatif stres kanser, nörolojik hastalık, romatoid ve üreme gibi çeşitli hastalıklara neden olmaktadır (70). Oluşan oksidatif stres overlerde erken folikül kaybına ve premenopozal kadınlarda POY'a neden olur. Üreme çağı boyunca primordial foliküller üç farklı durumda bulunabilir; uyku hali, aktivasyon ve atrezi (Lim & Choi, 2012). Çoğu primordial folikül, oosit olgunlaşması için aktivasyona kadar uyku halindedir. Aktive edildikten sonra oosit olgunlaşması devam eder. Bu dinamik süreç önemli ölçüde oksidatif strese neden olur. Oosit kalitesinin oksidatif stres oluşumu nedeniyle azaldığı bildirilmiştir (72). Foliküler sıvı önemli miktarda MEL içermektedir (73). Yapılan çalışmalar, foliküller sıvıdaki MEL'in ovulasyon sırasındaki oksidatif stresi iyileştirerek oositleri ve granüloza hücrelerini koruduğunu bildirmiştir (74).

Melatonin düzeyi ve üretimi yaşla birlikte giderek azalmaktadır. Yapılan çalışmalarda bu durumun çeşitli hastalıkların gelişimiyle ilişkili olduğu ve eksojen MEL takviyesinin yaşlıların ve hastaların yaşam kalitesini iyileştirdiğini gösterilmiştir(75). Ek olarak, MEL takviyesinin oosit kalitesini iyileştirdiği görülmüştür. MEL reseptörleri (MT1 ve MT2) overlerde eksprese edilmektedir. MEL tedavisinin, SIRT1 sinyalinin aracılık ettiği oksidatif stres hasarını azaltarak POY'u iyileştirdiği gösterilmiştir. Ancak MEL'in primordial foliküller üzerindeki etkisi belirsizliğini korumaktadır. Yapılan çalışmalar, overlerde bulunan endojen MEL'in folikülogenez sırasında oluşan oksidatif strese karşı primordial folikülleri korumada etkili olduğunu göstermektedir.

2.8. RESVERATROL

Resveratrol (RES); E-5-(4-hydroxystyryl) benzene-1,3-diol; üzüm, dut ve diğer bitkilerde yaygın olarak bulunan bir doğal fitoaleksindir (Şekil 2.5) (76). Anti-tümör, immün regülasyon, anti-inflamatuar, anti-oksidasyon, hücre koruması ve anti-apoptoz etkileri dahil olmak üzere bir dizi farmakolojik etkileri bulunmaktadır (77). Yapılan çalışmalarda RES'in hücrelerin hayatta kalmasını ve UV ışınımının neden olduğu hücre ölümüne karşı korumayı engellediği rapor edilmiştir. RES antioksidan yolunun modülasyonu sağlayarak veya doğrudan bir antioksidan olarak rol oynayarak hücresel redoks durumunu dengeler (78).

Folikül disfonksiyonu over inflamasyonu ile ilişkilidir (79). RES, reaktif oksijen türevlerinin birikimini etkili bir şekilde temizleyebilir. Aynı zamanda LH, LH/FSH oranı ve TNF-a seviyesini azaltarak over folikül yapısını iyileştirebilir (80). Fare oositlerinde mankozeb kaynaklı apoptotik hasara karşı RES'in koruyucu etkisi olduğu ve ratlarda POY modelinde RES'in over fonksiyonunu iyileştirdiği görülmüştür. Aynı zamanda RES'in PI3K/Akt/mTOR sinyal yolunu aktive ederek rat over fonksiyonunu geliştirdiği, böylece oksidatif stresi azalttığı ve granülosit apoptozunu inhibe ettiği görülmüştür (81).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN KİMYASAL VE CİHAZLAR

Tez çalışmasında kullanılan deney hayvanları, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı tarafından, kimyasallar ise Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimi kapsamında önerilen firmalar tarafından temin edildi. Tez çalışmasında kullanılan kimyasallar aşağıda sıralandığı gibidir;

Melatonin (14427, Cayman)
Resveratrol (BD4672, BLD Pharm)
Sisplatin (10119, Koçak Farma)
Rompun (047956, Bayer)
Ketalar (150086, Pfizer)
Anti-SIRT1 antikoru (SC74465, Santa cruz)
Anti-FOXO3a antikoru (A0102, ABclonal)
Anti-H2ax antikoru (AP0687, ABclonal)
Anti-Bcl2 antikoru (sc-7382, Santa Cruz)
Alexa 488 GAM (A28175, Thermo Scientific)
Alexa 594 GARb (A11012, Thermo Scientific)
DAPI (D9542, Sigma)
PBS (P4417, Sigma)
Gliserol (G9012, Sigma)
Hidrojen peroksit (072091000, Merck)
cDNA kiti (C03-01-05, Atlas Biyoteknoloji)
Trizol (ET101-01, TransgenBiotech)
qPCR mastermix solüsyonu (EQ001, ELK Biyoteknoloji)
Sükroz (MS011, Cassionlabs)
OCT (IA018, Tissue Tek)
Hematoksilen (MHS80, Merck)
Ponceou BS (B6008, Sigma)

Açık Yeşil (L5382, Sigma)

Asit Fuksin (F8129, Sigma)

Fosfomolibdik Asit (B6652, Chembio)

Eozin-Y (HT110280, Merck)

Formaldehit (103999Merck Millipore)

Etanol (TK.200650, Tekkim)

Entellan (1079600500, Sigma)

Ksilen (TK.090270, Tekkim)

Metanol (24229, Sigma)

İzopropil Alkol (1096341000, Merck)

Periyodik Asit (375810, Sigma)

Schiff Reaktifi (3952016, Sigma)

Rat Östrojen ELISA Kit (8714, ELK Biyoteknoloji)

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar aşağıda sıralandığı gibidir;

Mikrotom (Leica, Almanya)

Kriyomikrotom (Leica, Almanya)

pH Metre (Metle Toledo MP 2200, İngiltere)

Manyetik Karıştırıcı (BIBBY Stuart, İngiltere)

Işık Mikroskobu (ZEISS, Almanya)

Floresan Mikroskobu (Olympus, Almanya)

Hassas Terazi (Isolab, Türkiye)

Mikropipetler- 10ul, 20ul, 200ul ve 1000ul- (Ependorf, ABD)

+4 ºC Buzdolabı (Samsung, Kore)

-20 ºC Buzdolabı (Samsung, Kore)

-80 ºC Derin Dondurucu (Eppendorf, Almanya)

Etüv (Thermo fisher, ABD)

Otoklav (Thermo fisher, ABD)

Soğutmalı Santrifüj (Thermo fisher, ABD)

Mikrosantrifüj (Bio-Rad, ABD)

ELISA Mikroplaka Okuyucu (H1 Synergy, Agilent, ABD)

PCR Cihazı (Biorad 85600, ABD)

TissueLyser (Qiagen, Almanya)

3.2. HAYVAN BAŞINA DÜŞEN BARINMA ALANI VE BAKIM KOŞULLARI

Deneyde kullanılan hayvanlar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edildi. Çalışmada 8 haftalık,180-200 gr ağırlığında 42 adet erişkin, Sprague Dawley cinsi dişi rat kullanıldı. Projenin etik onayı (No. 2022-01/04, 20 Ocak 2022) Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (EK) alındı. Tüm deney hayvanı işlemleri standart etik kurallara uygun olarak gerçekleştirildi. Ratlar, standart bakım ve beslenme koşullarında barındırıldı. Her hayvan için 70 cm^2 alan sağlandı ve hayvanlar 12 saat karanlık, 12 saat ışık uygulamasına maruz bırakıldı.

3.3. DENEY GRUPLARININ OLUŞTURULMASI

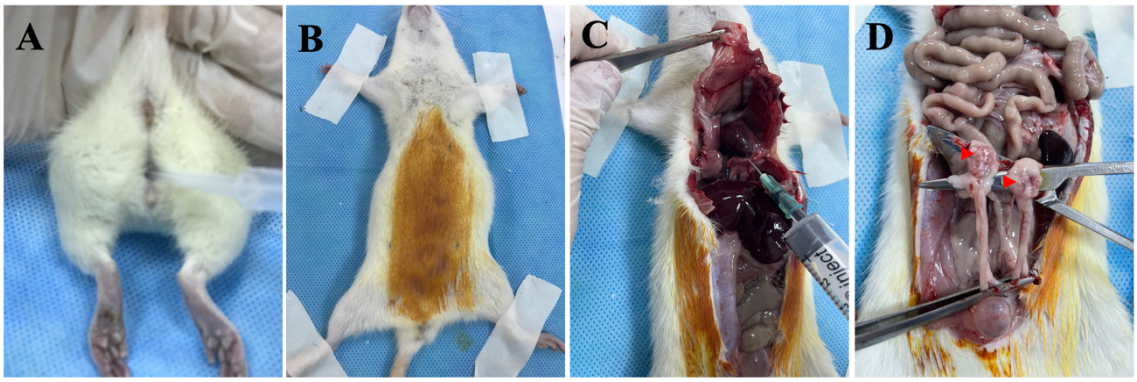
Çalışmada kullanılacak denek sayısını belirlemek için G*Power yazılımı (versiyon 3.1.9.4) ile "Power analysis/Güç analizi" yapıldı. Deneyde elde edilecek verilerin grup ortalamaları arasında anlamlı farkın bulunabilmesi için her gruptaki denek sayısı 6 olarak belirlendi (Tip 1 hata = 0.05, Testin gücü = 0.80) (82).

Deneysel çalışmada 8 haftalık, 42 adet Sprague-Dawley cinsi erişkin dişi rat rastgele 7 gruba ayrıldı. Deney grupları Tablo 3.1'de belirtildiği gibidir.

Tablo 3.1: Deney grupları

Grup 1	KONT Grubu:	n=6	-% 0,9 salin salin verildi. -Deneyin 11. günü ratlar sakrifiye edildi.
Grup 2	POY/POF Grubu	n=6	- 2 mg/kg SİS i.p. olarak verildi. - Deneyin 11. günü ratlar sakrifiye edildi.
Grup 3	MEL Grubu	n=6	- 20 mg/kg MEL i.p. olarak verildi. - Deneyin 11. günü ratlar sakrifiye edildi.
Grup 4	RES Grubu	n=6	- 10 mg/kg RES oral gavaj olarak verildi. - Deneyin 11. günü ratlar sakrifiye edildi.
Grup 5	POY+MEL Grubu	n=6	- 20 mg/kg MEL i.p. olarak verildi. - MEL enkeksiyonundan 2 saat sonra 2 mg/kg/ SİS i.p. olarak verildi. - Deneyin 11. günü ratlar sakrifiye edildi.
Grup 6	POY+RES Grubu	n=6	-10 mg/kg RES oral gavaj olarak verildi. - RES verilmesinden 2 saat sonra 2 mg/kg/ SİS i.p. olarak verildi. - Deneyin 11. günü ratlar sakrifiye edildi.
Grup 7	POY+MEL+RES Grubu	n=6	- 20 mg/kg MEL i.p. 10 mg/kg RES oral gavaj olarak verildi. - MEL ve RES verilmesinden 2 saat sonra 2 mg/kg/ SİS i.p. olarak verildi. - Deneyin 11. günü ratlar sakrifiye edildi.

Ratlarda klinik parametreler olarak vücut ağırlığı (gr) ve over ağırlığı (gr) bakıldı. Laboratuvar parametreleri olarak 11. gün sakrifiye edilen tüm ratların, overleri (kırmızı üçgen) çıkarıldı (Resim 3.1). Alınan overlerde gerekli laboratuvar incelemeleri morfolojik, histolojik, moleküler ve biyokimyasal olarak incelendi.



Resim 3.1: Ratlarda uygulanan deneysel prosedür

3.4. SOLÜSYONLARIN HAZIRLANMASI

Deney esnasında solüsyonlar taze günlük hazırlandı. MEL, RES ve SİS stok solüsyonları hazırlandıktan sonra salin içerisinde seyreltildi. Solüsyonlar aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı;

Hazır ticari formdaki SİS (10 mg/20 ml, Koçak Farma ®) kendi çözücüsü olan serum fizyolojik ile 2 mg/kg dozda her bir rata intraperitoneal verilmeye uygun şekilde kendi solüsyonu ile hazırlandı (83).

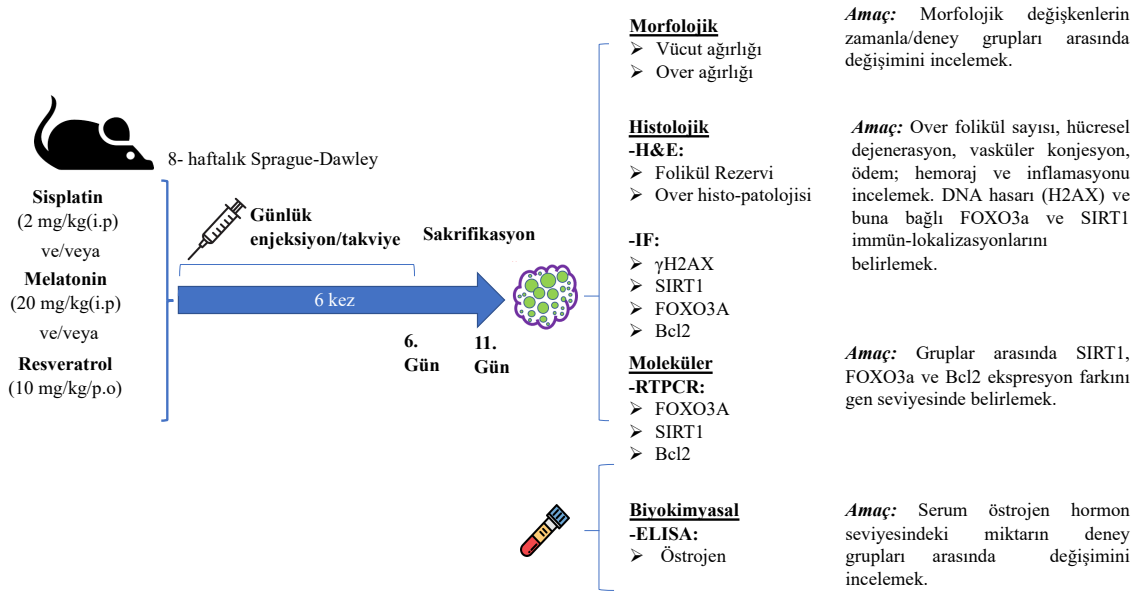
Melatonin, 50 mg/ml'lik konsantrasyonda etanol içinde hazırlandı ve salin içinde seyreltildi. Rat sayısı ve ağırlıklarına bağlı olarak her rata 20 mg/kg olarak hazırlandı ve intraperitoneal olarak verildi (84).

Resveratrol stok solüsyonu etanol içerisinde hazırlandı ve 10 mg/mL'lik konsantrasyonda normal salin içinde seyreltildi. Rat sayısı ve ağırlıklarına bağlı olarak her rata 10 mg/kg olarak hazırlandı ve oral yol (gavaj) ile verildi (85).

3.5. PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİ MODELİNİN OLUŞTURULMASI

Östrus fazında olduğu belirlenen her rata 1ml olacak şekilde uygun konsantrasyonlarda RES oral yol (gavaj) ile, MEL ve SİS ise intraperitoneal olarak 6 gün boyunca her gün verildi. Antioksidanlar (MEL ve RES) SİS enjeksiyonundan iki saat önce uygulandı.

6 günlük periyodun ardından son enjeksiyondan 5 gün sonra, 11. günde ratlara 75 mg/kg Ketamin ve 10 mg/kg Ksilazin anestezisi uygulandı. Ratların abdominal bölgeleri açılarak overleri eksize edildi. Cerrahi sırasında "eksanguinasyon" yani kansız bırakılarak sakrifikasyon işlemi yapıldı. Sol overler histolojik analizler ve immün boyama için %4 parafomaldehit (PFA) içinde fikse edildi. Sağ over ise Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR) analizi için -80 °C'de saklandı. Fikse edilen örnekler kriyomatriks solüsyonuna (Optimal Critical Temperature; OCT) gömülüp, 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Ek olarak, serum E2 seviyesini ölçmek için kalpten alınan kan örneklerinden serum ayrıştırıldı ve hormon seviyesi ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ile tespit edildi. Uygulanan deneysel prosedür ve laboratuvar yöntemleri Şekil 3.1'de belirtildiği gibidir;



Şekil 3.1: Uygulanan deneysel prosedür ve laboratuvar yöntemleri

3.6. ALINAN ÖRNEKLERİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ

Deneysel prosedür olarak alınan kan ve over dokusu örneklerinde histolojik boyama, floresan boyama, RT-PCR ve ELISA deneyleri yapıldı. Uygulanan deneysel prosedürler aşağıda belirtildiği gibidir.

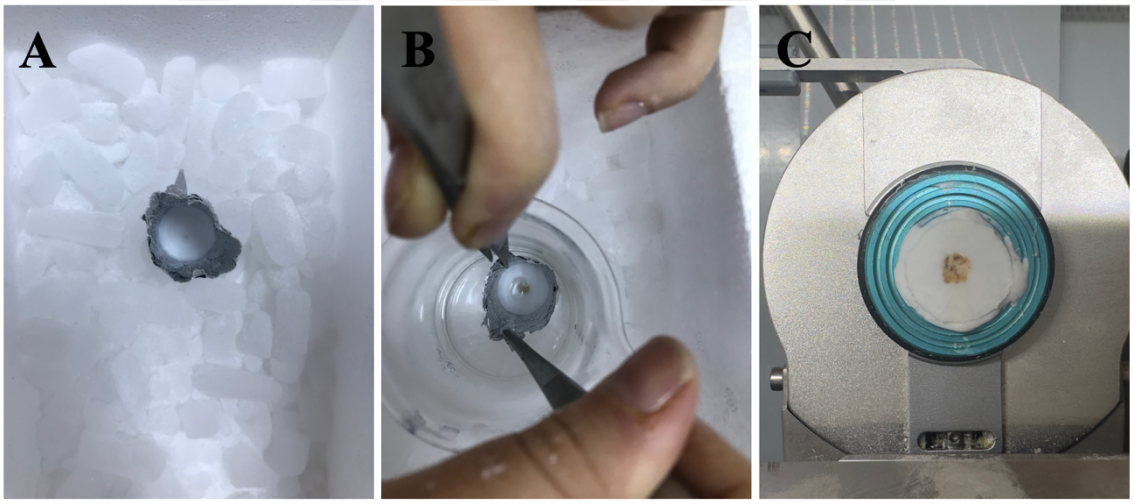
3.6.1. Morfolojik Değerlendime

3.6.1.1. Vücut ve over ağırlığı: Deney süresi boyunca (11 gün) tüm ratlarda klinik parametre olarak vücut ağırlıkları (gr) günlük olarak tartıldı. Deney sonunda tüm gruplara ait ratların over ağırlıkları (gr) tartıldı. Sakrifikasyon günü ağırlıkları tartılan ratların over ağırlık indeksi aşağıda belirtilen şekilde hesaplandı.

Over Ağırlık İndeksi= (Over Ağırlığı/Vücut Ağırlığı) X 100

3.6.2. Histolojik Değerlendirme

3.6.2.1. Doku takibi ve rutin histolojik boyamalar: Alınan overlerde Tablo 3.2 ‘de belirtildiği gibi kriyo doku takibi yapıldı. %4 PFA ile en az 24 saat fikse edilen fikse edilen overlerde sükroz doku takibi uygulandı.



Resim 3.2: Alınan over dokularına uygulanan kriyotakip prosedürü

Fikse olan over dokuları % 10, 20 ve 30’luk sükroz içeren fosfat tamponlu solüsyonda bekletildi. Öncelikle % 10 luk sükroz solüsyonunda dibe çöken over dokusu % 20 lik ve daha sonra da %30 luk sükroz solüsyonlarına aktarıldı. Takibi tamamlanan dokular kriyomikrotomda kesim işlemi için -20 °C’de kriyomikrotom gömme ortamında

(OCT) alındı ve 5 µm kalınlığında doku kesitleri alındı (Resim 3.2) Alınan kesitler -20 °C'de saklandı.

Tablo 3.2: Kriyo doku takibi prosedürü

Amaç	**Kimyasal**	**Süre**
Fiksasyon	% 4 PFA	48 saat
Yıkama	PBS	3x5 dk
Dehidrasyon	%10 sükroz	Doku çökene kadar
Dehidrasyon	%20 sükroz	Doku çökene kadar
Dehidrasyon	%30 sükroz	Doku çökene kadar
Gömme	OCT	

Hematoksilen&Eozin boyama için alınan kesitler Tablo 3.3'te belirtilen prosedür izlenerek boyandı. Lam üzerine alınan kesitler distile suya daldırılarak matriks uzaklaştırıldı. 2 dk hematoksilende bekletildikten sonra 5 dk distile su ile yıkandı. Daha sonra 2 dk eozinde bekletilip 5 dk distile su ile yıkandı. Son olarak dokular dehidratasyon için artan alkol serilerinden geçirilip, 15 dk ksilende bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

Tablo 3.3: Hematoksilen&Eozin boyama prosedürü

Amaç	Kimyasal	Süre
Matriks uzaklaştırma	Distile su	10 dk
Boyama	Hematoksilen	2 dk
Yıkama	Distile su	5 dk
Boyama	Eozin	2 dk
Yıkama	Distile su	5 dk
Dehidrasyon	%80 alkol	5 dk
Dehidrasyon	%96 alkol	5 dk
Dehidrasyon	%96 alkol	5 dk
Kapama	Ksilen	15 dk
Kapama	Entellan	

Periyodik Asit Schiff & Masson Trikrom boyaması için alınan kesitler Tablo 3.4'te belirtilen prosedürler izlenerek boyandı. Distile suda bekletilerek matriks uzaklaştırması yapılan kesitler, 10 dk %0,5'lik Periyodik asit solüsyonunda boyanıp, 5 dk distile suda yıkandı. Ardından, 20 dk Schifft reaktifinde bekletilip, 10 dk ılık distile su ile yıkandı. Daha sonra kesitler sırasıyla 5 dk hematoksilen boyasında boyanıp 5 dk distile suda, 4 dk Biebrik Scarlet-Asit Fuksin boyasında boyanıp 5 dk distile suda yıkandı. Bu aşamaya gelen kesitler, 10 dk fosfomolibdik asit solusyonunda bekletildikten sonra 10 dk açık yeşil boyasında boyandı ve boyaların diferansiyasyonunu sağlamak amacıyla %1'lik asit fuksin solüsyonuna 30sn daldırılıp çıkarıldı. Yükselen alkol serilerinden geçirilen kesitler, şeffaflaştırma işlemi için ksilende yıkandıktan sonra entellan ile kapatıldı.

Tablo 3.4: Periyodik asit schiff &Masson trikrom boyama prosedürü

Amaç	Kimyasal	Süre
Matriks uzaklaştırma	Distile su	10 dk
Boyama	% 0,5 Periyodik Asit	10 dk
Yıkama	Distile su	5 dk
Boyama	Schifft Reaktifi	20 dk
Boyama	Ilık distile su	10 dk
Boyama	Hematoksilen	5 dk
Yıkama	Distile su	5 dk
Boyama	Biebrik Skarlet- Asit Fuksin	4 dk
Yıkama	Distile su	5 dk
Boyama	Fosfomolibdik Asit	10 dk
Boyama	Açık Yeşil	5-10 dk
Yıkama	%1 Asetik Asit	30 sn
Dehidrasyon	%95 Alkol	30 sn
Dehidrasyon	%100 Alkol	30 sn
Kapama	Ksilen	15 dk
Kapama	Entellan	

3.6.2.2. Folikül sayımı: Folikül sayımı tüm over dokusunun her beşinci kesitinde yapıldı. Foliküler yapıları; oosit tek katlı pregranüloza hücreleri tabakasıyla çevrelendiğinde primordial folikül, tek katlı küboidal granüloza hücreleri ile çevrelenmiş bir oosite sahip olduğunda primer folikül, iki katlı granüloza hücre tabakası ve henüz birleşmemiş küçük antrum yapıları gözlendiğinde sekonder folikül, birden fazla granuloza hücre tabakası ve tek bir antrum içerdiğinde ise tersiyer folikül olarak belirlendi. Foliküler kesitte nükleus ve nükleolus içeren oosit mevcut olduğunda primordiyal, primer, sekonder, tersiyer ve atretik foliküller sayıldı. Nükleolusun boyutu 25 μm'den küçüktür; bu şekilde aynı folikülün iki kez sayılması önlenmiştir. Primordial foliküllerin çekirdeği 25 μm 'den küçüktür ve bu nedenle, daha büyük foliküllerin aksine, aynı folikülü iki kez sayma riski yoktur. Atretik foliküller piknotik granüloza hücreleri, fragmente oosit, nükleer membran kaybı veya kümülüs kalitesinin düşük olması ile belirlendi. H&E boyama metodu uygulanmış doku kesitlerinin Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarında bulunan dijital fotoğraf makinesi (Zeiss, Almanya) ataçmanlı ışık mikroskobuyla (Zeiss, Almanya) ile incelendi.

3.6.2.3. Histopatolojik değerlendirme: Over foliküllerinin dağılımını incelemek için H&E boyanan örneklerde ışık mikroskopisi ile histopatolojik değerlendirme (foliküller hücre dejenerasyonu, vasküler konjesyon/hemoraji ve inflamasyon) yapıldı. Değerlendirmeler için 0'dan 4'e kadar ordinal skala kullanıldı; 0=normal, 1=az, 2=orta, 3=çok, 4=çok şiddetli. Tüm gruplardaki örneklerde overde karbonhidrat depolarını ve zona pellusida ile oositin bütünlüğünü tespit etmek için Periyodik Asit Schiff (PAS) ve over dokusu içindeki kolajen birikiminin miktarını tespit etmek için Masson'un Trikrom (MT) boyaması yapıldı. PAS&MT boyanan örneklerde ışık mikroskopisi ile histopatolojik değerlendirme (fibrotik alanlar) yapıldı. Boyanan preparatlardan 10X büyütmede çekilen fotoğraflardan rastgele 5 alan seçilerek Image J programı ile kollajen miktarı hesaplandı. H&E ve PAS&MT boyama metodu uygulanmış doku kesitlerinin Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarında bulunan dijital fotoğraf makinesi (Argenit, Türkiye) ataçmanlı ışık mikroskobuyla (Zeiss, Almanya) ile histopatolojik incelemeleri yapıldı ve fotoğrafları çekildi.

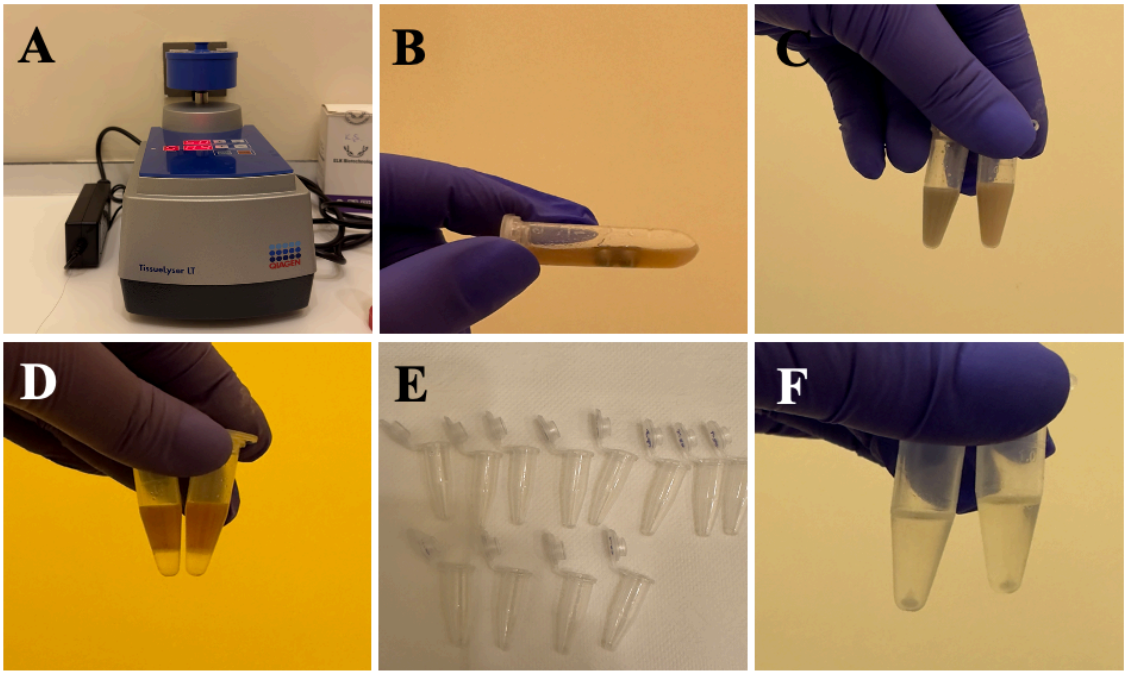
3.6.2.4. İmmünfloresan boyama: Kriyokesitlerde immünfloresan (İF) boyama prosedürü Tablo 3.5'te belirtildiği gibi uygulandı. Kısaca; 5 um kalınlıkta slaytlara yerleştirilen kesitler, % 0,1 Triton-X solüyonunda 30 dk bekletildi. Yıkama solüsyonu olarak %0,05 Tween 20 içeren fosfat tamponlu tuzlu su (PBS-T) kullanıldı. PBS-T içinde yıkandıktan sonra kesitlere bloklama tamponu (%4 bovin serum albümini-BSA ve PBS içinde %5 normal keçi serumu-NGS) eklendikten sonra ve lamlar 1 saat oda sıcaklığında nemlendirilmiş bir odada inkübe edildi. Daha sonra kesitler, 16 saat boyunca 4°C'de aşağıdaki primer antikorlarla (pH2Ax, SIRT1, FOXO3a, Bcl2) boyandı. Slaytlar daha sonra PBS-T ile yıkandı ve oda sıcaklığında 2 saat boyunca Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit (1:1000, Invitrogen) ve Alexa Fluor 594 goat anti-mouse (1:1000, Invitrogen) sekonder antikorları ile inkübe edildi. 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:20.000, Sigma) ile PBS: Gliserol (1:1) kapatma solüsyonu içerisinde kesitler kapatıldıktan sonra ve karanlıkta, 4 ^{o}C 'de saklandı. Boyanan örnekler floresan mikroskop altında incelendi. İmmunofloresan metodu uygulanmış doku kesitleri Olympus kameralı (U-TV0.63XC) Olympus BX53F mikroskop ile görüntülendi. Kesitlerindeki immünoreaktivite yoğunlukları X20'de Image J software programı ile hesaplandı.

Tablo 3.5: İmmünfloresan boyama prosedürü

Amaç	Kimyasal	Süre
Matriks uzaklaştırma	Distile su	10 dk
Permabilizasyon	% 0,1 Triton-X	30 dk
Yıkama	PBS-T	5 dk
Bloklama	% 4 BSA- % 5 NGS	1 saat
Boyama	Primer Antikor (SIRT1, pH2Ax, FOXO3a)	14 saat
Yıkama	PBS-T	3X5 dk
Boyama	Sekonder Antikor (Alexa488, Alexa 594)	2 saat
Yıkama	PBS-T	3X5 dk
Kapama	PBS: Gliserol: DAPI	

3.6.3. Moleküler Değerlendirme

3.6.3.1. **RT-PCR:** Deney gruplarına ait over dokularında SIRT1, FOXO3a, Bcl2 mRNA ekspresyon seviyelerinin tespiti yapıldı. Total RNA, üreticinin protokollerine göre TRIpure reaktifi (ELK Biyoteknoloji, Çin) kullanılarak, yaklaşık 50 mg ağırlığındaki dondurulmuş over dokusundan izole edildi.



Resim 3.3: Over dokularına uygulanan RNA izolasyonu prosedürü.

Homojenizatör yardımıyla 15 dk parçalanan doku homojenatı üzerine kloroform eklendi. Vortex yardımıyla karıştırılan homojenattan sentrifügasyon yardımıyla üst faz (total RNA) alındı. Ayrı tüpe aktarılan total RNA üzerine izopil alkol eklenerek çöktürüldü. Sentrifügasyon yardımıyla pellet haline getirilen total RNA %75 EtOH ile yıkandı ve elüsyon için oda sıcaklığında 15 dk kurutuldu (Şekil 3.4). 30 µl ribonükleaz (RNAz) içermeyen su içerisinde kurutulan RNA'lar sulandırıldı. Elde edilen RNA'ların saflığı ve konsantrasyonu, Nano Drop ®ND-100 spektrofotometre ile 260 nm ve 280 nm'deki absorbans değerlerinin oranlanmasıyla OD260 / 280 belirlendi. Bu oranlama sonucunda 1.8- 2.0 aralığında çıkan değerler saf RNA olarak kabul edildi. TRIpure reaktifi kullanılarak total RNA izolasyon prosedürü Tablo 3.6'da gösterildiği gibidir.

Tablo 3.6: TRıpure ile total RNA izolasyon prosedürü

Amaç	**Kimyasal**	**Süre**
Homojenizasyon	TRIpure	15 dk +4 ^{O}C
Faz ayrıştırılması	Klorofrom	15 sn vortex
Sentrifügasyon		10 dk +4 ^{O}C
Çöktürme	İzopropil alkol	10 dk, oda sıcaklığı
Sentrifügasyon		10 dk +4 ^{O}C
Yıkama	%75 EtOH	
Sentrifügasyon		3 dk +4 ^{O}C
Kurutma		15 dk, oda sıcaklığı
Elüsyon	RNAz içermeyen su	

Her örnekten yaklaşık 3 ug tamamlayıcı DNA (complementary DNA; cDNA) sentezlenecek şeklinde sulandırılan RNA'lar dNTP karışımı, RNAase inhibitörü, ters transkriptaz (200 U/ µl) ve random hexamer (50 µM) (ABT, Ankara, Türkiye) içeren cDNA kiti kullanılarak cDNA'ya çevrildi. cDNA sentezi için Tablo3.7 'de belirtilen prosedür uygulandı.

Tablo 3.7: cDNA sentezi prosedürü

Sıcaklık	**Zaman**	**Tekrar**
25 °C	10 dk	1
37 °C	120 dk	1
85 °C	5 dk	1
4°C	∞	1

PCR reaksiyonları, 50 ng template tamamlayıcı DNA (cDNA) ve 2 ul, 10 x PCR tamponu içeren 20 ul'lik total hacimde gerçekleştirildi. SIRT1, FOXO3a, Bcl2 için zincir reaksiyonu (PCR) amplifikasyonları, Tablo 3.8' de belirtilen prosedüre göre SYBR Green kullanılarak gerçekleştirildi.

Tablo 3.8: RT-PCR prosedürü

Primer Adı	**Sıcaklık**	**Süre**	**Tekrar**
Denatürasyon	95°C	3 dk	1
Tekrar	95°C	5 sn	45
	53°C	34 sn	
Erime Eğrisi Analizi	65-95°C	5 sn	1

Kullanılan primer dizileri Tablo 3.9' te belirtildiği gibidir. mRNA ölçümü için, her bir genin Ct'si, kontrol gen ifadesine göre normalleştirildi. B-aktin gen ekspresyonu standart olarak kullanıldı. Amplifikasyonun spesifitesi erime eğrisi analizi ile doğrulandı. Beta-aktin mRNA'sın normalizasyondan sonra, numunelerin gen ekspresyon seviyelerini ölçmek için karşılaştırmalı eşik (CT) metodu (ΔΔCT metodu) kullanıldı. Gen ekspresyonundaki oransal değişiklikler $2^{-\Delta\Delta CT}$ denklemi kullanılarak hesaplandı.

Tablo 3.9: Primer dizileri

Primer Adı	**Forward**	**Reverse**
Beta Aktin	CAGGGTGTGATGGTGGGTATGG	AGTTGGTGACAATGCCGTGTTC
FOXO3a	CTCCCGTCAGCCAGTCTATG	GCTTAGCACCAGTGAAGTTCC
SIRT1	GGCACCGATCCTCGAACAAT	CGCTTTGGTGGTTCTGAAAGG
Bcl2	GCAGCTTCTTTCCCCGGAAGGA	AGGTGCAGCTGACTGGACATCT

3.6.4. Biyokimyasal Değerlendirme

3.6.4.1. Serum östrojen seviyesinin belirlenmesi: Serum E2 konsantrasyonları ELISA kiti ile ölçüldü. Ratların vena cava inferiorundan alınan ve EDTA'lı tüplere konan 5 ml kan örneklerinden E2 düzeyleri incelendi. Serum numuneleri tam kan örnekleririnin 1500 rpm'de 15 dk +4 ºC 'de santrifüj işlemi ile elde edildi ve kan serumu -80 °C'de saklandı. 25x yıkama tamponunu distile su ile 1x çalışma konsantrasyonuna seyreltildi. 10 µL Biyotinlenmiş-Konjugat ile 990 µL Biyotinlenmiş-Konjugat Biyotinlenmiş-Konjugat Seyreltici ile 100 kat seyreltildi. Stok standart solüsyonu 1,0 mL Standart Seyreltici ile çözdürüldü (1000 pg/mL) ve oda ısısında 10 dakika bekletildi. 0,5 mL Standart Seyreltici içeren 7 tüp hazırlandı ve seyreltme serisi oluşturmak için seyreltilmiş standardı kullanıldı. Bir sonraki transferden önce her tüp iyice karıştırıldı. 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,25 pg/mL, 15,63 pg/mL gibi 7 seyreltilmiş standart noktası oluşturuldu ve son tüpe sadece Standart Seyreltici (0 pg/mL) kondu. Sreptavidin-HRP 990 µL HRP Seyreltici ile 10 µL Streptavidin-HRP konularak 100 kat seyreltildi.

Kullanmadan önce tüm malzemeler ve hazırlanan reaktifler oda sıcaklığına getirildi. Kuyu başına 50 µL standart veya örnek eklendi. Her kuyucuğa 50 µL Biyotinlenmiş -Konjugat (1x) eklendi ve 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Kuyucuklar yıkama solüsyonu ile yıkandı ve Streptavidin-HRP (1x) eklenip 37°C'de 1 saat boyunca inkübe edildi. Kuyucuklar yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa substrat solüsyonu eklendi ve 37°C'de 20 dakika boyunca inkübe edildi. Substratlar eklendikten ve substrat gelişimi için karanlıkta inkübe edildikten sonra, antikor aktivitesi bir mikroplaka okuyucu kullanılarak analiz edildi. Kuyucuklardaki renk, hormona bağlı miktarı ile orantılı olarak değişmektedir. Rengin yoğunluğu 450 nm'de ölçüldü. Serum sıvılarındaki hormon düzeyleri spektrofotometre (Spectrum Instruments, SP-UV 300SRB) ile ölçüldü.

3.7. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

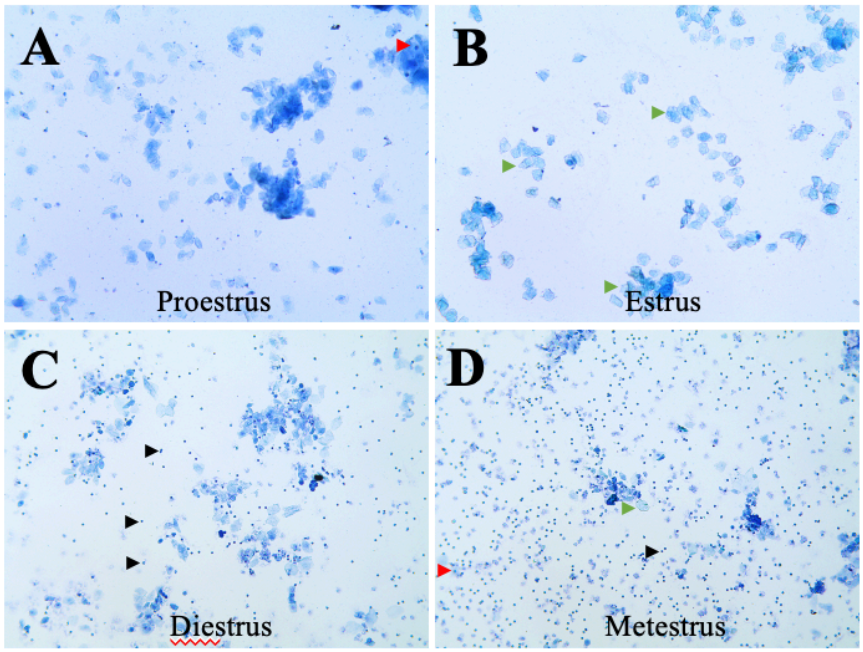
İstatistiksel analiz ve hesaplamalar IBM SPSS Statistics 21 (IBM) ile gerçekleştirildi. Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve Shapiro-Wilk testi kullanılarak incelendi. Değişimleri tanımlamak için ortalama ± standart sapma değerleri kullanılmıştır. Parametrik test varsayımlarını karşılayan

değişkenler tek yönlü ANOVA ile değerlendirildi. ANOVA sonucunda bir farklılık tespit edildiğinde, Bonferroni post hoc testi kullanılarak bu farklılığın kaynağı araştırıldı. Gruplar arasında parametrik olmayan değişkenleri karşılaştırmak için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. Bir fark tespit edildiğinde, farklı grupları belirlemek için Mann-Whitney testi ve Bonferroni düzeltmesi ile post hoc ikili karşılaştırmalar yapıldı. P değeri 0,002'in altındaki değerler anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. MORFOLOJİK BULGULAR

Deney başlangıcında tüm ratların estrus fazında olduğu belirlendi. Proöstrus aşamasında çekirdekli epitel hücreleri (Resim 4.1, kırmızı ok) gözlendi. Östrus fazında çekirdeksiz kornifiye hücreler (Resim 4.1, yeşil ok) gözlendi. Lökositler (Resim 4.1, siyah ok) sadece diestrus fazında gözlendi. Metestrus fazında çekirdekli epitel, çekirdeksiz kornifiye epitel hücreleri ve lökositler izlendi.



Resim 4.1: Vajinal sürüntü örneklerinde metilen mavisi boyama

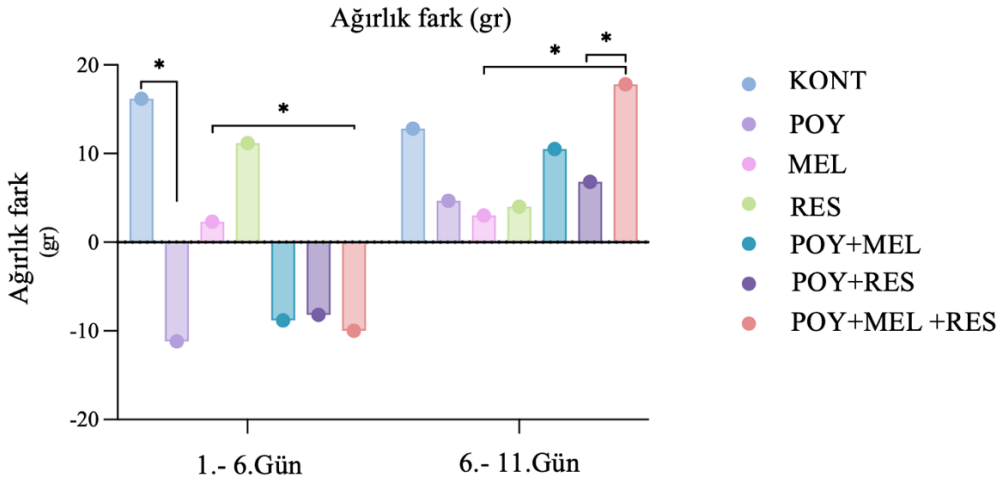
Deney gruplarına ait hayvanların vücut ağırlıklarının karşılaştırılması Tablo 4.1 ve Şekil 4.1'de gösterildiği gibidir. Tüm gruplara ait ratların başlangıç ağırlıkları birbirine yakın olduğundan gruplar arasında istatistiksel anlamlılık bulunmadı ($p>0,002$). Ancak deney süresi boyunca (11 gün) KONT, MEL ve RES gruplardaki ratlarda kilo artışı saptandı. 6. günde SİS grubundaki ağırlık kaybı KONT grubuna göre anlamlı idi. Ayrıca 6.günde POY+MEL+RES grubundaki ağırlık azalışı MEL grubuna kıyasla anlamlı bulundu. 6.-11. günlerde POY uygulaması sonrası tedavi uygulanan gruplarında

(POY+MEL, POY+RES ve POY+MEL+RES) KONT grununa benzer şekilde kilo artışı gözlendi. 6 ve 11. günlerde POY+MEL+RES grubundaki ağırlık artışı MEL ve POY+RES grubuna göre anlamlı bulundu.

Tablo 4.1: Tüm deney gruplarında 1., 6. ve 11. gün vücut ağırlıkları

GRUP	Ağırlık fark (1.-6. Gün) (gr)	Ağırlık fark (6.-11. Gün) (gr)
KONT	5,5±4,7*	12,8±10,4
POY	11,1±4,6ψ	4,6±5,7
MEL	2,3±2,9	3,0±2,7
RES	11,1±14,9	4,0±23,3
POY+MEL	8,8±5,9	10,5±3,8
POY+RES	8,1±4,7	6,8 ±2,3
POY+MEL+RES	10,0±1,5Ω	17,8±2,1Ωδ

ψ, *, Ω, φ, ω: p<0,002 *: POY grubuna göre anlamlı, ψ: KONT grubuna göre anlamlı,Ω: MEL grubuna göre anlamlı φ: RES grubuna göre anlamlı, δ: POY+RES grubuna göre anlamlı. POY: prematür over yetmezliği, KONT: kontrol, MEL: melatonin, RES: resveratrol.



Şekil 4.1: Tüm deney gruplarında vücut ağırlık değişimleri

Tüm gruplardaki ratların over ağırlığı ve over ağırlık indeksinin ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.2'de gösterildiği gibidir. Tek yönlü ANOVA analizine göre gruplar arasında anlamlılık tespit edilmedi. POY grubunda KONT

grubuna kıyasla over ağırlığında anlamlı bir azalma görüldü. POY grubu ile POY+MEL, POY+RES, POY+MEL+RES grupları kıyaslandığında bu tedavi gruplarının over ağırlığının bir miktar arttığı gözlendi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.

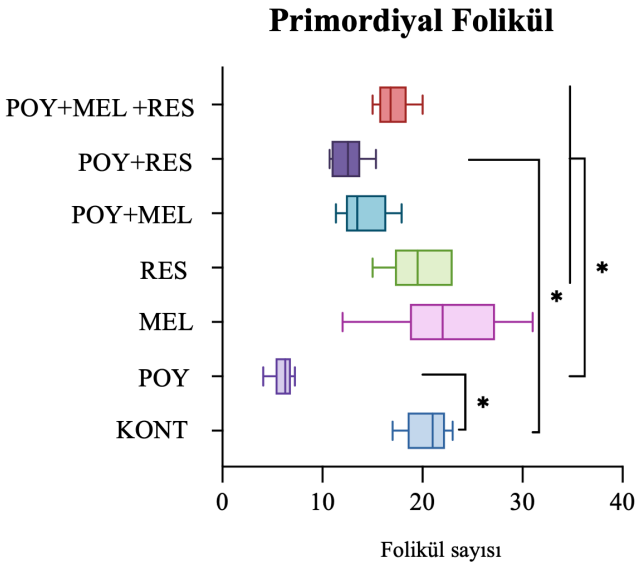
Tablo 4.2: Tüm deney gruplarında over ağırlıkları ve over ağırlık indeksi

GRUP	Over Ağırlığı (gr)	Over Ağırlık İndeksi
KONT	0,06±0,01	0,036±0,008
POY	0,04±0,00	0,030±0,008
MEL	0,05±0,01	0,035±0,008
RES	0,06±0,02	0,032±0,008
POY+MEL	0,05±0,01	0,033±0,005
POY+RES	0,05±0,01	0,035±0,008
POY+MEL+RES	0,06±0,12	0,036±0,008

POY: prematür over yetmezliği, KONT: kontrol, MEL: melatonin, RES: resveratrol.

4.2. HİSTOLOJİK BULGULAR

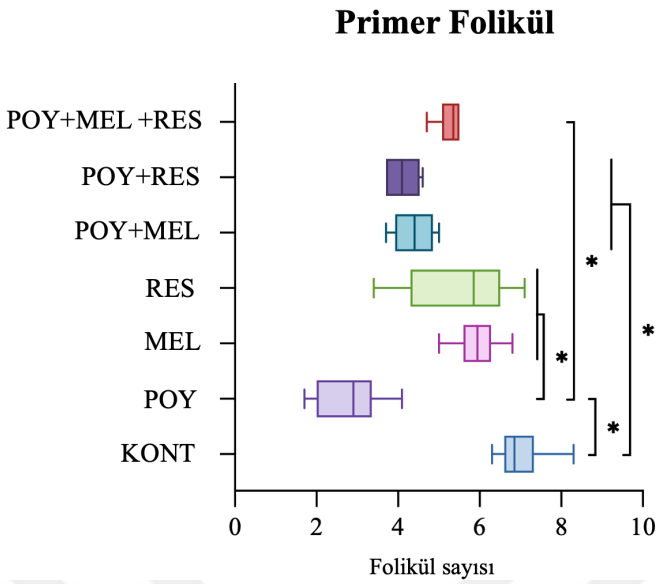
4.2.1. Tüm Gruplara Ait Over Folikül Sayıları



Şekil 4.2: Gruplar arası primordiyal folikül sayısı karşılaştırılması

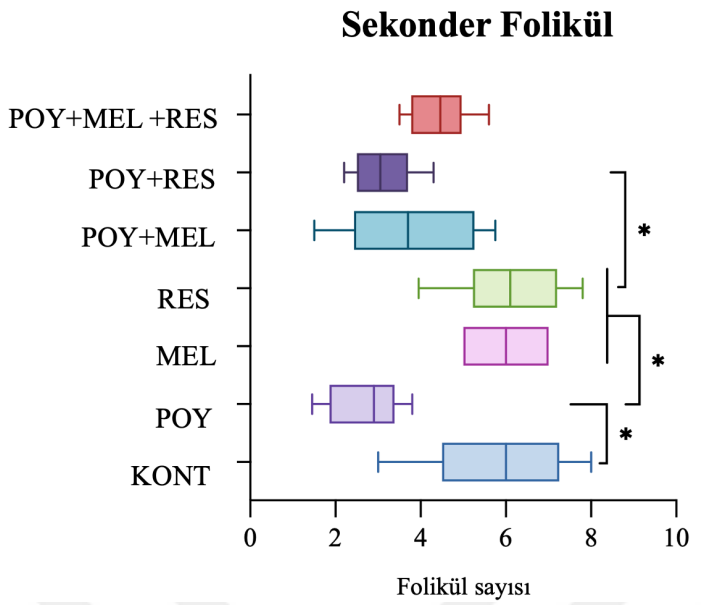
Tüm gruplara ait primordiyal, primer, sekonder ve atretik folikül sayılarında tek yönlü ANOVA analizine göre gruplar arasında anlamlı farklılıklar bulundu ($p<0,002$).

Gruplar arasındaki primordiyal folikül sayısındaki değişim Şekil 4.2'de belirtildiği gibidir. Primordiyal folikül sayısında KONT grubuna kıyasla MEL ve RES grubundaki primer folikül sayısında herhangi bir fark yoktu. POY grubundaki primordiyal folikül sayısındaki azalış KONT grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0,002$). POY+RES grubundaki primordiyal folikül sayısındaki azalış KONT grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p<0,002$). MEL grubundaki primordial sayısındaki artış POY grubuna kıyasla anlamlı bulunmazken; KONT, RES, POY+MEL, POY+RES, POY+MEL+RES grubundaki primordiyal folikül sayısındaki artış POY grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p<0,002$). POY+MEL, POY+RES ve POY+MEL+RES grupları kıyaslandığında POY+MEL+RES grubunda primordiyal folikül POY+MEL, POY+RES gruplarına kıyasla daha fazla görüldü ancak bu artış sadece POY grubuna kıyasla anlamlı idi ($p<0,002$).



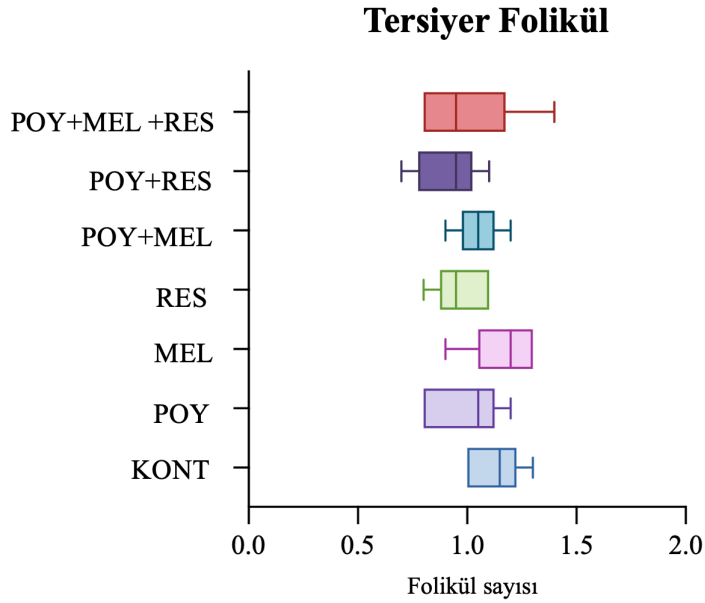
Şekil 4.3: Gruplar arası primer folikül sayısı karşılaştırılması

Gruplar arasındaki primer folikül sayısındaki değişim Şekil 4.3'de belirtildiği gibidir. Primer folikül sayısında KONT grubuna kıyasla MEL ve RES grubundaki primer folikül sayısında herhangi bir fark yoktu. POY grubundaki primer folikül sayısı KONT grubuna kıyasla 2,5 kat azalmıştı ve bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,002$). POY grubunda primer folikül sayısındaki azalış MEL, RES ve KONT grubuna göre anlamlı idi ($p<0,002$). POY grubuna kıyasla POY+MEL ve POY+RES grubundaki primer folikül sayısındaki artış anlamsız bulunurken, POY+MEL+RES grubundaki artış anlamlı bulundu ($p<0,002$). Aynı zamanda KONT grubuna kıyasla POY+MEL ve POY+RES grubunda primer folikül sayısında anlamlı azalış bulundu ($p<0,002$).



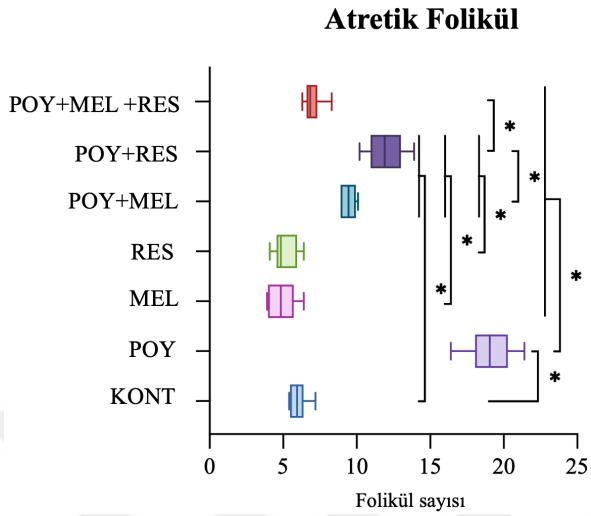
Şekil 4.4: Gruplar arası sekonder folikül sayısı karşılaştırılması

Gruplar arasındaki sekonder folikül sayısındaki değişim Şekil 4.4'de belirtildiği gibidir. Sekonder folikül sayısında KONT grubuna kıyasla MEL ve RES grubundaki primer folikül sayısında herhangi bir fark yoktu. KONT, MEL ve RES grubuna göre POY grubunda anlamlı bir azalış görüldü ($p<0,002$). Ayrıca sekonder folikül sayısında, RES grubuna kıyasla POY+RES grubunda anlamlı bir azalma görüldü ($p<0,002$).



Şekil 4.5: Gruplar arası tersiyer folikül sayısı karşılaştırılması

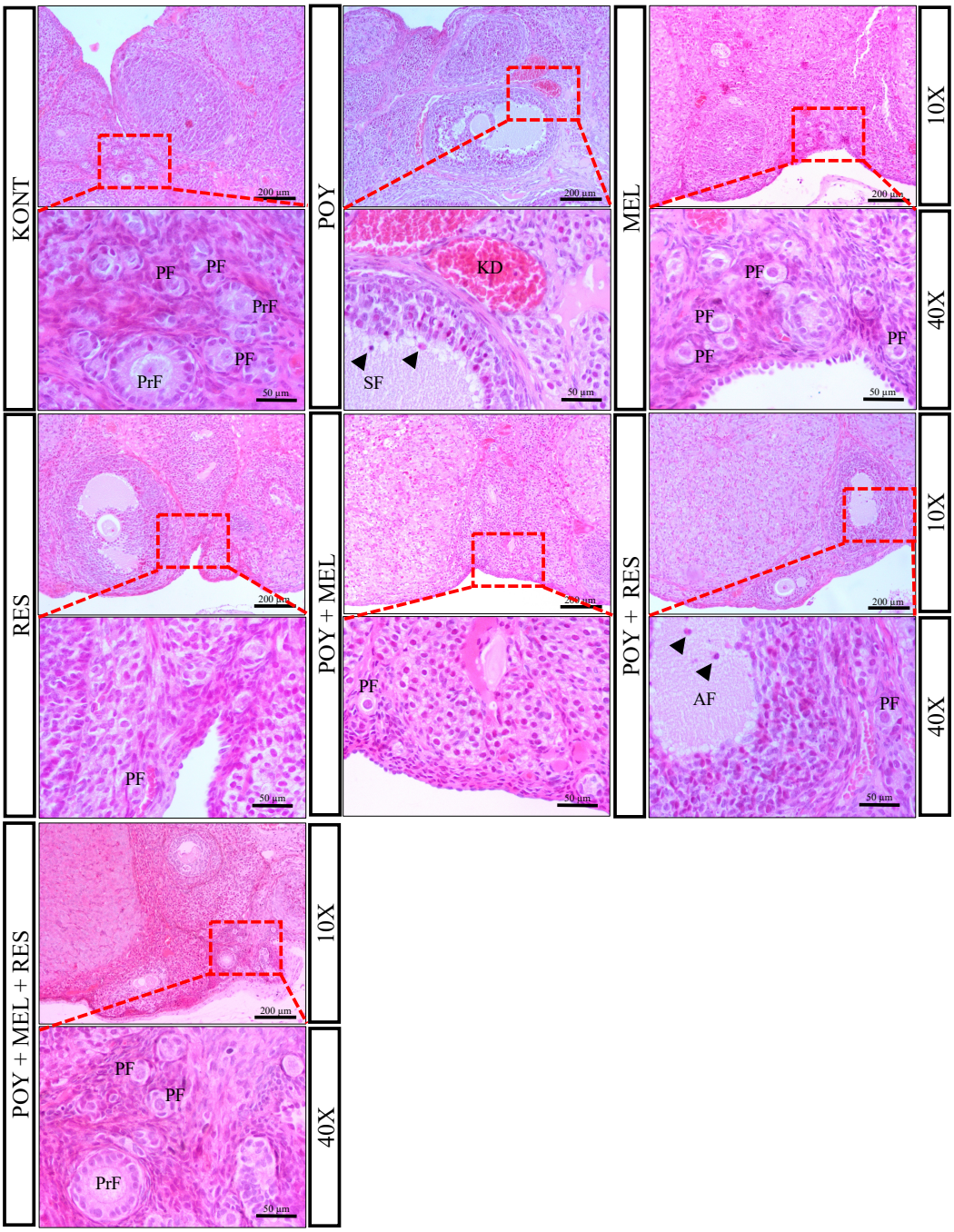
Gruplar arasındaki tersiyer folikül sayısındaki değişim Şekil 4.5'de belirtildiği gibidir. Gruplar arasında tersiyer folikül sayısında herhangi bir fark bulunmadı.



Şekil 4.6: Gruplar arası atretik folikül sayısı karşılaştırılması

Gruplar arasındaki atretik folikül sayısındaki değişim Şekil 4.6'da belirtildiği gibidir. Atretik folikül sayısında KONT grubuna kıyasla MEL ve RES grubunda herhangi bir fark yoktu. POY grubunda tüm gruplara kıyasla anlamlı bir artış bulundu ($p<0,002$). POY ve POY+MEL grupları karşılaştırıldığında POY+MEL grubundaki artış MEL grubuna göre anlamlı idi ($p<0,002$). RES ve POY+RES grupları karşılaştırıldığında POY+RES grubundaki artış RES grubuna göre anlamlı bulundu ($p<0,002$). POY+MEL ve POY+RES grupları karşılaştırıldığında POY+RES grubundaki artış POY+MEL grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p<0,002$). POY+MEL+RES grubundaki azalış ise POY+RES grubuna kıyasla anlamlı bulundu ($p<0,002$).

4.2.2. Hematoksilen & Eozin Bulguları



Resim 4.2: Deney gruplarında hematoksilen&eozin boyaması. PF: primordiyal folikül, PrF: Primer folikül, SF: Sekonder Folikül, AF: Atretik folikül, KD: Kan damarı, ok başı: apoptotik hücre

KONT grubuna ait over dokusunda düzenli korteks ve medulla organizasyonu görüldü. Korteks yüzeyinde tek katlı kübik hücrelerden oluşmuş germinal epitel izlendi. Germinal epitel altında tunika albuginea gözlendi (Resim 4.2). Over folikülleri tunika

albugenia altında görüldü. Foliküllerin çevresi bağ doku stroması ile çevriliydi. Korteks bölümünde primer oosit ve çevresindeki tek katlı yassı foliküller hücrelerin oluşturduğu primordiyal foliküller (PF) gözlendi. Primer oosit'in tek katlı ya da çok katlı kübik hücrelerle çevrelendiği erken ve geç primer foliküller primordiyal foliküllerden daha az sayıda idi ve daha büyüktü. Aynı zamanda primer folikül (PrF) yapılarında oositin etrafında zona pelusida görüldü. Granüloza hücreleri arasında antrum boşluğunun görülmesi ile tanımlanan sekonder foliküller (SF) görüldü. Daha büyük antrum yapısına sahip tersiyer foliküller izlendi. Oositi çevreleyen zona pellusida tabakası sekonder ve tersiyer foliküllerde daha belirgin olarak izlendi. Graaf foliküllerde oosit çevresinde organize olan granüloza hücrelerinin oluşturduğu korona radiata tabakası izlendi. Tersiyer ve sekonder foliküllerde belirgin teka interna ve eksterna tabakaları izlendi. Ayrıca H&E ile ile açık boyanmış granuloza lutein hücreleri ve koyu boyanmış teka lutein hücrelerinin oluşturduğu korpus luteum yapıları izlendi. Medulla bölgesinde zengin kan damarları (KD), bağ doku hücreleri ve lifleri izlendi (Resim 4.2).

POY grubu over dokusuna ait korteks yüzeyinde yer yer yassı ve kübik hücrelerden oluşan germinal epitel izlendi. Germinal epitel altında tunika albuginea izlendi. Korteks bölgesinde KONT grubuna kıyasla sayıca azalmış ve dejenere olmuş primordiyal folikül yapıları görüldü. Aynı zamanda dejenere olan primer ve sekonder folikül yapıları içerisinde dejenere olmuş oosit görüldü. Dejenere foliküllere ek olarak atretik foliküller (AF) görüldü. Primer ve sekonder foliküllerde dejenere oosit ve zona pelusida (atretik yapılar) gözlendi. Folikül atrezisi özellikle gelişmekte olan foliküllerde gözlendi. Atretik preantral foliküllerde, dejenere olmuş oosit ve apoptotik hücreler (Resim 4.2, ok başı) içeren düzensiz granüloza hücre tabakası gözlendi. Atretik antral foliküllerde oosit intakt olmasına rağmen granüloza tabakasında apoptotik hücreler (>%5) ve teka tabakasında hipertrofi gözlendi. Atrezi ilerledikçe granüloza hücrelerinin tamamen kaybolduğu ve oositin dejenere olduğu gözlendi. Atretik foliküllerde hücresel vakuolizasyon gözlendi. Atretik foliküllerin etrafında hemorojik alanlar görüldü. Atretik foliküllere ek olarak kistik foliküller görüldü. Kistik foliküllerde folikül lümenine dökülmüş apoptotik granüloza hücreleri gözlendi (Resim 4.2, ok başı).

MEL ve RES grubuna ait over dokusu KONT grubuna benzerdi. MEL ve RES grubuna ait over dokusu düzenli korteks ve medulla organizasyona sahipti. Overin en dış kısmında yer alan tek katlı kübik hücrelerin oluşturduğu germinal epitel ve altında sıkı

fibröz bağ dokusundan oluşan tunika albuginea gözlendi. Primer oosit ve tek katlı yassı foliküler hücrelerin oluşturduğu primodiyal foliküler yapıları görüldü. KONT grubunda görülen primer ve sekonder, tersiyer folikül ve korpus luteum yapıları izlendi (Resim. 4.2).

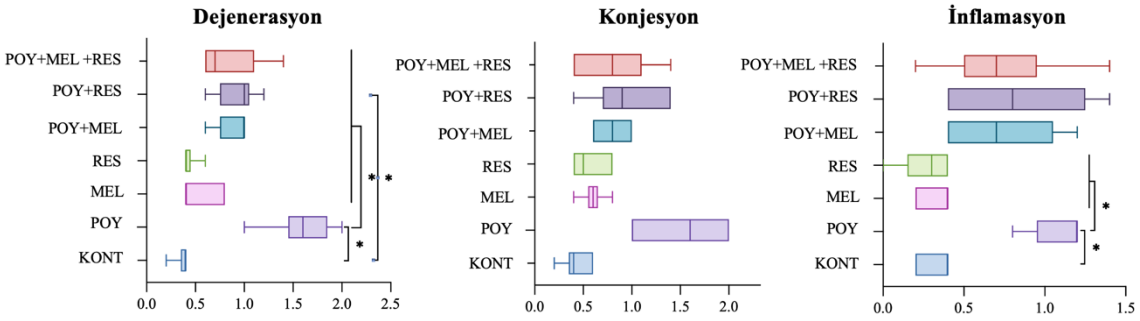
POY+MEL grubuna ait overin en dışında tek katlı kübik veya yassı epitelden oluşan germinal epitel hücreleri ve altında tunica albuginea izlendi. Korteks bölümündeki sağlıklı primordiyal ve gelişmekte olan folikül sayısı POY grubuna oranla daha fazlaydı (Resim 4.2). Ancak bazı alanlar da atretik ve kistik foliküller görüldü. POY grubuna kıyasla az miktarda da olsa atretik foliküller görüldü. Sağlıklı oosit etrafında belirgin zona pelusida ve korona radiata hücreleri içeren tersiyer foliküller bazı alanlarda az sayıda da olsa görüldü.

POY+RES grubuna ait over dokusunda korteks tabakasındaki germinal epitel ve tunika albugenia KONT grubunda görüldüğü gibiydi (Resim 4.2). Ancak korteks ve medullada hafif hemorojik alanlar görüldü. Sağlıklı primordiyal, primer ve sekonder folikül sayısı POY grubuna göre anlamlı derecede fazladı. POY grubuna göre daha az sayıda ancak MEL ve RES ve KONT grubuna kıyasla daha fazla sayıda kistik ve atretik folikül yapıları gözlendi (Resim 4.2). Birçok alanda atretik foliküllerde dejenere oosit ve apoptotik granüloza hücreleri görüldü (Resim 4.2, ok başı). Birkaç alanda olgun Graaf folikülü izlendi.

POY+MEL+RES grubuna ait over dokusunun germinal epitel ve tunika albugenia tabakaları KONT grubunda görüldüğü gibiydi. Kortekste POY, POY+MEL ve POY+RES grubuna kıyasla daha fazla sayıda sağlıklı primordiyal ve gelişmekte olan foliküller görüldü (Resim 4.2). Bazı alanlarda yer yer atretik ve kistik folikül gözlendi. Sağlıklı primer ve sekonder foliküllerde belirgin zona pelusida ve folikül etrafında yerleşik teka hücreleri görüldü. Bazı alanlarda POY, POY+MEL, POY+RES grubundaki konjesyon ve atretik folikül yapıları gözlendi.

4.2.3. Histopatolojik Bulgular

Tüm deney gruplarına ait over dokusunda yapılan histopatolojik skorlamaların gruplar arası karşılaştırılması Şekil 4.7'de belirtildiği gibidir.



Şekil 4.7: Histopatolojik skorlamaların gruplar arası karşılaştırılması

KONT grubuna ait over dokusunda foliküler hücre dejenerasyonu çok az alanda gözlendi. MEL ve RES gruplarında KONT grubuna benzer şekilde foliküler hücre dejenerasyonu oldukça sınırlıydı. Bu nedenle MEL, RES ve KONT grupları arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. POY grubunda görülen foliküler hücre dejenerasyonu diğer tüm deney gruplarına kıyasla anlamlı derecede fazla bulundu ($p<0,002$). KONT grubuna kıyasla POY+RES grubunda anlamlı derecede artmış foliküler hücre dejenerasyonu görüldü ($p<0,002$). POY grubu ile POY+MEL grubu kıyaslandığında POY+MEL grubunda foliküler hücre dejenerasyonunun anlamlı derece azaldığı görüldü ($p<0,002$). POY grubu ile POY+RES grubu kıyaslandığında POY+RES grubunda foliküler hücre dejenerasyonunun anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p<0,002$). POY+MEL ve POY+RES gruplarındaki dejenere foliküller hücreler karşılaştırıldığında iki grupta da kontrole kıyasla azalmış dejenerasyon gözlendi bu nedenle bu gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. POY ile POY+MEL+RES grubu kıyaslandığında ise POY+MEL+RES grubunda foliküler hücre dejenerasyonunun anlamlı derecede azaldığı görüldü ($p<0,002$).

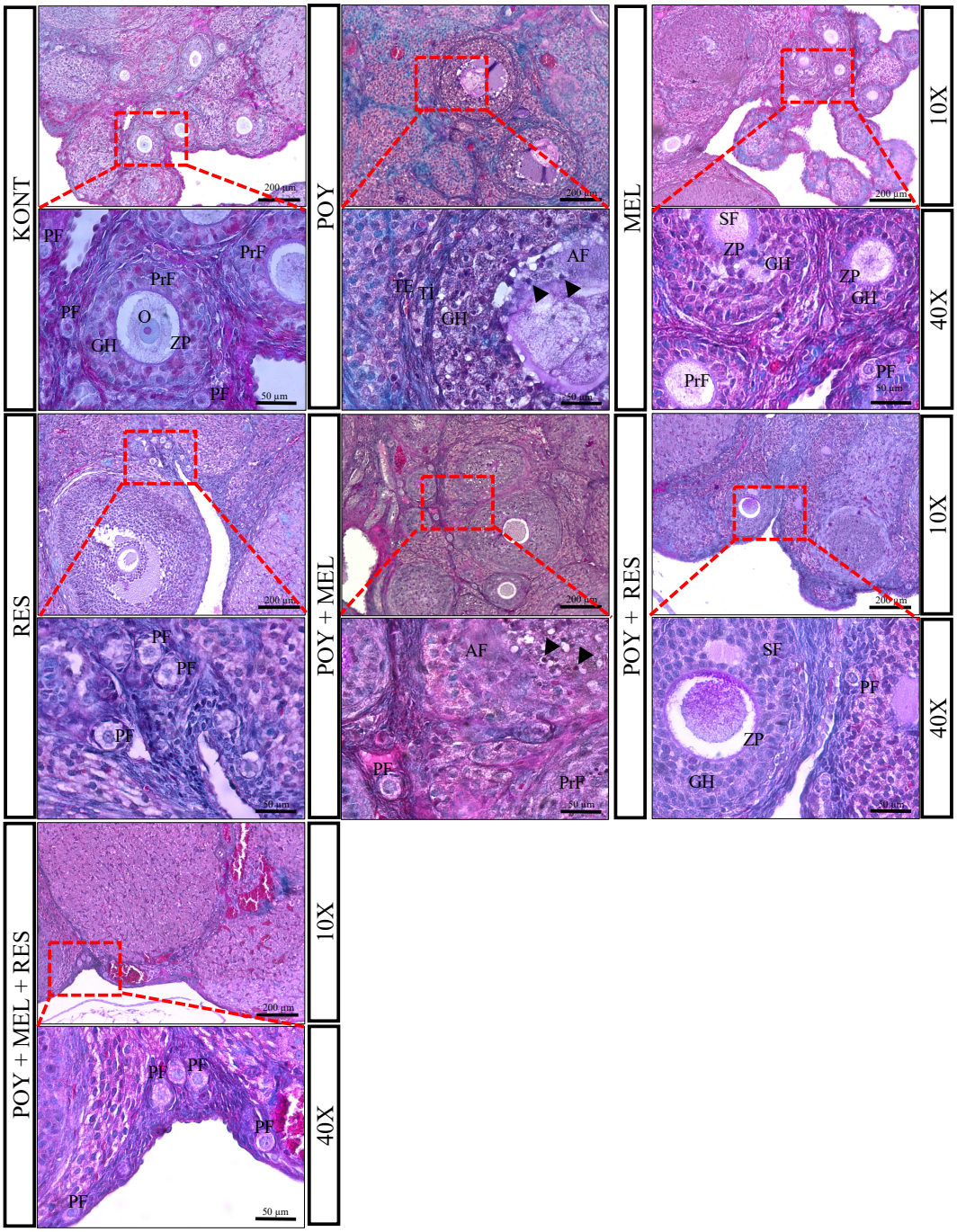
KONT grubuna ait over dokusunda çok az miktarda hemorojik alanlar gözlendi. MEL ve RES gruplarında KONT grubuna benzer şekilde hemorojik alanlar oldukça sınırlıydı. Bu nedenle MEL, RES ve KONT grupları arasında anlamlı bir farklılık izlenmedi. POY grubu ile POY+MEL grubu kıyaslandığında POY+MEL grubunda hemorojik alanların azaldığı görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. POY grubu ile POY+RES grubu kıyaslandığında POY+RES grubunda hemorojik alanların azaldığı görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. POY+MEL ve POY+RES gruplarındaki hemorajik alanlar karşılaştırıldığında iki grupta da kontrole kıyasla azalmış hemoraji gözlendi bu nedenle bu gruplar arasında anlamlı bir farklılık yoktu. POY ile

POY+MEL+RES grubu kıyaslandığında ise POY+MEL+RES grubunda da hemorojik alanlar azalmıştı ama bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

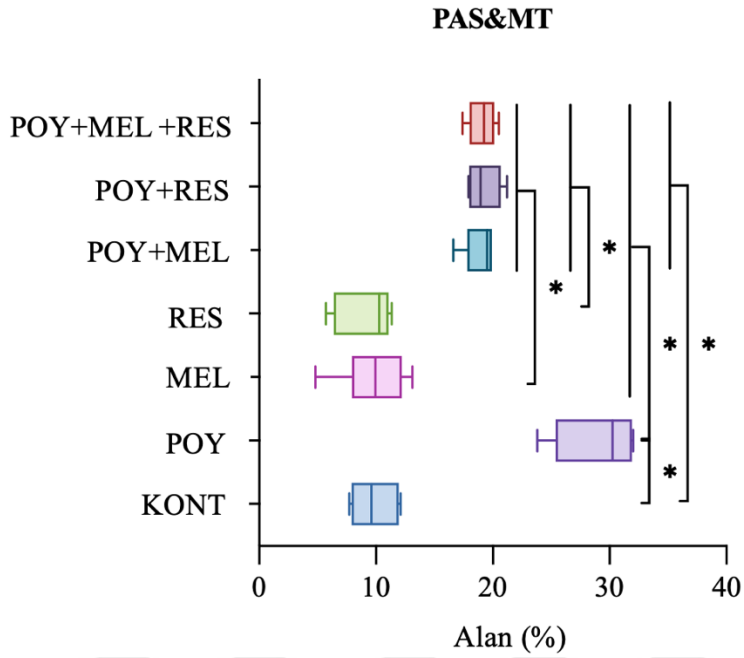
KONT, MEL ve RES gruplarına ait over dokusunda inflamasyon gözlenmedi. Bu nedenle MEL, RES ve KONT grupları arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. KONT, MEL ve RES grubuna göre POY grubunda bazı alanlarda inflamasyon görüldü ($p<0,002$). POY grubu ile POY+MEL grubu kıyaslandığında POY+MEL grubunda inflamasyonun azaldığı görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. POY grubu ile POY+RES grubu kıyaslandığında POY+RES grubunda inflamasyonun azaldığı görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. POY+MEL ve POY+RES gruplarındaki inflamasyon karşılaştırıldığında iki grupta da kontrole kıyasla azalmış inflamasyon gözlendi bu nedenle bu gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. POY ile POY+MEL+RES grubu kıyaslandığında ise POY+MEL+RES grubunda da inflamasyon azalmıştı ama bu azalış istatistiksel olarak anlamlı değildi.

4.2.4. Periyodik Asit-Schiff & Masson Trikrom Bulguları

Tüm deney gruplarına ait over dokusunda Periodik Asit-Schiff (PAS) ve Masson Trikrom (MT) boyamasına ait örnekler Resim 4.3'de ve kollajen miktarı yoğunlukları Şekil 4.8'de belirtildiği gibidir.



Resim 4.3: Deney gruplarında periyodik asit schiff & masson trikrom boyaması. PF: primordiyal folikül, PrF: Primer folikül, SF: Sekonder Folikül, AF: Atretik folikül, KD: Kan damarı, ok başı: apoptotik hücre



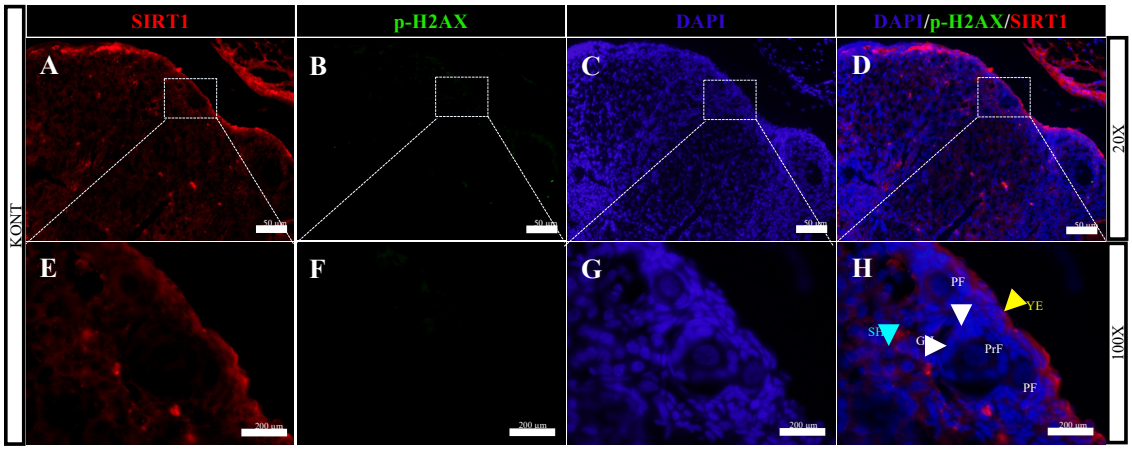
Şekil 4.8: Gruplar arası kollajen miktarı yoğunluklarının karşılaştırılması

Periyodik Asit Schiff &Masson Trikrom (PAS&MT) boyanmış KONT grubuna ait over dokularında en dışta tunika albugenia tabakası içerisinde boyanmış kollajen lifler görüldü. Gelişmekte olan foliküllerin çevresinde teka tabakalarında MT ile boyanmış kollajen lifler ve PAS ile boyanmış zona pellusida yapıları görüldü. Medulla içerisinde de bağ doku alanlarında boyanan kollajen lifler görüldü. Ayrıca oositi (O) çevreleyen intakt ve sürekli zona pellusidada (ZP) pozitif PAS reaksiyonu görüldü. MEL ve RES grubunda da KONT grubuna benzer şekilde boyanma izlendi.

KONT, MEL ve RES grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. POY grubundaki overlerde kortekste, medullada, yüzey epitelinin altındaki tunika albuginea ve folikülleri çevreleyen stromada artmış kolajen birikimi görüldü. POY grubundaki artış KONT grubu hariç diğer tüm deney gruplarına göre anlamlı idi ($p<0,002$). KONT grubuna kıyasla POY, POY+MEL, POY+RES ve POY+MEL+RES gruplarında anlamlı derecede artmış kollajen birikimi görüldü ($p<0,002$). MEL ve POY+MEL grupları karşılaştırıldığında POY+MEL grubunda anlamlı derecede artmış kollajen birikimi görüldü ($p<0,002$). RES ve POY+RES grupları karşılaştırıldığında POY+RES grubunda anlamlı derecede artmış kollajen birikimi görüldü ($p<0,002$). POY+MEL ve POY+RES gruplarında kollajen birikimi açısından fark yoktu. POY+MEL+RES grubundaki artış MEL ve RES grubuna kıyasla anlamlı derecede fazla bulundu ($p<0,002$).

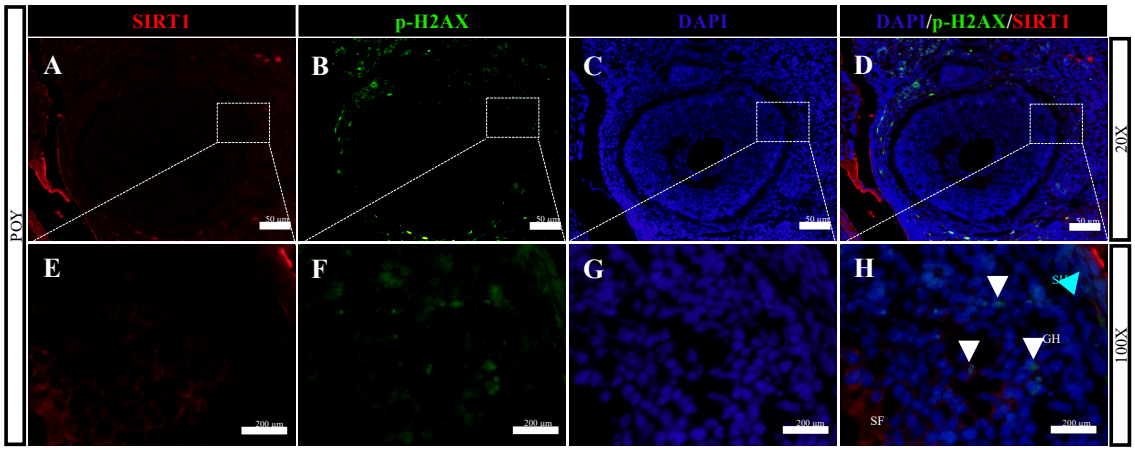
4.2.5. İmmün-floresan Bulgular

KONT grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.4'de belirtildiği gibidir. KONT grubundaki overlerde SIRT1 ekspresyonu; yüzey epiteli (YE), primer (PrF) ve primordiyal folikül (PF) çevresindeki over stroma hücreleri (SH) ve granuloza hücrelerinde (GH) görünürken, pH2Ax immün reaktivitesi gözlenmedi.



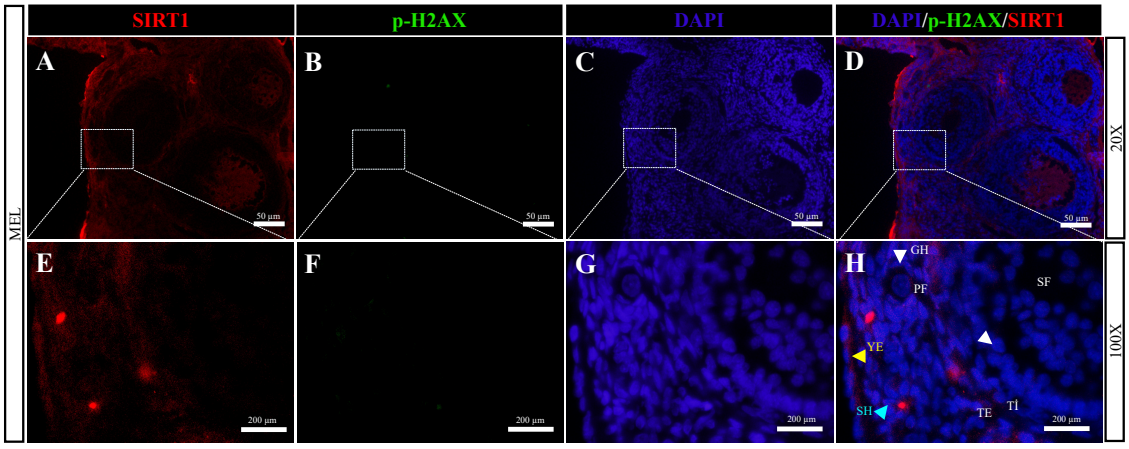
Resim 4.4: KONT grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları

POY grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.5'de belirtildiği gibidir. POY grubundaki overlerde SIRT1 ekspresyonu çoğunlukla yüzey epiteli (YE) ile sınırlı iken over stroma hücreleri (SH) ve sekonder folikül (SF) gibi büyüyen foliküllerin granuloza hücrelerinde (GH) artmış pH2Ax immün reaktivitesi gözlendi.



Resim 4.5: POY grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları

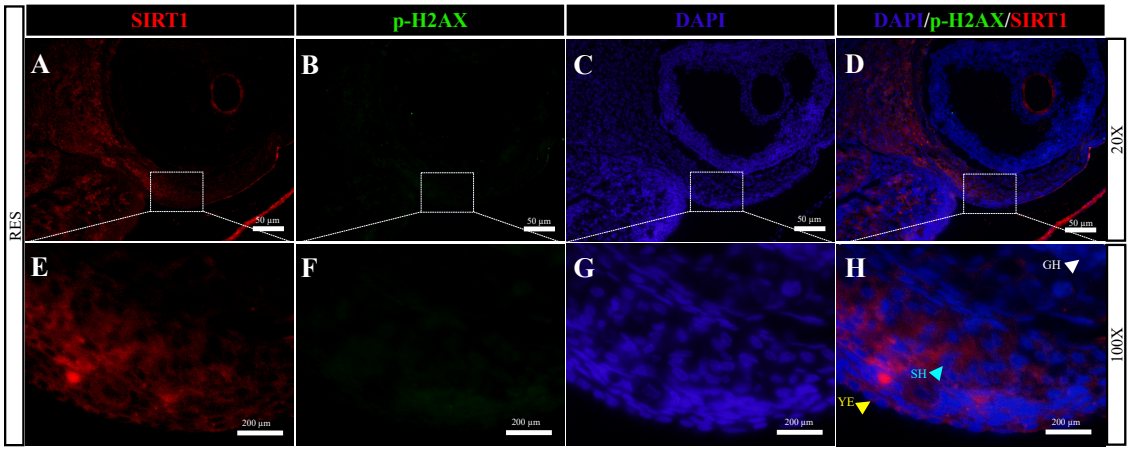
MEL grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.6'da belirtildiği gibidir. MEL grubundaki overlerde KONT grubundaki overlerde görüldüğü gibi SIRT1 ekspresyonu yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri (SH), granuloza hücrelerinde (GH) görünürken pH2Ax immün reaktivitesi gözlenmedi. Ayrıca folikül etrafını çevreleyen teka interna (Tİ), teka eksterna (TE) tabakalarında da pH2Ax immün reaktivitesi gözlenmezken, SIRT1 ekspresyonu gözlendi.



Resim 4.6: MEL grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları

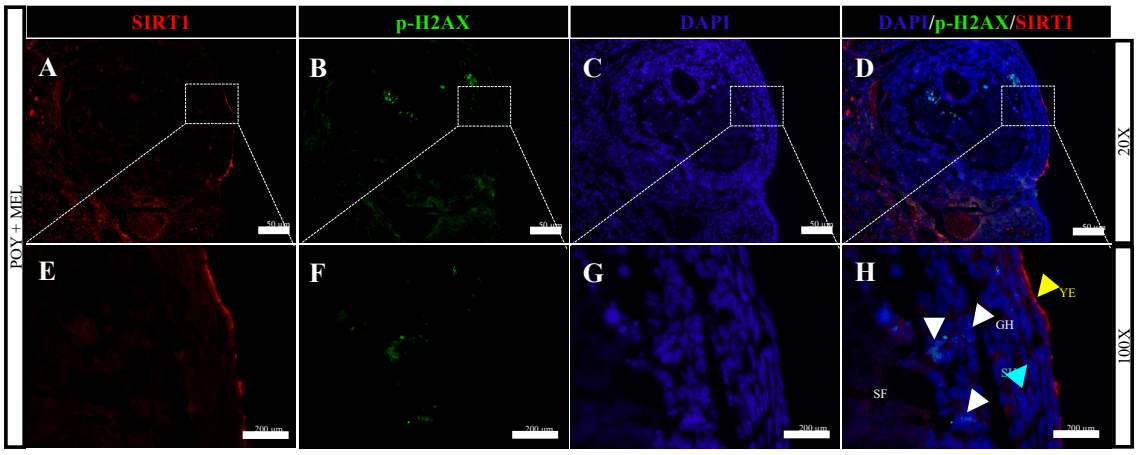
RES grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.7'de belirtildiği gibidir. RES grubundaki overlerde KONT

grubundaki overlerde görüldüğü gibi SIRT1 ekspresyonu yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri (SH), granuloza hücrelerinde (GH) görünürken pH2Ax immün reaktivitesi gözlenmedi.



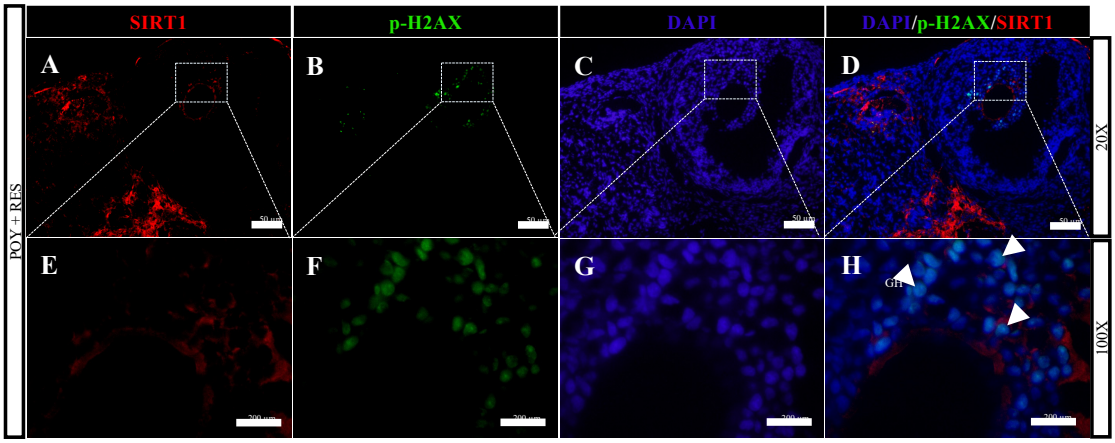
Resim 4.7: RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları

POY+MEL grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.8'da belirtildiği gibidir. POY+MEL grubundaki overlerde SIRT1 ekspresyonunda POY grubuna kıyasla artış görüldü. SIRT1 ekspresyonu yer yer yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri (SH) ve granuloza hücrelerinde (GH) görüldü. Granuloza hücrelerinde ise KONT grubuna kıyasla azalmış SIRT1 ekspresyonu ile beraber sekonder folikül (SF) gibi büyüyen foliküllerin granuloza hücrelerinde pH2Ax immün reaktivitesi gözlendi.



Resim 4.8: POY+MEL grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları

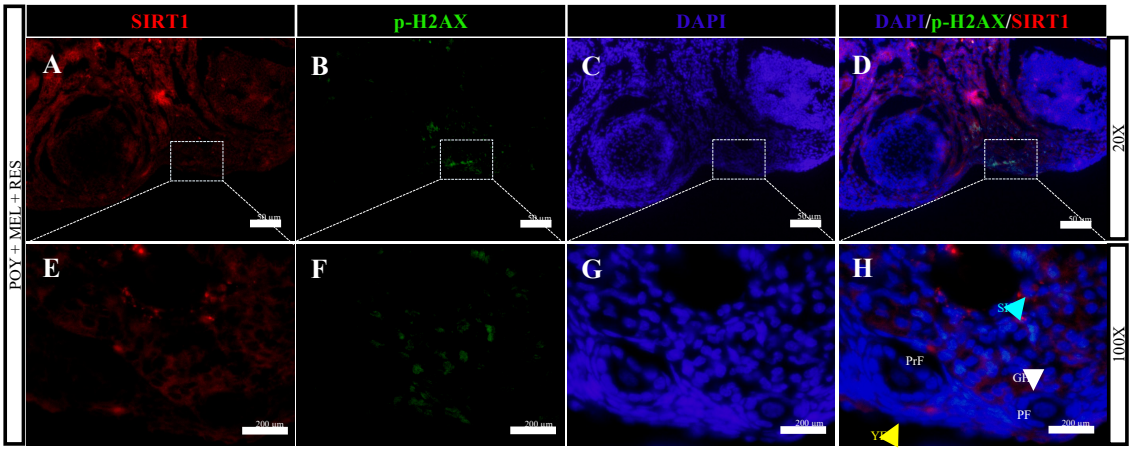
POY+RES grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.9'da belirtildiği gibidir. POY+RES grubundaki overlerde SIRT1 ekspresyonunda POY grubuna kıyasla artış görüldü. SIRT1 ekspresyonu yer yer yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri (SH) ve granuloza hücrelerinde (GH) görüldü. Granuloza hücrelerinde ise KONT grubuna kıyasla azalmış SIRT1 ekspresyonu görünürken bazı granuloza hücrelerinde pH2Ax immün reaktivitesi gözlendi.



Resim 4.9: POY+RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları

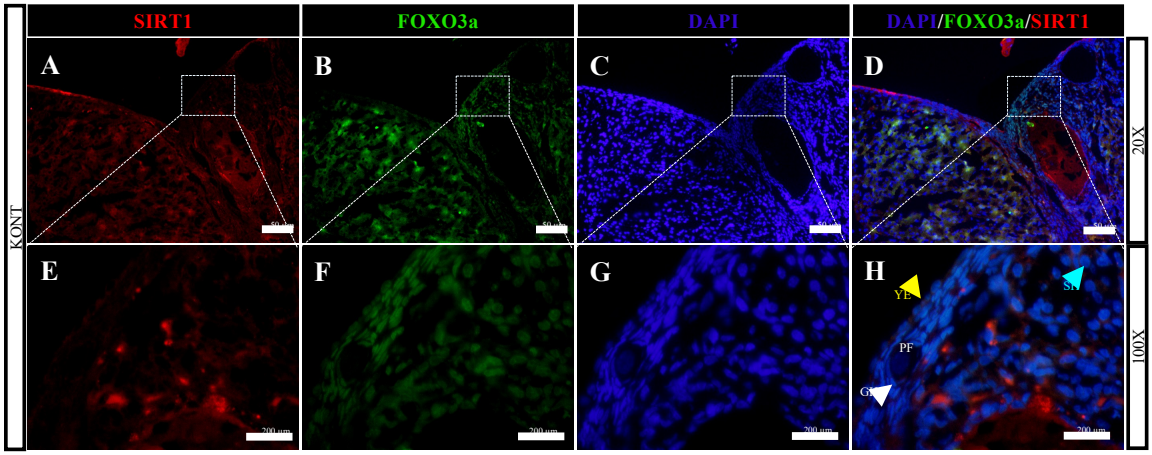
POY+MEL+RES grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.10'da belirtildiği gibidir. POY+MEL+RES grubundaki overlerde SIRT1 ekspresyonunda POY kıyasla grubuna artış görüldü. SIRT1 ekspresyonu

yüzey epiteli (YE) hücrelerinde görülürken daha çok over stroma (SH) ve granuloza hücrelerinde (GH) görüldü. Primer (PrF) ve primordiyal folikülü (PF) çevreleyen granuloza ve over stroma hücrelerinde artmış SIRT1 ekspresyonu gözlendi. pH2Ax immün reaktivitesinde POY+MEL ve POY+RES gruplarına kıyasla azalma görülürken, bazı alanlarda over stroma hücrelerinde az sayıda pozitif hücre gözlendi.



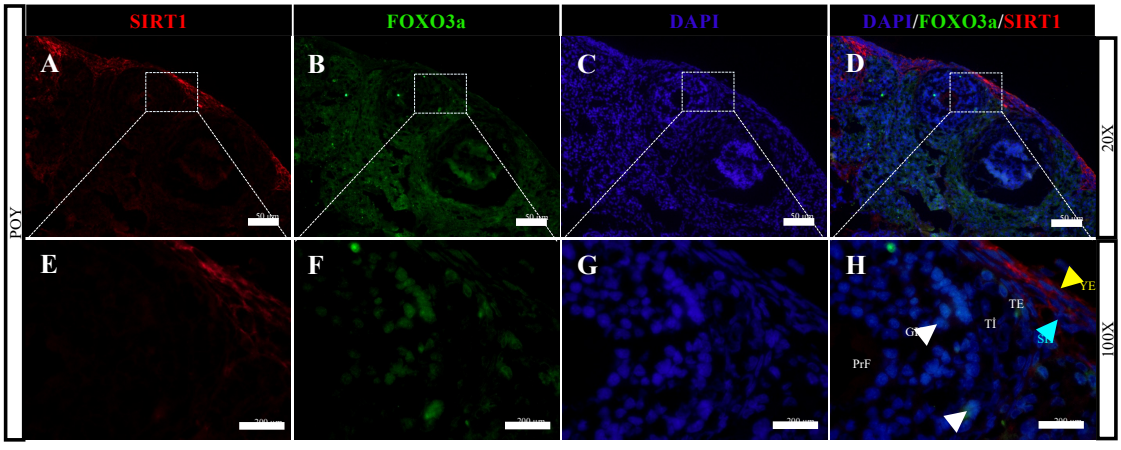
Resim 4.10: POY+MEL+RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve pH2Ax (yeşil) immün-lokalizasyonları

KONT grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.11'de belirtildiği gibidir. KONT grubundaki overlerde SIRT1 ekspresyonu yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri (SH), granuloza hücrelerinde (GH) görülürken; FOXO3a ekspresyonu yüzey epiteli ve primordiyal folikülü (PF) çevreleyen over stroma ve granuloza hücrelerinde gözlendi.



Resim 4.11: KONT grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

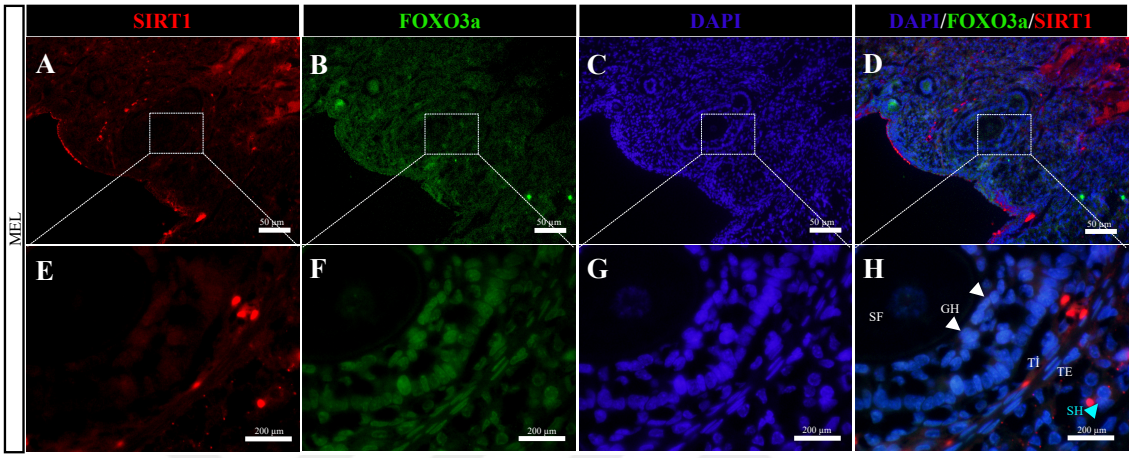
POY grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.12'de belirtildiği gibidir. POY grubundaki overlerde SIRT1 ekspresyonunun çoğunlukla yüzey epiteli (YE) ile sınırlı olduğu gözlendi. Yüzey epiteli, primer (PrF) ve primordiyal folikülleri (PF) çevreleyen over stroma hücreleri ve granuloza hücrelerinde azalmış FOXO3a ekspresyonu gözlendi. FOXO3a ekspresyonundaki azalış geç primer (PrF) folikülleri çevreleyen teka interna (Tİ) ve teka eksterna (TE) tabakasında da gözlendi.



Resim 4.12: POY grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

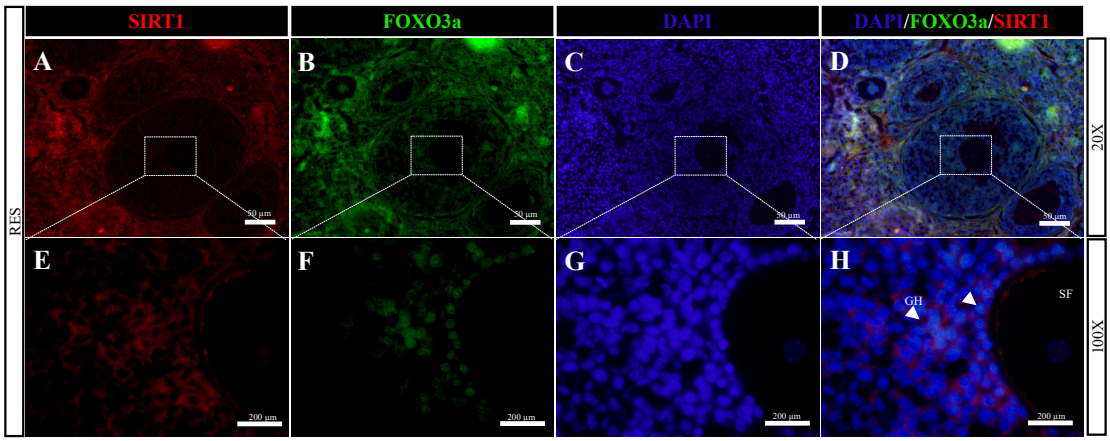
MEL grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.13'de belirtildiği gibidir. MEL grubundaki overlerde SIRT1 ve

FOXO3a ekspresyonu yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri (SH), granuloza hücrelerinde (GH) görüldü. Ayrıca sekonder folikül (SF) gibi büyüyen foliküllerin etrafında bulunan teka interna (Tİ) ve teka eksterna (TE) tabakasında da FOXO3a ekspresyonu gözlendi.



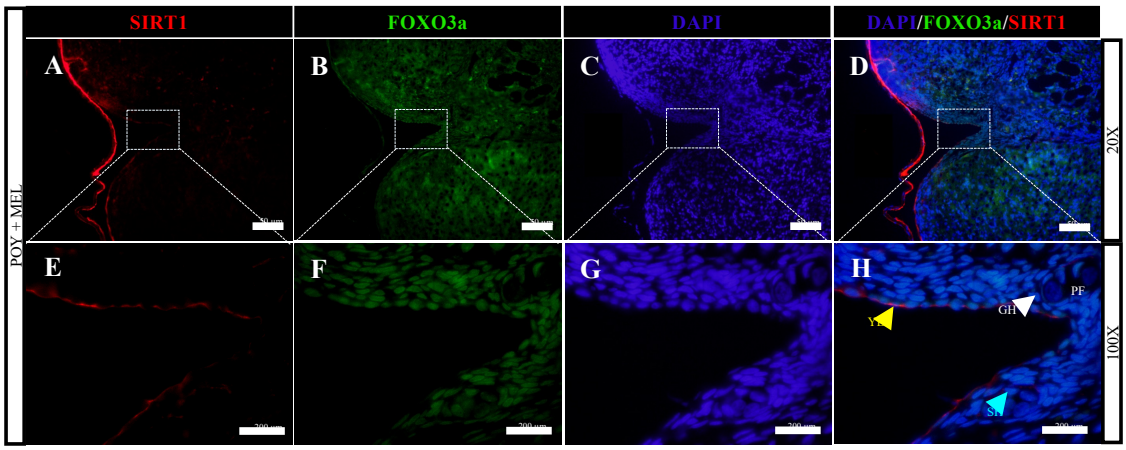
Resim 4.13: MEL grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

RES grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.14'de belirtildiği gibidir. RES grubundaki overlerde KONT grubundaki overlerde görüldüğü gibi SIRT1 ve FOXO3a ekspresyonu yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri (SH), granuloza hücrelerinde (GH) görüldü. FOXO3a ekspresyonu sekonder folikül (SF) gibi büyüyen foliküllerin grabuloza hücrelerinde (GH) görüldü.



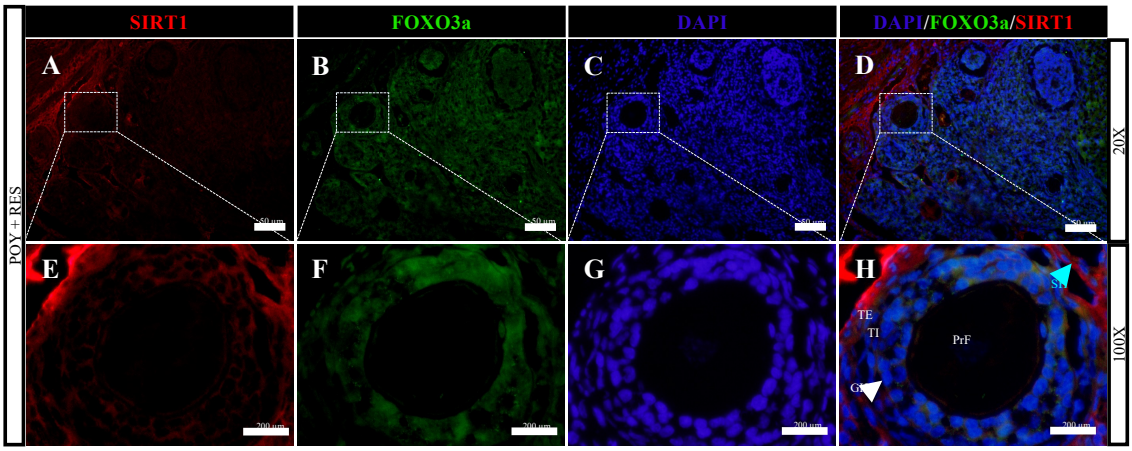
Resim 4.14: RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

POY+MEL grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.15'de belirtildiği gibidir. POY+MEL grubundaki overlerde SIRT1 ekspresyonunda POY grubuna kıyasla artış görüldü. SIRT1 ekspresyonu yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri (SH) ve granuloza hücrelerinde (GH) görüldü. Granuloza hücrelerinde ise KONT grubuna kıyasla azalmış SIRT1 ekspresyonu görülürken primordiyal foliküllerin (PF) granuloza hücrelerinde ve over stroma hücrelerinde POY grubuna kıyasla artmış FOXO3a immün reaktivitesi gözlendi.



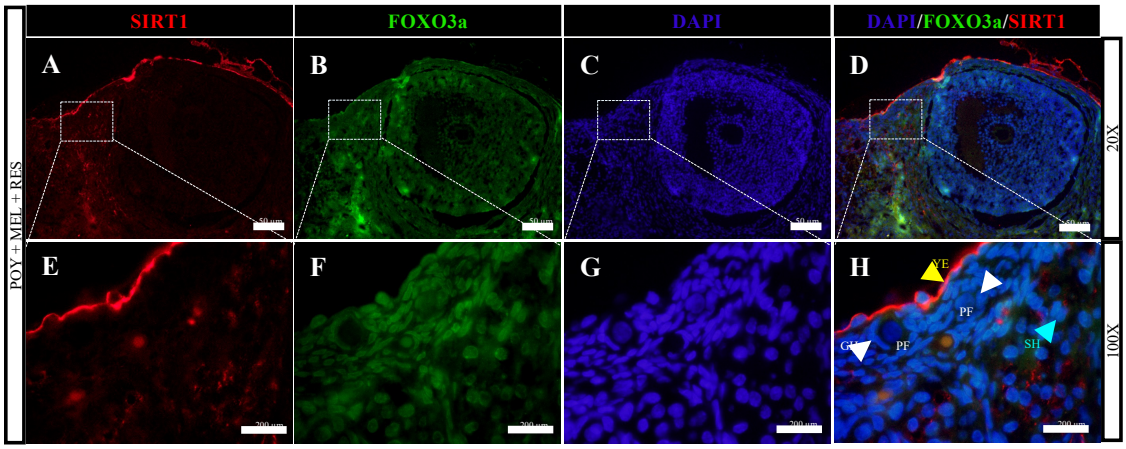
Resim 4.15: POY+MEL grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

POY+RES grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.16'da belirtildiği gibidir. POY+RES grubundaki overlerde SIRT1 ekspresyonunda POY grubuna kıyasla artış görüldü. SIRT1 ekspresyonu yer yer yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri (SH) ve granuloza hücrelerinde (GH) görüldü. Granuloza hücrelerinde ise KONT grubuna kıyasla azalmış SIRT1 ekspresyonu görülürken primer folikül (PrF) gibi büyüyen foliküllerin granuloza hücrelerinde POY'a kıyasla artmış FOXO3a immün reaktivitesi gözlendi.



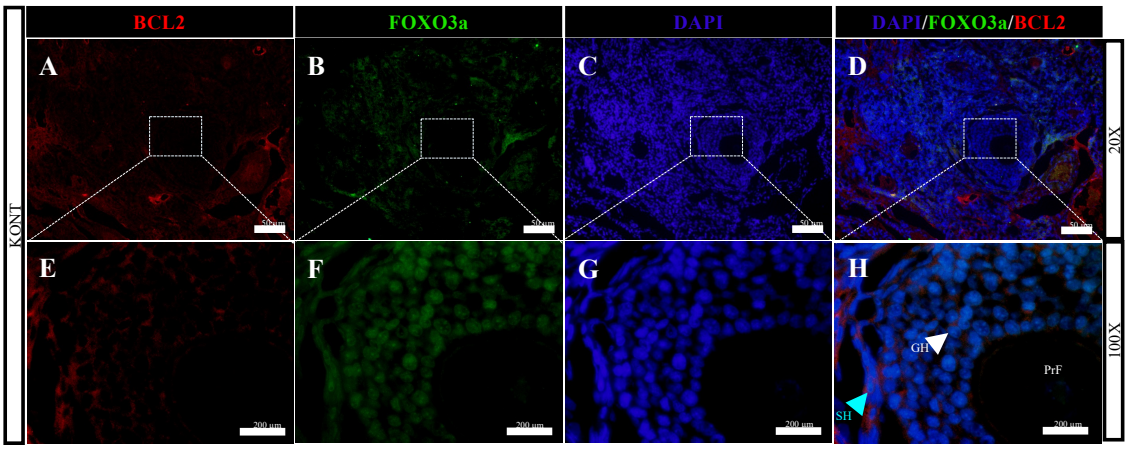
Resim 4.16: POY+RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

POY+MEL+RES grubuna ait over dokusunda SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün lokalizasyonları Resim 4.17'de belirtildiği gibidir. POY+MEL+RES grubundaki overlerde SIRT1 ekspresyonunda POY grubuna kıyasla artış görüldü. SIRT1 ekspresyonu yüzey epiteli hücreleri (YE), over stroma (SH) ve granuloza hücrelerinde (GH) görüldü. Granuloza ve over stroma hücrelerinde artmış SIRT1 ekspresyonu gözlendi. FOXO3a immün reaktivitesinde POY+MEL ve POY+RES gruplarına kıyasla artış görüldü.



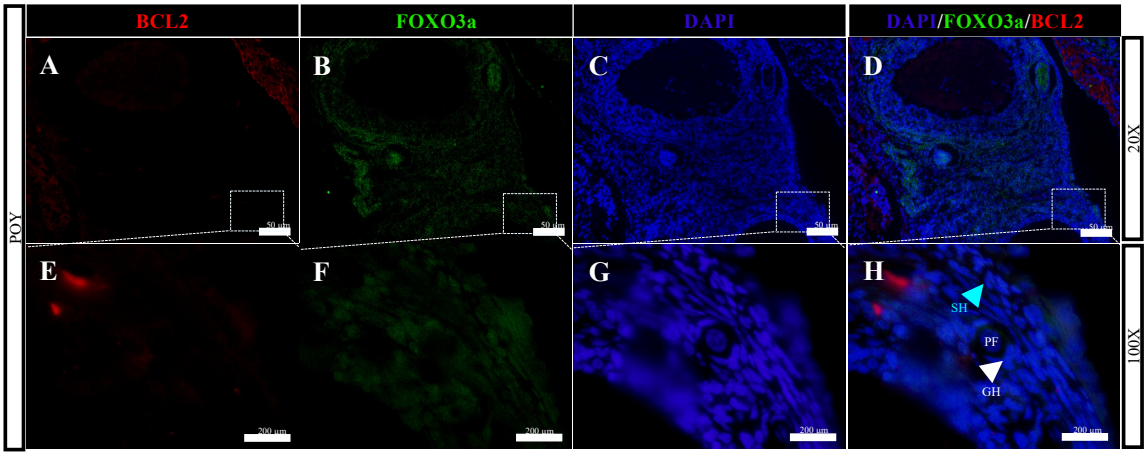
Resim 4.17: POY+MEL+RES grubu overlerindeki SIRT1 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

KONT grubuna ait over dokusunda FOXO3a (yeşil) ve Bcl2 (kırmızı) immün lokalizasyonları Resim 4.18'de belirtildiği gibidir. KONT grubundaki overlerde FOXO3a ekspresyonu over stroma hücreleri (SH), granuloza hücrelerinde (GH) görülürken; Bcl2 ekspresyonu stroma hücreleri (SH) ve büyüyen folikülleri çevreleyen granuloza hücre sitoplazmasında gözlendi.



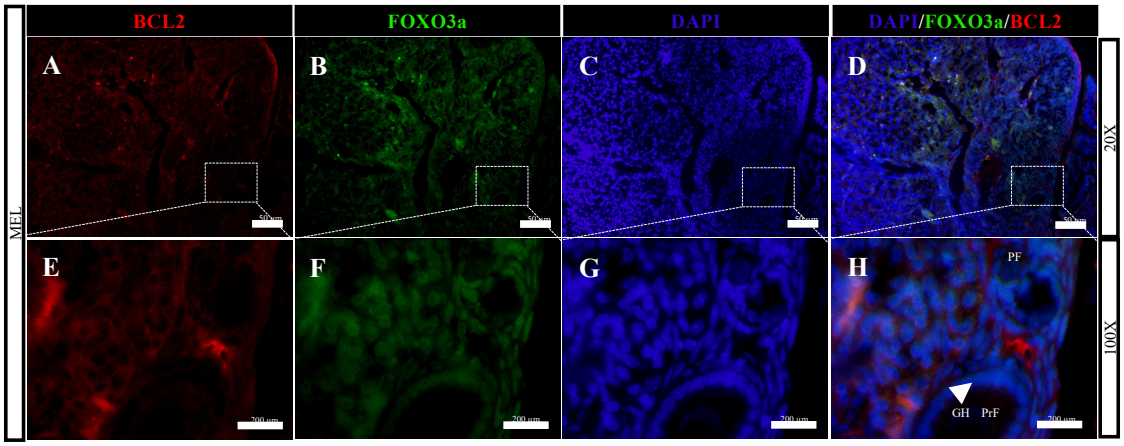
Resim 4.18: KONT grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

POY grubuna ait over dokusunda FOXO3a (yeşil) ve Bcl2 (kırmızı) immün lokalizasyonları Resim 4.19'da belirtildiği gibidir. POY grubundaki overlerde folikülleri çevreleyen over stroma hücreleri (SH) ve granuloza hücrelerinde (GH) azalmış FOXO3a ekspresyonu gözlendi. Bcl2 ekspresyonu az da olsa stroma hücrelerinde görüldü. Granuloza hücrelerinde azalmış Bcl2 ekspresyonu görüldü.



Resim 4.19: POY grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

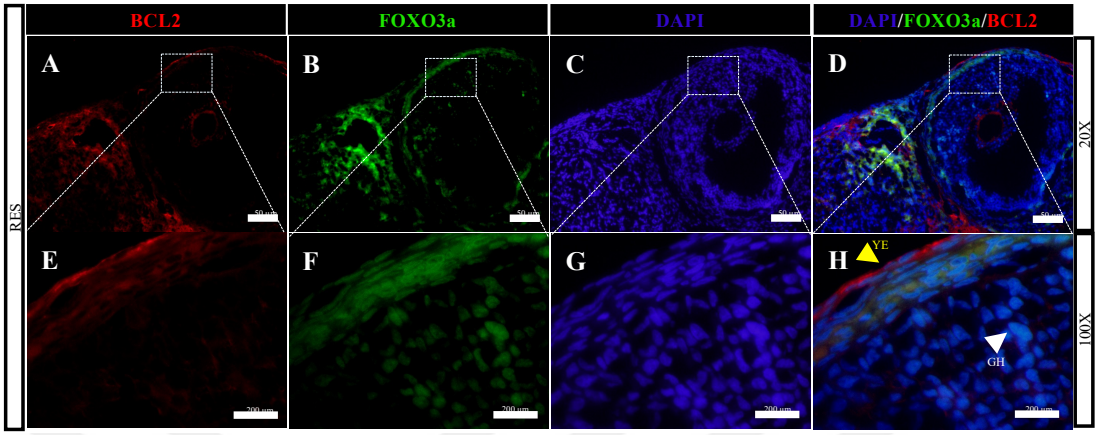
MEL grubuna ait over dokusunda FOXO3a (yeşil) ve Bcl2 (kırmızı) immün lokalizasyonları Resim 4.20'de belirtildiği gibidir. MEL grubundaki overlerde Bcl2 ekspresyonu çoğunlukla over stroma hücreleri (SH), granuloza hücrelerinde (GH) görülürken yer yer yüzey epiteli hücrelerinde de görüldü. FOXO3a ekspresyonu yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri ve granuloza hücrelerinde görüldü.



Resim 4.20: MEL grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

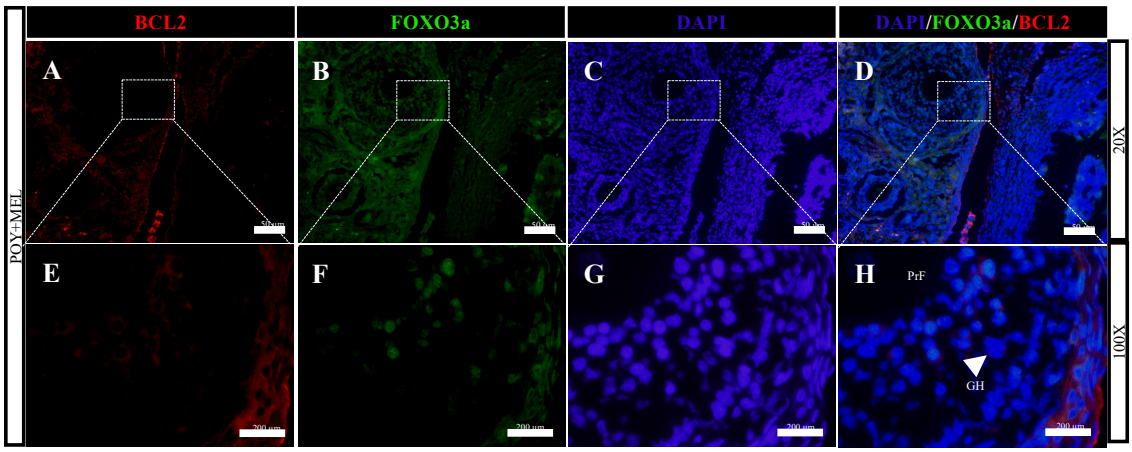
RES grubuna ait over dokusunda FOXO3a (yeşil) ve Bcl2 (kırmızı) immün lokalizasyonları Resim 4.21'de belirtildiği gibidir. RES grubundaki overlerde Bcl2 ekspresyonu çoğunlukla over stroma hücreleri (SH), granuloza hücrelerinde (GH)

görünürken bazı yüzey epiteli hücrelerinde görüldü. FOXO3a ekspresyonu yüzey epiteli (YE), over stroma hücreleri ve granuloza hücrelerinde görüldü.



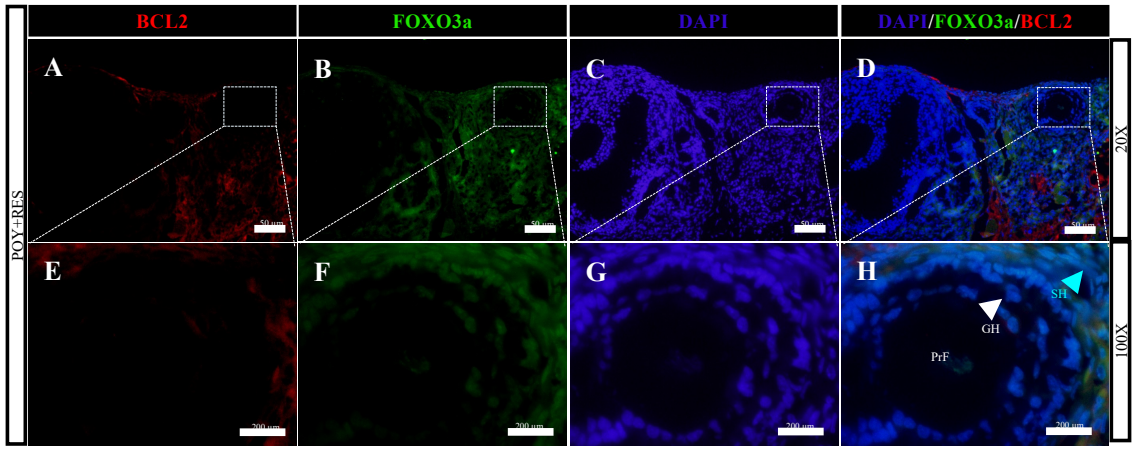
Resim 4.21: RES grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

POY+MEL grubuna ait over dokusunda FOXO3a (yeşil) ve Bcl2 (kırmızı)) immün lokalizasyonları Resim 4.22'de belirtildiği gibidir. POY+MEL grubundaki overlerde Bcl2 ekspresyonunda POY grubuna kıyasla artış görüldü. FOXO3a ekspresyonunda over stroma hücreleri (SH), primordiyal folikül ve primer folikül (PrF) gibi büyüyen folikül etrafını çevreleyen granuloza hücrelerinde (GH) POY grubuna kıyasla az da olsa artmış FOXO3a immün reaktivitesi gözlendi.



Resim 4.22: POY+MEL grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

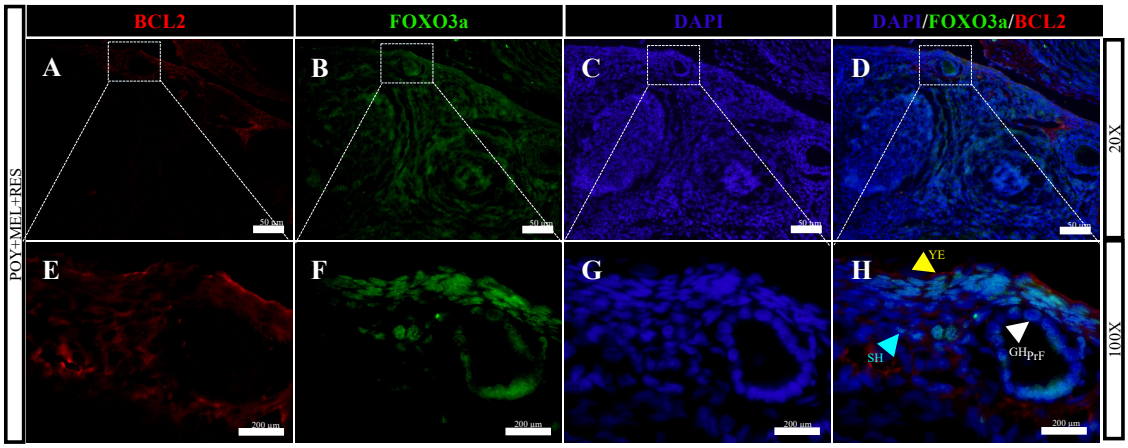
POY+RES grubuna ait over dokusunda FOXO3a (yeşil) ve Bcl2 (kırmızı) immün lokalizasyonları Resim 4.23'de belirtildiği gibidir. POY+RES grubundaki overlerde Bcl2 ekspresyonunda POY grubuna kıyasla artış görüldü. Primer folikül (PrF) gibi büyüyen foliküllerin granuloza hücrelerinde (GH) POY grubuna kıyasla artmış FOXO3a immün reaktivitesi gözlendi.



Resim 4.23: POY+RES grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

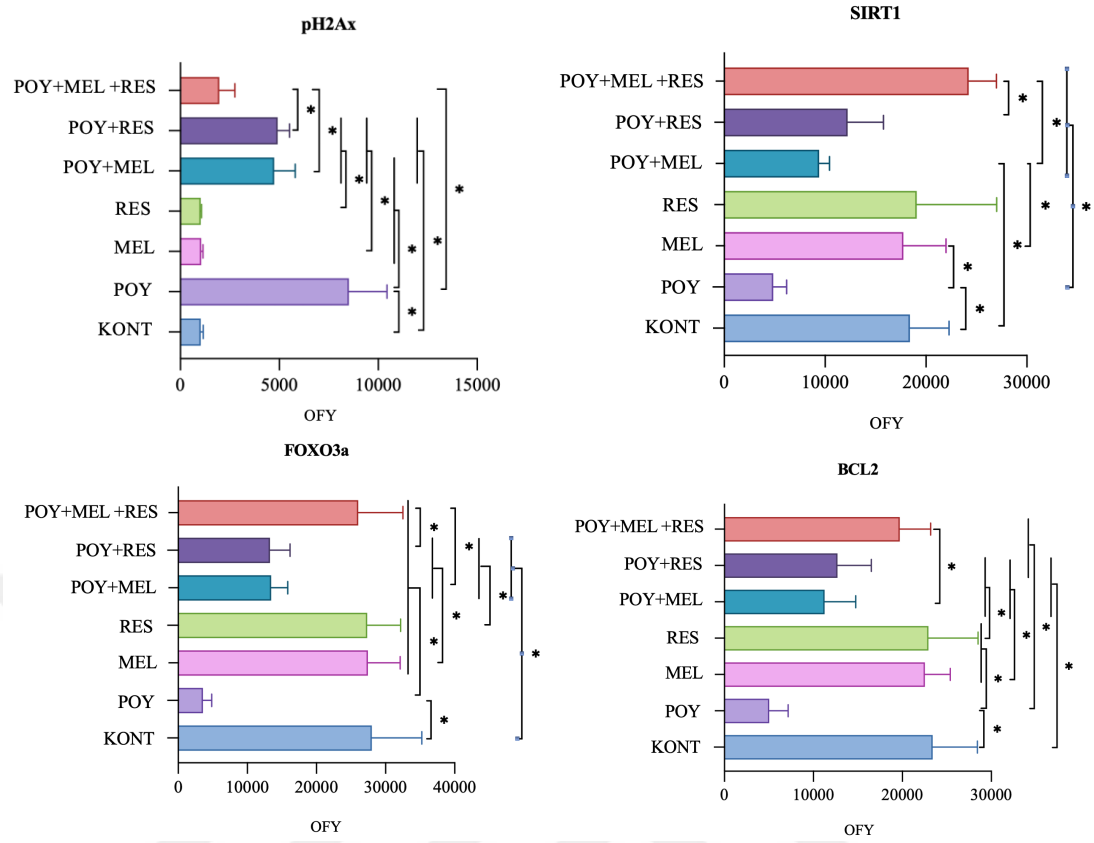
POY+MEL+RES grubuna ait over dokusunda FOXO3a (yeşil) ve Bcl2 (kırmızı) immün lokalizasyonları Resim 4.24'de belirtildiği gibidir. POY+MEL+RES grubundaki

overlerde Bcl2 ekspresyonunda POY grubuna kıyasla artış görüldü. Bcl2 ekspresyonu yüzey epiteli hücreleri (YE), over stroma (SH) ve granuloza hücrelerinde (GH) görüldü. Granuloza ve over stroma hücrelerinde artmış Bcl2 ekspresyonu gözlendi. FOXO3a immün reaktivitesinde POY+MEL ve POY+RES gruplarına kıyasla artış görüldü.



Resim 4.24: POY+MEL+RES grubu overlerindeki Bcl2 (kırmızı) ve FOXO3a (yeşil) immün-lokalizasyonları

Tüm deney gruplarına ait over dokusundaki pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 immunorektivite yoğunlularının analizi Şekil 4.9'da belirtildiği gibidir. Tek yönlü ANOVA analizine göre tüm gruplardaki over dokusunda pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 immunoreaktivitesi için gruplar arasında anlamlı farklılık bulundu ($p<0,002$).



Şekil 4.9: Tüm gruplardaki pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 immunoreaktivite yoğunlukları

İmmünfloresan bulgularda pH2Ax ekspresyonunda KONT grubuna kıyasla POY, POY+MEL ve POY+RES grubunda anlamlı artış görüldü ($p<0,002$). POY grubundaki pH2Ax immünreaktivitesindeki artış MEL, RES, POY+MEL ve POY+MEL+RES grubuna göre anlamlı idi ($p<0,002$). POY+MEL+RES grubunda POY grubuna göre anlamlı azalma görüldü ($p<0,002$). MEL ve POY+MEL grubu kıyaslandığında POY+MEL grubunda pH2Ax immünreaktivitesinde anlamlı artış görüldü ($p<0,002$). RES ve POY+RES grubu kıyaslandığında POY+RES grubunda pH2Ax immünreaktivitesinde anlamlı artış görüldü ($p<0,002$). POY+MEL ve POY+RES grupları arasında pH2Ax immünreaktivitesinde anlamlı farklılık görülmezken; POY+MEL+RES grubunda pH2Ax immünreaktivitesinde hem POY+MEL hem de POY+RES grubuna kıyasla anlamlı azalma görüldü ($p<0,002$).

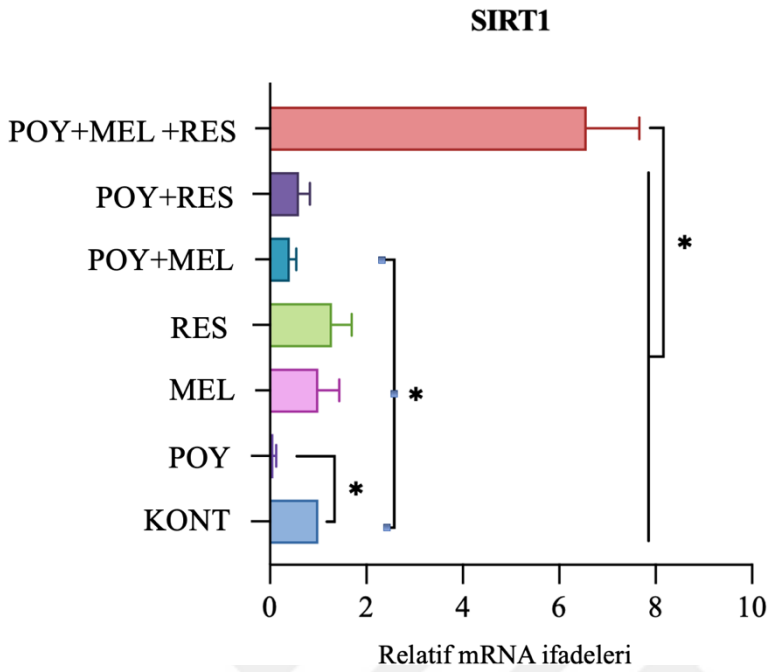
SIRT1 ekspresyonunda KONT grubuna kıyasla POY ve POY+MEL grubunda anlamlı azalma görüldü ($p<0,002$). POY grubundaki SIRT1 ekspresyonundaki azalma

KONT ve MEL grubuna göre anlamlı idi (p<0,002). POY+MEL, POY+RES ve POY+MEL+RES gruplarındki SIRT1 ekspresyonundaki artış POY grubuna göre anlamlı bulundu (p<0,002). POY+MEL grubundaki SIRT1 immünreaktivitesi MEL grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmış bulundu (p<0,002). POY+MEL ve POY+RES grupları arasında SIRT1 immünreaktivitesi açısından farklılık bulunmadı. POY+MEL+RES grubundaki SIRT1 ekspresyoundaki artış hem POY+MEL hem de POY+RES grubuna kıyasla anlamlı idi (p<0,002).

FOXO3a ekspresyonunda POY grubundaki azalma tüm gruplara kıyasla anlamlı idi (p<0,002). POY+MEL grubundaki FOXO3a immünreaktivitesi MEL grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmış bulundu (p<0,002). POY+RES grubundaki FOXO3a immünreaktivitesi RES grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmış bulundu (p<0,002). POY+MEL ve POY+RES gruplarında KONT grubuna kıyasla FOXO3a immünreaktvivitesinde anlamlı azalma görüldü (p<0,002). POY+MEL ve POY+RES gruplarında FOXO3a immünreaktivitesi açısından farklılık bulunmadı. POY+MEL+RES grubundaki FOXO3a ekspresyoundaki artış hem POY+MEL hem de POY+RES grubuna kıyasla anlamlı idi (p<0,002).

Bcl2 ekspresyonunda POY grubundaki azalış POY+MEL grubu hariç diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı bulundu (p<0,002). KONT grubuna kıyasla POY+MEL ve POY+RES grubunda Bcl2 immünreaktivitesinde anlamlı azalma görüldü. MEL ve POY+MEL grupları kıyaslandığında POY+MEL grubundaki Bcl2 immünreaktivitesindeki azalma MEL grubuna kıyasla anlamlı idi (p<0,002). RES ve POY+RES grupları kıyaslandığında POY+RES grubundaki Bcl2 immünreaktivitesindeki azalma RES grubuna kıyasla anlamlı idi (p<0,002). POY+MEL ve POY+RES gruplarında Bcl2 immünreaktivitesi açısından farklılık bulunmadı. POY+MEL+RES grubundaki Bcl2 ekspresyoundaki artış POY+RES grubuna göre anlamlı bulunmazken POY+MEL grubuna kıyasla anlamlı idi (p<0,002).

4.3. MOLEKÜLER BULGULAR

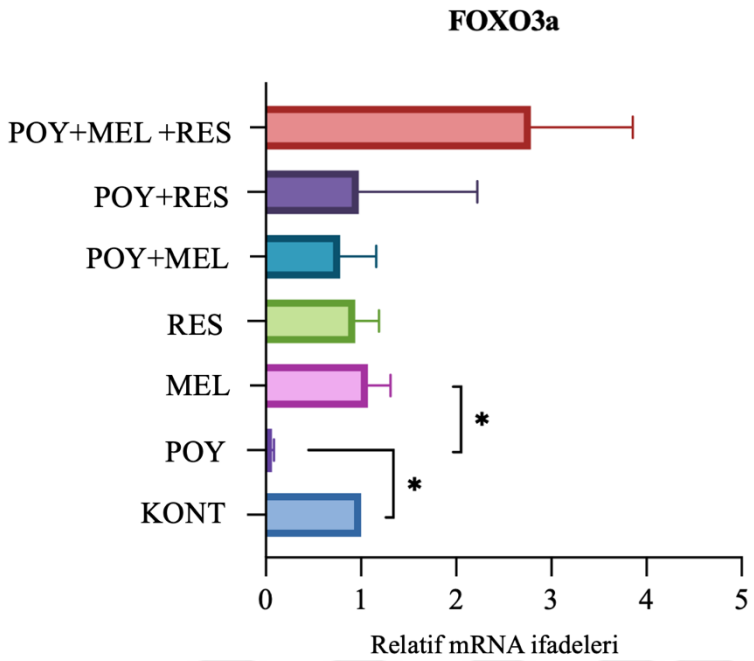


Şekil 4.10: Tüm gruplardaki SIRT1 mRNA ifadeleri

KONT ve deney gruplarına ait over dokularında SIRT1 mRNA seviyelerinin ölçülmesi için qRT-PCR analizi yapıldı. Gruplar arası karşılaştırma tek yönlü varyans analizi ile yapıldı. Çoklu grup karşılaştırılması için Tukey's testi kullanıldı ($p<0,002$).

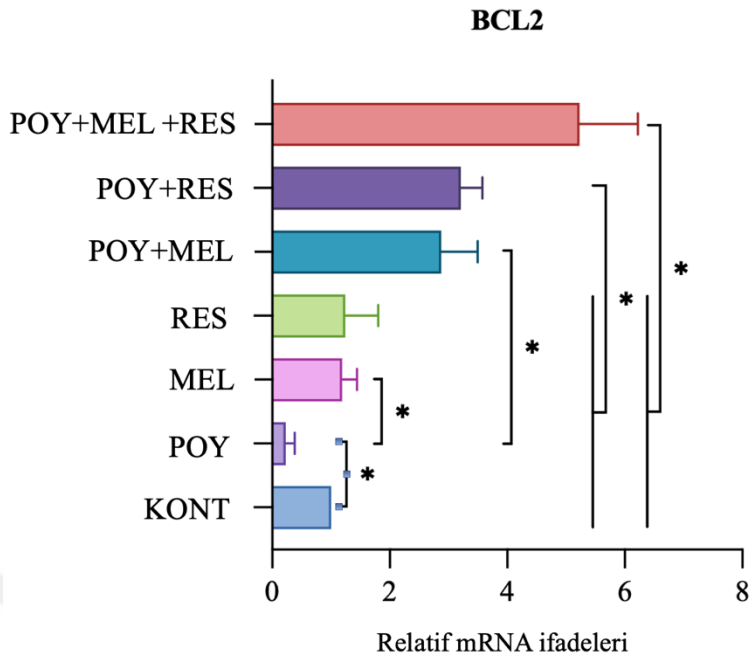
Gruplar arası SIRT1 gen ifadelerinin kıyaslanması Şekil 4.10'da belirtildiği gibidir. KONT grubuna kıyasla POY grubunda SIRT1 mRNA seviyesinin azaldığı gözlendi. KONT grubuna göre POY grubundaki bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,002$). POY+MEL grubunda da SIRT1 mRNA seviyesinde KONT grubuna kıyasla anlamlı derecede azalma görüldü ($p<0,002$). MEL grubu POY+MEL grubu ile kıyaslandığında POY+MEL grubunda SIRT1 mRNA seviyesinde azalma görüldü ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. RES grubu POY+RES grubu ile kıyaslandığında POY+RES grubunda SIRT1 mRNA seviyesinde azalma görüldü ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. POY+MEL ve POY+RES grupları kendi aralarında kıyaslandığında ise her iki gruptaki SIRT1 mRNA seviyeleri birbirine çok yakın bulundu ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

POY+MEL+RES grubundaki SIRT1 mRNA seviyesindeki artış diğer tüm deney grupları ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,002).



Şekil 4.11: Tüm gruplardaki FOXO3a mRNA ifadeleri

KONT ve deney gruplarına ait over dokularında FOXO3a mRNA seviyelerinin ölçülmesi için qRT-PCR analizi yapıldı. Gruplar arası FOXO3a gen ifadelerinin kıyaslanması Şekil 4.11'de gösterildiği gibidir. KONT grubuna kıyasla POY grubunda FOXO3a mRNA seviyesinin azaldığı gözlendi. KONT grubuna göre POY grubundaki bu azalış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (p<0,002). MEL grubu POY+MEL grubu ile kıyaslandığında POY+MEL grubunda FOXO3a mRNA seviyesinde azalma görüldü ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. RES ve POY+RES grubunda FOXO3a mRNA seviyesinde anlamlı bir farklılık saptanmadı. POY+MEL+RES grubunda diğer deney gruplarına ve KONT grubuna kıyasla artış görüldü ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. POY grubuna göre MEL grubunda anlamlı derecede artmış FOXO3a mRNA ekspresyonu görüldü (p<0,002).



Şekil 4.12: Tüm gruplardaki Bcl2 mRNA ifadeleri

KONT ve deney gruplarına ait over dokularında Bcl2 mRNA seviyelerinin ölçülmesi için qRT-PCR analizi yapıldı. Gruplar arası Bcl2 gen ifadelerinin kıyaslanması Şekil 4.12'de gösterildi. KONT grubuna kıyasla POY grubunda Bcl2 mRNA seviyesinde anlamlı olarak azalma görüldü ($p<0,002$). POY grubuna kıyasla ve POY+MEL grubunda Bcl2 mRNA ekspresyonunda anlamlı artış görüldü ($p<0,002$). POY+RES grubundaki Bcl2 mRNA seviyesindeki artış RES, MEL, POY ve KONT grubuna kıyasla anlamlı idi ($p<0,002$). POY+MEL+RES grubundaki Bcl2 mRNA seviyesindeki artış RES, MEL, POY ve KONT grubuna kıyasla anlamlı idi ($p<0,002$). POY+MEL+RES grubundaki Bcl2 mRNA seviyesinde POY+MEL ve POY+RES gruplarına kıyasla artış görüldü. Ancak; POY+MEL+RES, POY+MEL, POY+RES grupları kendi aralarında kıyaslandığında anlamlı bir farklılık saptanmadı.

4.4. BİYOKİMYASAL BULGULAR

Tüm deney gruplarında serum E2 seviyesi ELİSA yöntemi ile ölçüldü. Tüm gruplar için E2 hormon seviyesi Tablo 4.3'de gösterilmiştir. Tek yönlü ANOVA analizine göre gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı.

KONT grubuna kıyasla MEL grubundaki E2 seviyesinde azalma görüldü ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı. POY ve POY+MEL grupları karşılaştırıldığında POY+MEL grubunda E2 seviyesinde artış görüldü ancak bu artış istatiksel olarak anlamlı değildi. POY ve POY+RES grupları karşılaştırıldığında POY+RES grubunda E2 seviyesinde artış görüldü ancak bu artış istatiksel olarak anlamlı bulunmadı. Aynı şekilde POY+MEL+RES grubundaki serum E2 hormon seviyesinde artış görüldü ancak bu artış istatiksel olarak anlamlı değildi.

Tablo 4.3: Tüm gruplardaki serum östrojen hormonu seviyeleri

	KONT	POY	MEL	RES	POY + MEL	POY + RES	POY + MEL + RES
E2 (pg/ml)	101,7±43,2	60,2±48,0	76,7±19,6	123,6±37,2	88,3±32,4	109,8±41,8	113,6±50,2

5. TARTIŞMA

Prematür over yetmezliği (POY), over hormon salınımı ve folikül rezervinin azalması ile karakterizedir. POY over fonksiyonunda hızlı bir azalmaya ve menopozun erken başlamasına neden olur. POY, 40 yaşın altındaki kadınların yaklaşık %1'ini ve 30 yaşın altındaki kadınların %0,1'ini etkileyen bir durumdur (30). POY etiyolojisinde kalıtımın ve otoimmunite, enfeksiyonlar, gonadotoksik ajanlar, radyoterapi ve kemoterapi gibi heterojen faktörlerin rolü olduğu düşünülmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda POY semptomlarını önlemek ve tedavi etmek için POY'un birçok farklı deneysel modeli üzerinde çalışılmıştır. Literatürde POY oluşturulan hayvan modellerinde hormonal değişiklikler, over foliküllerindeki değişiklikler, over hasarı ve üreme döngüsü bozuklukları başarı kriteri olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalara rağmen, POY oluşturulan hayvan modellerinde standart bir yöntem bulunamamıştır. Fare ve ratlar ovulasyon zamanı ve mono-poliovülasyon dahil olmak üzere bazı varyasyonlar ve fiziksel farklılıklar dışında over gelişim süreçleri ve işlevleri ve POY oluşum meknizması bakımından insanlar ile benzerlik göstermektedir. POY modeli oluşumunda kullanılan en yaygın hayvan modellemelerinde intraperitoneal (i.p.) veya kuyruk damarı (intravenöz, i.v.) enjeksiyonu ile kimyasal indüksiyon tercih edilmiştir. Literatürde, POY'u indüklemek için kullanılan ajanlar ve dozları arasında önemli farklılıklar vardır. Bu nedenle, hayvanlarda deneysel olarak POY oluşturulması için kullanılacak yöntem zor olabilmektedir. Bu çalışmanın amaçlarından biri, literatürde en yaygın POY indükleyici ajan olarak bilinen SİS ile ratlarda indüklenen POY modelinde MEL ve RES'in tedavi edici etki mekanizmaları arasındaki farklılıkları morfolojik, histopatolojik, hormonal ve moleküler yöntemleriyle ortaya koymaktır. Kemoterapi POY oluşumunun en yaygın etiyolojik nedenlerinden biridir. Kemoterapide kullanılan farklı ilaçlar, farklı düzeylerde over toksisitesine neden olur ve farklı gelişim aşamalarındaki folikülleri hedefler. En fazla over toksisitesi görülen ajanlardan biri de alkilleyici platinum ailesine ait ajanlarla tedavi sonucu görülmektedir (44). Bu nedenle bu çalışmada SİS, POY indükleyici kemoterapötik ajan olarak tercih edilmiştir.

Farelerde 5 mg/kg SİS'in 15 gün boyunca uygulanmasının farelerde ciddi şekilde düşük aktiviteye neden olduğu, termojenez aktiviteyi artırdığı ve hatta ölüme neden olduğu gösterilmiştir. SİS dozu her gün uygulandığında kümülatif olarak etki edebilmektedir (86). Bir başka çalışmada ratlarda ölümcül dozun 10 mg/kg olduğu belirtilmiştir (87). Bu nedenle bu çalışmada ratlarda şiddetli ovotoksisite gözlemleyebilmek ve ratları deney boyunca yaşatabilmek için ratlara altı gün boyunca günlük 2 mg/kg vücut ağırlığı dozunda SİS i.p. olarak enjekte edildi (83). Over yetmezliği vajinal smear kullanılarak doğrulanabilmektedir (64). Bu nedenle bu çalışmada enjeksiyonlar sonrasında ratlarda POY model oluşumu vajinal sitoloji ile tasdiklendi. Yapılan bu çalışma sonucunda SİS ile POY modeli oluşturmak için kullanılan bu dozun uygun bir doz olduğunu düşünülmektedir. Deneysel POY modelini tedavi edebilmek için uygulacak tedavi dozları literatürde bulunan örneklerden yola çıkarak belirlenmiştir. Özcan ve arkadaşları overlede SİS'e karşı 10 mg/kg RES dozun overleri SİS kaynaklı hasara karşı etkili bir şekilde koruduğunu göstermiştir (82). Barberino ve arkadaşları ise 20 mg/kg MEL ile ön tedavinin, overleri SİS kaynaklı hasara karşı koruduğunu bildirmiştir (88). Bu nedenle MEL ve RES için seçilen koruyucu tedavi edici dozların uygun olduğu düşünüldü.

Sisplatin, çocuklarda yüksek riskli malign germ hücreli tümörler, hepatoblastom veya medulloblastom gibi agresif tümörlerin tedavisinde kullanılmaktadır. Kanser tedavilerindeki gelişmeler umut verici olsa da bu tedavilerin endokrin ve metabolik komplikasyonlar da dahil olmak üzere çok çeşitli olumsuz etkileri vardır. Radyasyon ve kemoterapi tedavisinden en ciddi ve en sık etkilenen organlar hipotalamus, hipofiz bezi, tiroid bezi, over ve testis gibi endokrin organlardır (89). Bu komplikasyonlar genellikle tedaviden yıllar sonra ortaya çıkmaktadır (90). Kemoterapi; kadınlarda over germ hücrelerini etkiler ve premenopozal kadınlarda klinik olarak endokrin disfonksiyon ve infertilite olarak ortaya çıkan POY'a neden olur. Bazı müdahale ajanlarının over folikül rezervini kanser tedavilerine karşı korumak için etkili olabileceği öne sürülmüştür (91). Ancak kemoterapötik ilaç kullanımı sonucu ortaya çıkan folikül kaybının moleküler mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. POY etiyoloji ve histopatalojik oluşumunun anlaşılması hastalığın tedavisinin uygulanabilir hale gelmesi için önemlidir. Yapılan çalışmanın amaçlarından biri MEL ve RES'in POY gelişen overlerdeki folikül rezervinin korunması

ve hücresel dejenerasyon, vasküler konjesyon /hemoraji ve inflamasyon oluşumu üzerine etkisini gözlemlenmesidir.

Günümüzde, kemoterapinin neden olduğu folikül rezervindeki azalışın nedeni olarak iki muhtemel yolak öne sürülmüştür: "folikül aktivasyonu" ve "apoptoz". Alkilleyici ajanlar overde büyüyen foliküllerin granüloza hücrelerine zarar verir. Büyüyen foliküllerin granüloza hücreleri, dormant primordial foliküllerin aktivasyonunu baskılamada rol oynayan AMH ürettiğinden, granüloza hücrelerine verilen hasar AMH üretimini azaltır (92). AMH sekresyonundaki azalma nedeniyle dolaylı olarak aktive olan primordial foliküller folikülogenez sürecine devam eder ve daha sonra atreziye uğrar. Atreziye uğrayan folikül sayısındaki artış da POY oluşmasına neden olur. Literatürde 5 mg/kg SİS'in foliküllerde apoptozu indüklediği, günlük 2mg/kg SİS enjeksiyonunun ise aktivasyonu indüklediği belirtilmiştir (84). Bu nedenle, SİS'in primordial foliküllerin oositlerini ve büyüyen foliküllerin granüloza hücrelerini yok etme mekanizmasının açıklığa kavuşturulması, folikül rezervini SİS'e karşı korumak ve adjuvan tedavilerin keşfi ve geliştirilmesi için önemlidir. Bu çalışma, kanser hastalarında gelecekte doğurganlığın korunmasına yönelik uygulanabilir adjuvan tedavi için bir basamak oluşturmaktadır.

Oosit ve granüloza hücrelerinde görülen apoptoz POY için olası diğer neden olarak tanımlanabilmektedir. Kemoterapi kaynaklı folikül rezervindeki azalışın bir diğer nedeni primordial foliküllerde görülen apoptozun artışıyla oluşan atrezidir. Ancak kompleks apoptoz oluşum mekanizması nedeniyle çoğu molekülün apoptozu hangi yolla aktive ya da inhibe edebildiği bilinmektedir. Primordial foliküllerdeki oositler DNA hasarına karşı oldukça hassastır (93). SİS, DNA veya proteine bağlanır. Platin eklentileri ile bağlanma sonucu DNA onarım sistemlerinin aktive olur veya hasarın yoğunluğuna bağlı olarak hücre ölümünü de içeren çeşitli sinyal yolakları aktive olur. Primordial folikül içerisindeki oosit çoğalmasa da oosit spesifik genomik gözetim molekülleri nedeniyle kemoterapötik ajanlara karşı savunmasızdır. p53 tümör baskılayıcı ailesinin bir üyesi olan p63, primordial, primer ve erken sekonder foliküllerin oositlerinde dimer halinde bulunur. Gonadotoksik ajanların neden olduğu DNA hasarı sonucunda p63 dimerleri hiperfosforilasyon sonucu tetramer halini alır. Tetramer oluşumu sonucu PUMA-NOXA apoptoz yolağı aktive olur (94). Yapılan çalışmalarda ayrıca primordial folikül oositlerinin SİS sonucu aktive olmadığı da

gösterilmiştir (93). Bu çalışmanın bir diğer amacı da POY'un moleküler mekanizmasında etkili olabileceği düşünülen SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 gen ve protein ekspresyonlarının MEL ve RES ile uygulanan tedavi yöntemlerindeki değişiminin gösterilmesidir.

Bu çalışmada tüm deney gruplarında deney sonu ratların vücut, over ağırlıkları ve over ağırlık indeksi kıyaslandı. Deneysel çalışmada kullanılan ratlar gelişim çağında (8 haftalık) olduğu için KONT, MEL ve RES gruplarında deney boyunca vücut ağırlığındaki artış devam etse de deney süresince ortaya çıkan vücut ağırlık farklılıklarında anlamlılık görüldü. 1.-6. günlerde KONT grubuna kıyasla POY grubunda anlamlı derecede kilo azalışı görülürken sadece MEL veya RES verilen ratlarda kilo artışı KONT grubundaki ratlara benzer şekilde bulundu. Literatürde benzer şekilde Dong Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı dozlarda uygulanan (0.5, 1, 1.5, 2, 3, and 4 mg/kg) SİS enjeksiyonu sonucu Sprague Dawley ratlarda kilo artışının kademeli olarak azaldığı ve enjeksiyon tedavisinin sonunda (10.gün) en düşük değerlerine ulaştığını rapor edilmiştir. SİS enjeksiyonunun uygulanmaması durumunda ise vücut ağırlıklarının az miktar da olsa arttığı ancak yine de KONT grubununkinden önemli ölçüde düşük seviyede kaldığı görülmüştür (95). Bir başka çalışmada ise SİS ile POY oluşturulan ratların vücut ve over ağırlıkları KONT grubuna kıyasla önemli ölçüde azaldığı ancak rölatif over ağırlığının etkilenmediği belirtilmiştir. Günlük 10 mg/kg RES uygulanan ratlarda over ve vücut ağırlıkları KONT grubununki ile karşılaştırılabilir düzeyde bulunmuştur. Tek başına RES ile tedavi edilen ratların ağırlıkları ise KONT grubu ile benzer bulunmuştur (85). Çalışmamızda da POY oluşturulan ve MEL, RES ve MEL+RES uygulanan ratların deney sonu vücut ağırlıklarına bakıldığında bir miktar artış gözlendi. POY+MEL+RES grubundaki kilo artışı MEL ve RES grubuna göre anlamlı bulundu. Ratların over ağırlıkları kıyaslandığında ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi. Ayrıca MEL, RES ve MEL+RES tedavileri POY oluşturulan ratların over ağırlıklarında anlamlı bir artış sebep olmadı. Dong Li ve arkadaşları yaptığı çalışmada farklı dozlarda uygulanan (0.5, 1, 1.5, 2, 3, and 4 mg/kg) SİS enjeksiyonunun ratlarda over ağırlığını anlamlı derece düşürdüğü bildirilmiştir (95). Lei Zhu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Spraque Dawley ratlarda 4-vinylcyclohexene diepoxide (VCD) ile oluşturulan POY model grubunda azalmış over ağırlık indeksi bildirilmiştir (96). Bir başka çalışmada da ratlarda siklofosfamid ile oluşturulan POY modelinde azalmış

over ağırlık indeksi parametre olarak belirtilmiştir (97). Jiang ve arkadaşlarının farelerde SİS uygulamasına karşı RES'in tedavi uygunluğunun incelendiği çalışmada POY oluşturulan farelerin ağırlıklarının KONT grubundakilere kıyasla önemli ölçüde daha düşük olduğu bulunmuştur. Aynı çalışmada POY oluşturulan farelere 20 mg/kg ve 40 mg/kg RES uygulanan farelerin POY grubundakilere kıyasla anlamlı derecede daha yüksek ağırlıklara sahip olduğu gözlenmiştir (77) Al-Salahat ve arkadaşları, Wistar ratlarda tek doz 7 mg/kg SİS uygulamasının vücut ve over ağırlığında anlamlı düşüşe neden olduğunu bildirmişlerdir. SİS ile birlikte 30 mg/kg MEL tedavisinin vücut ve over ağırlığında anlamlı artışa neden olduğu belirtilmiştir. Sadece 30 mg/kg MEL verilen ratların over ve vucüt ağırlıklarında ise anlamlı değişiklik saptanmamıştır (98). Bu çalışmada da sadece MEL ve RES verilen ratların deney sonu vücut ve over ağırlıklarında istatistiksel anlamlılık tepit edilmedi. Bu çalışmada POY+MEL, POY+RES ve POY+MEL+RES gruplarında vücut ağırlığı bir miktar artmasına rağmen over ağırlıklarında daha az artış görüldü. Bu nedenle SİS uygulaması öncesi ve sonrasında uygulanan MEL, RES ve MEL+RES'in vücut ağırlığını arttırmada daha etkili olduğu görüldüğü için genel metabolizmada çok yönlü iyileşme sağlayabileceği düşünüldü. Ayrıca POY oluşturulan ratlarda SİS'in sadece over değil, metabolik olarak tüm vücudu etkilediği düşünüldü.

Bu çalışmada over primordial ve gelişim aşamasındaki folikül sayıları da karşılaştırıldı. Primordiyal folikül sayısına bakıldığında KONT grubuna kıyasla POY grubunda yaklaşık 3 kat azalma görüldü. SİS maruziyeti sonucu oluşan POY modelinde gelişmekte olan folikül sayılarına kıyasla primordiyal folikül rezervi oldukça azaldı. Primer folikül sayıları kıyaslandığında ise POY grubunda primer folikül sayısı KONT grubuna göre anlamlı bir azalma gösterdi. Elde edilen bu bulgular SİS'in özellikle erken gelişim evresindeki primordiyal ve primer folikülleri hedef alarak POY'u tetiklediğini düşündüren çalışmalarla benzerdir. Li ve arkadaşlarının overlerdeki SİS toksititesinin incelendiği çalışmada SİS'in KONT grubuna kıyasla primordial folikül sayısında anlamlı düşüşe neden olduğu bildirilmiştir (99). SİS overde primordial gelişen folikül popülasyonunu azaltmakta, bu durum da infertiliteyi tetiklemektedir. SİS'e maruz kalmanın foliküller üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar, doğrudan ve/veya hızlandırılmış aktivasyon nedeniyle dolaylı olarak primordial folikül ölümü yoluyla primordial folikül rezervindeki azalışı sıklıkla bildirmektedir; her iki durumda da bu durum POY'a yol açmaktadır (44). Ancak, farelerin yetişkin kortikal primordial

foliküllerinde primordiyalden primere ve primordiyalden sekondere aktivasyonun sırasıyla en az 7-9 gün ve 23-24 gün sürmesi beklendiğinden ve ratlarda üreme siklusunun farelere kıyasla daha uzun olmasından dolayı bu çalışmada kullanılan zaman dilimi folikül aktivasyonunu tam olarak gözlemlemek için yeterli olmayabilir (100). Bununla birlikte, POY grubunda belirgin primer folikül sayısı artışının olmaması, 2 mg/kg SİS'in primordial folikül aktivasyonunu ve primordiyal foliküllerden primer folikül gelişimini indüklemediğini açıkça göstermektedir. Bu çalışma ile folikül aktivasyonunun primordial folikül rezervinin azalmasının önemli bir mekanizması olduğunu öne süren çalışmalar arasındaki farklılıkların nedenleri belirsizdir, ancak deneysel çalışmalarda kullanılan fare/rat türleri veya uygulanan kemoterapi dozlarındaki çalışmalar arası farklılıklarla ilgili olabilir. Literatürde mesna, mirtazapin, RES ve sildenafil sitrat gibi antioksidan ajanların SİS verilen ratların over rezervi üzerindeki koruyucu etkileri açısından incelenmiştir. SİS'in over toksititesini engellemek amaçlı sildenafil sitrat uygulanan ratlarda sildenafil sitratın primordial folikül sayısını anlamlı derecede arttırdığı gösterilmiştir (101). Çalışmamızda MEL ve RES uygulanan ratlarda primordial ve primer folikül sayısında KONT grubuna göre anlamlılık bulunmadı. POY oluşumu sonucunda azalan primordial folikül rezervine karşı uygulanan MEL ve RES'in terapötik etkilerini değerlendirmek amaçlı POY+MEL ve POY+RES ve POY+MEL+RES grupları karşılaştırıldığında bu gruplardaki artış POY grubuna göre anlamlı bulundu. Ancak bu gruplar arasında anlamlı farklılık tespit edilmedi. Bu sonuçlar, POY oluşumunda SİS maruziyeti sonucunda over fonksiyonunun maksimum düzeyde baskılandığını ve MEL ve/veya RES tedavisi ile yeniden kazanılabileceğini gösterdi. Primer folikül sayısında POY+MEL ve POY+RES gruplarında KONT grubuna kıyasla anlamlı azalma görülürken, POY oluşumuna karşı MEL ve RES'in birlikte kullanıldığı POY+MEL+RES grubunda primer folikül sayısının POY grubuna kıyasla anlamlı derece korunduğu görülmüştür. Bu sonuçlar primer folikül sayısının korunmasında MEL+RES tedavisinin daha etkili olabileceğini düşündürdü. Ayrıca KONT grubuna kıyasla POY+RES grubunda primordiyal folikül sayısında anlamlı azalma görüldü. Jiang ve arkadaşlarının farelerde SİS kullanımı ile oluşturulan modelde 20mg/kg ve 40mg/kg dozlarda RES'in tedavi uygunluğunu incelediklerinde, RES tedavi gruplarında SİS grubuna kıyasla primordial ve primer folikül oranlarının arttığını göstermişler. Ayrıca primordial folikül sayısındaki artışın RES konsantrasyonu ile doğru

orantılı olduğu belirtmişlerdir (77). Bu nedenle POY+RES grubunda kullanılan RES'in folikül rezervini korumada tek başına yeterli olmayabileceği düşünüldü. Ancak Johnson ve arkadaşlarının primordial folikül rezervinin yenilenebilir olduğunu bildirmiş olsalar da bu durum henüz doğrulanmamıştır (102). Bu nedenle, foliküllerin kantitatif ölçümü potansiyel doğurganlığı değerlendirmenin en iyi yoludur. Tutarlı bir şekilde, MEL ve RES ile kombinasyon tedavisi primer ve primordiyal folikül sayısını maksimum düzeyde korumuştur. Ancak deneyde kullanılan ratların tümü histolojik ve moleküler analiz için sakrifiye edildiğinden gebelik oranı incelenememiştir.

Bu çalışmada gelişmekte olan sekonder, tersiyer folikül yapıları da değerlendirildi. Sekonder folikül sayısı SİS ile indüklenen POY grubunda KONT grubuna kıyasla anlamlı şekilde azaldı. Li ve arkadaşlarının ratlarda yaptığı çalışamaya göre 10 gün boyunca 1mg/kg dozunda uygulanan SİS'in overde KONT grubuna kıyasla primordial foliküllerin yanısıra sekonder ve graaf folikül sayısında anlamlı derecede azalmaya neden olduğu belirtilmiştir (99). Jiang ve arkadaşlarının Kunming farelerde yaptığı çalışmada SİS ile oluşturulan POY sonrasında 40 mg/kg dozunda uygulanan RES tedavisi sonucu sekonder folikül sayısında POY grubuna göre anlamlı artış görülürken 20 mg/kg dozunda uygulanan RES tedavisinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Graaf folikül sayısında ise kontrole göre anlamlı bir azalış görülürken 20 mg/kg ve 40 mg/kg RES uygulanan gruplarda POY grubuna göre anlamlı artış görülmüştür(77). Bu çalışmada sadece MEL veya RES verilen ratlarda sekonder ve tersiyer folikül sayılarında KONT grubuna kıyasla anlamlı bir değişiklik gözlenmedi. Bu durum sadece MEL veya RES'in overde gelişen folikül sayısına anlamlı derecede etki etmediğini göstermektedir. Al Slahat ve arkadaşları, Wistar ratlarda 7 mg/kg SİS uygulamasının KONT grubuna kıyasla primordial ve gelişmekte olan (primer, sekonder ve Graaf) folikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olduğunu belirtmiştir. SİS ve MEL ile tedavi edilen grupta ise primordial ve büyüyen folikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış görülmüştür. Sadece 30 mg/kg MEL verilen ratlarda ise primordial ve gelişen folikül sayısında KONT grubuna göre anlamlı değişiklik saptanmamıştır (98). Ancak bu çalışmada ise MEL ve POY+MEL grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı farklılık görülmedi. Tersiyer folikül sayısında gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmedi bu nedenle bu sonuç literatürde belirtilen bulgular ile çelişmektedir. Bu durum türler ve uygulanan SİS dozu arasındaki farklılıklara ve folikül sayılarını ölçmek için

mutlak folikül sayısı yerine folikül yoğunluğunun hesaplanmasından kaynaklanabilir. RES ve POY+RES grupları karşılaştırıldığında ise POY+RES grubunda RES grubuna kıyasla anlamlı azalma görüldü. Bu nedenle POY+RES grubunda kullanılan RES'in primordiyal folikül sayısında olduğu gibi sekonder folikül sayısını korumada tek başına yeterli olmayabileceği düşünüldü.

Tüm gruplarda atretik folikül sayıları da karşılaştırıldı. POY grubunda KONT grubu ile karşılaştırıldığında atretik folikül sayısında yaklaşık 3 kat artış gözlendi. Aynı zamanda POY grubunda atretik folikül sayısındaki artış diğer tüm gruplara kıyasla anlamlı derecede fazla bulundu. Yapılan çalışmalarda SİS'in gelişmekte olan foliküllerde apoptozu indüklediği atreziye neden olduğu bildirilmektedir (44). Bu nedenle POY grubunda gelişen foliküllerdeki artan atrezinin granüloza hücrelerinde artmış olan apoptoz ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Tek doz SİS maruziyetinin overde oluşturduğu hasarın incelendiği çalışmada SİS'in normal over dokusuna zarar verdiği, fonksiyonel folikül sayısında azalmaya, atretik folikül sayısında artışa neden olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada MEL ve RES grupları arasında atretik foliküller açısından anlamlı bir farklılık tespit edilmedi. Bu durum tek başına MEL veya RES'in overde normal fizyolojik süreç olarak görülen folikül atrezisine anlamlı derecede etki etmediğini göstermektedir. SİS kaynaklı POY oluşumunda; folikül atrezisinde artış ve büyüyen foliküllerdeki granüloza hücrelerinde apoptoz mekanizması rol oynamaktadır. Over hasarına karşı koruyucu etkileri olduğu düşünülen mesna ve mirtazapin'in bu olumsuz etkileri önlemede başarılı olmadığı belirtilmiştir (103). Özcan ve arkadaşlarının Sprague Dawley ratlarda SİS maruziyetinin incelendiği çalışmada SİS uygulaması ratlarda atretik folikül sayısını anlamlı derecede artırırken 10 mg/kg RES tedavisinin atretik folikül sayısını anlamlı derece düşürdüğü tespit edilmiştir (82). Jiang ve arkadaşlarının farelerde SİS ile oluşturduğu POY modelinde atretik foliküllerin sayısı ve oranının RES tedavisinden sonra, özellikle 40 mg/kg RES grubunda POY grubuna göre anlamlı derecede azaldığı bildirilmiştir (77). Al Slahat ve arkadaşları, Wistar ratlarda 7 mg/kg SİS uygulamasının KONT grubuna kıyasla atretik folikül sayılarında istatistiksel olarak anlamlı artışa neden olduğunu belirtmiştir. SİS ile birlikte 30 mg/kg MEL tedavisinin ise atretik folikül sayısını anlamlı derecede düşürdüğünü belirtmiştir. Sadece 30 mg/kg MEL verilen ratlarda ise atretik folikül sayısında KONT grubuna göre anlamlı değişiklik saptanmamıştır (98). Çalışmamızda POY+RES grubunda RES grubuna

kıyasla anlamlı derecede artmış atretik folikül sayısı tespit edildi. POY+MEL grubunda ise MEL grubuna kıyasla anlamlı derecede artmış atretik folikül sayısı görüldü. Her ne kadar POY+MEL ve POY+RES gruplarında görülen atretik folikül sayısı POY grubuna kıyasla anlamlı derecede azalmış olsa da, bu sonuçlar MEL veya RES'in POY oluşumunda görülen atretik folikül oluşumunu tek başına yeterli seviyede koruyamadığını düşündürdü. Tutarlı bir şekilde, kombinasyon tedavisi uygulanan grupta ise atretik folikül sayısındaki azalış hem POY+MEL hem de POY+RES grubuna kıyasla anlamlı bulundu. Bu sonuç kombinasyon tedavisinin POY oluşumunda görülen folikül atrezisini önleyebileceğini düşündürdü. SİS maruziyeti sonucu oluşan POY'da MEL ve RES'in birlikte uygulanması sonucu artan koruyucu etki, herhangi bir kalibrasyon olmaksızın iki ajanın toplam dozajına atfedilebilir veya aralarındaki sinerjik reaksiyonla ilişkili olabilir.

Işık ve transmisyon elektron mikroskobunda POY tanısı konulan kadınların overlerinde yoğun bağ dokusu ve birkaç korpus albikans gözlenmiştir. Overde fibriler elementlerin ve hücrelerin dağılımının homojen olmadığı saptanmıştır. Elektron transmisyon mikroskopisinde, over stromasında yüksek konsantrasyonda fibroblast ve kollajen lifleri görülmüştür. Ayrıca, stromada bazı bölgeler daha fazla kolajen birikimi gösterirken, diğer bölgelerin daha fazla hücresel elemente sahip olduğu görülmüştür (104). Bu çalışmada, tüm gruplara ait over dokusu foliküller hücre vakuolizasyonu/dejenerasyonu, vasküler konjesyon/hemoraji, ve inflamasyon ve fibrotik alanlar gibi doku hasarını belirten histopatolojik kriterler açısından değerlendirildi. Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre POY grubunda granüloza hücrelerinde izlenen foliküller hücre dejenerasyonunda diğer tüm deney gruplarına kıyasla artış gözlendi. Zhang ve arkadaşları ratlarda SİS ile oluşturdukları POY modelinde antral foliküllerdeki granüloza hücreleri ve oositte hafif dejenerasyon ve nekroz görüldüğünü bildirmişlerdir (105). Taskın ve arkadaşları SİS maruziyetinin sonucu overlerde ciddi dejenerasyon, hemoraji, vasküler konjesyon görüldüğünü belirtmişlerdir (101). Siklofosfamid ile POY oluşturulan rat overlerinde fibröz stroma görülürken foliküllerde lenfosit infiltrasyonu gözlenmiştir. MEL ile tedavi edilen overlerdeki morfolojik değişikliklerin ise POY grubundakilerden daha iyi olduğu gözlenmiştir (106). Bu çalışmada POY grubunda gelişimin farklı aşamalarında dilate konjestif kan damarları, hemoraji, inflamatuar hücre infiltrasyonları ile ciddi foliküler dejenerasyon gözlenirken POY+MEL, POY+RES ve

POY+MEL+RES gruplarında overin histolojik mimarisinin neredeyse korunduğu gözlendi. Inflamasyonda MEL, nükleer faktör κB'nin (NF κB) DNA'ya bağlanmasını inhibe ederek pro-inflamatuar sitokinlerin sentezini azaltır ve nitrik oksit sentaz geninin ekspresyonunu baskılayarak anti-inflamatuar özellik gösterebilir (107). Bu nedenle MEL'in bu yönüyle tedavi edici etkisinin anti-inflamatuar özellikte olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Dolayısıyla bu çalışmada da MEL ve/veya RES, POY gelişen overlerde SİS kaynaklı foliküler hücre dejenerasyonunu hafifletmiştir. KONT, MEL ve RES grubuna kıyasla POY grubunda daha fazla konjesyon ve hemorajik alan tespit edildi ancak istatistiksel olarak anlamlılık görülmedi. Melekoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre ratlarda siklofosfamid ile hasar oluşturulan overlerde korpus luteum çevresinde ve over stromasında orta veya şiddetli seviyede hemoraji görülürken; SOD, GSH, GPX gibi antioksidan parametrelerinin ise azaldığı görülmüştür. Over doku hasarındaki artışın, oksidatif stres seviyesindeki artış nedeniyle ortaya çıktığı düşünülmüştür (108). Bu çalışmadan elde edilen bulgularda ise POY grubunda SİS toksisitesi sonucu artmış oksidatif stresin dokuda inflamasyon ve dejenerasyonu tetiklediği düşünüldü. POY oluşturulan ratlara MEL, RES ve MEL+RES uygulanması ile azalan hücre dejenerasyonunun ise uygulanan antioksidanların dokudaki oksidatif stress mekanizmasını baskılayabilme kabiliyetinden olabileceği düşünüldü.

Fibrozis genellikle overde yaşlılıkla ortaya çıkan bir durumdur. Fibrozis, hücre dışı matriks (ECM) birikimi ve yıkımında dengesizlik olduğunda oluşur. Bağ dokularının aşırı birikimi patolojik bir durum olarak tanımlanır ve organ yaralanması veya yetmezliğinin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Said ve arkadaşları, SİS ile POY oluşturulan rat overlerinde KONT ve sadece RES (10 mg/kg) grubunda folikül gelişiminin farklı aşamalarında normal histolojik yapı görürken POY grubunda belirgin fibrozis ile birlikte interstisyel hiperplazi görmüşlerdir. Bununla beraber RES tedavisi sonucu overde belirgin normal yapı gözlemişlerdir (85). Aynı zamanda Wistar Albino cinsi ratlarda siklofosfamid ile oluşturulan POY modelinde stromada özellikle genişlemiş tıkalı kan damarlarının çevresinde yoğun kolajen lif birikimi görülmüştür. Bu çalışmada elde edilen bulgular ise KONT grubundaki stromal dokuda normal kollajen dağılımı görülürken POY grubunda kollajen birkiminin arttığı görüldü. Bu bulgu, POY overlerinde fokal fibrozis oluştuğunu tespit eden Zhou ve arkadaşları çalışması ile uyumludur ve hasarlı overlerde mikro çevre dejenerasyonuna işaret etmektedir (109). Over stroması kemoterapötik

ajanlar tarafından dolaylı olarak zarar görebilir (110). Literatürde kemoterapinin stromal fibrozis ve over vasküler anormalliklerine yol açtığı bildirilmiştir. Bu bulgular, kan damarlarındaki hasarın ve over korteksindeki fokal fibrozisin kemoterapiye bağlı over disfonksiyonunun bir başka mekanizması olabileceğini düşündürmektedir (111). Ayrıca, daha önce kemoterapiye maruz kalmış hastaların overlerinde kortikal fibrozis nedeniyle kortikal stromal damarlarda kalınlaşma ve hyalinizasyon görüldüğü bildirilmiştir (112). Fibrozisteki artışın da inflamasyonla ilişkili olabileceği düşünülmektedir (113). Aynı zamanda bu çalışmada dejenere oositi çevreleyen ZP'de soluk boyanmış PAS pozitif alanlar görüldü. Bu sonuçlar, oosit ve oositi çevreleyen ZP içindeki karbonhidrat yoğunluğunun azaldığını ve hatta tükendiğini gösterdi. Literatürde SİS uygulanan hayvanlarda miyokardiyum ve böbrek hücrelerinde PAS reaktivitesinin belirgin şekilde azaldığı gösterilmiştir (114) Aynı zamanda SİS'in over toksisitesinin incelendiği çalışmada, SİS uygulanan gruplarda ZP ve oositte PAS reaktivitesinin azaldığı, MEL ile tedavi edilen gruplarda ise arttığı görülmüştür (98). Bu nedenle bulgularımız literatür ile uyumludur. Ayrıca, MEL, RES ve MEL+RES ile tedavi edilen overlerde normal kolajen birikimi görülürken ZP ve oositte PAS yoğunluğunun POY grubuna göre arttığı görüldü. MEL, apoptotik ve nekrotik değişiklikler, enflamatuar hücre infiltrasyonu ve özellikle TGF-β gibi fibrozis indükleyici faktörlerin ekspresyonu dahil olmak üzere epitel hücre hasarını inhibe ederek anti-fibrotik etki gösterir. Ayrıca MEL'in glikozaminoglikanlar ve kolajen dahil olmak üzere ekstraselüler birikimini ve fibrozis gelişimini azalttığı belirtilmiştir (115). Bu nedenle bu çalışmada POY+MEL grubunda görülen fibrotik doku azalışının MEL'in anti-fibrotik etkisinden kaynaklandığı düşünüldü. Literatürde RES'in over dokusu üzerindeki anti-fibrotik etkisini inceleyen çalışmalarda sadece SİS verilen ratlarda, SİS toksisitesi kümülüs ooforusun incelmesi, oosit dejenerasyonu, stromal fibrozis ve korpus luteumun fibrolizi olarak ortaya çıkmıştır. Tek doz SİS (5 mg/kg) enjeksiyonundan sonra verilen düşük doz RES (5 mg/kg) tedavisi sonucu, overde kümülüs hücrelerinde az da olsa azalma ve kortikal hücrelerde dejenerasyonlar görüldüğü için RES hafif bir koruma sağlamıştır. Aynı çalışmada SİS enjeksiyonundan sonra 10 mg/kg dozunda RES ile tedavi edilen rat overlerinde preovulatuar folikül varlığı ve teka foliküllerinin tam olarak korunmasıyla birlikte normale yakın bir over histomorfolojisi görülmüştür. Aynı etkiler, 21 gün boyunca SİS enjeksiyonundan önce ve sonra 10 mg/kg RES verilen rat overlerinde de görülmüştür (80). Bu sonuçlar, RES'in folikül sayısında olduğu gibi over histomorfolojisinin korunmasındaki koruyucu ve tedavi edici etkisinin

doza bağlı olduğunu göstermektedir. Sonuç olarak SİS maruziyetinin over doku hasarını oluşturduğu ve overde foliküller hücre dejenerasyonu, vasküler konjesyon/hemoraji, inflamasyon ve fibrotik alanlarda artışa neden olduğu literatürdeki çalışmalarda belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda elde edilen veriler, her iki ajanın da (MEL ve/veya RES) ratlarda POY oluşumunda görülen patolojik bulguları önlediğini gösterdi. Ancak tekli ve kombine tedavi uygulanan gruplar arasında fibrotik alan yoğunluğu açısından fark görülmedi. Aynı zamanda literatürde SIRT1 agonistlerin SIRT1 ekspresyonunu artırarak SIRT1'in fibrojenik faktörlerin aktivasyonunu baskıladığını, over morfolojisini iyileştirdiğini ve over oksidatif stresini azalttığını belirtmişlerdir (5). Bu nedenle POY+MEL, POY+RES ve POY+MEL+RES gruplarında görülen fibrotik doku azalışının MEL ve/veya RES nedeniyle artan SIRT1 ekspresyonu ile ilişkili olabileceği de düşünüldü.

Over sağlığı, hipotalamus-hipofiz-over eksenindeki hormon salınımı ile yakından ilişkilidir (116). Bu nedenle POY'un klinik tanısında hormonal değerlendirmeler yapılmaktadır. E2 foliküllerdeki teka hücreleri ve granüloza hücreleri tarafından üretilir. Artan seviyedeki E2 salınımı hipotalamus-hipofiz-over ekseninde hipofizden FSH salgısı üzerinde negatif geri bildirim sağlar. Artan FSH ile aynı zamanda azalan E2 hormon seviyesi POY'un klinik tanısında belirteç olarak kullanılabilmektedir. Bu nedenle, deney sonunda ratlardan alınan kardiyak kan örneklerinde serum E2 hormonu seviyeleri ELİSA yöntemi ile incelendi. Bu çalışmada her ne kadar POY grubunda serum E2 konsantrasyonu KONT grubuna göre azalmış olsa da istatistiksel anlamlılık görülmedi. Dong Li ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, farklı dozlarda uygulanan (0.5, 1, 1.5, 2, 3, and 4 mg/kg) SİS enjeksiyonunun ratlarda serum E2 seviyesini anlamlı derece düşürdüğü bildirilmiştir (95). Bu çalışmada her ne kadar anlamlılık görülmemiş olsa da POY+MEL grubu E2 seviyesi POY grubuna göre daha fazla idi. Bir başka çalışmada siklofosfamid ile POY oluşturulan Sprague Dawley ratlarda model grubunda E2 seviyesinin düştüğü belirtilmiştir. Aynı çalışmada günlük 10 ve 20 mg/kg MEL enjeksiyonu verilen ratlarda E2 seviyesinin POY oluşturulan ratlara kıyasla anlamlı derecede arttığı rapor edilmiştir (106). Bu çalışmada her ne kadar anlamlılık görülmemiş olsa da POY+RES grubu E2 seviyesi POY grubuna göre daha fazla bulundu. Peripubertal Sprague Dawley ratlarda oluşturulan POY modelinde model oluşumu sonrasında uygulanan 10

mg/kg RES'in serum E2 seviyesinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı bildirilmiştir (117). Al-Slahat ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tek doz 7 mg/kg dozunda SİS uygulamasının Wistar ratlarda serum E2 ve AMH seviyesini anlamlı derece düşürdüğü görülmüştür. Aynı çalışmada SİS enjeksiyonu öncesinde uygulanan 30 mg/kg MEL tedavisinin serum FSH ve LH seviyesini anlamlı derecede düşürürken serum E2 seviyesini anlamı derecede artırdığı belirtilmiştir (98). Overbeek ve arkadaşlarının kemoterapiye maruz kalan kadınlarla ilgili yapılan çalışmaları konu alan meta-analiz çalışmasında KONT gruplarına kıyasla kemoterapi alan kadınlarda anormal seviyede yüksek FSH, düşük inhibin, AMH ve E2 seviyeleri olduğunu belirtmişlerdir. Melekoglu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, siklofosfamid ile oluşturulan POY modelinde Kurkumin ve Kapsaisin kullanımının serum AMH ve E2 düzeyinde artışa neden olduğu belirtilmiştir (108). Yapılan bu çalışmada POY grubunda koruyucu ve tedavi amaçlı verilmiş olan MEL ve/veya RES tedavisi sonucu E2 seviyesinde artış gözlenmiş ancak anlamlılık tespit edilmemiştir. Bu durum türler ve uygulanan SİS dozu arasındaki farklılıklara bağlı olabileceği gibi serum veya doku örneklerindeki E2 hormon seviyesine bağlı olabilir.

Bu çalışmada SİS tarafından oluşturulan POY modelinde tüm overlerde POY oluşumunda rol oynadığı düşünülen SIRT1/pH2Ax immün-lokalizasyonuna bakıldı. Over rezervi, primordial foliküllerin sayısına göre belirlendiği bildirilmiştir (118). Platin bileşikleri de dahil olmak üzere alkilleyici benzeri ajanlar, en ovotoksik kemoterapi ajanları arasında yer almaktadır (119). SİS, DNA eklentileri oluşturarak DNA çift sarmal kırılmalarına neden olur. SİS uyku halindeki hücrelerin yanı sıra hızla bölünen hücrelere de zarar verebilir. Folikül rezervini oluşturan primordial foliküller mayoz bölünmede dinlenme halinde bulunan oosit ve tek tabakalı granuloza hücresi içermektedir. Primordial foliküller, büyüyen folikül havuzuna girmek üzere aktive edilene kadar 50 yıla kadar dinlenme durumunda kalır. Bu süre boyunca germ hattı bütünlüğünün korunması sıkı genomik gözetim ile sağlanabilir. Bu nedenle primordial foliküller, doğurganlık için potansiyel olarak olumsuz sonuçları olan genotoksik strese karşı son derece hassastır. Bu özellikler, SİS'in hücre döngüsüne özgü olmayan etkisiyle birleştiğinde, SİS'in primordial foliküller içindeki oositlere doğrudan zarar vererek over folikül rezervini azaltabileceğine dair güçlü bir biyolojik argüman oluşturmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada SİS tarafından oluşturulan

genotoksik stres oluşumunu belirlemek için DNA hasarı belirteci olarak tüm overlerde pH2Ax immün-lokalizasyonuna bakıldı. Bu çalışmada elde edilen bulgularda POY grubundaki özellikle sekonder ve antral foliküllerdeki granüloza hücrelerinde DNA hasarı tespit edildi. SİS gibi alkilleyiciler ve alkilleyici benzeri ajanlar hücre döngüsüne spesifik değildir, ancak özellikle hızla çoğalan, mitotik olarak aktif hücrelerde etkilidir. Bu nedenle, bu çalışmada da görüldüğü gibi, büyüyen folikül, granüloza ve teka hücreleri üzerindeki etkileri şaşırtıcı değildir. POY'a karşı MEL'in koruyucu etkisinin karşılaştırıldığı POY +MEL uygulanan grupta pH2Ax reaktivisinde önemli bir azalış tespit edildi. Yapılan çalışmalar, MEL'in palmitik asit gibi gonadotoksik ajanların neden olduğu toksisiteye karşı over folikülleri üzerinde koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir (120) MEL'in endoplazmik retikulum stresinin inhibisyonu, reaktif oksijen türleri seviyelerinin azaltılması ve apoptozun inhibisyonu gibi süreçlerde rol oynaması koruyucu etkisini açıklamaktadır. Ayrıca yapılan çalışmalar MEL'in, fare overlerinde primordial foliküllerin aktivasyonunu bloke ederek, PTEN (Phosphatase and tensin homolog), AKT (serine-threonine protein kinase)'nin SİS aracılı fosforilasyonunu ve FOXO3a'nın primordial oositlerde çekirdekten sitoplazmaya translokasyonunu önemli ölçüde azalttığını göstermiştir (2,12). Bir başka çalışmada iki saatlik 30 mg/kg MEL ile ön tedavinin ardından 15 gün boyunca 2 mg/kg SİS ile tedavisinin, primordial foliküller ve büyüyen foliküllerin granüloza hücreleri üzerinde herhangi bir koruyucu etkisi olmadığı gösterilmiştir (84). POY'a karşı RES'in koruyucu etkisinin karşılaştırıldığı POY +RES uygulanan grupta pH2Ax reaktivisinde POY grubuna kıyasla önemli bir azalış tespit edilmemiştir. Literatürde overde SİS'e karşı RES'in olası koruyucu veya tedavi edici etkisinin özellikle overdeki granuloza hücrelerindeki DNA hasarına (pH2Ax) etkisini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Elde edilen sonuçlar, RES'in SİS kullanılarak foliküllerdeki granuloza hücrelerinde oluşturulan DNA hasarını azaltmadığını göstermiştir. Son çalışmalar SIRT1'in memeli hücrelerindeki metabolik süreçlerin ve stres yanıtının düzenlenmesinde önemli bir rol oynadığını ve DNA hasarı da dahil olmak üzere, streslerin neden olduğu apoptoz veya hücresel yaşlanmayı inhibe ederek hücre sağkalımını desteklediğini ortaya koymuştur (121). Memelilerde SIRT1 DNA hasarının onarımı ile bağlantılı çeşitli faktörleri deasetile ederek genomik stabiliteyi de etkilemektedir. SIRT1'in genomik bütünlükteki rolü, Sirt1-/- embriyolarında kromozomal sapmaların arttığının ve DNA onarımının bozulduğunun yakın zamanda

gösterilmesiyle de kanıtlanmıştır (122). Buna ek olarak, oksidatif hasarı takiben SIRT1'in DNA kırılma bölgelerine toplandığı gösterilmiştir. SIRT1, yaşlanma, proliferasyon, inflamasyon, enerji homeostazı, gen susturma ve uzun yaşam süresini etkileyen çeşitli hücresel süreçlerde rol oynar. Ancak SIRT1'in normal ve kanser hücrelerinde DNA onarımı ile arasındaki etkileşim tam olarak anlaşılamamıştır. SIRT1, DNA'da heterokromatin oluşumuna neden olarak ve DNA'da hasarlı bölgeye birçok onarım faktörünün gelmesini sağlar ve böylece DNA hasarının azaltılmasına yardımcı olur. Stres varlığında SIRT1, DNA onarım mekanizmalarında rol oynayan farklı proteinlerle etkileşime girerek onları DNA hasar odaklarına toplar veya DNA onarımında yer alan proteinleri deasetile ederek aktive eder. Bu nedenle SIRT1, DNA onarımının sağlanması ve genomik stabilitenin sağlanmasında önemli rol oynar (123). POY'da MEL ve RES'in koruyucu etkisinin karşılaştırıldığı POY+MEL+RES uygulanan grupta pH2Ax reaktivisinde POY+MEL veya POY+RES gruplarına kıyasla önemli bir azalma tespit edildi. Bu sonuçlar MEL+RES ile uygulanan kombinasyon tedavisinin SİS ile POY gelişen overlerde SİS'in neden olduğu DNA hasarını önleyebileceği veya tedavi edebileceğini gösterdi. Lopez ve arkadaşları, MEL'in düşük doz RES tarafından üretilen oksidasyon hasarını ortadan kaldırabildiğini ve MEL ve RES kombine tedavisinin DNA koruması üzerinde sinerjik bir etki göstermediğini belirtmişlerdir (124). MEL, reseptörleri aracılığıyla işlev görür; örneğin MT1 tarafından in vitro olarak sığır embriyo gelişimini teşvik eder. Buna karşın RES, hayvanlarda reseptörü olmayan bir fitohormon türüdür. Sığır embriyolarında MEL ve MEL+RES, sıcaklık stresinin polar cisim üzerindeki olumsuz etkilerini hafifletmede tek başına RES'e kıyasla daha etkili olduğu görülmüştür. MEL+RES tedavisi uygulanan sığır embriyolarında polar cisim oranı kontrollerden bile daha yüksek bulunmuştur. Genel olarak, MEL+RES tedavisinin, ısı stresinin oositler üzerindeki olumsuz etkisini hafifletmede MEL'den daha güçlü olduğu ve tek başına MEL tedavisinin tek başına RES tedavisinden daha güçlü olduğu görülmüştür (125). Özetle; bu çalışmada elde edilen veriler POY grubunda büyüyen foliküllerin granuloza hücrelerinin pH2Ax-pozitif olduğunu ve apoptoz sonucu atreziye uğradığını gösterdi. Çalışmamızda elde edilen bulgularda daha önce de belirtildiği gibi primordial folikül rezervindeki azalışın, primer veya sekonder foliküllerde bir artışa neden olmadığı görüldü. Bu çalışmada sürekli 2 mg/kg SİS tedavisinin primordial ve büyüyen foliküllerin granuloza hücrelerini yok ederek toplam folikül rezervini azalttığı görüldü. Bu veriler farklı

seviyelerde gelişmekte olan folikül sayıları (primer, sekonder ve tersiyer) ve overlerin histopatolojik bulguları, SİS'in POY gelişen overlerde over rezervi üzerinde toksik etkisi olduğunu gösterdi. POY+MEL+RES grubunda pH2Ax immün reaktivisinde POY+MEL veya POY+RES gruplarına kıyasla önemli bir azalma tespit edildi. Bu nedenle MEL+RES ile uygulanan kombinasyon tedavinin POY gelişen overlerde SİS'in neden olduğu DNA kırığını önleyebileceği veya tedavi edebileceği görüldü.

Bu çalışmada SİS tarafından oluşturulan POY modelinde tüm overlerde POY oluşumunda rol oynadığı düşünülen SIRT1/FOXO3a immün-lokalizasyonu ve mRNA gen ifadesine bakılmıştır. KONT grubunda SIRT1 ve FOXO3a protein ekspresyonu normal dağılım gösterirken, POY grubunda SIRT1 ve FOXO3a protein ve mRNA ekspresyonunda anlamlı derecede azalma görüldü. POY+MEL grubundaki SIRT1 protein seviyesi MEL ve KONT grubuna kıyasla daha az iken POY grubuna kıyasla anlamlı derecede fazla idi. Bu sonuç tek başına MEL tedavisinin SIRT1 protein seviyesini KONT grubundaki kadar koruyamadığını ancak POY oluşan overlerden daha iyi koruduğunu gösterdi. FOXO3a protein ekspresyonu POY+MEL grubunda MEL ve KONT grubuna kıyasla anlamlı derece azaldı ancak FOXO3a mRNA düzeyinde farklılık görülmedi. Zhang ve arkadaşları, fare foliküler sıvısında MEL miktarının yaşla birlikte azaldığını ve eksojen MEL takviyesinin SIRT1/SOD2 ekspresyonunu aktive ederek, yaşlanan oosit kalitesini iyileştirdiğini ve yaşlanan overlerde üreme potansiyelini geri döndürerek yaşlanan oositlerdeki mayotik defekti tersine çevirdiğini belirtmişlerdir (126). Ayrıca SIRT1'in telomer bütünlüğünü koruyarak ve over yaşlanmasını düzenleyerek hücre yapışma proteinlerinin düzenlenmesinde rol oynadığı da belirtilmiştir (127). Qin ve arkadaşları, 27 haftalık dişi fareleri metformin ile tedavi etmiş ve tedavi edilen grupta SIRT1 ekspresyonunun önemli ölçüde arttığını ve bu farelerin daha yüksek E2 hormonu seviyelerine ve daha istikrarlı östrus döngülerine sahip olduğunu göstermiştir (128). Zhang ve arkadaşları çalışmalarında MEL'in SIRT1 agonisti olarak davrandığını ve 24 haftalık farelerde yavru büyüklüğünü önemli ölçüde artırdığını kaydetmiştir. Bu sonuçlar, MEL'in over yaşlanmasını geciktirdiğini ve farelerde doğurganlığı artırdığını göstermektedir (129). Uzun süreli (43 hafta) MEL tedavisinin over yaşlanması üzerine etkisinin incelendiği çalışmada tedavi edilen grupta telomer uzunluğunun artmasıyla over yaşlanmasının geciktiğini bulmuşlardır. Bu veriler, MEL'in antioksidan etkisinin yanısıra

telomerlerin korunması, SIRT1 ifadesinin uyarılması ve ribozom işlevinin artırılması dahil olmak üzere çoklu mekanizmalar yoluyla over yaşlanmasını geciktirdiğini göstermektedir (130). Ma ve arkadaşları ayrıca MEL'in SIRT1'i aktive ederek tripterygium glikozitlerinin neden olduğu POY'dan koruma sağladığını göstermişlerdir. POY modeli oluşturulan farelerde MEL tedavisinden sonra POY grubunda azalan SIRT1, FOXO3a mRNA ekspresyonundaki azalmanın azaltılabildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, Ex527'nin (SIRT inhibitörü), SIRT1 ve FOXO3a ekspresyonunu inhibe ederek MEL'in oksidatif stres üzerindeki koruyucu etkilerini bloke ettiği belirtilmiştir (131). Bu sonuçlar, MEL'in SIRT1 sinyalizasyonunun aktivasyonunu içerdiğini ve MEL kaynaklı SIRT1 sinyalizasyon aktivasyonunun POY'da oksidatif stres hasarını teşvik edebileceğini düşündürmüştür. Literatür ve bu çalışmadan elde edilen bulgular MEL'in SIRT1 ve FOXO3a aktivasyonu ile POY'da ortaya çıkan oksidatif stres hasarını azaltabileceğini düşündürmüştür. POY+RES uygulanan grupta SIRT1 ve FOXO3a protein ekspresyonunda POY grubuna kıyasla anlamlı derece artış görüldü. Soliman ve arkadaşları Sprague-Dawley ratlarda RES tedavisi yoluyla SIRT1 ifadesini artırarak NF-κB kaynaklı enflamatuar sitokin üretiminin azaldığını ve over fonksiyonunun geri kazanıldığını belirtmişlerdir (132). Long ve arkadaşları, SIRT1'in FOXO3a'yı aktive ettiğini ve vahşi tip farelere kıyasla SIRT1 ekspresyon seviyesi artırılan farelerde daha fazla üreme kapasitesi görüldüğünü belirtmişlerdir (133). Zhao ve arkadaşları, domuz overlerinde foliküler atrezi sırasında SIRT1 ekspresyonunun granüloza hücre apoptozu ile birlikte dinamik değişiklikler gösterdiğini belirtmiş ve SIRT1'in overde granüloza hücre apoptozunun aracılık ettiği foliküler atrezi ile ilgili süreçlerin düzenlenmesinde rol oynayabileceğini düşündürmüştür (134). Nie ve arkadaşları, farelerde siklofosfamid ile indüklenen POY'a karşı, pro-apoptotik protein Bax'ın ekspresyonunu önemli ölçüde inhibe ederek ve SIRT1'in RES tarafından aktivasyonu yoluyla anti-apoptotik protein Bcl-xL'nin ekspresyonunu uyararak koruyabilmişlerdir (134). Han ve arkadaşları SIRT1'in ERK1/2 sinyal yolunu aktive ederek ve anti-inflamatuar işlevleri olan NF-B sinyal yolunu inhibe ederek granüloza hücrelerinde apoptoz direncini artırdığını bulmuşlardır (135). Sirotkin ve arkadaşları domuz over granüloza hücrelerinde de benzer sonuçlar bulmuştur; burada SIRT1'in over granüloza hücrelerinin apoptoz ve proliferasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörlerini düzenlediği gösterilmiştir (136). Ancak bu çalışmadan elde

edilen bulgularda POY+MEL veya POY+RES gruplarında POY grubuna kıyasla SIRT1 ve FOXO3a protein seviyesinde anlamlı artışa neden olurken, mRNA ekspresyonunda anlamlı farklılığa neden olmaması tek başına MEL veya RES tedavisinin yeterli olmayabileceğini düşündürdü. POY+MEL+RES uygulanan grupta ise SIRT1 protein ve mRNA ekspresyonu POY+MEL veya POY+RES gruplarından daha fazla görüldü. Benzer özellikleri göz önüne alındığında, literatürde MEL ve RES'in olası sinerjistik etkilerini analiz eden birkaç çalışma vardır. Kwon ve arkadaşları, MEL ve RES'in, enerjinin korunması ve nöronal hücre ölümünün önlenmesinde etkili olduğunu bildirmiştir. Bu çalışmada, MEL ve RES'in birlikte uygulanmasının, hipokampal nöron hücrelerinde amiloid kaynaklı sitotoksisiteye karşı nöroprotektif özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir. Ek olarak, MEL ve RES kombinasyonunun SIRT1 aktivitesi üzerinde sinerjistik bir etki göstermesi ve bu kombinasyon tedavisinin tek başına her bir ajandan daha nöroprotektif olabileceği görülmüştür (137). Li ve arkadaşları, insan monositlerinde SIRT aktivatörlerinin hem lipopolisakkarit kaynaklı tümör nekroz faktörü ile ilişkili apoptoz indükleyici ligand (TRAIL) artışını hem de Bcl-2 mRNA ve protein düşüşünü tamamen ortadan kaldırdığını ancak FOXO3 mRNA üzerinde hiçbir etkisi olmadığını belirtmiştir (138). Bu çalışmada da mRNA düzeyinde SİS+MEL+RES grubunda FOXO3a ekspresyonunda anlamlı farklılık görülmedi. Dolayısıyla SİS+MEL+RES grubunda daha fazla artış görülen SIRT1 ekspresyonunun artan FOXO3a protein ekspresyonu ile ilişkili olabileceği düşünüldü.

Bu çalışmada, SİS tarafından oluşturulan POY modelinde tüm overlerde POY oluşumunda rol oynadığı düşünülen FOXO3a/Bcl2 immünlokalizasyonu ve mRNA gen ifadesine bakılmıştır. Literatürde SIRT1'in mitokondriyal aktivitenin bir sonucu olarak üretilen reaktif oksijen türevi birikimini önlediğini ve metabolizma ile reaktif oksijen türevleri homeostazını kontrol eden sistemler arasındaki rol oynadığı vurgulanmıştır. FOXO'nun transkripsiyon sonrası düzenlemesi kapsamlı bir şekilde çalışılmış olmasına rağmen, transkripsiyonel düzenlemeleri hakkında çok az şey bilinmektedir (139). Nükleus-mitokondri arası iletişimde FOXO3a aktivitesi SIRT bağımlı deasetilasyon ile modüle edilir (7). SIRT1, granüloza hücrelerinde proliferasyon ve apoptozun düzenlenmesinde rol oynayan Bax ve Bcl-xL ekspresyonunu doğrudan ve diğer sinyal yolaklarına katılarak dolaylı olarak düzenleyebilir. Foliküler gelişim sırasında enerji kaynağı esas olarak granüloza

hücreleri tarafından sağlanır. Mitokondriyal solunumun yüksek yoğunluğu altında ortaya çıkan reaktif oksijen türevi metabolizmasındaki dengesizlik dolaylı olarak granüloza hücre apoptozuna yol açabilir. Bu nedenle, granüloza hücrelerinin over fonksiyonu ve foliküler gelişim süreçleri için gerekli olduğu ve SIRT1'in proliferasyon, apoptoz, luteinizasyon ve diğer biyolojik süreçlere katıldığı açıktır (8). Farelerde 3-nitropropiyonik asit ile oluşturulan POY modelinde SIRT1 inhibitörü verilen farelerde p53, Kaspaz 3 ve Bax ekspresyonunun arttığı ve Bcl2 ekspresyonunun ise azaldığı görülmüştür. RES ile tedavi uygulanan grupta ise p53, Kaspaz 3 ve Bax ekspresyonu azalırken ve Bcl2 ekspresyonunun arttığı görülmüştür. Bu sonuçlar, SIRT1'in mitokondri yapısını ve işlevini etkileyerek, foliküler apoptozu inhibe ettiğini ve böylelikle primordial folikül sayısını artırarak over rezervini artırabileceğini göstermiştir (9). Oksidatif stres uyaranlarına yanıt olarak FOXO asetilasyonu da FOXO'nun hücre içi lokalizasyonunu belirler. Asetilasyon, FOXO proteinlerinin çekirdek içinde belirli bölgelerde yerel konsantrasyonlarını artırarak FOXO aktivitesini düzenler (63). FOXO3a apoptozun önemli bir aracısıdır, ancak proapoptotik işlevini kontrol eden mekanizmalar tam olarak anlaşılamamıştır. Asetilasyon, FOXO3 odaklı apoptozu desteklemektedir. Aynı zamanda FOXO3a' nın JNK (c-Jun N-terminal kinaz) bağımlı fosforile formunun (p-FOXO3) spesifik olarak apoptotik olduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda, asetilasyonun FOXO3'ün apoptotik işlevinin düzenlenmesinde de bir rolü olduğunu bildirilmiştir. Bu nedenle SIRT ailesi deasetilazlarının neden olduğu deasetilasyonun FOXO3'ün apoptotik işlevinin aksine antioksidanı desteklediği öne sürülmüştür. Bu çalışmadan elde edilen verilerde POY grubunda SIRT1, FOXO3a ve Bcl-2 protein ve mRNA ekspresyonunda KONT grubuna kıyasla anlamlı azalma görüldü. Bu sonuçlar SIRT1 ekspresyonundaki azalışın FOXO3a aracılığı ile Bcl2 ekspresyonunu azalttabileceğini düşündürdü. Aynı zamanda bu sonuçlar sitoplazmada bulunan SIRT1 ekspresyonunun mitokondri'de lokalize olan Bcl2 ekspresyonunu dolaylı olarak etkileyebildiğini gösterdi. SIRT ailesinin birden fazla üyesinin FOXO3'ün deasetilasyonu yoluyla FOXO3'e bağlı apoptozu kontrol ettiği bildirilmiştir (140) SIRT1'in ekspresyonu veya aktivasyonu, FOXO3'ün antioksidan fenotipini desteklemiştir; bu da asetillenmiş FOXO3'ün daha apoptotik, deasetillenmiş FOXO3'ün ise daha antioksidan olduğunu göstermiştir. FOXO3a deasetilasyonunun, pro-apoptotik genleri inhibe ederek ve eş zamanlı olarak hücre döngüsü durması, DNA onarımı ve antioksidan aktivitede yer

alan FOXO3a hedefleri olan GADD45, MnSOD ve p27'nin ekspresyonunu artırarak hücreye bağlı sitoprotektif bir etki gösterdiği belirtilmiştir (7) Bu çalışmada MEL ve RES'in birlikte uygulandığı kombine tedavi grubunda protein seviyesinde pH2Ax, SIRT1, FOXO3a, Bcl2 ve mRNA seviyesinde SIRT1, Bcl2 ekspresyonu POY grubuna kıyasla anlamlı bulundu. MEL ve RES kombine tedavisinin POY oluşturulan ratlarda SIRT1 ve Bcl-2 mRNA ve protein düşüşünü tamamen ortadan kaldırdığı ancak FOXO3a mRNA üzerinde etkisi olmadığı görüldü. Tekli tedavilerin uygulandığı POY+MEL ve POY+RES grubunda ise pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 protein ve mRNA ekspresyonunda anlamlı farklılık görülmedi. POY+MEL ve POY+RES grupları POY+MEL+RES grubu ile karşılaştırıldığında protein seviyesinde farklılık pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 ekspresyonunda görülürken; mRNA seviyesinde farklılık yalnızca SIRT1 ekspresyonunda görüldü. Tipik olarak SIRT1, asetilenmiş FOXO3a'yı deasetilleyerek hücresel fonksiyonları düzenleyebilir. Dolayısıyla POY+MEL+RES grubunda artan SIRT1 ekspresyonunun FOXO3a deasetilasyonunu sağlayarak Bcl2 mRNA ve protein ekspresyonunu artırabileceği ve hücrenin apoptozun engelleyebileceği düşünüldü. Bu sonuçlar deasetillenmiş FOXO3'ün daha antioksidan özellikte olduğunu ortaya koyan çalışmalar ile desteklenebilir (138). Bu sonuç ayrıca POY oluşturulan ratlarda MEL+RES tedavisinin overde hücre apoptozunu dolaylı olarak kontrol edebileceğini gösterdi. Literatürde yapılan çalışmalarda, MEL+RES kombinasyon tedavisinin domuz oositlerinin in vitro maturasyonu ve iyi kalitede embriyo oluşumu üzerinde sinerjik etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. MEL+RES uygulamasının embriyo gelişimi ve anti-apoptoz (Bcl-2) ile ilgili gen ekspresyonlarını önemli ölçüde artırdığı belirtilmiştir. Diğer bir yandan FOXO3a'nın over hücrelerinde apoptozu indüklediğini öne süren çalışmalar da bulunmaktadır. Over granüloza hücreleri üzerinde yapılan araştırmalarda, FOXO3'ün yokluğunda proapoptotik faktörler BNIP3 (BCL2 Interacting Protein 3) ve BCL2L11'in (BCL2 Like 11) mRNA seviyelerinin yanı sıra poli [ADP-riboz] polimeraz 1 (PARP-1) ve bölünmüş kaspaz3 protein seviyelerinin azaldığı gösterilmiştir. Ayrıca FOXO3 proteini ile tedaviden sonra, BNIP3 ve BCL2L11'in mRNA seviyelerinin yanı sıra PARP-1 ve kaspaz3'ün protein seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (142). Liu ve arkadaşları, FOXO3a'nın yenidoğan rat overlerinde oosit apopitozisine rol oynadığını ve proapoptotik faktörlerin ekspresyonunu düzenleyerek primordiyal folikül oluşumuna ve oosit apoptoza aracılık ettiğini öne sürmüştür (143). İnsan over

granuloza benzeri tümör hücrelerinde (KGN) yapılan deneyler, proapoptotik faktörler FASLG (Fas Ligand) ve BCL2L11'in ekspresyonunun arttığı ve FOXO3 ekspresyon vektörlerinin transfeksiyonu ile hücre ölümünün indüklendiği bildirilmiştir (142). Literatürde ve bu çalışmada elde edilen bazı çelişkili sonuçlar insan ve kemirgenler arasındaki farklılıklara, dozaja ve uygulama stratejisine bağlanabilir. Rat overleri daha yüksek konsantrasyonda GnRH reseptörüne sahiptir ve hipofiz-over duyarsızlaştırması hızlı bir şekilde tamamlanabilir; bu nedenle, ratlar tedaviye insanlara kıyasla farklı bir yanıt gösterebilir (99). Bulgular arasındaki tutarsızlığın bir başka açıklaması da primordial foliküllerin aktivasyonunu kontrol eden sinyal yolaklarının karmaşıklığı ve farklı moleküllerdeki genetik değişikliklerin aynı POY fenotipine yol açması olabilir. Literatür ve bu çalışmadan elde edilen verilere dayanarak POY+MEL+RES grubunda artan SIRT1 ekspresyonunun, pH2Ax/SIRT1 sinyalleşme yolu aracılığıyla ve hücre apoptozunu azaltmak için FOXO3a gibi yolak proteinlerinin regülasyonu yoluyla over dokusu işlevinin sürdürülmesinde ve over folikül rezervindeki azalışın, hücre apoptozunun (Bcl2) ve folikül atrezisinin engellenmesinde önemli bir rol oynayabileceği düşünüldü. Dolayısıyla MEL ve RES'in POY patogenezinde görülen over yaşlanmasını geciktirme sürecinde hücre yaşamı ve apoptoz ile ilişkili süreçlere katılarak over rezervinin korunmasını da dolaylı olarak düzenleyebileceği düşünüldü.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada SİS ile ratlarda POY oluşumu indüklendi. POY modeli oluşturulan bu ratlara antioksidan (MEL ve/veya RES) uygulaması yapıldı. Bu çalışmanın amacı, kombinasyon halinde MEL ve RES ile tedavinin, rat over fonksiyonu, fenotipi, östrojen hormon seviyesi üzerinde sinerjik etkiler sağlayıp sağlayamayacağının belirlenmesiydi. Bu nedenle POY modeli geliştirilen ratlarda MEL ve RES'in overdeki etkisi morfolojik, moleküler, biyokimyasal ve histolojik olarak incelendi. Histolojik incelemelerde over folikül rezervi ve morfolojisinin yanısıra overde foliküler hücre dejenerasyonu, vasküler konjesyon/hemoraji ve inflamasyon ve fibrosis histopatolojik olarak gözlendi. Aynı zamanda bu çalışmada SİS'e karşı kullanılabilecek fertoprotektanların, folikül hücrelerinde ölüm yolaklarını (pH2AX, SIRT1, FOXO3a, Bcl2) kontrol eden molekülleri hangi seviyede hedef İF ve/veya RT-PCR yöntemleri ile analiz edildi.

Bu çalışmanın bir diğer amacı literatürde oksidatif stres kaynaklı hücre hasarını azaltmak için sıkça kullanılan MEL ve RES'i histopatolojik olarak kıyaslamak ve birlikte kullanıldığında ortaya çıkan etkisini kıyaslamaktı. Çalışma sonucunda elde edilen veriler, her iki ajanın da (MEL ve/veya RES) ratlarda POY oluşumunda görülen patolojik bulguları önlediğini gösterdi. Ancak tekli ve kombine tedavi uygulanan gruplar arasında patolojik bulgular açısından fark görülmedi.

Bu çalışmanın bir diğer amacı da literatürde oksidatif stres kaynaklı hücre hasarını azaltmak için sıkça kullanılan MEL ve RES'in overdeki E2 hormonu üzerine etkisini kıyaslamaktı. Çalışma sonucunda elde edilen verilerde gruplar arasında serum E2 hormonunda herhangi bir farklılık görülmedi.

Çalışmamızdaki diğer bir amaç da POY oluşumunda etkili olduğu düşünülen pH2AX, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 ekspresyonlarının protein ve mRNA düzeyinde analiz edilmesiydi. Bu çalışmadan elde edilen verilerde MEL ve RES'in birlikte uygulandığı kombine tedavi grubunda protein seviyesinde pH2Ax, SIRT1, FOXO3a, Bcl2 ve mRNA seviyesinde SIRT1 ve Bcl2 ekspresyonu POY grubuna kıyasla anlamlı bulundu. MEL ve RES kombine tedavisinin POY oluşturulan ratlarda SIRT1 ve Bcl-2 mRNA ve protein düşüşünü tamamen ortadan kaldırdığı ancak FOXO3a mRNA

ekspresyonu üzerinde etkisi olmadığı görüldü. Tekli tedavilerin uygulandığı POY+MEL ve POY+RES grubunda ise pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 protein ve mRNA ekspresyonunda anlamlı farklılık görülmedi. POY+MEL ve POY+RES grupları POY+MEL+RES grubu ile karşılaştırıldığında protein seviyesinde farklılık pH2Ax, SIRT1, FOXO3a ve Bcl2 ekspresyonunda görülürken; mRNA seviyesinde farklılık yalnızca SIRT1 ekspresyonunda görüldü. Dolayısıyla POY+MEL+RES grubunda artan SIRT1 ekspresyonunun, pH2Ax/SIRT1 sinyalleşme yolu aracılığıyla ve hücre apoptozunu azaltmak için FOXO3a gibi yolak proteinlerinin regülasyonu yoluyla over dokusu işlevinin sürdürülmesinde ve over folikül rezervindeki azalışın, hücre apoptozunun (Bcl2) ve folikül atrezisinin engellenmesinde önemli bir rol oynayabileceği düşünüldü. Yaptığımız çalışma sayesinde ilk defa POY'da MEL ve RES'in birlikte kullanımının SIRT1 ve FOXO3a protein ekspresyonunu arttırdığı (İF ile) gösterildi. Bu artışın da overde Bcl2'nin FOXO3a ile ilişkili olarak apoptozu ve folikül atrezisini baskılayabileceği kanaatine varıldı.

Böylece yapılacak sonraki çalışmalar sayesinde POY'da FOXO3a ve Bcl2 ile apoptoz ilişkisi daha kapsamlı gösterilerek hastalığın etiyolojisi ile ilgili mekanizmaların aydınlatılması önerilmektedir. POY'da MEL ve RES'in olası tekli ve sinerjik etkilerinin karşılaştırıldığı çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma sonucunda POY gelişen overlerde MEL'in, RES'in overdeki koruyucu etkisini artırdığı gözlendi. Yapılan literatür çalışmalarında overde önemli bir sinyal yolağı olan SIRT1/FOXO3a/Bcl2'nin sadece apoptoz ile değil aslında hücrelerin hayatta kalım ile ilgili süreçlerinde de etkili olduğu görüldü. Bu çalışmada da MEL'in SIRT1/FOXO3a/Bcl2 yolağı aracılığı ile önemli bir SIRT1 aktivatörü olan RES'in koruyucu etkisini artırabileceği gösterildi.

Ancak bu çalışmanın bazı sınırlamaları vardı. Literatür ve çalışmamızdan elde edilen bulgular karşılaştırıldığında ortaya çıkan bazı tutarsız veriler uygulanan yöntemlerin kısıtlılığıyla açıklanabilir. Bu çalışmada gen ifadesi mRNA ifadesi düzeyinde araştırıldı. Bu çalışmada Western blot analizi tekniği deney gruplarındaki protein ekspresyonuna ilişkin ek veriler sağlayabilirdi. Ayrıca, ek bir düzenleme yolu olarak protein döngüsü hakkında da bilgi sunabilirdi. Protein düzenleme sürecinin karmaşıklığı ve çok sayıda post-translasyonel modifikasyon göz önünde bulundurulduğunda, mRNA ekspresyon düzeyindeki farklılıklar protein düzeyine

yansımayabilir, bu konunun da ilerleyen çalışmalarda araştırılması gereken bir korelasyon olduğu düşünüldü. Ayrıca deneyde kullanılan ratların tümü histolojik ve moleküler analiz için sakrifiye edildiğinden gebelik oranı incelenemedi.

Overde bulunan hücreler mitokondride üretilen reaktif oksijen türevi konsantrasyonunu algılayarak, stres koşulları sırasında hücresel homeostazın korunmasında rol oynayan genler olan vitagenleri de içeren çok çeşitli sinyal yolları boyunca bilgi akışını koordine ederek yaşam süresini düzenler. Literatürde, diyet antioksidanlarının SIRT1 gen ifadesini artırarak hücreleri koruyucu etkisi olduğu belirtilmiştir. Dolayısıyla MEL ve RES, hücrelerde biyolojik işlevlerin korunması ve böylece yaşa bağlı veya SİS gibi kemoterapi kaynaklı POY riskini geciktirmek veya azaltmak için umut verici bir terapötik strateji sağlayabilir. Bu doğrultuda, ilerleyen çalışmalarda, özellikle gıdalarda veya besin takviyelerinde bulunan antioksidanların yaşlanma süreçleri ve yüksek reaktif oksijen türevi seviyelerine karşı olası faydalı etkilerinin tanımlaması önemlidir (141).

Bu kısıtlamalara rağmen, bulgularımız yenidir ve bu nedenle, özellikle literatürde MEL+RES ile tedavi edilen POY overlerinde benzer çalışmaların eksikliği göz önüne alındığında, rat over dokusu kullanan literatürdeki az sayıdaki çalışmadan biridir. Bu çalışmada SIRT1, FOXO3a, Bcl2'nin mRNA ekspresyonunda ve immün lokalizasyonlarında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar ortaya konuldu. Bu değişiklikler, primordial ve büyüyen foliküllerdeki hasarı gösterdiği gibi, POY over dokusundaki değişmiş foliküler içeriği yansıtmaktadır.

Son olarak, bazı Akdeniz beslenme biçiminde MEL ve RES'in bulunması, Akdeniz diyetinin potansiyel sağlık faydalarını ortaya koyan hipotezlere yeni bir bakış açısı getirmektedir. MEL ve RES; üzüm çekirdeği ekstresi ve Akdeniz diyetinin diğer bileşenlerinde bulunmaktadır. MEL ve RES içeren Akdeniz diyeti sadece tek bir bileşik içeren diyetlere kıyasla sinerjik etkilere sahip olabilir. MEL ve RES'in olası sinerjik etkisinin altında yatan kesin mekanizmaların belirlenmesi için daha fazla araştırma gereklidir. Ayrıca, kombine MEL+RES tedavileri ile kanser, kardiyovasküler ve nörodejeneratif hastalık riskini azaltmak için ve klinik etkinliği tanımlamak için ek çalışmalar gereklidir.

KAYNAKLAR

1. Dasari, S., Bernard Tchounwou, P. (2014). Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. In *European Journal of Pharmacology* (Vol. 740).
2. Jang, H., Lee, O. H., Lee, Y., Yoon, H., Chang, E. M., Park, M., Lee, J. W., Hong, K., Kim, J. O., Kim, N. K., Ko, J. J., Lee, D. R., Yoon, T. K., Lee, W. S., & Choi, Y. (2016). Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. *Journal of Pineal Research*, *60*,3.
3. Yan, J., Deng, D., Wu, Y., Wu, K., Qu, J., & Li, F. (2020). Catalpol protects rat ovarian granulosa cells against oxidative stress and apoptosis through modulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Bioscience Reports*, *40*,4.
4. Alam, F., Syed, H., Amjad, S., Baig, M., Khan, T. A., & Rehman, R. (2021). Interplay between oxidative stress, SIRT1, reproductive and metabolic functions. *Current Research in Physiology*, *4*.
5. Wang, D., Wang, T., Wang, R., Zhang, X., Wang, L., Xiang, Z., Zhuang, L., Shen, S., Wang, H., Gao, Q., & Wang, Y. (2020). Suppression of p66Shc prevents hyperandrogenism-induced ovarian oxidative stress and fibrosis. *Journal of Translational Medicine*, *18*,1.
6. Zhang, H., Lin, F., Zhao, J., & Wang, Z. (2020). Expression Regulation and Physiological Role of Transcription Factor FOXO3a During Ovarian Follicular Development. In *Frontiers in Physiology* (Vol. 11).
7. Fasano, C., Disciglio, V., Bertora, S., Signorile, M. L., & Simone, C. (2019). Foxo3a from the nucleus to the mitochondria: A round trip in cellular stress response. In *Cells* (Vol. 8, Issue 9).
8. Li, X., He, Y., Wu, S., Zhang, P., Gan, M., Chen, L., Zhao, Y., Niu, L., Zhang, S., Jiang, Y., Guo, Z., Wang, J., Shen, L., & Zhu, L. (2023). Regulation of SIRT1 in Ovarian Function: PCOS Treatment. *Current Issues in Molecular Biology*, *45*,3.
9. Guo, L., Liu, X., Chen, H., Wang, W., Gu, C., & Li, B. (2022). Decrease in ovarian reserve through the inhibition of SIRT1-mediated oxidative phosphorylation. *Aging*, *14*,5.
10. Pariente, R., Pariente, J. A., Rodríguez, A. B., & Espino, J. (2016). Melatonin sensitizes human cervical cancer HeLa cells to cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis: Effects on oxidative stress and DNA fragmentation. *Journal of Pineal Research*, *60*,1.
11. Ateşşahin, A., Şanna, E., Türk, G., Çeribaşi, A. O., Yilmaz, S., Yüce, A., & Bulmuş, Ö. (2006). Chemoprotective effect of melatonin against cisplatin-induced testicular toxicity in rats. *Journal of Pineal Research*, *41*,1.
12. Jang, H., Na, Y., Hong, K., Lee, S., Moon, S., Cho, M., Park, M., Lee, O. H., Chang, E. M., Lee, D. R., Ko, J. J., Lee, W. S., & Choi, Y. (2017). Synergistic effect of melatonin and ghrelin in preventing cisplatin-induced ovarian damage via regulation of FOXO3a phosphorylation and binding to the p27Kip1 promoter in primordial follicles. *Journal of Pineal Research*, *63*,3.
13. Shi, J. M., Tian, X. Z., Zhou, G. bin, Wang, L., Gao, C., Zhu, S. E., Zeng, S. M., Tian, J. H., & Liu, G. S. (2009). Melatonin exists in porcine follicular fluid and improves in vitro maturation and parthenogenetic development of porcine oocytes. *Journal of Pineal Research*, *47*,4.
14. Chen, C., Jiang, X., Lai, Y., Liu, Y., & Zhang, Z. (2015). Resveratrol protects against arsenic trioxide-induced oxidative damage through maintenance of glutathione homeostasis and inhibition of apoptotic progression. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, *56*,3.
15. Kwon, K. J., Kim, J. N., Kim, M. K., Lee, J., Ignarro, L. J., Kim, H. J., Shin, C. Y., & Han, S. H. (2011). Melatonin synergistically increases resveratrol-induced heme oxygenase-1 expression through the inhibition of ubiquitin-dependent proteasome pathway: A possible role in neuroprotection. *Journal of Pineal Research*, *50*,2.
16.Tajes, M., Gutierrez-Cuesta, J., Ortuño-Sahagun, D., Camins, A., & Pallàs, M. (2009). Anti-aging properties of melatonin in an in vitro murine senescence model: Involvement of the sirtuin 1 pathway. *Journal of Pineal Research*, *47*,3.
17. Tao, X. Y., Zuo, A. Z., Wang, J. Q., & Tao, F. B. (2016). Effect of primary ovarian insufficiency and early natural menopause on mortality: A meta-analysis. In *Climacteric* (Vol. 19, Issue 1).
18. Colvin, C. W., & Abdullatif, H. (2013). Anatomy of female puberty: The clinical relevance of developmental changes in the reproductive system. In *Clinical Anatomy* (Vol. 26, Issue 1).
19. Eroschenko, V. P. (2005). diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. In *Library of Congress Cataloging-in-Publication Data*.

20. Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2014). Color Atlas and Text of Histology-sixth editon. In *Lippinot Williams and Wilkins*.
21. Michael H.Ross, P. (deceased), & Wojciech Pawlina. (2014). HISTOLOGY A TEXT AND ATLAS with Correlated Cell and Molecular Biology. In *Psychological Science* (Vol. 25, Issue 9).
22. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and Sterility*, *108*,3.
23. Zhao, Y. X., Chen, S. R., Su, P. P., Huang, F. H., Shi, Y. C., Shi, Q. Y., & Lin, S. (2019). Using Mesenchymal Stem Cells to Treat Female Infertility: An Update on Female Reproductive Diseases. In *Stem Cells International* (Vol. 2019).
24. Jankowska, K. (2017). Premature ovarian failure. In *Przeglad Menopauzalny* (Vol. 16, Issue 2).
25. Ebrahimi, M., & Asbagh, F. A. (2011). Pathogenesis and causes of premature ovarian failure: An update. *International Journal of Fertility and Sterility*, *5*,2.
26. Chon, S. J., Umair, Z., & Yoon, M. S. (2021). Premature Ovarian Insufficiency: Past, Present, and Future. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9).
27. Massin, N., Gougeon, A., Meduri, G., Thibaud, E., Laborde, K., Matuchansky, C., Constancis, E., Vacher-Lavenu, M. C., Paniel, B., Zorn, J. R., Misrahi, M., Kuttenn, F., & Touraine, P. (2004). Significance of ovarian histology in the management of patients presenting a premature ovarian failure. *Human Reproduction*, *19*,11.
28. Fraison, E., Crawford, G., Casper, G., Harris, V., & Ledger, W. (2019). Pregnancy following diagnosis of premature ovarian insufficiency: a systematic review. In *Reproductive BioMedicine Online* (Vol. 39, Issue 3).
29. Rudnicka, E., Kruszewska, J., Klicka, K., Kowalczyk, J., Grymowicz, M., Skórska, J., Pięta, W., & Smolarczyk, R. (2018). Premature ovarian insufficiency - aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation. In *Przeglad Menopauzalny* (Vol. 17, Issue 3).
30. Wesevich, V., Kellen, A. N., & Pal, L. (2020). Recent advances in understanding primary ovarian insufficiency. In *F1000Research* (Vol. 9).
31. Dawood, A. S., El-Sharawy, M. A., Nada, D. W., & El-Sheikh, M. F. (2018). Premature ovarian failure of autoimmune etiology in 46XX patients: Is there a hope? *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, *15*,4.
32. Chapman, C., Cree, L., & Shelling, A. N. (2015). The genetics of premature ovarian failure: Current perspectives. In *International Journal of Women's Health* (Vol. 7).
33. Park, M., Suh, D. S., Lee, K., & Bae, J. (2014). Positive cross talk between FOXL2 and antimüllerian hormone regulates ovarian reserve. *Fertility and Sterility*, *102*,3.
34. Simpson, J. L. (2008). Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: Overview of selected candidate genes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1135*.
35. Ahn, H. W., Morin, R. D., Zhao, H., Harris, R. A., Coarfa, C., Chen, Z. J., Milosavljevic, A., Marra, M. A., & Rajkovic, A. (2010). MicroRNA transcriptome in the newborn mouse ovaries determined by massive parallel sequencing. *Molecular Human Reproduction*, *16*,7.
36. Veiga-Lopez, A., Luense, L. J., Christenson, L. K., & Padmanabhan, V. (2013). Developmental programming: Gestational bisphenol-A treatment alters trajectory of fetal ovarian gene expression. *Endocrinology*, *154*,5.
37. Wang, X., Zhang, X., Dang, Y., Li, D., Lu, G., Chan, W. Y., Leung, P. C. K., Zhao, S., Qin, Y., & Chen, Z. J. (2020). Long noncoding RNA HCP5 participates in premature ovarian insufficiency by transcriptionally regulating MSH5 and DNA damage repair via YB1. *Nucleic Acids Research*, *48*,8.
38. Kirshenbaum, M., & Orvieto, R. (2019). Premature ovarian insufficiency (POI) and autoimmunity-an update appraisal. In *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* (Vol. 36, Issue 11).
39. Fridovich-Keil, J. L., Gubbels, C. S., Spencer, J. B., Sanders, R. D., Land, J. A., & Rubio-Gozalbo, E. (2011). Ovarian function in girls and women with GALT-deficiency galactosemia. In *Journal of Inherited Metabolic Disease* (Vol. 34, Issue 2).
40. Budani, M. C., & Tiboni, G. M. (2017). Ovotoxicity of cigarette smoke: A systematic review of the literature. In *Reproductive Toxicology* (Vol. 72).
41. Meirow, D., & Nugent, D. (2001). The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Human Reproduction Update*, *7*,6.
42. He, L., Long, X., Yu, N., Li, Y., Liu, X., & Cheng, X. (2021). Premature Ovarian Insufficiency (POI) Induced by Dynamic Intensity Modulated Radiation Therapy via P13K-AKT-FOXO3a in Rat Models. *BioMed Research International*, *2021*.

43. Bath, L. E., Wallace, W. H. B., Shaw, M. P., Fitzpatrick, C., & Anderson, R. A. (2003). Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: Detection by anti-Müllerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Human Reproduction*, *18*,11.
44. Spears, N., Lopes, F., Stefansdottir, A., Rossi, V., De Felici, M., Anderson, R. A., & Klinger, F. G. (2019). Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Human Reproduction Update*, *25*(6).
45. Ozcelik, B., Turkyilmaz, C., Ozgun, M. T., Serin, I. S., Batukan, C., Ozdamar, S., & Ozturk, A. (2010). Prevention of paclitaxel and cisplatin induced ovarian damage in rats by a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Fertility and Sterility*, *93*,5.
46. Siddik, Z. H. (2003). Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. In *Oncogene* (Vol. 22, Issue 47 REV. ISS. 6).
47. Chovanec, M., Abu Zaid, M., Hanna, N., El-Kouri, N., Einhorn, L. H., & Albany, C. (2017). Long-term toxicity of cisplatin in germ-cell tumor survivors. In *Annals of Oncology* (Vol. 28, Issue 11).
48. Qi, L., Luo, Q., Zhang, Y., Jia, F., Zhao, Y., & Wang, F. (2019). Advances in Toxicological Research of the Anticancer Drug Cisplatin. In *Chemical Research in Toxicology* (Vol. 32, Issue 8).
49. Yuksel, A., Bildik, G., Senbabaoglu, F., Akin, N., Arvas, M., Unal, F., Kilic, Y., Karanfil, I., Erylmaz, B., Yilmaz, P., Ozkanbas, C., Taskiran, C., Aksoy, S., Guzel, Y., Balaban, B., Ince, U., Iwase, A., Urman, B., & Oktem, O. (2015). The magnitude of gonadotoxicity of chemotherapy drugs on ovarian follicles and granulosa cells varies depenDing upon the category of the drugs and the type of granulosa cells. *Human Reproduction*, *30*,12.
50. Nguyen, Q. N., Zerafa, N., Liew, S. H., Morgan, F. H., Strasser, A., Scott, C. L., Findlay, J. K., Hickey, M., & Hutt, K. J. (2018). Loss of PUMA protects the ovarian reserve during DNA-damaging chemotherapy and preserves fertility. *Cell Death and Disease*, *9*(6).
51. Chang, E. M., Lim, E., Yoon, S., Jeong, K., Bae, S., Lee, D. R., Yoon, T. K., Choi, Y., & Lee, W. (2015). Cisplatin induces overactivation of the dormant primordial follicle through PTEN/AKT/FOXO3α pathway which leads to loss of ovarian reserve in mice. *PLoS ONE*, *10*,12.
52. Li, F., Turan, V., Lierman, S., Cuvelier, C., De Sutter, P., & Oktay, K. (2014). Sphingosine-1-phosphate prevents chemotherapy-induced human primordial follicle death. *Human Reproduction*, *29*,1.
53. Goldman, K. N., Chenette, D., Arju, R., Duncan, F. E., Keefe, D. L., Grifo, J. A., & Schneider, R. J. (2017). MTORC1/2 inhibition preserves ovarian function and fertility during genotoxic chemotherapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(12). https://doi.org/10.1073/pnas.1617233114
54. Oktem, O., & Oktay, K. (2007). A novel ovarian xenografting model to characterize the impact of chemotherapy agents on human primordial follicle reserve. *Cancer Research*, *67*,21.
55. Durlinger, A. L. L., Kramer, P., Karels, B., Grootegoed, J. A., Uilenbroek, J. T. J., & Themmen, A. P. N. (2000). Apoptotic and proliferative changes during induced atresia of pre-ovulatory follicles in the rat. *Human Reproduction*, *15*,12.
56. Cai, L., Zong, D., Tong, G., & Li, L. (2021). Apoptotic mechanism of premature ovarian failure and rescue effect of Traditional Chinese Medicine: a review. In *Journal of Traditional Chinese Medicine* (Vol. 41, Issue 3).
57. Grabowska, W., Sikora, E., & Bielak-Zmijewska, A. (2017). Sirtuins, a promising target in slowing down the ageing process. In *Biogerontology* (Vol. 18, Issue 4).
58. Tatone, C., di Emidio, G., Barbonetti, A., Carta, G., Luciano, A. M., Falone, S., & Amicarelli, F. (2018). Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: Emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. *Human Reproduction Update*, *24*,3.
59. Zhou, X. L., Xu, J. J., Ni, Y. H., Chen, X. C., Zhang, H. X., Zhang, X. M., Liu, W. J., Luo, L. L., & Fu, Y. C. (2014). SIRT1 activator (SRT1720) improves the follicle reserve and prolongs the ovarian lifespan of diet-induced obesity in female mice via activating SIRT1 and suppressing mTOR signaling. *Journal of Ovarian Research*, *7*,1.
60. Morris, B. J. (2005). A forkhead in the road to longevity: The molecular basis of lifespan becomes clearer. In *Journal of Hypertension* (Vol. 23, Issue 7).
61. Morris, B. J. (2013). Seven sirtuins for seven deadly diseases ofaging. In *Free Radical Biology and Medicine* (Vol. 56).
62. Zhang, T., Zhou, Y., Li, L., Wang, H. H., Ma, X. S., Qian, W. P., Shen, W., Schatten, H., & Sun, Q. Y. (2016). SIRT1, 2, 3 protect mouse oocytes from postovulatory aging. *Aging*, *8*(4). https://doi.org/10.18632/aging.100911
63. Calnan, D. R., & Brunet, A. (2008). The FoxO code. In *Oncogene* (Vol. 27, Issue 16).
64. Na, J., & Kim, G. J. (2020). Recent trends in stem cell therapy for premature ovarian insufficiency and its therapeutic potential: a review. In *Journal of Ovarian Research* (Vol. 13, Issue 1).

65. Li, J., Mao, Q. X., He, J. J., She, H. Q., Zhang, Z., & Yin, C. Y. (2017). Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem Cell Research and Therapy*, *8*,1.
66. Dang, J., Jin, Z., Liu, X., Hu, D., & Wang, Z. (2015). Human cord blood mononuclear cell transplantation for the treatment of premature ovarian failure in nude mice. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *8*,3.
67. Hewlett, M., & Mahalingaiah, S. (2015). Update on primary ovarian insufficiency. In *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* (Vol. 22, Issue 6).
68. Qin, J. C., Fan, L., & Qin, A. P. (2017). The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on women with diminished ovarian reserve (DOR) in IVF cycle: Evidence from a meta-analysis. In *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction* (Vol. 46, Issue 1).
69. Sheikhansari, G., Aghebati-Maleki, L., Nouri, M., Jadidi-Niaragh, F., & Yousefi, M. (2018). Current approaches for the treatment of premature ovarian failure with stem cell therapy. In *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 102).
70. Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. In *International Journal of Biomedical Science* (Vol. 4, Issue 2).
71. Lim, E. J., & Choi, Y. (2012). Transcription factors in the maintenance and survival of primordial follicles. In *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* (Vol. 39, Issue 4).
72. Tamura, H., Takasaki, A., Miwa, I., Taniguchi, K., Maekawa, R., Asada, H., Taketani, T., Matsuoka, A., Yamagata, Y., Shimamura, K., Morioka, H., Ishikawa, H., Reiter, R. J., & Sugino, N. (2008). Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. *Journal of Pineal Research*, *44*,3.
73. Tamura, H., Nakamura, Y., Korkmaz, A., Manchester, L. C., Tan, D. X., Sugino, N., & Reiter, R. J. (2009). Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertility and Sterility*, *92*,1.
74. Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Aasada, H., Yamagata, Y., & Sugino, N. (2012). The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *Journal of Ovarian Research*, *5*,1.
75. Jang, H., Hong, K., & Choi, Y. (2017). Melatonin and fertoprotective adjuvants: Prevention against premature ovarian failure during chemotherapy. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 18, Issue 6).
76. Salehi, B., Mishra, A. P., Nigam, M., Sener, B., Kilic, M., Sharifi-Rad, M., Fokou, P. V. T., Martins, N., & Sharifi-Rad, J. (2018). Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. In *Biomedicines* (Vol. 6, Issue 3).
77. Jiang, Y., Zhang, Z., Cha, L., Li, L., Zhu, D., Fang, Z., He, Z., Huang, J., & Pan, Z. (2019). Resveratrol plays a protective role against premature ovarian failure and prompts female germline stem cell survival. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*,14.
78. Means, J. C., Gerdes, B. C., & Koulen, P. (2017). Distinct mechanisms underlying resveratrol-mediated protection from types of cellular stress in C6 glioma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(7).
79. Ebrahimi, M., & Asbagh, F. A. (2015). The role of autoimmunity in premature ovarian failure. In *Iranian Journal of Reproductive Medicine* (Vol. 13, Issue 8).
80. Chinwe, G. S., Azuka, O. I., & Adaeze, N. C. (2018). Resveratrol supplementation rescues pool of growing follicles and ovarian stroma from Cisplatin-induced toxicity on the ovary in Sprague-Dawley rats: An experimental study. *International Journal of Reproductive BioMedicine*, *16*,1.
81. Li, N., & Liu, L. (2018). Mechanism of resveratrol in improving ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *44*,8.
82. Özcan, P., Fiçicioılu, C., Yildirim, Ö. K., Özkan, F., Akkaya, H., & Aslan, I. (2015). Protective effect of resveratrol against oxidative damage to ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats. *Reproductive BioMedicine Online*, *31*,3.
83. Liu, J., Zhang, H., Zhang, Y., Li, N., Wen, Y., Cao, F., Ai, H., & Xue, X. (2015). Homing and Restorative Effects of Bone Marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Molecules and Cells*, *37*,12.
84. Eldani, M., Luan, Y., Xu, P. C., Bargar, T., & Kim, S. Y. (2020). Continuous treatment with cisplatin induces the oocyte death of primordial follicles without activation. *FASEB Journal*, *34*,10.
85. Said, R. S., Mantawy, E. M., & El-Demerdash, E. (2019). Mechanistic perspective of protective effects of resveratrol against cisplatin-induced ovarian injury in rats: emphasis on anti-inflammatory and anti-apoptotic effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *392*,10.

86. Perše, M. (2021). Cisplatin mouse models: Treatment, toxicity and translatability. In *Biomedicines* (Vol. 9, Issue 10).
87. Abo El-Noor, M., Elgazzar, F., Alshenawy, H., Soliman, W., & Shalaby, N. (2017). The Potential Impact of Magnesium Supplementation on Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in Adult Male Albino Rats. *Ain Shams Journal of Forensic Medicine and Clinical Toxicology*, *28*,1.
88. Barberino, R. S., Menezes, V. G., Ribeiro, A. E. A. S., Palheta, R. C., Jiang, X., Smitz, J. E. J., & Matos, M. H. T. (2017). Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. *Biology of Reproduction*, *96*,6.
89. Gebauer, J., Higham, C., Langer, T., Denzer, C., & Brabant, G. (2018). Long-Term Endocrine and Metabolic Consequences of Cancer Treatment: A Systematic Review. In *Endocrine Reviews* (Vol. 40, Issue 3).
90. Chemaitilly, W., & Sklar, C. A. (2019). Childhood Cancer Treatments and Associated Endocrine Late Effects: A Concise Guide for the Pediatric Endocrinologist. In *Hormone Research in Paediatrics* (Vol. 91, Issue 2).
91. Kim, S. Y., Cho, G. J., & Davis, J. S. (2019). Consequences of chemotherapeutic agents on primordial follicles and future clinical applications. In *Obstetrics and Gynecology Science* (Vol. 62, Issue 6).
92. Carlsson, I. B., Scott, J. E., Visser, J. A., Ritvos, O., Themmen, A. P. N., & Hovatta, O. (2006). Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of growth of human primordial ovarian follicles in vitro. *Human Reproduction*, *21*,9.
93. Nguyen, Q. N., Zerafa, N., Liew, S. H., Findlay, J. K., Hickey, M., & Hutt, K. J. (2019). Cisplatin- and cyclophosphamide-induced primordial follicle depletion is caused by direct damage to oocytes. *Molecular Human Reproduction*, *25*,8.
94. Kerr, J. B., Hutt, K. J., Michalak, E. M., Cook, M., Vandenberg, C. J., Liew, S. H., Bouillet, P., Mills, A., Scott, C. L., Findlay, J. K., & Strasser, A. (2012). DNA Damage-Induced Primordial Follicle Oocyte Apoptosis and Loss of Fertility Require TAp63-Mediated Induction of Puma and Noxa. *Molecular Cell*, *48*,3.
95. Li, D., Chen, Y., Qi, L., Ju, X., Liu, H., & Wang, G. (2013). Differentially expressed genes in cisplatin-induced premature ovarian failure in rats. *Animal Reproduction Science*, *137*,3–4.
96. Zhu, L., Li, J., Xing, N., Han, D., Kuang, H., & Ge, P. (2015). American ginseng regulates gene expression to protect against premature ovarian failure in rats. *BioMed Research International*, *2015*.
97. Li, S., Liu, M., Ma, H., Jin, Q., Ma, Y., Wang, C., Ren, J., Liu, G., & Dai, Y. (2021). Ameliorative effect of recombinant human lactoferrin on the premature ovarian failure in rats after cyclophosphamide treatments. *Journal of Ovarian Research*, *14*,1.
98. Al-Shahat, A., Hulail, M. A. E., Soliman, N. M. M., Khamis, T., Fericean, L. M., Arisha, A. H., & Moawad, R. S. (2022). Melatonin Mitigates Cisplatin-Induced Ovarian Dysfunction via Altering Steroidogenesis, Inflammation, Apoptosis, Oxidative Stress, and PTEN/PI3K/Akt/mTOR/AMPK Signaling Pathway in Female Rats. *Pharmaceutics*, *14*,12.
99. Li, X., Kang, X., Deng, Q., Cai, J., & Wang, Z. (2013). Combination of a GnRH agonist with an antagonist prevents flare-up effects and protects primordial ovarian follicles in the rat ovary from cisplatin-induced toxicity: A controlled experimental animal study. *Reproductive Biology and Endocrinology*, *11*,1.
100. Zheng, W., Zhang, H., Gorre, N., Risal, S., Shen, Y., & Liu, K. (2014). Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Human Molecular Genetics*, *23*,4.
101. Taskin, M. I., Yay, A., Adali, E., Balcioglu, E., & Inceboz, U. (2015). Protective effects of sildenafil citrate administration on cisplatin-induced ovarian damage in rats. *Gynecological Endocrinology*, *31*,4.
102. Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., & Tilly, J. L. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, *428*,6979.
103. Sakin, O., Angin, A. D., Oruç, M. A., Akalin, E. E., Cikman, M. S., Basak, K., Alan, Y., Kaptanagasi, A. O., Alan, M., & Oktem, A. (2021). Evaluation of protective effects of mirtazapine and mesna on cisplatin-induced ovarian damage in rats. *Journal of Experimental and Clinical Medicine (Turkey)*, *38*,2.
104. Zhang, X., Han, T., Yan, L., Jiao, X., Qin, Y., & Chen, Z. J. (2019). Resumption of Ovarian Function After Ovarian Biopsy/Scratch in Patients With Premature Ovarian Insufficiency. *Reproductive Sciences*, *26*,2.
105. Zhang, T., Yan, D., Yang, Y., Ma, A., Li, L., Wang, Z., Pan, Q., & Sun, Z. (2016). The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *81*.
106. Xu, H., Bao, X., Kong, H., Yang, J., Li, Y., & Sun, Z. (2022). Melatonin Protects Against Cyclophosphamide-induced Premature Ovarian Failure in Rats. *Human and Experimental Toxicology*, *41*.
107. Cardinali, D. P. (2021). Melatonin and healthy aging. In *Vitamins and Hormones* (Vol. 115).

108. Melekoglu, R., Ciftci, O., Eraslan, S., Cetin, A., & Basak, N. (2018). Beneficial effects of curcumin and capsaicin on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a rat model. *Journal of Ovarian Research*, *11*,1.
109. Zhou, F., Shi, L. B., & Zhang, S. Y. (2017). Ovarian fibrosis: A phenomenon of concern. In *Chinese Medical Journal* (Vol. 130, Issue 3).
110. Bedoschi, G., Navarro, P. A., & Oktay, K. (2016). Chemotherapy-induced damage to ovary: Mechanisms and clinical impact. In *Future Oncology* (Vol. 12, Issue 19).
111. Ben-Aharon, I., Meizner, I., Granot, T., Uri, S., Hasky, N., Rizel, S., Yerushalmi, R., Sulkes, A., & Stemmer, S. M. (2012). Chemotherapy-Induced Ovarian Failure as a Prototype for Acute Vascular Toxicity. *The Oncologist*, *17*,11.
112. Meirow, D., Dor, J., Kaufman, B., Shrim, A., Rabinovici, J., Schiff, E., Raanani, H., Levron, J., & Fridman, E. (2007). Cortical fibrosis and blood-vessels damage in human ovaries exposed to chemotherapy. Potential mechanisms of ovarian injury. *Human Reproduction*, *22*,6.
113. McCloskey, C. W., Cook, D. P., Kelly, B. S., Azzi, F., Allen, C. H., Forsyth, A., Upham, J., Rayner, K. J., Gray, D. A., Boyd, R. W., Murugkar, S., Lo, B., Trudel, D., Senterman, M. K., & Vanderhyden, B. C. (2020). Metformin abrogates age-associated ovarian fibrosis. *Clinical Cancer Research*, *26*,3.
114. Deniz, G. Y., Laloglu, E., Altun, S., Yiğit, N., & Gezer, A. (2020). Antioxidant and anti-apoptotic effects of vitexilactone on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Biotechnic and Histochemistry*, *95*,5.
115. Hu, W., Ma, Z., Jiang, S., Fan, C., Deng, C., Yan, X., Di, S., Lv, J., Reiter, R. J., & Yang, Y. (2016). Melatonin: The dawning of a treatment for fibrosis? *Journal of Pineal Research*, *60*(2). https://doi.org/10.1111/jpi.12302
116. Ruohonen, S. T., Poutanen, M., & Tena-Sempere, M. (2020). Role of kisspeptins in the control of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis: old dogmas and new challenges. In *Fertility and Sterility* (Vol. 114, Issue 3).
117. Özatik, F. Y., Erol, K., & Özatik, O. (2016). Estrogen modulating effects of resveratrol in female rats. *Marmara Medical Journal*, *29*,2.
118. Bristol-Gould, S. K., Kreeger, P. K., Selkirk, C. G., Kilen, S. M., Mayo, K. E., Shea, L. D., & Woodruff, T. K. (2006). Fate of the initial follicle pool: Empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. *Developmental Biology*, *298*,1.
119. Findlay, J. K., Hutt, K. J., Hickey, M., & Anderson, R. A. (2015). How is the number of primordial follicles in the ovarian reserve established? In *Biology of Reproduction* (Vol. 93, Issue 5).
120. Chen, Z., Lei, L., Wen, D., & Yang, L. (2019). Melatonin attenuates palmitic acid-induced mouse granulosa cells apoptosis via endoplasmic reticulum stress. *Journal of Ovarian Research*, *12*,1.
121. Finkel, T., Deng, C. X., & Mostoslavsky, R. (2009). Recent progress in the biology and physiology of sirtuins. In *Nature* (Vol. 460, Issue 7255).
122. Wang, R. H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H. S., Cao, L., Xiao, C., Kim, S., Xu, X., Zheng, Y., Chilton, B., Jia, R., Zheng, Z. M., Appella, E., Wang, X. W., Ried, T., & Deng, C. X. (2008). Impaired DNA Damage Response, Genome Instability, and Tumorigenesis in SIRT1 Mutant Mice. *Cancer Cell*, *14*,4.
123. Wang, R. H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H. S., Cao, L., Xiao, C., Kim, S., Xu, X., Zheng, Y., Chilton, B., Jia, R., Zheng, Z. M., Appella, E., Wang, X. W., Ried, T., & Deng, C. X. (2008). Impaired DNA Damage Response, Genome Instability, and Tumorigenesis in SIRT1 Mutant Mice. *Cancer Cell*, *14*,4.
124. López-Burillo, S., Tan, D. X., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Manchester, L. C., & Reiter, R. J. (2003). Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and α-lipoic acid differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: A study of their individual and synergistic actions. *Journal of Pineal Research*, *34*,4.
125. Li, Y., Wang, J., Zhang, Z., Yi, J., He, C., Wang, F., Tian, X., Yang, M., Song, Y., He, P., & Liu, G. (2016). Resveratrol compares with melatonin in improving in vitro porcine oocyte maturation under heat stress. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, *7*,1.
126. Zhang, M., Lu, Y., Chen, Y., Zhang, Y., & Xiong, B. (2020). Insufficiency of melatonin in follicular fluid is a reversible cause for advanced maternal age-related aneuploidy in oocytes. *Redox Biology*, *28*.
127. Valerio, D., Luddi, A., De Leo, V., Labella, D., Longobardi, S., & Piomboni, P. (2018). SA1/SA2 cohesion proteins and SIRT1-NAD + deacetylase modulate telomere homeostasis in cumulus cells and are eligible biomarkers of ovarian aging. *Human Reproduction*, *33*,5.
128. Qin, X., Du, D., Chen, Q., Wu, M., Wu, T., Wen, J., Jin, Y., Zhang, J., & Wang, S. (2019). Metformin prevents murine ovarian aging. *Aging*, *11*,11.
129. Zhang, L., Zhang, Z., Wang, J., Lv, D., Zhu, T., Wang, F., Tian, X., Yao, Y., Ji, P., & Liu, G. (2019). Melatonin regulates the activities of ovary and delays the fertility decline in female animals via MT1/AMPK pathway. *Journal of Pineal Research*, *66*,3.

130. Tamura, H., Kawamoto, M., Sato, S., Tamura, I., Maekawa, R., Taketani, T., Aasada, H., Takaki, E., Nakai, A., Reiter, R. J., & Sugino, N. (2017). Long-term melatonin treatment delays ovarian aging. *Journal of Pineal Research*, *62*,2.
131. Ma, M., Chen, X. Y., Li, B., & Li, X. T. (2017). Melatonin protects premature ovarian insufficiency induced by tripterygium glycosides: Role of SIRT1. *American Journal of Translational Research*, *9*,4.
132. Said, R. S., El-Demerdash, E., Nada, A. S., & Kamal, M. M. (2016). Resveratrol inhibits inflammatory signaling implicated in ionizing radiation-induced premature ovarian failure through antagonistic crosstalk between silencing information regulator 1 (SIRT1) and poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1). *Biochemical Pharmacology*, *103*.
133. Long, G. Y., Yang, J. Y., Xu, J. J., Ni, Y. H., Zhou, X. L., Ma, J. Y., Fu, Y. C., & Luo, L. L. (2019). SIRT1 knock-in mice preserve ovarian reserve resembling caloric restriction. *Gene*, *686*.
134. Nie, Z., Zhang, L., Chen, W., Zhang, Y., Wang, W., Hua, R., Zhang, T., Zhao, C., Gong, M., & Wu, H. (2021). The protective effects of resveratrol pretreatment in cyclophosphamide-induced rat ovarian injury: an vivo study. *Gynecological Endocrinology*, *37,*10.
135. Han, Y., Luo, H., Wang, H., Cai, J., & Zhang, Y. (2017). SIRT1 induces resistance to apoptosis in human granulosa cells by activating the ERK pathway and inhibiting NF-κB signaling with anti-inflammatory functions. *Apoptosis*, *22*,10.
136. Sirotkin, A. V., Dekanová, P., Harrath, A. H., Alwasel, S. H., & Vašíček, D. (2014). Interrelationships between sirtuin 1 and transcription factors p53 and NF-κB (p50/p65) in the control of ovarian cell apoptosis and proliferation. *Cell and Tissue Research*, *358*,2.
137. Kwon, K. J., Kim, H. J., Shin, C. Y., & Han, S. H. (2010). Melatonin potentiates the neuroprotective properties of resveratrol against beta-amyloid-induced neurodegeneration by modulating AMP-activated protein Kinase pathways. *Journal of Clinical Neurology (Korea)*, *6*,3.
138. Li, Z., Bridges, B., Olson, J., & Weinman, S. A. (2017). The interaction between acetylation and serine-574 phosphorylation regulates the apoptotic function of FOXO3. *Oncogene*, *36*,13.
139. Olmos, Y., Sánchez-Gómez, F. J., Wild, B., García-Quintans, N., Cabezudo, S., Lamas, S., & Monsalve, M. (2013). SirT1 regulation of antioxidant genes is dependent on the formation of a FoxO3a/PGC-1α complex. *Antioxidants and Redox Signaling*, *19*,13.
140. Brunet, A., Sweeney, L. B., Sturgill, J. F., Chua, K. F., Greer, P. L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S. E., Mostoslavsy, R., Cohen, H. Y., Hu, L. S., Cheng, H. L., Jedrychowski, M. P., Gygi, S. P., Sinclair, D. A., Alt, F. W., & Greenberg, M. E. (2004). Stress-Dependent Regulation of FOXO Transcription Factors by the SIRT1 Deacetylase. *Science*, *303*,5666.
141. Lee, S., Jin, J. X., Taweechaipaisankul, A., Kim, G. A., & Lee, B. C. (2018). Synergistic effects of resveratrol and melatonin on in vitro maturation of porcine oocytes and subsequent embryo development. *Theriogenology*, *114*, 191–198.
142. Cui, C., Han, S., Yin, H., Luo, B., Shen, X., Yang, F., Liu, Z., Zhu, Q., Li, D., & Wang, Y. (2019). FOXO3 Is Expressed in Ovarian Tissues and Acts as an Apoptosis Initiator in Granulosa Cells of Chickens. *BioMed Research International*, *2019*.
143. Liu, H., Luo, L. L., Qian, Y. S., Fu, Y. C., Sui, X. X., Geng, Y. J., Huang, D. N., Gao, S. T., & Zhang, R. L. (2009). FOXO3a is involved in the apoptosis of naked oocytes and oocytes of primordial follicles from neonatal rat ovaries. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *381*,4.

EK

Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 01.02.2022-7353

T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARARI

Toplantı Tarihi : 20.01.2022
Toplantı Sayısı : 01
Karar Sayısı : 04

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Uluslararası Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı öğretim üyesi **Doç. Dr. Salime Pelin ERGÜVEN**'in **"Ratlarda Sisplatin ile Oluşturulan Deneysel Prematür Over Yetmezliği (POF) Modelinde Melatonin ve Resveratrol'ün Etkisi"** başlıklı bilimsel çalışma önerisi 20.01.2022 tarihli 01 sayılı toplantıda Etik Kurulumuz tarafından görüşülmüş olup, etik açıdan **"uygun"** olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Aslı Gibidir
e-imzalıdır
Prof. Dr. Ülkan KILIÇ
HADYEK Başkanı

Evrakı Doğrulamak İçin : https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys?eD=BSFB0DUT7P

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.