



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

**DOKTORA
TEZİ**

**TEKRARLANAN KONTROLLÜ OVARYAN
HİPERSTİMÜLASYON'UN (KOH) OVER
REZERVİ ÜZERİNE ETKİSİNİN
PHOSPHATASE AND TENSIN HOMOLOGUE
DELETED ON CHROMOSOME TEN (PTEN)
YOLAĞI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

PERİHAN YALÇINKAYA

HİSTOLOJİ - EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2018



**TEKRARLANAN KONTROLLÜ OVARYAN HİPERSTİMÜLASYON'UN
(KOH) OVER REZERVİ ÜZERİNE ETKİSİNİN PHOSPHATASE AND
TENSİN HOMOLOGUE DELETED ON CHROMOSOME TEN (PTEN)
YOLAĞI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI**

Perihan YALÇINKAYA

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2018

Perihan YALÇINKAYA tarafından hazırlanan “TEKRARLANAN KONTROLLÜ OVARYAN HİPERSTİMÜLASYON’UN (KOH) OVER REZERVİ ÜZERİNE ETKİSİNİN PHOSPHATASE AND TENSİN HOMOLOGUE DELETED ON CHROMOSOME TEN (PTEN) YOLAĞI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji - Embriyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan: Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL

Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



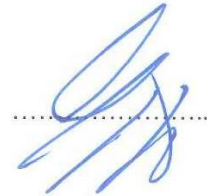
Üye: Prof. Dr. A. Çevik TUFAN

Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara Yıldırım
Beyazıt Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



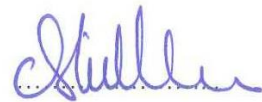
Üye: Prof.Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye: Doç. Dr. Ayten TÜRKKANI

Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, TOBB ETÜ
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi: 20/06/2018

Jüri üyeleri tarafından Doktora tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Perihan YALÇINKAYA

20/06/2018

TEKRARLANAN KONTROLLÜ OVARYAN HİPERS TİMÜLASYON'UN
(KOH) OVER REZERVİ ÜZERİNE ETKİSİNİN PHOSPHATASE AND
TENSIN HOMOLOGUE DELETED ON CHROMOSOME TEN (PTEN)
YOLAĞI ÜZERİNDEN ARAŞTIRILMASI

(Doktora Tezi)

Perihan YALÇINKAYA

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2018

ÖZET

Ovaryumlardan en ideal sayı ve kalitede oosit elde etmek için "aynı siklusta çok sayıda follikülün geliştirilmesi" olarak tanımlanan kontrollü ovarian hiperstimülasyon (KOH), infertilite olgularının artması ile birlikte, yardımcı üreme tekniklerinin (YÜT) vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. YÜT'deki ilerlemelere rağmen gebelik sağlamak için hastaların çoğunda birden fazla KOH uygulaması yapılması gerekmektedir. Tekrarlanan KOH uygulamaların, over rezervini temsil eden primordiyal foliküllerin, dormansitesinin korunması, canlılığı ve aktivasyonunu kontrol eden faktörler üzerine olan etkisi oldukça merak uyandırmaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, over rezervinin korunmasında görev alan PTEN ve FOXO3'ün ifadenmelerinde, KOH protokol yöntemleri uygulandıktan sonra oluşabilecek olası değişimleri göstermeyi amaçladık. Çalışmamızda kullanılan, genç dönemlerindeki (8 haftalık) 18 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan her grupta 6 denek olacak şekilde rastgele *Kontrol*, *Deney-1 (3 tekrar)* ve *Deney-2 (5 tekrar)* gruplarına ayrıldı. Deney gruplarına 10 IU/0,1ml PMSG ve bu işlemten 48 saat sonra 10 IU/0,1ml hCG enjeksiyonunu kapsayan KOH protokolü uygulandı. Bu işlem *Deney-1* ve *Deney-2 gruplarına* 1'er hafta arayla sırasıyla, 3 ve 5 kez uygulandı. *Kontrol* gruplarına ise aynı işlemler 0,1ml 0.9% NaCl solüsyonu ile gerçekleştirildi. Deney bitiminde, alınan kan örnekleri süpernatantları ayrıldı ve ELİSA analizleri yapılana kadar -20°C'de saklandı. Ovaryum dokuları ise ışık mikroskopik incelemeler için %10'luk nötral formaldehit solüsyonu içerisine konuldu. H-E ile boyanan histolojik kesitlerde, ovaryum foliküllerinin sayısı fiziksel disektör yöntemi kullanılarak belirlendi. Bununla birlikte PTEN, FOXO3 ve LH-R moleküllerinin ekspresyonlarını IHC yöntemlerle değerlendirildi. Çalışmamız sonucunda, KOH uygulamasının, PIK3 hücre içi sinyal yolağının temel bileşenlerinden olan ve over rezervini koruduğu bilinen PTEN ve FOXO3 proteinleri ile LH-R ekspresyon düzeylerini azalttığı, over rezerv belirteçlerinden olan FSH, E2 ve LH gibi hormonların seviyelerini etkilediği, ovaryumun histolojik yapısı, oosit morfolojisi ve sayısı üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğu izlenmiştir.

Bilim Kodu : 1033

Anahtar Kelimeler : Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon, over rezervi, PTEN, FOXO3

Sayfa Adedi : 98

Danışman : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF REPEATED CONTROLLED OVARIAN
HYPERSTIMULATION (COH) ON OVARIAN RESERVE VIA PHOSPHATASE AND
TENSIN HOMOLOGUE DELETED ON CHROMOSOME TEN (PTEN) PTEN PATHWAY

(Ph. D. Thesis)

Perihan YALÇINKAYA

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES

June 2018

ABSTRACT

Controlled ovarian hyperstimulation (COH), defined as "The development of multiple follicles on the same cycle" to obtain the ideal number and quality of oocytes from the ovaries, has become an indispensable part of assisted reproductive techniques (ART), with an increase in infertility cases. Despite the advances in ART, more than one application of COH is required in the majority of patients to provide pregnancy. The effect of repeated COH applications on the factors controlling the preservation, viability and activation of primordial follicles, which represent over-reserve makes high sensation. For this reason, we aimed to show possible changes in the expression of PTEN and FOXO3, which are involved in preserving the over-reserve, after applying the COH protocol methods. 18 young Wistar albino female rats (8 weeks old) used in our study were randomly assigned to *Control*, *Experiment-1* (3 repetitions) and *Experiment-2* (5 repetitions) groups as 6 subjects in each group. Experimental groups were treated with 10 IU / 0,1ml PMSG and a COH protocol consisting of 10 IU / 0,1ml hCG injection after 48 hours. This procedure was applied 3 and 5 times to *Experiment-1* and *Experiment-2* groups, respectively, with a weekly period. For the control groups, the same procedures were performed with 0,1 ml of 0,9% NaCl solution. At the end of the experiment, the supernatants of the blood samples taken were separated and stored at -20 ° C until ELISA analysis. The ovarium tissues were placed in 10% neutral formaldehyde solution for light microscopic examinations. In histological sections stained with H-E, the number of ovarian follicles was determined using the physical disector method. However, the expression of PTEN, FOXO3 and LH-R molecules was evaluated by IHC methods. As a result of our study, it was concluded that COH administration reduces the expression levels of PTEN and FOXO3 proteins and LH-R, which are among the essential components of the PIK3 intracellular signaling pathway and also it affects the levels of hormones such as FSH, E2 and LH, which are over-reserve markers, and causes adverse effects on the histological structure, oocyte morphology and number of ovaries.

Science Code : 1033

Key Words : Controlled ovarian hyperstimulation, ovarian reserve, PTEN, FOXO3

Page Number : 98

Advisor : Prof. Dr. Çiğdem ELMAS

TEŞEKKÜR

"Tekrarlanan kontrollü ovaryan hiperstimülasyon'un (KOH) dişi üreme sistemi organları üzerine etkisinin çeşitli yollar üzerinden araştırılması" başlıklı ve 01/2017-14 kodlu projemize sağladıkları destekle doktora tez çalışmamı yapmamı sağlayan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Birimi'ne teşekkürler.

Doktora eğitimim süresince her konuda özverisini, bilgisini ve desteğini esirgemeyen, tecrübesi ile bana her zaman yol gösteren değerli hocam, danışmanım sayın Prof. Dr. Çiğdem ELMAS'a, Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Candan ÖZOĞUL başta olmak üzere doktora eğitimim boyunca bilimsel birikimleri ile katkı sağlayan, değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Suna ÖMEROĞLU ve Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na,

Birlikte çalışmaktan her zaman keyif aldığım, doktora eğitimimin her aşamasında dostluklarını, tecrübelerini ve yardımlarını benden hiç esirgemeyen çok değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Sanem SARIBAŞ ve Arş. Gör. Özen AKARCA'ya,

Tezimin proje/deney sürecindeki yardım ve desteklerinden dolayı sevgili arkadaşlarım Mehmet YILDIZ'a ve Halil RUSO'ya

Laboratuvar imkanlarını ve güler yüzlerini esirgemeyen başta Veteriner Hekim Dr. Elvan ANADOL olmak üzere tüm GÜDAM ekibine ve deney sürecindeki yardımlarından dolayı anabilim dalı personelimize,

Doktora eğitimimin son döneminde, hayatıma kattıkları güzellikler ve kıymetli dostlukları için Okan Üniversitesi Tıp Fakültesi çalışma arkadaşlarım, Arş. Gör. Pınar GÜLTEPE, Arş. Gör. H. Öykü DİNÇ ve Arş. Gör. Merve Bat'a

İnançlarını, desteklerini, sabır ve sevgilerini hiç esirgemediğim tüm yaşamım boyunca her koşulda arkamda ve yanımda olan, sevgili babam Yüksel YALÇINKAYA'ya uzakta da olsa varlığını her zaman yanımda hissettiğim biricik kardeşim Agah YALÇINKAYA'ya ve en çok da sevgi ve ilham kaynağım, kıymetli annem Emine YALÇINKAYA'ya

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Ovaryum	5
2.1.1. Ovaryum anatomisi.....	5
2.1.2. Ovaryum histolojisi	6
2.2. Gonad Oluşumu ve Oogenezis	8
2.3. Folikülogenez ve Ovulasyon	10
2.4. Primordiyal Folikül Seçilim Mekanizması.....	18
2.4.1. FOXO	20
2.4.2. PTEN	21
2.5. Over Rezervi.....	21
2.5.1. Yaş	22
2.5.2. Bazal kan testleri.....	22
2.5.3. Dinamik testler.....	23
2.5.4. Ultrason testleri.....	24
2.5.5. Histolojik yöntem	24

	Sayfa
2.6. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon	24
3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Deneysel Yöntem	27
3.1.1. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolü	27
3.2. Işık Mikroskopik Yöntemler	29
3.2.1. Doku takibi ve gömme.....	29
3.2.2. Kesit alma	29
3.2.3. Hematoksilen - Eozin (H&E) boyama.....	29
3.2.4. İmmunohistokimyal boyama	32
3.3. ELISA Yöntemi.....	35
3.3.1. Kan örneklerinde FSH, LH ve E2 tayini	35
3.4. İstatistiksel Analizler	37
4. BULGULAR	39
4.1. Işık Mikroskopik Bulgular	39
4.1.1. Hematoksilen - Eozin (H&E) boyama bulguları	39
4.1.2. İmmunohistokimyal (IHK) bulgular.....	53
4.2. ELISA Bulguları.....	66
5. TARTIŞMA	69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
KAYNAKLAR	79
EKLER	93
EK-1. Etik Kurul Onayı	95
EK-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası	96
ÖZGEÇMİŞ	97

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Folikül sayımlarının istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler I.....	52
Çizelge 4.2. Folikül sayımlarının istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler II	52
Çizelge 4.3. PTEN immünreaktivite seviyelerinin istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler.....	57
Çizelge 4.4. FOXO3 immünreaktivite seviyelerinin istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler.....	61
Çizelge 4.5. LH-R immünreaktivite seviyelerinin istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler.....	65
Çizelge 4.6. E2, LH ve FSH hormonların istatistiksel sonuçlara ait tanımlayıcı veriler.....	66

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. A. Kadın iç genital organlarının posterior görünümü B. enine kesit görünümü.....	6
Şekil 2.2. Ovaryumun enine kesit görünümü.....	8
Şekil 2.3. Folikülojenezde rol oynayan faktörler.....	9
Şekil 2.4. Primordiyal folikülün şematik görünümü.....	12
Şekil 2.5. Tek tabakalı primer folikülün şematik görünümü	13
Şekil 2.6. Çok tabakalı primer folikülün şematik görünümü.....	13
Şekil 2.7. Sekonder folikülün şematik görünümü.....	15
Şekil 2.8. Graaf folikülün şematik görünümü.....	16
Şekil 2.9. PI3K sinyal yolağının şematik gösterimi.....	19
Şekil 3.1. Tarafsız sayım çerçevesinde sayım kurallarının şematik gösterimi	31
Şekil 3.2. Örnek kesit ve gözlem kesit uygulamalarının şematik gösterimi	32
Şekil 4.1. PTEN immünreaktivite seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması	57
Şekil 4.2. FOXO3 immünreaktivite seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması	61
Şekil 4.3. LH-R immünreaktivite seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması	65
Şekil 4.4. E2 hormon seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması	67
Şekil 4.5. LH hormon seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması	67
Şekil 4.6. FSH'a hormon seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması	67

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu....	40
Resim 4.2. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu....	41
Resim 4.3. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu....	42
Resim 4.4. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu....	43
Resim 4.5. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu	44
Resim 4.6. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu	45
Resim 4.7. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu	46
Resim 4.8. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu	47
Resim 4.9. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu	48
Resim 4.10. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu	49
Resim 4.11. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu	50
Resim 4.12. PTEN primer antikoru ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu	54
Resim 4.13. PTEN primer antikoru ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu	55
Resim 4.14. PTEN primer antikoru ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu	56
Resim 4.15. FOXO3 primer antikoru ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu	58
Resim 4.16. FOXO3 primer antikoru ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu ...	59
Resim 4.17. FOXO3 primer antikoru ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu ...	60
Resim 4.18. LH-R primer antikoru ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu	62
Resim 4.19. LH-R primer antikoru ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu.....	63
Resim 4.20. LH-R primer antikoru ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
-----------------	--------------------

μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
H	Hidrojen
mg	Miligram
mm	Milimetre
Na	Sodyum
NO	Nitrik oksit
°C	Santigrat
OH	Hidroksil
sn	Saniye

Kısaltmalar	Açıklamalar
--------------------	--------------------

AFC	Antral folikül sayısı (<i>Antral follicle count</i>)
Aİ	Aromataz inhibitörü
Akt	Protein kinase B
AMH	Anti-Müllerian hormon
BMP-4	Kemik morfojenik protein-4 (<i>Bone morphogenic protein</i>)
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CC	Klomifen sitrat
cdk	Siklin bağımlı kinaz
COC	Kümülüs oosit bileşkesi (<i>Cumulus oocyte complex</i>)
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
E2	Östradiol (<i>Estradiol</i>)

Kısaltmalar	Açıklamalar
EFORT	Ekzojen FSH over rezervi testi
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
FOXO	Forkhead box O
FSH	Folikül stimüle edici hormon
GAST	GnRH agonist stimülasyon testi
GnRH	Gonadotropin salgılayıcı hormon
GnRHa	Gonadotropin salgılayıcı hormon agonisti
GnRHant	Gonadotropin salgılayıcı hormon antagonisti
H&E	Hematoksilen-Eosin
hCG	İnsan koryonik gonadotropin
hMG	Human menopausal gonadotropin
hMG	İnsan menopozal gonadotropin
H-Score	Histoscore
ICSI	İntrasitoplazmik sperm enjeksiyonu
IVF	İn-vitro fertilizasyon
KL	Kit ligandı
KOH	Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon
LH	Luteinize edici hormon
LH-R	Luteinize edici hormon reseptörü
MI	Metafaz I
MIF	Müllerian inhibitör faktör
MII	Metafaz II
mTORC1, C2	Mammalian target of rapamycin complex 1,2
OHSS	Ovaryan Hiperstimülasyon Sendrom
OMI	Oocyte maturation inhibitör
OPU	Oosit toplama
p27	Siklin bağımlı kinaz inhibitörü
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCOS	Polikistik over sendromu
PDK-1	Phosphoinositide-dependent kinase-1
PGH	Primordial germ hücreleri

Kısaltmalar	Açıklamalar
pH	Power of hydrogen
PI3K	Fosfatidilinositol-3 Kinaz
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat
PMSG	Gebe kısrak serum gonadotropin
POF	Primordiyal ovaryan yetmezlik
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten
S6K1	p70 ribosomal protein S6 kinase-1
SRY	Sex-determining region Y
STAT3	Signal transducer and activator of transcription-3
TDF	Testis belirleyici faktör
TGF-β	Dönüştürücü büyüme faktörü-B
TNF-α	Tümör nekrozis faktör- α
TSC1/2	Tuberin/tuberous sclerosis complex 1,2
VTE	Venöz Tromboemboli
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
YÜT	Yardımcı üreme teknikleri
ZO	Zonula okludens
ZP	Zona pellusida

1. GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü'nce (WHO) infertilite (kısırlık), bir yıl süresince düzenli korunmasız cinsel ilişkiye karşın gebelik elde edilememesi olarak tanımlanmaktadır [1]. Günümüzde üreme çağındaki çiftlerin yaklaşık %10-15'i infertilite problemi yaşamakta ve bu çiftlerin yaklaşık %20'si tedaviye ihtiyaç duymaktadır [2]. İnfertilite tedavisinde son aşamayı, in-vitro fertilizasyon (IVF) ve intrasitoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) gibi yardımla üreme teknikleri (YÜT) oluşturmaktadır. Tedavide temel felsefe, ovaryan folliküllerden aspire edilen oositler ile ejakulattan veya cerrahi yollar ile elde edilen spermelerin laboratuvar ortamında biraraya getirilmesi, fertilizasyonu ve in-vitro kültür şartlarında geliştirilen embriyoların intrauterin kaviteye transferidir [3].

En iyi kalitede, sağlıklı embriyonun transfer edilmesi uygulamalardaki başarı olasılığını arttırmaktadır. İdeal embriyonun seçilebilmesi için daha fazla sayıda oosit elde etmek gerekmektedir. Bu nedenle günümüzde dünyadaki hemen hemen tüm üreme sağlığı merkezlerinde Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon (KOH) uygulanmaktadır. KOH, yardımla üreme tekniklerinde ovaryumlardan en ideal sayı ve kalitede oosit elde etmek ereği ile aynı siklusta çok sayıda follikülün geliştirilmesi tekniğidir. İnfertilite olgularının artması ile birlikte KOH, yardımla üreme tekniklerinin vazgeçilmez bir parçası olmuştur [4].

Günümüzde ideal sayıda döllenebilecek, sağlıklı oosit elde edebilmek ereği ile GnRH agonistleri (GnRHa) ve GnRH antagonistleri (GnRHant) kullanılarak birbirinden farklı özellikler taşıyan KOH protokolleri geliştirilmiştir [5]. Tüm protokollerde erek mümkün olduğunca fazla sayıda 16-20 mm çaplı olgun folikül elde etmektir. Ancak, bu yöntem normal ovulasyona sahip kadınlarda fizyolojik olan, tek baskın folikül seçimi ve olgunlaşması mekanizmasına ters düşmektedir. Bu nedenle, hiperstimülasyon uygulamalarının insan vücudu üzerine olan etkisi son zamanlarda birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir.

Bazı çalışmalar tekralanan KOH uygulamalarının ovaryum işlevleri, over yanıtı, embriyo kalitesi ve klinik gebelik oranı üzerinde olumsuz etkisinin olmadığını bildirilmiştir [6,7]. Benzer şekildeki çalışmalarda ardışık olarak tekrarlanan üçüncü KOH uygulamasına kadar hastaların over rezervinde belirgin bir düşüş olmadığı, elde edilen olgun oosit sayısının

aynı kaldığı ve oosit kalitesinde fark olmadığı ifade edilmiştir [8]. Her ne kadar tekrarlanan KOH'un olumsuz etkileri konusunda bir görüş birliği bulunmasa da literatürde bu uygulamaların ovaryumların yapı ve işlevi üzerindeki olumsuz etkilerini gösteren güçlü kanıtlar vardır [9]. Örneğin; tekrarlanan süperovulasyonun primatlarda ovaryum yapısı, foliküler histoloji, farklı gelişim evresindeki foliküllerin oranı ve oosite spesifik genlerin ekspresyon seviyeleri üzerinde anlamlı derecede olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir. Ancak, süperovulasyon uygulamaları granülosa hücrelerinde artmış mitokondriyum anomalilerine ve steroid hormon sentezinde rol alan genlerin ekspresyonlarında azalmaya neden olduğu ifade edilmiştir [10]. Tekrarlayan ovaryan hipersitümlasyon uygulamaları fare ovaryumunda oksidatif hasar ve mitokondrial DNA mutasyonlarını indükler [11]. Yüksek dozda uygulanan stimülasyon protokolleri oosit anöplodisi, embriyo mortalitesi, fetal büyüme geriliği ve konjenital anomalileri arttırır. Süperovülasyon farelerde, gecikmiş embriyonik gelişim, artmış anormal blastosist oluşumu ve belirgin fetal büyüme geriliğine neden olur [12]. Bununla birlikte Ovaryan Hiperstimülasyon Sendromu (OHSS) ve Venöz Tromboemboli (VTE) KOH uygulamasında karşılaşılmaması muhtemel en ciddi komplikasyonlardır.

YÜT uygulamalarında her yaşta dikkate alınması gereken en önemli parametrelerden biri de over rezervidir. Over rezervi kavramı, ovaryum folikül havuzunun büyüklüğü ve kalitesi anlamında olup, ölçüm için birçok sonografik ve hormonal belirteçler kullanılmaktadır [13]. Over rezervini temsil eden primordiyal foliküllerin çoğunluğu üretken dönem boyunca sessiz durumda beklerler. Primordiyal foliküllerin dormansitesinin korunması, canlılığı ve aktivasyonunu baskılayıcı ve aktive edici faktörlerin kontrolü altındadır [14,15]. Bu faktörleri kapsayan hücre içi sinyal yollarından birisi de PI3K sinyal yolağıdır. PI3K sinyal yolağının temel bileşenlerinden birisi olan PTEN, bu yolağının negatif düzenleyicisidir ve primordiyal folikül havuzunun korunmasında kritik öneme sahiptir [16,17]. Ovaryum rezervinin potansiyel koruyucusu olarak kabul edilen PTEN'in ekspresyonunda oluşan bir düzensizlik primordiyal folikül havuzunun erken aktivasyonuna neden olur. Tüm primordiyal foliküllerin bu şekilde hızlı ve toplu şekilde aktivasyonu kaçınılmaz olarak folikül havuzunun erken tükenmesine dolayısıyla prematür over yetmezliği'ne (POF) ve erken menopoza neden olur [18,19].

Bir kadının sahip olduğu toplam oosit sayısı genetik olarak belirlidir ve bu sayı yaşam boyu giderek azalır. Yardımla üreme tekniklerindeki ilerlemelere rağmen gebelik sağlamak için hastaların çoğunda birden fazla KOH uygulaması yapılması gerekmektedir. Tekrarlanan KOH uygulamaların, hastanın gelecekteki over rezervini etkileyip etkilemeyeceğı sorusunu gündeme getirmiştir. Tekrarlanan KOH uygulamaların, hastanın zaten tükenmekte olan over rezervine olan etkisi oldukça merak uyandırmaktadır.

Klinisyenler, tekrarlanan KOH uygulamalarının follikül havuzuna ve dolayısı ile over rezervine bir etki göstermediğini, sadece o menstrual döngü için seçilen oositlerin tamamının olgunlaşmasını hedeflediklerini belirtse de literatürde tekrarlanan KOH tedavisinin over rezervlerine etkisini PI3K sinyal yolağı üzerinden inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Biz de bu veriler doğrultusunda, yetişkin dönemde sıçanlara uygulanan KOH uygulamaları sonrasında over rezervinde meydana gelebilecek olası primordiyal folikül kaybının nedenleri arasında, foliküler büyümenin baskılanma mekanizmasının bozulmuş olabileceğini hipotezini kurduk. Bu nedenle çalışmamızda, primordiyal folikülden primer foliküle geçişte baskılayıcı moleküller olarak görev alan PTEN ve FOXO3A'nın ifadenmelerinde, KOH protokol yöntemleri uygulandıktan sonra oluşabilecek olası değişimleri immünohistokimyasal yöntemler ile göstermeyi amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

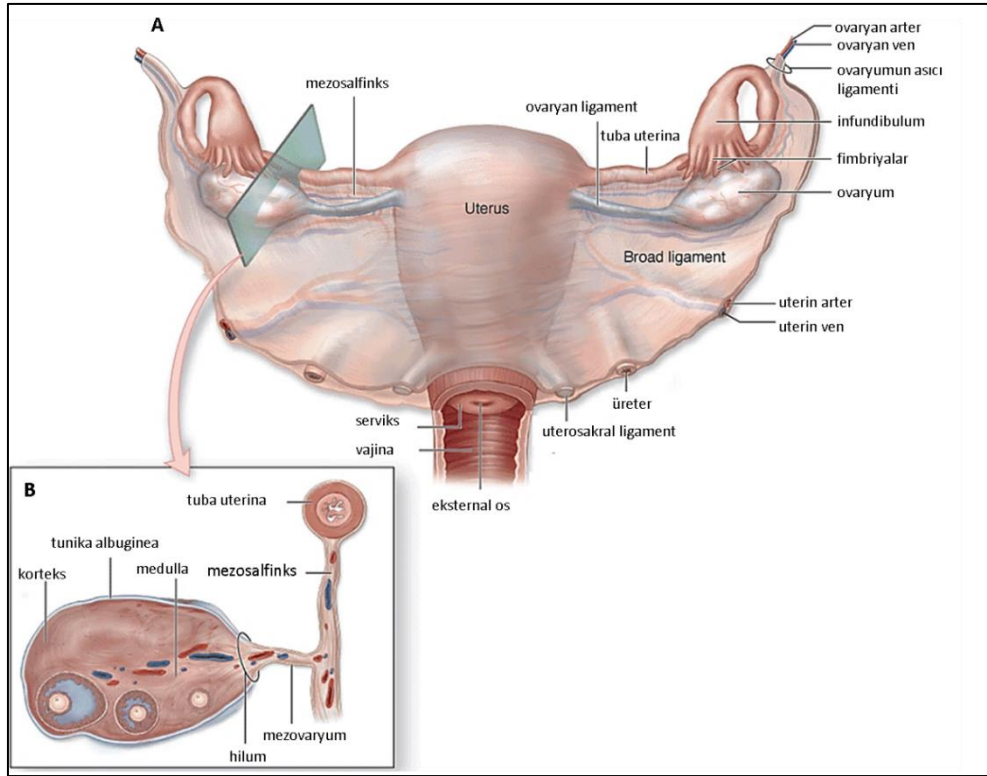
2.1. Ovaryum

2.1.1. Ovaryum anatomisi

Kadında esas üreme organı olan ve kadın üreme hücresi, oosit'i üreten ovaryum'lar uterus'un her iki tarafında lateral pelvik duvarlara yakın konumda *fossa ovarica* (*Krause çukuru*) denilen çukurlara yerleşmiş 3 – 3,5 cm uzunluğunda, 2 - 3 cm genişliğinde 1 – 1,5 cm kalınlığında ve 3 - 5 gr ağırlığında bir çift organdır. Embriyonal yaşamın başlangıcında intraabdominal yerleşimli olan ovaryumlar, ikinci aydan itibaren pelvis boşluğuna inmeye başlayarak (*decensus ovarii*) *arteria iliaca externa*, *arteria iliaca interna* ve *ligamentum latum uteri* arasında yer alan *fossa ovarica*'ya yerleşirler [20-22].

Ovaryum'un *facies medialis* ve *facies lateralis* olarak iki yüzü, *extremitas tubaria* (üst uç) ve *extremitas uterina* (alt uç) olarak iki ucu, *margo mesovaricus* (ön kenar) ve *margo liber* (arka kenar) olarak isimlendirilen iki kenarı bulunur [23,24].

Ligamentum latum uteri'nin arka yaprağı olan mesovarium, ovaryum'un ön kenarına tutunur ve ovaryum'un menteşe hareketini yapmasına olanak sağlar. Mesovarium içinde yer alan damar, sinir ve lenfatiklerin ovaryuma girip çıktıkları yere ise *hilum ovarii* denir. Ovaryum'un alt ucu fundus uteri'nin yan köşesine ligamentum ovarii proprium ile bağlanır. Ligamentum suspensorium ovarii denen periton katlantısı ise ovaryum'u pelvisin yan duvarına sabitler. Tuba uterina'dan ovaryumlara doğru uzanan saçaksı uzantılara *fimbria ovarica* adı verilir. Ovaryumun üst ucuna yapışan bu uzantılar karın boşluğuna atılan ovum'un tuba uterina'ya taşınmasını sağlar [21,25].



Şekil 2.1. A. Kadın iç genital organlarının posterior görünümü B. enine kesit görünümü [26]

2.1.2. Ovaryum histolojisi

İntraperitoneal bir organ olmasına karşın tunika seroza katmanı içermeyen ovaryumların dış yüzeyi puberte öncesine değin, çok katlı yassı epitel ile örtülüdür. Periton'un mezotel katmanından farklı olan bu epitel daha sonra tek katlı kübik hale gelir ve *germinal epitel* olarak isimlendirilir [27]. Önceleri düz ve parlak olan ovaryumun dış yüzeyi puberteden sonra, ovaryum folliküllerinin yırtılması ve oositlerin atılması sonucunda gittikçe daha pürüzlü ve mat bir hale gelir. Menopozdan sonra ise ovaryumlar küçülür ve yüzeyi skar dokusunun neden olduğu küçük çukurlarla dolar [28,29].

Germinal epitelin elektron mikroskopik görüntülerinde, hücrelerin periton boşluğuna bakan üst yüzeylerinde çok sayıda mikrovillus izlenir. Hücre sitoplazmasında, çekirdek çevresinde yerleşik organeller iyi gelişmiştir. Hücrelerin yan yüzlerinde ise desmozom tipi bağlantı birimleri gözlenir [30,31]. Germinal epitelin altında, ovaryum'a beyazımsı rengini veren ve sıkı bağ dokusu yapısında olan *tunica albuginea* katmanı bulunur. Damardan yoksun olan ve ovaryum'un yüzeyine zıt olarak yerleşmiş kollajen fibriller içeren bu katman yaşla birlikte kalınlaşır [31,32].

Ovaryum histolojik olarak, medulla ve korteks denen, aralarında kesin bir sınır bulunmayan iki farklı bölümden oluşur [33, 34].

Ovaryum'un en iç kısmı olan medulla fibroelastik gevşek bağ dokusu yapısındadır. Medulla stroması, hilustan ovaryuma giren kan ve lenf damarları, sinir demetleri ile intersitisyel hücreler, bağ dokusu hücreleri ve hilar hücrelerinden oluşur [33, 34]. Hilar hücreleri medullada bulunan epitelioid hücre grubudur. Testisdeki Leydig hücreleri ile benzer hücresel organizasyona sahip olan bu hücreler androjen salgırlar [35]. Medullayı çevreleyen ve ovaryum'un esas işlevsel katmanı olan korteks ise gelişimin değişik evrelerindeki ovaryum foliküllerini, dejenere olmuş atretik folikülleri, korpus luteum ve korpus albicans yapılarını ve bunlar arasında dağılan sıkı bağ dokusu yapısındaki stromayı içerir. Korteks stromasında ise kollajen ve elastik lifler, retiküler lif ağırları ile iğ biçimli stroma hücreleri bulunur [33-37].

Ovaryumda, histolojik gelişim evresinde göre 3 tip folikül bulunur. Bunlar;

1- Primordiyal Folikül

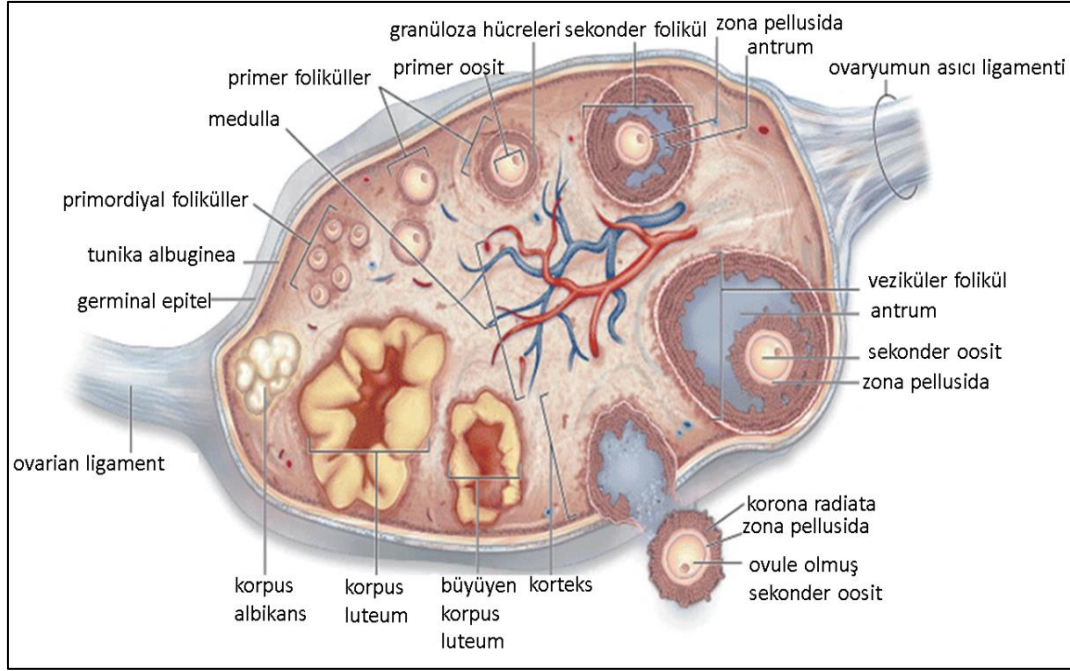
2- Büyüyen Folikül

a- Primer Folikül

- Unilaminar (tek katmanlı ya da erken) primer foliküller
- Multilaminar (çok katmanlı ya da geç) primer foliküller

b- Sekonder (Antral) Folikül

3- Olgun (Graaf) Folikül



Şekil 2.2. Ovaryumun enine kesit görünümü [26]

2.2. Gonad Oluşumu ve Oogenezis

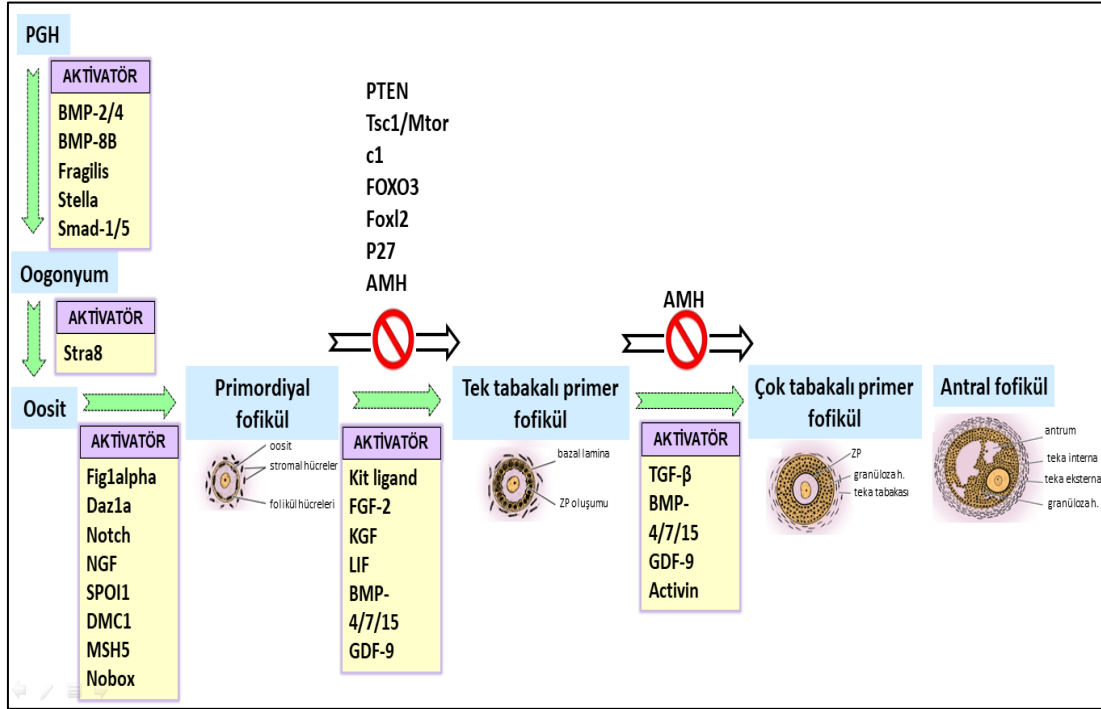
Gonadlar (testis ve ovaryumlar) üç kaynaktan köken alırlar;

- Karın arka duvarı mezoteli
- Altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu)
- Primordiyal germ hücreleri (ilkel cins hücreleri)

Gonadal gelişim, 5. haftada kölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşması sonucu mezonefrozun medialinde, bir çift gonadal kabartı'nın oluşması ile başlar [38-39]. Gelişimin erken evrelerinde vitellus kesesinin allontoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında beliren *primordiyal germ hücreleri* (PGH) son bağırsağın dorsal mezenterisi boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşır, 6. haftada da genital kabartıyı işgal ederler. Yaklaşık 1000 - 2000 kadar hücre bu yolu izleyerek, genital kabartıya ulaşır. Buraya ulaşan hücrelerin göç davranışları son bulur [40].

Embriyonik dönemden başlayarak, PGH'den ovulasyon öncesi foliküle kadar olan folikül gelişim sürecinde otokrin - parakrin şekilde hareket eden bazı ekstra-hücrel matriks bileşenleri, büyüme faktörleri, inhibisyon ve aktivasyon faktörleri rol oynar [41].

- Germ hücresi oluşumunda, aktivasyonunda, gelişiminde ve foliküllerin canlılığı korumasında rol oynadığı düşünülen genler ve transkripsiyon faktörleri Şekil 2.3’de özetlenmiştir.



Şekil 2.3. Folikülojenezde rol oynayan faktörler [42]

Göçleri, stella, fragilis genleri ve BMP-4 tarafından düzenlenen primordiyal germ hücreleri, genital kabartılara ulaşamazlarsa ya da anormal yapıda olurlarsa, gonad geriler ve *streak ovaryum* oluşur [43]. Primordiyal germ hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, çoğalan ve altlarındaki mezenşimin içine gömülen genital kabartı epiteli, burada ilkel cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kordonları oluşturur [38,39,44]. Gelişimin 7. haftasına değin gonadlar, erkek ve dişi yapısal özellikleri taşımazlar. Genital sistemin her iki cinste de birbirine benzediği, bu döneme *seksüel gelişimin farklanmamış evresi* bu dönemdeki gonadlara ise *farklanmamış gonadlar* denir [44]. Cinsiyetin farklanması, çok sayıda genin rol aldığı kompleks bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı ise kısa kolunda (Yp11) SRY genini taşıyan Y kromozomudur. Bu genin eksprese ettiği protein olan *testis belirleyici faktör* (TBF) cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri harekete geçirir. Farklanmamış gonadlar, dışta yer alan bir korteks ile içte yerleşik medulladan oluşmaktadır. Bu faktörün yokluğunda, farklanmamış gonadın korteksi ovaryuma farklılaşırken medullası geriler. Primordiyal germ hücreleri içeren ilkel cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine

ayrılırlar ve ovaryumun medulla bölgesine yerleşirler. Bu hücre kümeleri bir süre sonra dejenere olurlar. Çoğalmayı sürdüren yüzey epitelinden *kortikol kordonlar* olarak isimlendirilen ikincil nesil kordonlar gelişir [38].

Primordiyal germ hücreleri gonadlara ulaştıklarında *oogonyum* olarak isimlendirilirler. Mitotik aktiviteleri oldukça yüksek olan oogonyumlar ard arda geçirdikleri mitotik bölünmelerle sayılarını hızla arttırırlar. Böylece fetal ovaryumlardaki oogonyumların sayısı gelişimin 5. ayında, yaklaşık 7 milyona ulaşır. Oogonyum'ların çoğu mitozla çoğalmayı sürdürürken, bir kısmı da primer oositlere farklanır. Bu dönemden sonra başlayan hücre dejenerasyonu, oogonyumların ve primer oositlerin büyük çoğunluğu atretik hale gelir [45,46].

Doğumda ovaryumlardaki primer oositlerin sayısı yaklaşık 700 000 – 2 000 000 arasında iken puberteye gelindiğinde bu sayı 400 000'e kadar düşer. Ancak, bir kadının üretken dönemi süresince yaklaşık 400 oosit tam anlamıyla olgunlaşır ve ovulasyonla dışarı atılır. Folikül sayısı 1000'in altına düştüğünde ise menapoz başlar. Menopozdan sonra geri kalan oositler ise birkaç yıl içinde tümüyle yok olur [38,42].

2.3. Folikülogenez ve Ovulasyon

Kadın genital sistemi, birbirleri ile bağlantılı üç ayrı hormon grubunun kontrolü altındadır [46] Bunlar:

1. Hipotalamus kökenli hormon;
 - Gonadotropin Serbestleştirici Hormon (GnRH)
2. Hipofiz bezi ön lobu kökenli olan Gonadotropin'ler;
 - Follikül Uyarıcı Hormon (FSH) ve Luteinize edici Hormon (LH)
3. Ovaryum kökenli hormonlar;
 - Östrojen ve Progesteron

Pubertenin başlamasıyla, bu hormonların salgı miktarları aylık ritmik değişiklikler gösterir. Genital hormonların salgı miktarlarındaki bu değişikliklere uygun olarak, ovaryumlar ve diğer genital organlarda da periyodik değişiklikler olaylanır. Döllenme ve gebelik için, belli

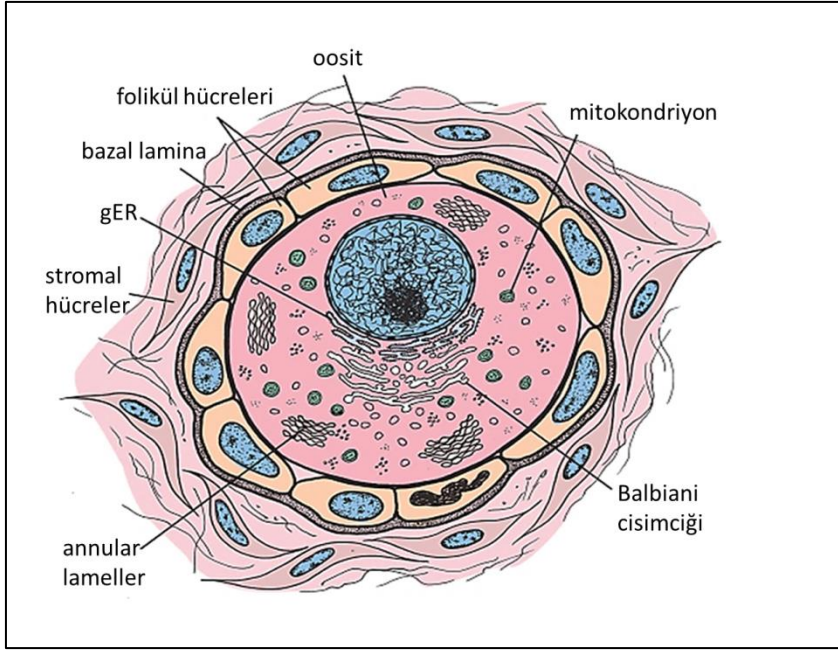
aralıklarla yapılan hazırlıklar olarak kabul edilen bu değişimlere *menstrual döngü* denir [47,48].

Kalınlaşan uterus endometriyumu'nun vaginal kanama (menstruasyon) yoluyla atılması ile özelleşmiş olan ve ortalama 28 günde bir yinelenen bu döngünün ilk 14 günü folliküler evre (preovulatuvar evre), ikinci 14 günü luteal evre (postovulatuvar evre) olarak adlandırılır. Graaf folikülünden sekonder oositin atılması süreci olan ovulasyon ise yaklaşık olarak 14. günde olaylanır.

Hipotalamus - Hipofiz - Ovaryum döngüsünün düzgün çalışması menstrual döngü için esastır [49].

Menstrual döngü sürecinde ovaryum'daki değişiklikler gonadotropinlerin etkisiyle düzenli bir şekilde sürer. Gonadotropin salgısının düzenlenmesinde ise hipotalamus kilit konumdadır. Hipotalamus bu düzenleme işini, portal hipofiz damarına belli aralıklarla (nabızsal olarak 90 dakika) patlamalar şeklinde salgıladığı, saflaştırılmış bir dekaeptit olan "GnRH" ile sağlar [48].

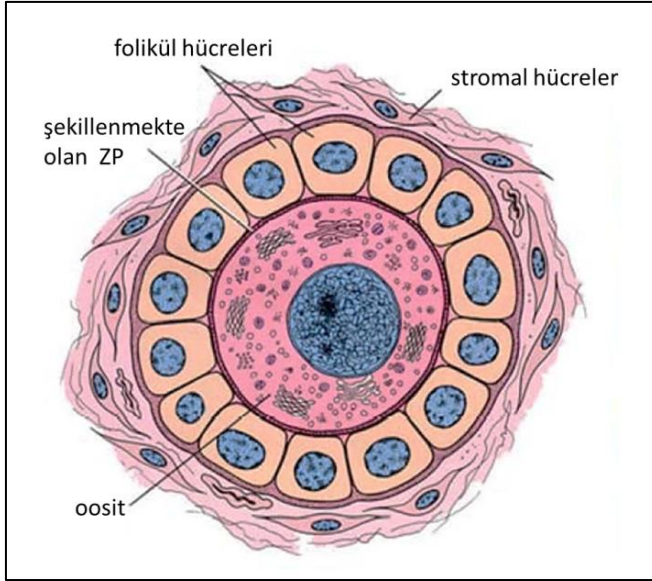
Puberte öncesinde, gonadotropinlerce uyarılmayan ovaryumlar inaktif durumdadır. Bu evrede oositler, ovaryum'larda tek kat granüloza hücreleriyle kuşatılmış olan *primordiyal folliküller* halinde bulunurlar. Folikül gelişiminin en erken aşaması olan ve olgun ovaryumda tunika albuginea'nın hemen altında, korteks stroması içinde yerleşmiş olan primordiyal folikül'de, folikül hücreleri birbirlerine desmozomlar ile tutunurlar ve stromadan çevrelerini saran bazal lamina ile ayrılırlar. Folikül içindeki oosit'in çapı ise, bu aşamada yaklaşık 25µm'dur. Oositte çekirdek ökromatik yapıda ve eksantirik konumludur. Bir ya da daha fazla sayıda çekirdekçik içerir. Ooplazma olarak isimlendirilen oosit sitoplazması, golgi kompleksi veziküllerini, endoplazmik retikulum tubuluslarını, mitokondriyonları ve lizozomları kapsar [33,50].



Şekil 2.4. Primordiyal folikülün şematik görünümü [51]

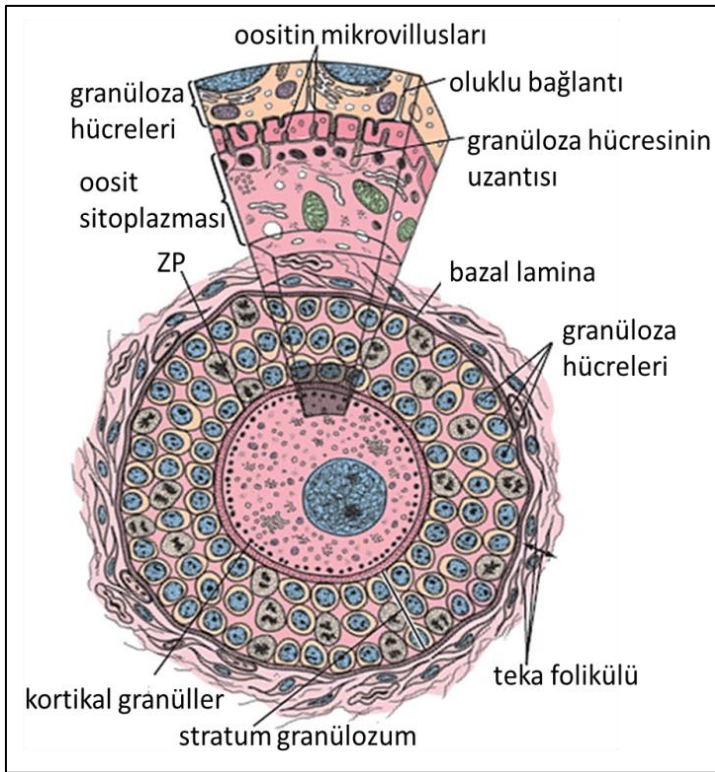
Embriyonik dönemde primordiyal foliküller içindeki primer oositlerin tamamı, birinci mayoz bölünmeye başlarlar. Ancak, bölünmenin metafaz ile devam etmesi gerekirken, primer oositler birinci mayoz bölünmenin profaz evresinde puberteye kadar dinlenme halinde kalırlar. Puberte sonrasında ise, hipofiz bezi ön lobundan salınan FSH'n etkisiyle her ovaryum döngüsünde 5 - 15 arasında değişen sayıda primordiyal folikül büyümeye başlar. Primordiyal folikül büyüyen folikül evresine geldiğinde oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada bazı değişiklikler olaylanır.

Pubertenin başlamasıyla, büyümenin ilk belirtisi, 100 - 150 μm çapına ulaşan primer oositi çevreleyen tek katlı, yassı folikül epitel hücrelerinin kübikleşmesidir. Bu aşamadaki follikül *tek katmanlı (erken/unilaminar) primer folikül* olarak isimlendirilir.



Şekil 2.5. Tek tabakalı primer folikülün şematik görünümü [51]

İlerleyen aşamalarda folikül hücreleri hızlı mitoz bölünmelerle çoğalırlar ve *çok katmanlı (geç/multilaminar) primer folikül* oluşur. Çoğalan folikül hücrelerine *granüloza hücreleri*, oluşturdukları katmana ise *granüloza katmanı* denir. Granüloza hücreleri bir bazal lamina üzerine otururlar [52,53].



Şekil 2.6. Çok tabakalı primer folikülün şematik görünümü [51].

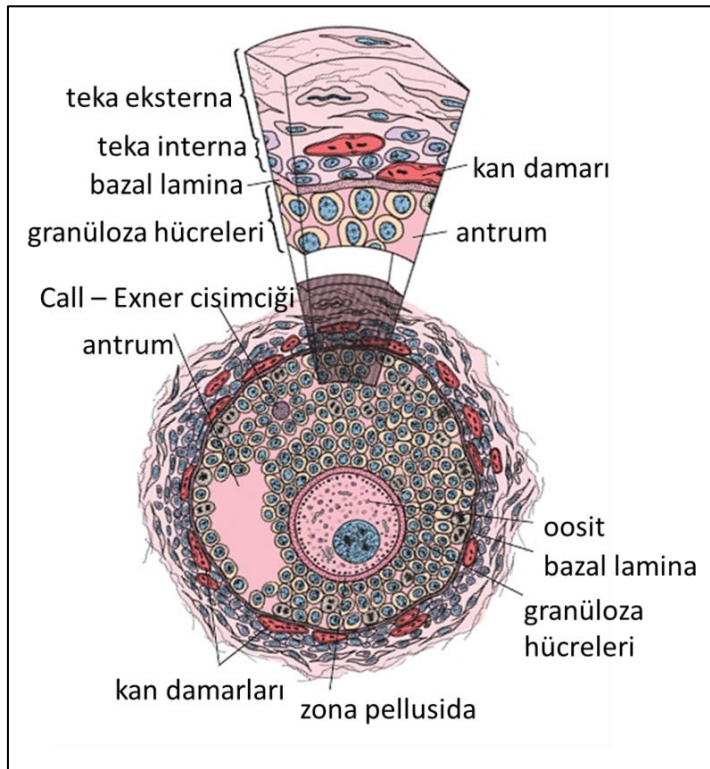
Oosit olgunlaşırken organel dağılımı da değişir. Serbest ribozomların, mitokondriyonların, küçük veziküllerin ve düz endoplazmik retikulum tubuluslarının sayısı artar. Seyrek olarak yağ damlacıkları ve lipokrom pigmentine de rastlanabilir [52,53]. Bu evrede primer oosit, *zona pellusida (ZP)* denilen, oositi çevresindeki folikül hücrelerinden ayıran, glikozaminoglikan ve glikoproteinlerden zengin bir katman oluşturur [51]. Folikül hücreleri tek katlı kübik hücrelere dönüştüğünde ve oosit'in çapı 50 - 80 µm'ye ulaştığında, ışık mikroskopunda görülebilen zona pellusida homojen, asidofilik, PAS (+) ve oldukça iyi boyanan jel kıvamında bir yapıdır. Zona pellusida büyümekte olan oosit ve çevresindeki folikül hücrelerince sentezlenir. Granüloza hücrelerinin ince sitoplazmik uzantıları zona pellusidayı deler ve oositin mikrovilluslarıyla temas eder [51].

Zona pellusida; dimerik yapıda olan ZP1, ZP2 ve ZP3 olmak üzere 3 farklı glikoproteinden oluşur. ZP2 ve ZP3 düzenli aralıklarla ZP1 dimerlerince birbirlerine bağlanarak uzun filament kompleksini oluştururlar. ZP3 spermiyum için, bir reseptör olarak görev yapar [33,54].

Bu değişiklikler olurken, bir yandan da folikülü çevreleyen stroma hücreleri *teka folikülü* ismi verilen bağ dokudan bir katman oluşturacak şekilde düzenlenir. Bu katman daha sonra *teka interna* ve *teka eksterna* olarak ikiye ayrılır [54].

Teka interna granüloza hücrelerine komşu iç katmandır. Kübik şekilli salgı hücrelerinden oluşur. Bunlar farklılaşarak steroid üreten hücrelere dönüşürler. LH reseptörü taşıyan bu hücreler, LH uyarımına yanıt olarak östrojen öncülü androjenleri ve ovulasyon öncesi evrede progesteron, az miktarda follikül sıvısı ile az miktarda intrafolliküler FSH salgırlar. Bu hücresel kat salgı hücrelerine ek olarak, fibroblastlar, kollajen lifler ve küçük damarlardan oluşan zengin bir dolaşım ağı içermesiyle tipik bir endokrin organ görünümündedir. Teka eksterna ise korteks stromasına komşu dış katmandır. Fibröz bağ dokusu yapısında olan bu katman içerdiği kollajen lif demetleri ve düz kas hücreleriyle daha çok bir kapsül işlevi görür. İki teka katmanı arasında ve teka eksterna ile ovaryum stroması arasında bulunan sınırlar belirgin olmamasına karşın, teka interna ile granüloza hücre katmanı arasında bulunan sınır hücrelerin yapısal olarak farklı olması ve aralarında kalın bir bazal membran bulunması nedeniyle oldukça belirgindir [51].

Multilaminar primer folikülün granüloza hücreleri, hipofiz bezi ön lobu bazofilik hücrelerinden salgılanan FSH'nin etkisiyle çoğalmaya devam eder, ancak eksantrik konumlu ve yaklaşık 125µm çapa ulaşan oosit artık daha fazla büyümmez. Büyümenin baskılanması, granüloza hücrelerince antral sıvıya salınan, 1 - 2 kDa ağırlığındaki bir peptid olan *oosit olgunlaşmasını baskılayan madde* (OMI) tarafından gerçekleştirilir. Granüloza hücre katmanı 6 - 12 hücre katına ulaştığında, granüloza hücreleri arasında içi sıvı dolu boşluklar belirmeye başlar. *Folikül sıvısı* (likör folikülü) ismi verilen sıvı ile dolu bu küçük boşluklar birleşerek *antrum* denilen daha büyük bir boşluğu oluştururlar. Folikül sıvısı, kan damarlarından plazmanın sızmasıyla oluşur ve yerel salgılardaki metabolizma ürünleri ile modifiye hale gelir. Folikül sıvısı hiyaluronat, steroidler, büyüme faktörleri ve gonadotropinlerden zengindir. Bu aşamadaki foliküle *sekonder* ya da *antral folikül* denir.

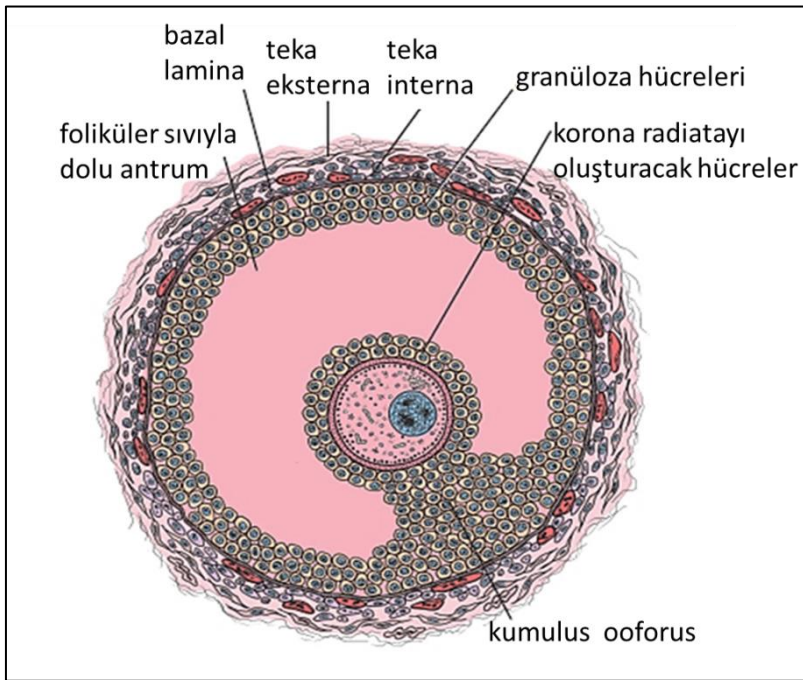


Şekil 2.7. Sekonder folikülün şematik görünümü [51]

Ancak oosit ile bağlantılı oldukları kutupta, oosit çevresinde daha yoğun bir şekilde biriken granüloza hücreleri, antruma doğru uzanan ve kümülüs ooforus denilen bir tepecik oluştururlar. Oositi çevreleyen ve ovulasyonda oosit ile birlikte atılan kümülüs ooforus hücrelerine korona radiata denir. Korona radiata hücrelerinin mikrovillusları zona pellusidayı geçerek oluklu bağlantılar aracılığıyla oositle bağlantı kurarlar ve birlikte *kümülüs oosit bileşkesi* (COC) olarak isimlendirilirler. Belli bir çapa ulaşmış içinde antrum

oluşan foliküller bu aşamadan sonra hormonlara bağımlı hale gelir ve gelişimlerini sürdürebilmek için gonadotropinlere gereksinim duyarlar. Yeterli miktarda hormona etkin kalan foliküller arasında oluşan seçilme sonucu, (canlı türüne göre değişmektedir) insanlar için genellikle bir folikül baskın hale gelerek gelişimini son aşamaya kadar sürdürür.

Folikül gelişiminin son aşaması olan *graaf (preovulatuvar) folikül*, olgun primer oosit içerir. Yaklaşık 10mm ya da daha fazla çapa sahip olan folikül ovaryum korteksinin kalınlığı boyunca uzanır ve ovaryumun dışına doğru çıkıntı yapar. Follikül en büyük boyuta ulaşırken granüloza hücrelerinin mitotik erki azalır. Antrumun genişlemesiyle incelen granüloza hücre katmanında, hücreler arasındaki boşluklar genişler, oosit ve kümülüs hücreleri ile geriye kalan granüloza hücreleri arasındaki bağlar gevşer. Teka katmanı daha belirgin hale gelir. Sitoplazmasında lipit damlacıkları biriken teka interna hücreleri tipik steroid sentezleyen hücre özelliği kazanır [54].



Şekil 2.8. Graaf folikülün şematik görünümü [51]

Döngünün tam ortasında LH miktarının aniden yükselmesiyle;

- Olgunlaşan folikül yüzeyinde yerel bir kabarıklık ortaya çıkar ve bu kabarıklığın tam tepesinde *stigma* denilen damarsız bir alan oluşur.
- Folikül duvarında hızla yeni kan damarları oluşurken, foliküler dokuda artan prostoglandin miktarı ovaryum duvarında yerel kasılmalara neden olur.
- Foliküler sıvısında bulunan plazminojen, granüloza hücreleri tarafından sentezlenen plazminojen aktivator ile plazmine dönüştürülür. Plazmin folikül duvarının dejenerasyonunda proteolitik ajan olarak görev yapar.

Sonuç olarak, folikülün büyümesi ve stigma'nın dejenerasyonu ile folikül yırtılır, yerel kasılmaların da etkisiyle oosit, kümülüs ooforus bölgesinden, etrafındaki bir miktar granüloza hücreleri ile birlikte dışarı atılır ve ovulasyon gerçekleşmiş olur. Ovulasyon ile dışarıya atılan oosit, tuba uterinaların fimbriyalarınca yakalanarak tüp içine alınır. Primer oosit'in birinci mayoz bölünmesi ovulasyondan hemen önce kaldığı yerden devam etmeye başlar ve büyüklükleri farklı, her biri 23 çift (2n DNA) kromozom içeren iki yavru hücre oluşması ile sonuçlanır. Oluşan bu hücrelerden, sitoplazmanın büyük bölümünü içeren ve hacim olarak büyük olan, *sekonder oosit*, çok az sitoplazma içeren ve sekonder oosite kıyasla oldukça küçük olan diğer hücre ise *1. kutup cismi* olarak isimlendirilir.

İnsanlarda mayoz bölünmeyi sürdüremeyen 1. kutup cismi, oosit hücre zarı ile zona pellusida arasındaki perivitellin aralıkta yer alır. Birinci mayoz bölünme sonucunda oluşan sekonder oosit hemen ikinci mayoz bölünmeye başlar. Ancak, bu bölünme metafaz evresinde duraklar. İkinci mayoz bölünme, yalnızca sekonder oosit bir spermiyum ile döllenirse tamamlanır. 2. kutup cismi de bu sırada oluşur. Döllenme gerçekleşmez ise, sekonder oosit ovulasyondan 24 saat sonra dejenere olur

Ovulasyonu izleyen ilk birkaç saat içinde, folikülün duvarında kalan granüloza ve teka interna hücreleri ise yaşamlarını çevredeki damarlar yoluyla sürdürmeye devam ederler. LH'nin etkisiyle, sitoplazmalarında sarımsı bir pigment biriken bu hücreler luteal hücrelere dönüşürler.

Oluşan bu yapıya *korpus luteum* denir. Korpus luteum'un granüloza hücreleri progesteron ve östrojen salgımlarken, Teka interna hücreleri, androstenedion ve testosteron gibi androjenleri salgılar.

Döllenme olmadığında ise korpus luteum ovulasyonu izleyen 7. - 8. günde en büyük boyutuna ulaşır, bu aşamadan sonra luteal hücrelerin dejenerasyonu ile giderek küçülür, salgı işlevi azalır, lipid özelliğini yitirir ve *korpus albicans* denilen skar dokusu haline gelir. Bu sırada korpus luteumun dejenerasyonu ile östrojen ve progesteron düzeyleri azaldığından menstrüasyon başlar.

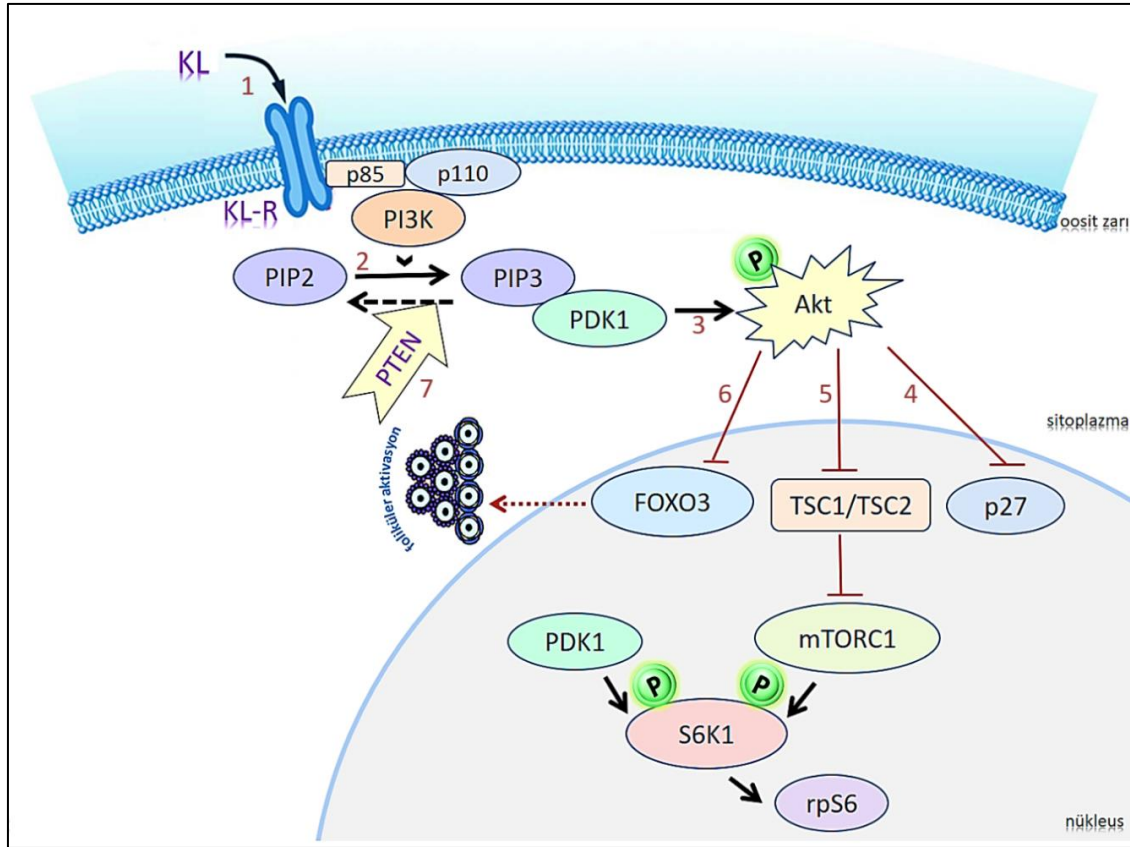
Gebelik gerçekleşirse, korpus luteumun dejenerasyonu, gelişmekte olan embriyonun sinsitiyotrofoblast hücrelerince salgılanan ve LH ile benzer özelliklere sahip olan *human koryonik gonadotropin* (hCG) hormonu tarafından engellenir. Böylece korpus luteum büyümesini sürdürür ve gebelik korpus luteumuna dönüşür. 4. ayın sonuna değin progesteron salgılamaya devam eden bu yapı, 4. aydan sonra yavaş yavaş dejenere olur.

2.4. Primordiyal Folikül Seçilim Mekanizması

Kadınların üretken dönemi, ovaryumdaki primordial folikül sayısı tarafından belirlenir. Over rezervini temsil eden primordiyal folikülün popülasyon dinamiklerinin düzenlenmesi, oosit ve somatik hücreler (granüloza hücreleri ve teka hücreleri) arasındaki çok yönlü iletişim ağı ile sağlanır. Bu iletişimde otokrin - parakrin şekilde hareket eden bazı ekstra-hücrel matriks bileşenleri ve büyüme faktörleri rol oynar. Primordiyal foliküllerin dormansitesinin korunması, canlılığı ve aktivasyonu inhibe edici ve aktive edici bazı faktörlerin kontrolü altındadır [55,56]. Bu faktörleri kapsayan hücre içi sinyal yolları henüz tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Ancak, son zamanlarda hem in vitro hem de in vivo çalışmalarda transgenik hayvan modellerini kullanarak oosit büyümesinin ve folikül gelişiminin altında yatan moleküler mekanizma/mechanizmalar aydınlatılmaya çalışılmaktadır [57,58].

Hücre içi PI3K sinyal yolağı bu mekanizmaların en önemlilerinden bir tanesidir [59].

- Bu yolda yer alan sinyal molekülleri ve işleyiş mekanizmaları Şekil 2.9'da özetlenmiştir.



Şekil 2.9. PI3K sinyal yolağının şematik gösterimi [41]

Oositler ve onu çevreleyen granülosa hücreleri arasındaki iletişim büyük ölçüde oosit-yüzey reseptörü *Kit* ve onun bilinen tek ligandı olan *KL* (Kit ligandı) arasındaki sinyalizasyona bağlıdır. Kit, folikül gelişiminin her aşamasında memeli oositlerinin yüzeyinde ifade edilir, KL ise yalnızca granülosa hücreleri tarafından üretilmektedir. Kit ve KL'nin etkileşimi oositin büyümesi, canlılığı ve yumurtalık foliküllerinin erken gelişimi için gerekli olan PI3K sinyal yolağını aktive eder. PI3K sinyal yolağı proliferasyon, canlılık, göç ve metabolizma düzenlenmesi için temel olan kinazlar, fosfatazlar ve transkripsiyon faktörleri içeren çeşitli sinyal moleküllerinden oluşan klasik bir sinyal yolağıdır [59-62].

PI3K sinyal yolağının bileşenleri olan ve folikül popülasyon dinamiklerinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen moleküller temel olarak PI3K, PIP2, PIP3, PDK1, Akt, p27, TSC, mTOR, S6K1, Foxo3 ve PTEN olarak sayılabilir [59,63,64].

Bu moleküler yolakta oluşan bir düzensizlik, primordiyal folikül havuzunun erken aktivasyonuna yol açar. Tüm primordial foliküllerin bu şekilde hızlı ve toplu şekilde

aktivasyonu kaçınılmaz olarak folikül havuzunun erken tükenmesine ve prematür over yetmezliği'ne (POF) ve erken menopoza neden olur [65-67].

PI3K sinyal yolağının işleyiş mekanizması numaralandırılmış şekilde özetlenmiştir;

1. Memelilerde, PI3K (fosfatidilinositol-3 Kinaz) sinyal yolağı insülin ve büyüme faktörleri gibi hücre dışı sinyaller tarafından uyarılır [63-64].
2. KL ile etkileşen Kit, PI3K'nin p85 alt biriminine bağlanarak PI3K'yi aktive eder. Kendisi de bir lipid kinaz olan PI3K, PIP2'yi (fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat) fosforile ederek onu PIP3'e (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat) dönüştürür [68].
3. PIP3 ise ikinci mesajcı gibi davranarak PDK-1 (phosphoinositide-dependent kinase-1) ve Akt'yi (protein kinase B) birbirine kenetler [68].

PI3K sinyal yolağının önemli bir molekülü olan Akt,

4. Siklin bağımlı kinaz (cdk) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörlerini (p27) negatif olarak denetleyerek hücre döngüsünü düzenler. p27 primordiyal folikülden primer foliküle geçişteki en önemli baskılayıcılardan birisidir. p27, TGF- β gibi sinyallere yanıt olarak ifade edilir ve hücre siklusunun G1 fazında tutuklu kalmasından sorumludur [42].
5. Akt memelilerde, TSC1 ve TSC2'nin (tuberous sklerosis complex 1 ve 2) fosforilasyonunu düzenler [69]. mTOR (mammalian target of rapamycin), protein sentezi ve hücre büyümesini düzenleyen serin/treonin kinazdır. mTORC1 ve mTORC2 olarak iki formu bulunan bu kinaz TSC denilen kompleks bir molekül tarafından negatif olarak kontrol edilir. TSC1 ve TSC2 olmak üzere iki molekül içeren heterodimerik kompleks bir yapı olan TSC primordiyal foliküllerin sessizliği ve aktivasyonunun düzenlenmesinde rol oynamaktadır [70]. S6K1, mTORC1'in ana substratıdır. TSC1 ve TSC2, S6K1'in mTORC1 tarafından fosforilasyonunu inhibe ederler, böylece primordiyal foliküllerin aktivasyonu engellenir [70,71].
6. Akt memelilerde, FOXO transkripsiyon faktörlerini de fosforile edebilir, böylelikle bu faktörlerin apoptotik transkripsiyonel aktivitelerinin inhibisyonuna neden olur.

2.4.1. FOXO (forkhead box O)

FOXO transkripsiyon faktörleri çatal başlı protein ailesindendir. Bu aile 2 büyük halka ya da kanatlar ile 3 α heliks yapısı içeren, 100 aminoasitlik DNA bağlanma bölgelerine sahip

olması nedeniyle ‘çatal başlı’ olarak adlandırılır [72,73]. FOX ailesi 44 farklı üyeden ve A’dan S’ye kadar isimlendirilmiş 19 alt gruptan oluşur. ‘O’ alt grubunun FOXO1, FOXO2, FOXO3 ve FOXO4 olmak üzere 4 üyesi vardır. FOXO transkripsiyon faktörleri ailesinin 3 üyesinin (FOXO1, FOXO3 ve FOXO4) mRNA’ları tüm memeli dokularında çeşitli oranlarda ifade edilir [74].

FOXO3 primordial foliküllerde oosit çekirdeğinde yüksek düzeyde ifade edilir. Bu ifadelenme düzeyi büyüyen foliküllerde giderek azalır. FOXO ailesinin hücre döngüsünün durdurulması, DNA tamiri ve ROS detoksifikasyonu, hücre ölümü ve hücre farklılaşması gibi birçok hücresel işlevleri bulunmaktadır [75-78].

FOXO3 transkripsiyon faktörü, farelerde yumurtalık rezervinin korunması için gereklidir. Farelerde FOXO3’ün azalan ifadesinin, primordial foliküllerde apoptozu indüklediği böylece ovarial rezervi azalttığı bilinmektedir [79].

7. PTEN ise, PI3K sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir ve primordial folikül havuzunun korunmasında kritik öneme sahiptir [80-82].

2.4.2. PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten)

10’uncu kromozoma yakın bir bölgede bulunan, hücre proliferasyonu, canlılığı, göçü ve apoptoz gibi birçok hücresel süreçlerde kritik rol oynayan tümör baskılayıcı bir gendir. PTEN geninde oluşabilecek mutasyonlar otozomal dominant bir sendrom olan ve cilt, bağırsak, göğüs, tiroid tümörleri ile karakterize edilen Cowden hastalığına neden olur. Bu mutasyonlar meme, uterus, tiroid ve beyin tümörleri riskinde de artışa neden olur [63,82].

2.5. Over Rezervi

YÜT uygulamalarında her yaşta dikkate alınması gereken en önemli parametrelerden biri de over rezervidir. Bir kadının sahip olduğu toplam oosit sayısı genetik olarak belirlidir ve bu sayı yaşam boyu giderek azalır. Over rezervi kavramı, ovaryum follikül havuzunun büyüklüğü ve kalitesi anlamında olup, ölçüm için birçok sonografik ve hormonal belirteç kullanılmaktadır [83,84].

Over rezervini değerlendirmede kullanılan bu belirteçler ana başlıklar halinde sıralanabilir;

- Klinik faktörler
 - Yaş
- Bazal kan testleri
 - FSH
 - LH
 - Estradiol
 - Progesteron
 - İnhibin B
 - Antimüllerian hormon
- Dinamik testler
 - Klomifen sitrat yükleme testi (CCCT)
 - Gonadotropin analogu yükleme testi (GAST)
 - Ekzojen FSH over rezerv testi (EFORT)
- Ultrason testleri
 - Antral folikül sayısı (AFC)
 - Over volümü
- Histolojik yöntemler
 - Over biyopsisi

2.5.1. Yaş

Bir kadının sahip olduğu toplam oosit sayısı genetik olarak belirlidir ve bu sayı yaşam boyu giderek azalır. Bu nedenle bir kadının kronolojik yaşı, over rezervi hakkında bilgi edinmenin basit bir yoludur. Genellikle over yaşı kronolojik yaşla paralel olsa da fizyolojik bir süreci temsil ettiğinden, over rezervini değerlendirmede tek başına yeterli değildir.

2.5.2. Bazal kan testleri

Menstrual döngünün erken foliküler evresinde (siklusun 3. günü) kan tahlili ile belirlenen serum FSH ve E2 düzeyleri, over rezervi hakkında bilgi verir. FSH değerinin 10 IU/L'nin üzerinde ve E2 değerinin de 80 pg/ml'nin üzerinde olması, over rezervinin azaldığını

göstetir. Serum FSH düzeyi normal olsa bile FSH/LH oranının artmış olması, kötü over rezervini ifade eder [83,85].

Dimerik ve polipeptit yapıda bir hormon olan inhibin'in A ve B olmak üzere iki farklı alt formu bulunmaktadır. Preantral ve antral foliküllerin granülosa hücrelerinden salgılanan ve negatif feedback etkisi ile FSH'ı baskılayıcı özelliği olan inhibin-B serum düzeyinin siklusun 3. günü, 45pg/ml'den düşük olması over rezervinin kötü olduğunun bir göstergesidir [86].

Over rezervinin belirlenmesinde kullanılan güvenilir belirteçlerden biri de serum AMH seviyesidir. Anti-Müllerian hormon (AMH) veya diğer adı ile müllerian inhibitör faktör (MIF), inhibin ve aktivin glikoproteinlerinin de dahil olduğu Transforming growth faktör-B (TGF- β) ailesine üye olan homodimerik bir glikoproteindir [87]. AMH, preantral ve erken antral foliküllerin granüloza hücreleri tarafından salgılanır. Bu salgılama foliküller FSH'a yanıt verir hale gelinceye kadar (6-8 mm oluncaya kadar) devam eder. Ancak, 8 mm veya üstü foliküllerde, teka hücreleri ve atretik foliküllerde ise salgılanmaz [88]. Primordiyal folikül havuzunun korumasında rol oynayan AMH, ayrıca preantral ve antral foliküllerin FSH duyarlılığını azaltır böylece aşırı folikül gelişimini inhibe ederek folikülogenezde önemli rol oynar [89].

2.5.3. Dinamik testler

Klomifen sitrat yükleme testi (CCCT), siklusun 3. gününde FSH düzeyinin ölçümünden sonra 5-9. günler arası 100 mg klomifen sitrat verilmesidir. Klomifen hipotalamus üzerindeki östrojen reseptörlerini bloke eder ve böylece hipofiz daha fazla FSH ve LH üretimi için uyarılmış olur. Over rezervi normal olan kadınlarda FSH düzeyinin artışı foliküller tarafından salgılanan inhibin-B tarafından baskılanırken, 3. gün veya 10. günde yüksek FSH düzeyi kötü over rezervini ifade eder [90].

GnRH agonist stimülasyon testi (GAST), siklusun 3. gününde GnRH uygulandıktan sonra pituitar FSH ve LH'nin artışına bağlı olarak estradiol seviyesindeki artışın değerlendirilmesini esas alan bir testdir. Ancak, GAST testi pahalı oluşu ve tekrarlayan kan testlerine ihtiyaç duyulması nedeni ile pratikte kullanılan bir test değildir [90].

Ekzojen FSH over rezervi testi (EFORT), siklusun 3. gününde 300 IU rekombinant FSH uygulandıktan 24 saat sonra estradiol ve inhibin-B düzeyindeki artışın değerlendirilmesidir. Ancak, yine bu testin de pahalı olması nedeni ile pratikte kullanılan bir test değildir [90].

2.5.4. Ultrason testleri

Ultrason testleri, over rezervinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir tarama ve tanı yöntemidir. Ultrason testleri içerisinde yer alan antral folikül sayısı (AFC) transvajinal ultrasonografi ile her iki ovaryumdaki erken foliküler fazdaki antral folikül sayısının belirlenmesi yöntemidir. Menstrual döngünün düzenli olduğu kadınlarda siklusun 2. - 4. günlerinde bakılan transvajinal ultrasonografide, antral folikül sayısının 4 - 10 olarak saptanması over rezervinin iyi olduğunun bir göstergesidir [91]. Yaşla birlikte folikül sayısının azalmasına bağlı olarak, ortalama ovaryum volümü de azalır. Bu nedenle, over hacmindeki azalmanın foliküllerin erken tükenmesinin bir göstergesi olabilir. Over volümü 3 düzlemde overlerinin çaplarının ölçülmesi ile hesaplanır [90].

2.5.5. Histolojik yöntem

Over biyopsisi, invaziv bir test olması ve olası zararları nedeni ile günümüz pratiğinde yer bulamamıştır ve kullanılmamaktadır [92].

2.6. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon (KOH)

Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon, yardımla üreme teknikleri dahilinde ovaryumlardan en ideal sayı ve kalitede oosit elde etmek amacı ile aynı döngüde çok sayıda folikülün geliştirilmesi tekniğidir. YÜT uygulamalarında hastaya birden fazla sayıda embriyo transfer edilmesi uygulamalardaki başarı olasılığını arttırmaktadır. Fazla sayıda embriyo elde edebilmenin tek yolu da fazla sayıda oosit elde etmekten geçmektedir.

KOH uygulamalarında fazla sayıda oosit elde edebilmek ereği ile *GnRH-agonist protokol* ve *GnRH-antagonist protokol* olmak üzere iki temel stimülasyon yöntemi kullanılmaktadır.

Agonist protokolde, GnRH analogları (GnRHa) denilen ve gonadotropin salınımını tetikleyen ilaçlar kullanılır. Bu ilaçlar ilk önce yumurtalıklarda aşırı bir uyarıya neden olur.

Ancak, *flare-up* olarak bilinen bu aşırı uyarılma daha sonra gonadotropin duyarsızlığına bağlı olarak güçlü bir baskılanma yaratır. Bu aşamadan sonra folikül gelişimi dışarıdan verilen gonadotropinler ile kontrol altına alınır. Gonadotropin analoglarının uygulama şemasına bağlı olarak, *uzun protokol*, *oral kontraseptif ve uzun protokol*, *stop protokol*, *mikrodoz flare-up* ve *kısa protokol* gibi farklı agonist protokoller geliştirilmiştir [93].

GnRH antagonistlerinin (GnRHant) kullanıldığı *tek doz GnRH-antagonist* ve *multiple doz GnRH-antagonist* protokollerde ise yumurtalıklarda flare-up etkisi oluşturmada, gonadotropin salınımının doğrudan baskılanması hedeflenir. Bu aşamadan sonra folikül gelişimi yine dışarıdan verilen gonadotropinler ile kontrol edilir [94,95].

Gonadotropinler tek başına verildiğinde kişinin kendi vücudundan salgılanan hormonlar nedeniyle foliküller kontrolsüz ve zamansız olarak ovüle olabilir (çatlayabilir). Luteinizan Hormon (LH) artışına neden olan bu duruma *erken luteinizasyon* denir. Erken luteinizasyon kaliteli, olgun oosit elde edilmesi şansını oldukça azalmaktadır. Bu riski en aza indirmek için, muayeneler esnasında kan östrojen düzeyi takibi ve ultrason incelemeleri ile folikül gelişimi takip edilir. Tüm protokollerde amaç, mümkün olduğunca fazla sayıda 14mm'den büyük foliküle ve folikül başına 200 pg/ml östrojen düzeyine ulaşmaktır.

Hedef foliküller yeterli büyüklüğe ulaştığında ise yumurtanın son olgunlaşmasını sağlamak amacıyla 5,000 – 10,000 ünite Human Chorionic Gonadotropin (hCG) (çatlatma iğnesi) enjeksiyonu uygulanır. Çatlatma iğnesinden 32 - 36 saat sonra oosit toplama işlemi (OPU) yapılır [96].

Human menopausal gonadotrophin (hMG) ve follikül stimüle edici hormon (FSH), YÜT uygulamalarında ovaryumların uyarılmasında sıklıkla kullanılan gonadotropin analoglarıdır. hMG menopozdaki kadınların idrarlarından elde edilen ve eşit miktarda FSH ve LH hormonları içeren bir maddedir. FSH ise ya bu idrarların ayrıştırılması ile ya da yeni bir teknoloji olan rekombinant teknoloji ile yapay olarak üretilir. Son yıllarda, KOH protokollerinde aromataz inhibitörlerinin (Aİ) kullanımı oldukça popüler hale gelmiştir [97,98]. Aİ, vücutta androjenlerin östrojenlere dönüşümünü inhibe ederek östrojen yapımını azaltmakta ve negatif geribildirim mekanizması ile endojen gonadotropinlerin düzeylerini arttırmaktadır. Aİ'nin kullanımı özellikle, kötü over yanıtı olan hastalar, OHSS

ve tromboz riski yüksek olan hastalar ile meme ve endometrium gibi östrojen bağımlı-kanser vakalarında tercih edilmektedir [99].

Çalışmamızda kullanacağımız ajan olan *gebe kısırak serum gonadotropin (PMSG)* ise kısıraklarda endometriumdan gebeliğin 40. ve 150. günleri arasında salınan, serum gonadotropini olarak da bilinen 68,000 dalton ağırlığında bir hormondur. Prolaktin hormonu yapısında olan PMSG'nin yarılanma ömrü yaklaşık 25 saattir ve FSH benzeri etkilerinin yanısıra LH'ın da bazı etkilerini göstermektedir. Yapılan çalışmalarda PMSG hormonu, özellikle ovarian hiperstimülasyon uygulamalarında, yarılanma ömrünün çok daha uzun olması ve tek enjeksiyonun yeterli olması nedeniyle FSH'a oranla daha çok tercih edilmektedir [100].

PMSG'nin preovulator folliküllerin atrezi oranlarını azaltıp antral folliküllerin gelişmesini stimule ederek folliküllerdeki östrojeniteyi artırdığı bu sayede östrüs ve ovulasyonların insidansını yükselttiği, izleyen diöstrüste plazma progesteron konsantrasyonunda artış sağladığı bildirilmektedir [101]. Bu etkileri ve daha sık kullanımı nedeniyle bizim çalışmamızda da PMSG tercih edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneysel Yöntem

Bu deneysel çalışma, Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun *G.Ü.ET-17.027* kod numaralı onayı ile gerçekleştirilmiştir. Çalışmamızda kullanılan genç dönemlerindeki (8 haftalık) 18 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan, *Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezi'nden (GÜDAM)* temin edilmiştir.

Deney öncesinde, vajinal smear örnekleri alınarak 3-5 döngü süresince izlenen ve ovaryan siklusları düzenli olan sıçanlar çalışmaya dahil edilmiştir. Tüm denekler, deney süresince 12 saat gündüz ve 12 saat gece döngüsü uygulanan, $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik denetimli sıcaklıktaki laboratuvarda tutulmuştur. Özel kafeslere yerleştirilen tüm deneklerin su ve besine serbest erişimi sağlanmıştır.

Deney hayvanları, her grupta 6 denek olacak şekilde rastgele seçilerek üç farklı gruba ayrılmıştır.

- Kontrol grubu (K): (n=6)
- Deney-1 (D1): 3 tekrar KOH uygulanan deney grubu (n=6)
- Deney-2 (D2): 5 tekrar KOH uygulanan deney grubu (n=6)

3.1.1. Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolü

Bu çalışmada dişi sıçanlarda folikülogenezi stimüle etmek için, FSH analogu olan *Pregnant Mare's Serum Gonadotropin* (PMSG, Cat: HOR-272, Prospec) ve ovulasyonu indüklemek için, LH analogu olan *Human Chorionic Gonadotropin* (hCG, Cat: C1063-1VL, Sigma) kullanılmıştır. Kontrol grubundaki deneklere ise, aynı stresi yaşatmak ereğiyle, PMSG yerine 0,1ml 0,9% NaCl çözeltisi ve bu uygulamadan 48 saat sonra hCG yerine yine 0,1ml 0,9% NaCl çözeltisi verilmiştir.

Gonadotropinlerin hazırlanışı ve uygulanması

PMSG ve hCG her uygulama öncesinde steril enjeksiyonluk su içerisinde 100 I.U./ml olacak şekilde çözülmüştür. Enjeksiyonun yapılacağı gün hazırlanan bu stok solüsyonlar deney gruplarına aşağıda belirtilen şekilde uygulanmıştır.

Kontrol grubu (K):

Protokolün ilk günü, deneklere 0,1ml 0,9% NaCl solüsyonu ve bu işlemten 48 saat sonra yine 0,1ml 0,9% NaCl solüsyonu verilmiştir [102]. Bu işlem toplamda 5 kez tekrarlanmıştır. Her uygulama arasında 1 hafta süre verilmiştir [103].

Deney-1 (D1): 3 tekrar KOH uygulanan deney grubu

Protokolün ilk günü, deneklere 10 IU/0,1ml PMSG ve bu işlemten 48 saat sonra 10 IU/0,1ml hCG uygulanmıştır [104]. Bu hiperstimülasyon işlemi, toplamda 3 kez tekrarlanmış ve her uygulama arasında 1 hafta süre verilmiştir [103].

Deney-2 (D2): 5 tekrar KOH uygulanan deney grubu

Protokolün ilk günü deneklere 10 IU/0,1ml PMSG ve bu işlemten 48 saat sonra 10 IU/0,1ml hCG uygulanmıştır [104]. Bu hiperstimülasyon işlemi, toplamda 5 kez tekrarlanmış ve her uygulama arasında 1 hafta süre verilmiştir [103].

Tüm uygulamalar her hafta aynı gün ve saatte, insülin iğnesi kullanılarak arka bacağı kas içi enjeksiyon ile uygulanmıştır. Deneklerde kas dokusu harabiyetini engellemek amacıyla enjeksiyonlar her hafta farklı taraftan yapılmıştır. Tüm gruplarda denekler, son uygulamayı takip eden 7. günde kurban edilmiştir.

Deney bitiminde, yüksek doz anestezi altında feda edilen deneklerin kan örnekleri ile birlikte ovaryum dokuları alındı. Deneklerden alınan kan örnekleri 3000 rpm'de +4°C'de 10dk santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı, elde edilen serum örnekleri küçük porsiyonlar halinde polipropilen tüplere konuldu ve analizler yapılana kadar -20°C'de saklandı. Ovaryum dokuları ise ışık mikroskopik incelemeler için, kuru ağırlıklarının tartılmasının ardından %10'luk nötral formaldehit solüsyonu içerisine konuldu.

3.2. Işık Mikroskopik Yöntemler

3.2.1. Doku takibi ve gömme

- %10'luk nötral formaldehit solüsyonunda 72 saat tespit edilen doku örnekleri, 24 saat akarsuda yıkanarak tespit maddesinden arındırıldı.
- Dokular fazla suyun uzaklaştırılması için sırasıyla %70'lik, %80'lik, %90'lık, %96'lık ve %100'lük artan etil alkol serisinden geçirildi.
- Dehidratasyon işleminden sonra, dokular ksilolde şeffaflandırılıp, parafine gömüldü.

3.2.2. Kesit alma

- Işık mikroskopik incelemeler için parafin bloklardan mikrotom ile (Leica SM 2000, Germany) 4µm kalınlığında kesitler alındı.
- Kesitlerin 37°C'lik su banyosunda açılması sağlandı.
- Rodajlı ve polilizinli lamalar üzerine alınan kesitler, havada kuruma işleminden sonra histokimyasal ve immunohistokimyasal boyamalar için hazır hale geldi.

3.2.3. Hematoksilen - Eozin (H&E) boyama

- Tüm deney gruplarına ait ovaryum bloklarından rodajlı lamalar üzerine 4 µm kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için, 37°C'lik etüvde bir gece tutulduktan sonra deparafinizasyonu hızlandırmak amacıyla etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi.
- Deparafinizasyon işlemini tamamlamak için kesitler 3 kez 20'şer dk ksilolde bırakıldı.
- Dehidratasyon için sırasıyla %100, %90, %80, %70 ve %50'lik azalan etil alkol serisinde 10'ar dk tutuldu.
- Kesitler 10 dk akan musluk suyu ile yıkanarak alkolün uzaklaştırılması sağlandı.
- 10 dk Harris hematoksilen boya solüsyonu içinde tutulan kesitler, daha sonra akan musluk suyu altında 10 dk yıkandı.
- Kesitler, 3 damla glasiyel asetik asit ile %70 alkol karışımı olan solüsyona 2-3 kez batırılıp çıkarıldı ve akan musluk suyu altında 10 dk yıkandı.
- 10 dk Eosin boya solüsyonu içinde tutulan kesitler daha sonra yine akan musluk suyu altında 10 dk yıkandı.

- Dehidratasyon işlemi için sırasıyla %50, %70, %80, %90 ve %100'lük artan etil alkohol serilerinden hızlıca geçirilen ve 45 dk ksilolde bekletilen kesitler entellan ile kapatıldı.
- Hazırlanan kesitlerden Leica DM 4000B (Germany) Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda elde edilen görüntüler, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi.

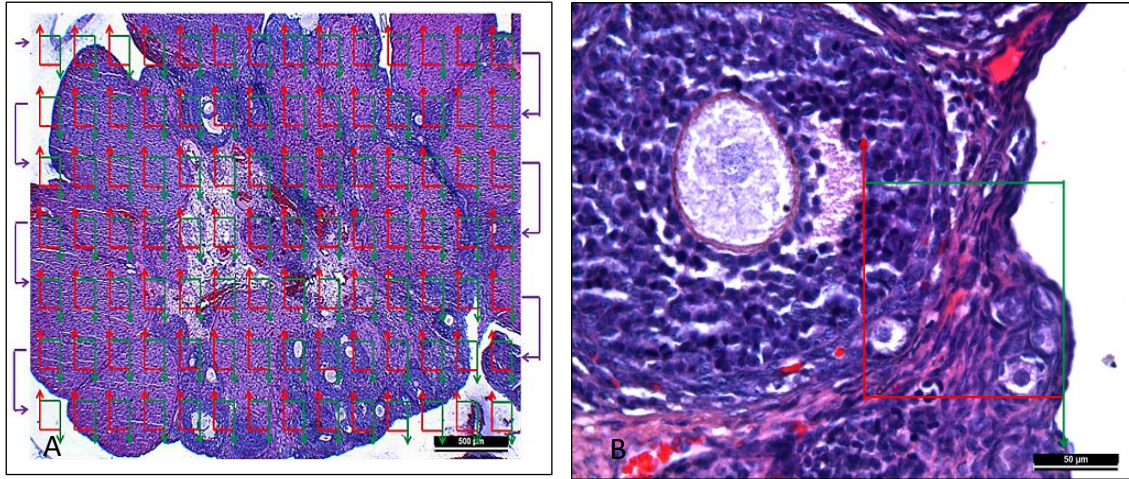
Folikül tanımlaması ve değerlendirmesi

Foliküllerin morfolojik sınıflandırılması Ross'a göre yapıldı [51]. Buna göre; primer oositi çevreleyen tek tabaka yassı granüloza hücrelerinin gözlendiği foliküller; *primordiyal folikül*, primer oositi çevreleyen tek tabaka kübik granüloza hücrelerinin gözlendiği foliküller; *tek tabakalı primer folikül*, görünür bir antruma sahip olmayan ve birden fazla granüloza hücre katmanına sahip olan foliküller; *çok tabakalı primer folikül*, bir veya iki küçük antrum içeren ya da tek bir büyük antral boşluğa sahip olan foliküller ise; *antral folikül* olarak tanımlanırken, tek bir büyük antrum içeren ve oositi çevreleyen kümülüs hücrelerinin belirgin olduğu foliküller ise; *graaf folikül* olarak tanımlandı [105,106]. Buna ek olarak, oositin yoksun olan, geniş bir antral kaviteye sahip, görünüşte sağlıklı hücrelerden oluşan ince ve çoğunlukla tek tabakalı bir granüloza hücre tabakası içeren yapılar ise *kistik foliküller* olarak tanımlandı [107].

Ovaryum folikül sayımı için kullanılan stereoloji yöntemi

Çalışmamızda, ovaryum foliküllerinin sayısı fiziksel disektör yöntemi kullanılarak belirlendi. Bu amaçla, her bir deneğe ait ovaryum bloğundan 4µm kalınlığında alınan ve H-E ile boyanan seri kesitler ½ örnekleme oranı ile disektör çiftlerine ayrıldı. Bu kesit çiftlerinden birisi "örnek" diğeri "gözlem" kesit olarak kabul edildi. Disektör çiftlerini oluşturan iki kesit arasındaki adım aralığı ise 4µm olarak belirlendi. Sistemik rasgele örnekleme (SRÖ) yöntemine göre seçilen kesitler fotoğraflanarak bilgisayara aktarıldı. Foliküllerin sayımı bilgisayar monitöründe "Powerpoint" programı kullanılarak yapıldı. Eşdeğer sayım alanları fotoğraf üzerinde yan yana görüntülendikten sonra, üzerlerine yine bu programda hazırlanan tarafsız sayım çerçevesi yerleştirildi.

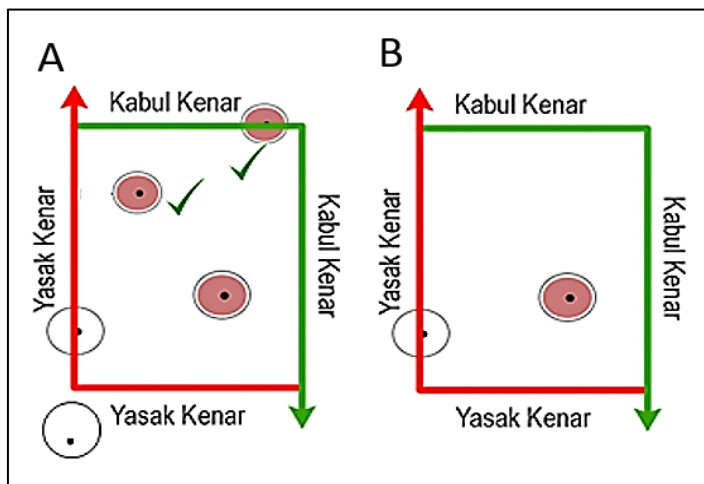
Tarafsız sayım çerçevelerinin yerleştirilmesi işlemi x4 objektif büyütmesinde, sayım işlemleri ise x40 objektif büyütmesinde gerçekleştirildi.



Resim 3.1. A. Tarafsız sayım çerçevesinin yerleştirilmesi, B. Sayım işlemi

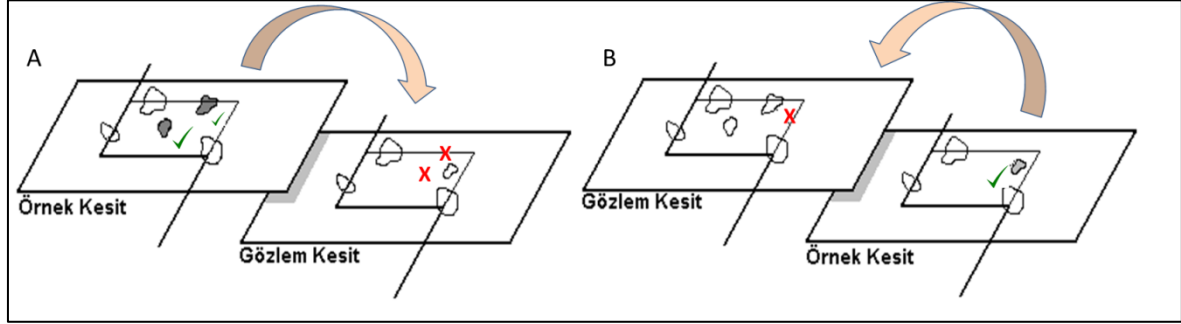
Foliküllerin sayımı, tarafsız sayım çerçevesinin sayım kurallarına göre yapıldı. Buna göre;

- Çerçevenin "kabul" çizgileri olarak ifade edilen "sağ" ve "üst" kenarlarına temas eden veya tamamen çerçeve içerisinde kalan, oosit çekirdeğinin net olarak izlendiği foliküller sayıma dahil edildi.
- Çerçevenin "yasak" çizgileri olarak ifade edilen "sol" ve "alt" kenarlarına temas eden ve bu kenarların dışında kalan foliküller ise sayıma dahil edilmedi.
- Çerçevenin "yasak" çizgilerinin uzantıları ile kesişen foliküller de sayıma dahil edilmedi [108,109].



Şekil 3.1. Tarafsız sayım çerçevesinde sayım kurallarının şematik gösterimi

- Örnek kesitte gözlenip, gözlem kesitte görünmeyen folikül izdüşümleri disektör partikülü olarak değerlendirildi ve sayıma dahil edildi. Bununla birlikte, çalışmanın etkinliğini artırmak amacıyla disektör çiftlerindeki örnek ve gözlem kesitlerin rolleri değiştirildi. Buna göre; örnek kesit olarak kullanılan kesit gözlem, önceki gözlem kesiti ise yeni örnek kesit olarak değerlendirilerek çift yönlü bir sayım yapıldı.



Şekil 3.2. Örnek kesit ve gözlem kesit uygulamalarının şematik gösterimi

Toplam Folikül Sayısının Hesaplanması

Tarafsız sayım çerçevesi kuralları dahilinde tamamlanan sayım işlemleri sonrasında, her bir deneye ait toplam folikül sayısını hesaplamak amacıyla öncelikle Cavalieri prensibi kullanılarak ovaryum hacim hesaplaması yapıldı. Daha sonra aşağıda belirtilen formül kullanılarak toplam folikül sayısı belirlendi. Buna göre;

$$\sum V(ref) = t \times \sum P \times a(p)$$

$$N = \frac{\sum Q^-}{h \times \sum a(\text{cer})} V(ref)$$

Bu formülde; N, toplam folikül sayısını; Q⁻, sayılan folikül sayısını; h, her kesit çifti arasındaki mesafeyi; a(çer), tarafsız sayım çerçevesinin alanını; V(ref), çalışılan yapının toplam (veya referans) hacmini; P, nokta sayısını; a(p) ise tek bir noktanın kesit üzerinde temsil ettiği alanı ifade etmektedir.

3.2.4. İmmunohistokimyal boyama

- Tüm deney gruplarına ait ovaryum bloklarından polilizinli lamalar üzerine 4 µm kalınlığında alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için, 37°C'lik etüvde bir gece

tutulduktan sonra deparafinizasyonu hızlandırmak amacıyla etüv ısısı 57°C'ye çıkarılarak 1 saat daha bekletildi.

- Deparafinizasyon işlemini tamamlamak için kesitler 2 kez 20'şer dk ksilolde bırakıldı.
- Dehidratasyon için sırasıyla % 100, % 96, % 80 ve % 70'lik azalan etil alkol serisinde 10'ar dk tutuldu.
- Kesitler 10 dk akan musluk suyu ile yıkanarak alkolün uzaklaştırılması sağlandı.
- Havada kurutularak dehidrate edilen kesitler alkolden uzaklaştırılmak için 2 kez 5'er dk distile sudan geçirildi.
- Doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla, kesitlere sitrat tamponu (pH 6,0) (Cat: AP-9003-500, Lot: BBI120127, Lab Vision, Fremont, USA) ile mikrodalga fırında retrieval işlemi uygulandı.
- Kesitler, retrieval işleminden sonra, sitrat tamponu içerisinde oda sıcaklığında 20 dk soğumaya bırakıldı.
- Soğuyan kesitler sitrattan arındırılmak için 2 kez 5'er dk distile suda bekletildi.
- Dokuların çevresi PAP-pen ile çevrilerek nemli ortam olmasına dikkat edilen immünohistokimya barına dizildi.
- Dokular 3 kez 3'er dk Phosphate Buffer Saline (PBS, Cat: AP-9009-10, Lab Vision, Thermo Scientific) (Ph:7,4) ile yıkandı. Daha sonra, 15 dk %3'lük hidrojen peroksit (Cat: TA-125-HP, Lot: HP41515, Lab Vision, Fremont, USA) ile etkin bırakıldı. İşlem sonrasında PBS ile lamalar yıkandı.
- Yıkanan lamlara 5 dk UltraV block (Cat: TA-125-UB, Lot: AUB161208AI, Lab Vision, Thermo Scientific) uygulanarak, özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemten sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi.
- Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan, Ab diluent (Cat: TA-125-UD, Lot: HD41390, Lab Vision, Thermo Scientific) ile 1/100 oranında hazırlanan PTEN (Cat: ab31392, Lot: GR62840-19, Abcam), FOXO3 (Cat: ab23683, Lot: GR314636-1, Abcam), LH-R (Cat: bs-6431R, Lot:AD080753, Bioss) primer antikorlarına etkin bırakıldı ve bu kesitler +4 derecede 1 gece inkübe edildi.
- Primer antikordan sonra lamalar 3 kez 3'er dk PBS ile yıkandı.
- Yıkamanın ardından 10 dk biotinli sekonder antikor (Cat: TP-125-BN, Lot: PBN170512AB, Lab Vision, Thermo Scientific) uygulandı.

- Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra dokular 10 dk streptavidin peroksidaz enzim (Cat: TS-125-HR, Lot: SHR170413AC, Lab Vision, Thermo Scientific) kompleksine etkin bırakıldı. İşlem sonrasında dokular yine 3 kez 3'er dk PBS ile yıkandı.
- Yıkanan dokulara, DAB kromojen (Cat: TA-125-HD, Lot: HD39609, Spring Bioscience) uygulandı. Yaklaşık 5-10 dk bekletildi ve gözle görülebilir immün tepkimenin ortaya çıkması sağlandı.
- Zemin boyası olarak Mayer'in hematoksilen'i kullanıldı.
- Boyanan kesitler azalan etil alkohol serilerinden hızlıca geçirildi. Daha sonra, 20 dk ksilolde bekletildi ve entellan ile kapatıldı.
- Hazırlanan kesitlerden Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda elde edilen görüntüler, Leica Q Vin 3 programında değerlendirildi.

H-Score Analizi

İmmunohistokimyasal boyamalar sonrasında, ovaryum dokusuna ait kesitlerde PTEN, FOXO3 ve LH-R proteinlerinin immünreaktivitesinin yoğunluğunu belirlemek için H-Score yöntemi kullanıldı. Buna göre; her bir deneğe ait ovaryum dokusundan 5µm kalınlığında alınan ve belirtilen primer antikolar ile immunohistokimyasal olarak boyanan kesitlerden 1 merkez ve 5 perifer olmak üzere rastgele 6 bölge seçildi. Seçilen bölgelerde ışık mikroskobu altında, "40x" büyütmede kesit düzleminde bulunan, foliküler yapılardaki immünreaktivite yoğunluğu aşağıda belirtilen semi-kantitatif puanlama sistemi ile belirlendi [110];

[0 (0%, *boyanma yok*), +1 ($\leq 30\%$, *zayıf boyanma*), +2 (30% - 60%, *orta şiddetli boyanma*) ve +3 ($> 60\%$, *yoğun boyanma*)]

Hesaplama için aşağıda belirtilen formül kullanıldı;

$$\sum P_i (i + 1)$$

Bu formülde; i, boyanma yoğunluğu skorunu; P_i ise, boyanan hücrelerin yüzdesini ifade etmektedir.

3.3. ELISA Yöntemi

3.3.1. Kan örneklerinde FSH, LH ve E2 tayini

FSH, LH serumlarının hazırlanması

Deneklerden alınan kan örnekleri 3000 rpm'de +4°C'de 10 dk santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı. Ayrıştırılan serum örnekleri küçük porsiyonlar halinde polipropilen tüplere konuldu ve analizler yapılana kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Serum FSH, LH düzeylerinin belirlenmesi

Elde edilen serum örneklerindeki protein düzeylerini belirlemek amacıyla, Serum FSH (Cat: E-EL-R0391, Lot:AK0017SEP22050, Elabscience Biotechnology Inc/United States), LH (Cat: E-EL-R0026, Lot:AK0017SEP18050, Elabscience Biotechnology Inc/United States) rat ELISA kitleri kullanıldı.

- 96 kuyucuklu mikrolakanın bir kuyucuğu kör olarak kullanılmak üzere boş bırakıldı.
 - 6 kuyucuğa 100µl farklı konsantrasyonlardaki standart solüsyonlar eklendi. Standartlar solüsyonlar FSH için; 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 0 ng/mL, LH için; 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0 mIU/mL konsantrasyonlarda hazırlandı. Diğer kuyucuklar ise serum örnekleri için kullanıldı.
 - Her bir kuyucuğa (kör hariç) 100µl serum örneği koyuldu ve 90 dk 37°C'de inkübe edildi.
 - Kuyucuklardaki solüsyon tamamen aspire edildikten sonra 100µl biyotin işaretli antikor tüm kuyucuklara eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
 - Kuyucuklara 350µl yıkama solüsyonu eklenerek 3 kez yıkandı.
 - 100µl Avidin - HRP konjugatı konuldu. 30 dk 37°C'de inkübe edildi.
 - Kuyucuklardaki solüsyonlar aspire edildikten sonra 350µl yıkama solüsyonu eklendi ve 5 kez yıkandı.
 - Tüm kuyucuklara 90µl substrat eklendi. 37 °C'de 15 dk karanlıkta inkübe edildi.
 - 50µl durdurma solüsyonu eklendi ve mikrolaka okuyucuda 450nm'de absorban değerleri okunarak veriler analiz edildi.
- * FSH için analiz aralığı: 3,13 -200 ng/mL, sensitivite: 1,88 ng/mL, CV <%10

* LH için analiz aralığı: 1,56 -100 mIU/mL, sensitivite: 0,94 mIU/mL, CV <%10

E2 serumlarının hazırlanması

Deneklerden alınan kan örnekleri 3000 rpm'de +4°C'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatantları ayrıldı. Ayırıştırılan serum örnekleri küçük porsiyonlar halinde polipropilen tüplere konuldu ve analizler yapılabilmek için -80 °C'de muhafaza edildi.

Rat serum E2 düzeylerinin belirlenmesi

Elde edilen serum örneklerindeki protein düzeylerini belirlemek amacıyla, Serum E2 (Cat: E-EL-R0065, Lot:AK0017SEP18051, Elabscience Biotechnology Inc/United States) rat ELISA kiti kullanıldı.

- 96 kuyucuklu mikrotiplerin bir kuyucuğu kör olarak kullanılmak üzere boş bırakıldı.
- 6 kuyucuğa 100µl farklı konsantrasyonlardaki standart solüsyonlar eklendi. Standartlar solüsyonlar E2 için; 1500, 700, 300, 150, 40 ve 0 pg/mL konsantrasyonlarında hazırlandı. Diğer kuyucuklar ise serum örnekleri için kullanıldı.
- Her bir kuyucuğa (kör hariç) 100µl serum örneği koyuldu ve 90 dk 37°C'de inkübe edildi.
- Kuyucuklardaki solüsyon tamamen aspire edildikten sonra 100µl biyotin işaretli antikor tüm kuyucuklara eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.
- Biotin ve streptavidin-HRP işaretli anti E2 antikor; kromojen reaktif A ve B eklendi.
- 50µl standart ve 50µl streptomisin-HRP eklendi (biotin antikorları standart ile birleşik halde olduğu için biotin antikoruna konulmadı).
- 40µl örnek, ardından 10µl E2 antikor, 50µl streptavidin-HRP eklendi. Sızdırmaz bir film ile kaplanarak karışması için iyice çalkalanan örnek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi.
- Kuyucuklara 350µl yıkama solüsyonu eklenerek 3 kez yıkandı.
- Önce her kuyucuğa 50µl reaktif A, ardından 50µl reaktif B eklendi ve 37 °C'de 10 dk karanlıkta inkübe edildi.
- 50µl durdurma solüsyonu eklendi ve mikrotiplere okuyucuda 450nm'de absorbans değerleri okunarak veriler analiz edildi.

* Analiz aralığı: 40-1500 pg/mL, sensitivite: 25 pg/mL, CV <%15.

3.4. İstatistiksel Analizler

- Sürekli değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu grafiksel olarak ve *Shapiro-Wilk testi* ile incelendi.
- Değişiklikleri tanımlamak amacıyla, ortalama $\pm$ standart sapma; minimum ve maksimum değerler; ortanca (çeyrekler arası genişlik) değerleri kullanıldı.
- Parametrik test varsayımlarını sağlayan değişkenler (tek katlı primer folikül, çok katlı primer folikül, graaf folikül ve kistik yapı sayıları) tek yönlü varyans analizi (*One Way ANOVA*) ile değerlendirildi. *ANOVA* sonucunda fark bulunduğunda, bu farkın kaynağı *Bonferroni post-hoc testi* araştırıldı.
- Non-parametrik değişkenleri gruplar (pTEN, FOXO3 ve LH-R ekspresyonları ile primordiyal folikül, antral folikül sayıları) arasında karşılaştırmak için *Kruskal-Wallis testi* uygulandı. Fark bulunduğunda farklı grubu belirleyebilmek için Bonferroni düzeltilmeli *Mann-Whitney testi* ile *post-hoc* ikili karşılaştırmalar yapıldı.
- İstatistiksel analiz ve hesaplamalar *IBM SPSS Statistics 21* (IBM Corp, NA, USA) ile yapıldı. İstatistiksel olarak $p \leq 0.05$ değeri anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

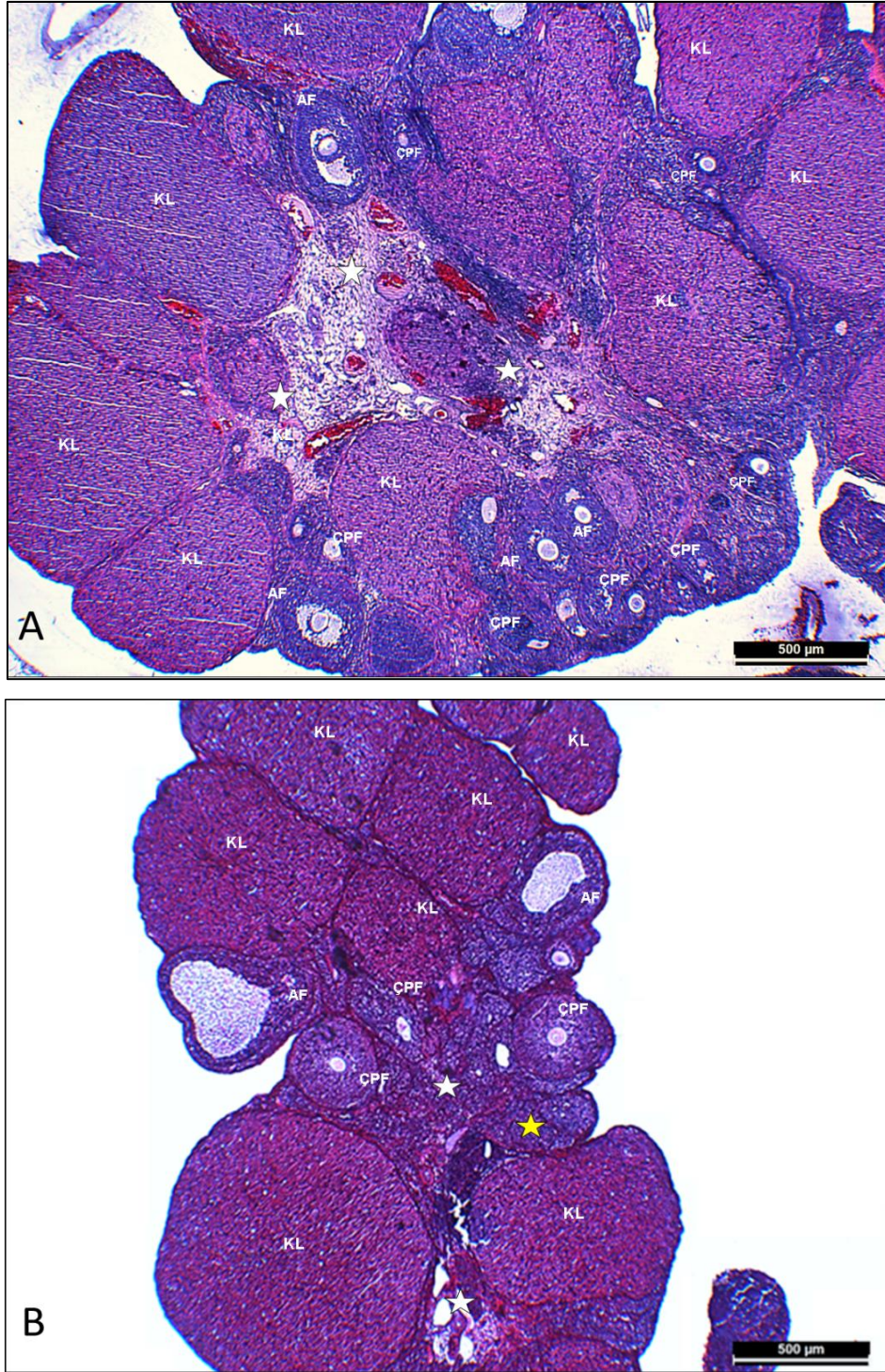
4. BULGULAR

4.1. Işık Mikroskopik Bulgular

4.1.1. Hematoksilen - Eozin (H&E) boyama bulguları

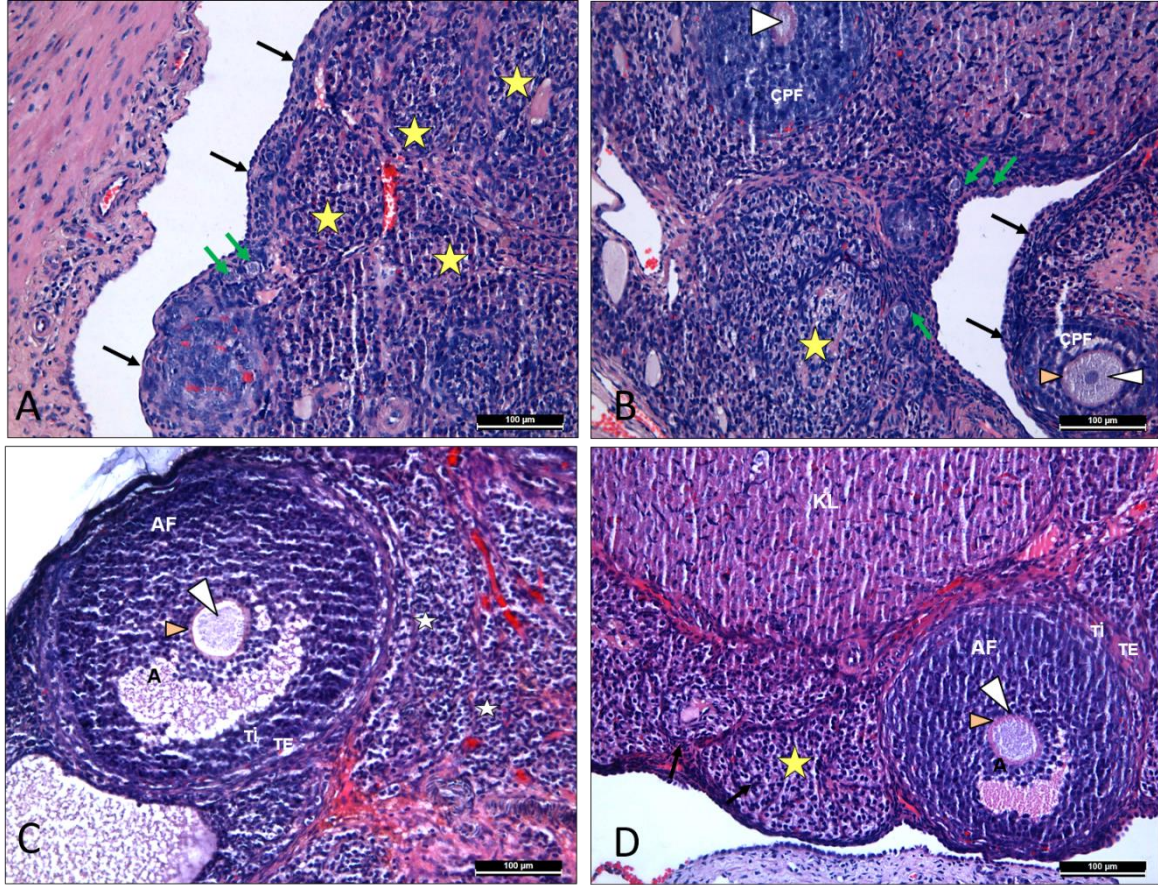
Kontrol grubu (K)

Kontrol grubu'na ait ovaryum kesitlerinde, küçük büyütmede; kortekse yerleşik olan farklı gelişim aşamalarındaki foliküller, korpus luteum ve medulla normal histolojik görünümdeydi. Ovaryumu çevreleyen germinal epitel yer yer alçak boylu kübik yer yer ise yassı epitel hücrelerini kapsamaktaydı. Germinal epitelin altında bulunan ince bağ dokusu, kan damarları ve bağ dokuya ait diğer hücreler ile normal histolojik yapı sergiliyordu. Primordiyal foliküller yalnızca germinal epitel altında değil, çeşitli gelişim aşamalarındaki diğer foliküllerin aralarındaki bağ dokuda da fazla sayıda bulunmaktaydı. Daha büyük büyütmede, sekonder foliküllerin; antrum, zona pellusida, primer oosit ve folikülleri çevreleyen teka interna ve teka eksterna yapıları ile normal histolojik yapılarında olduğu görüldü. Ayrıca, ovaryum korteksinde farklı gelişim aşamalarındaki sağlıklı foliküller ile birlikte az sayıdaki atretik foliküller de belirgin olarak izlendi (Resim 4.1-4.2-4.3-4.4).



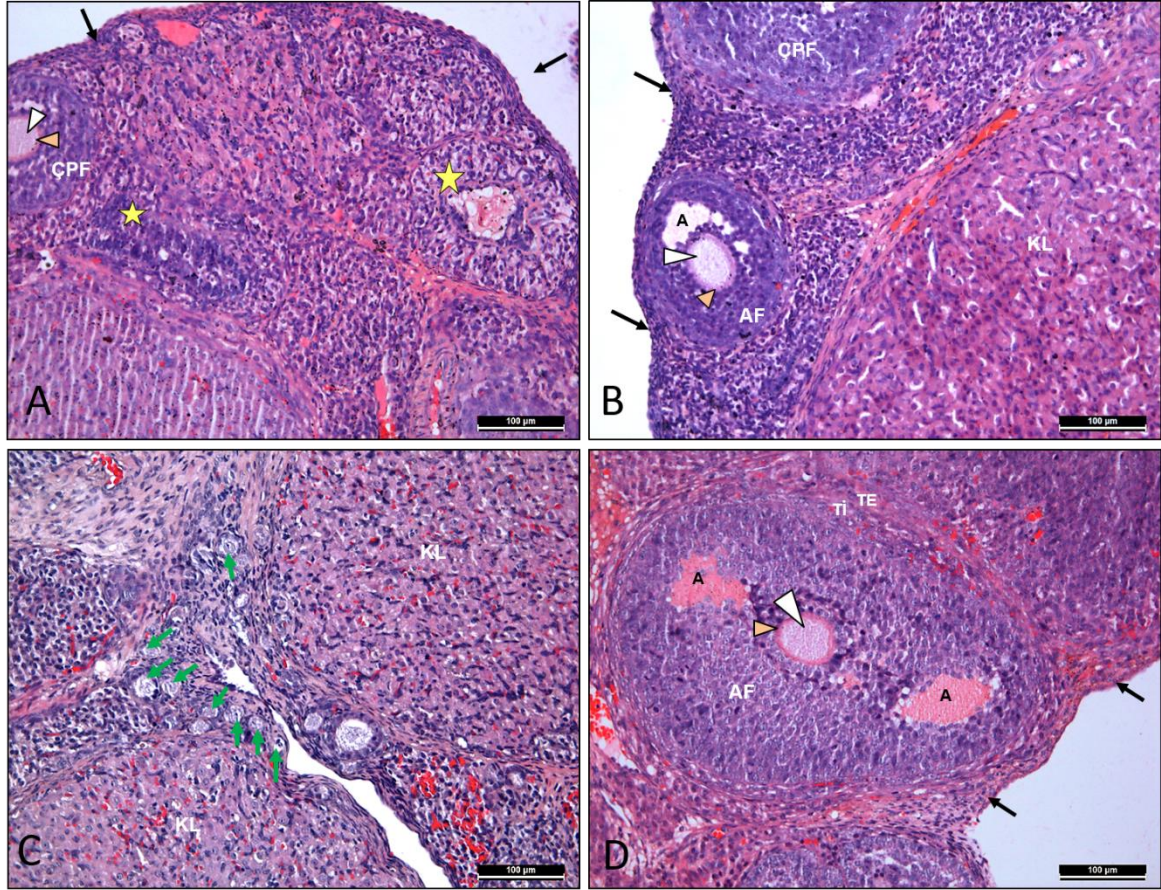
Resim 4.1. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu

Tek tabakalı primer folikül (TPF), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), antretik folikül (★), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆) (A,B; H&E, x 40)



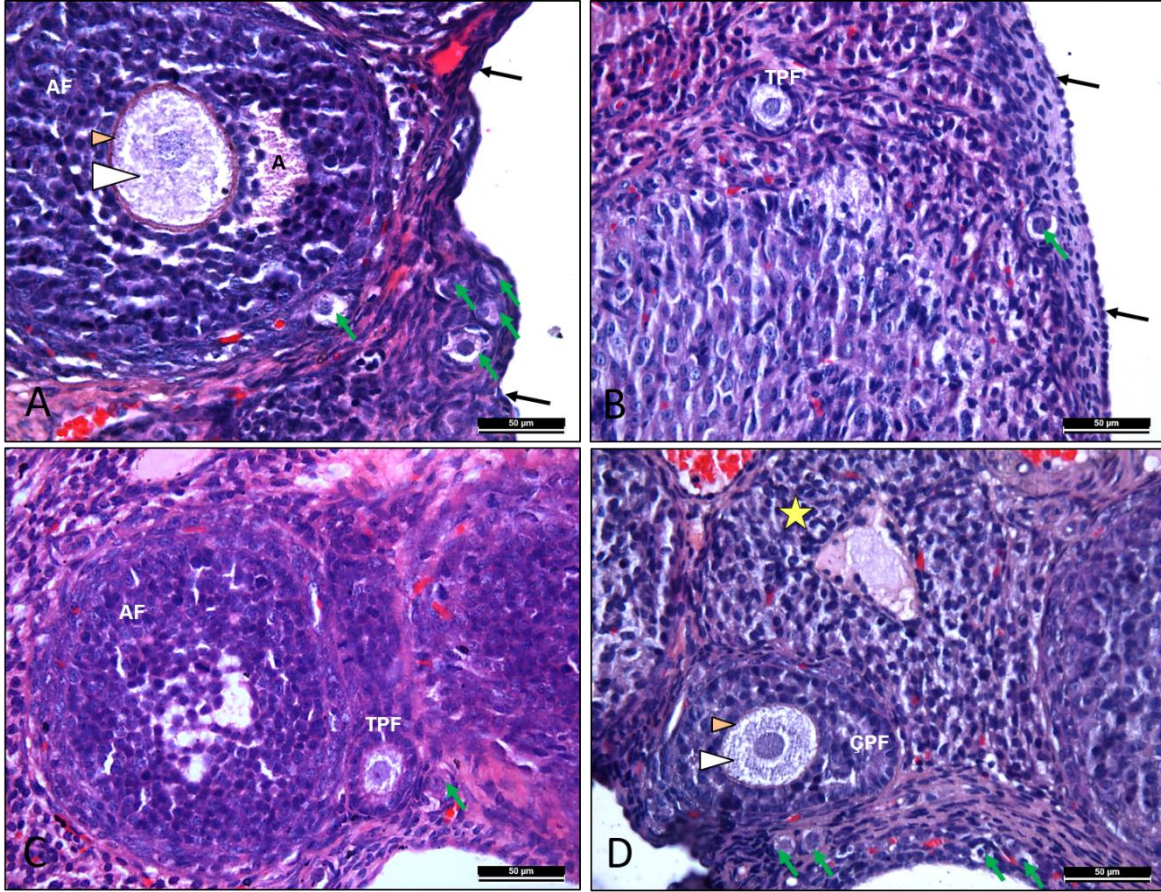
Resim 4.2. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (➔), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), oosit sitoplazması (◁), zona pellusida (▷), antrum (A), teka interna (Tİ), teka eksterna (Tİ), atretik folikül (★), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (➔) (A,B,C,D; H&E, x 200)



Resim 4.3. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), oosit sitoplazması (◁), zona pellusida (▷), antrum (A), teka interna (Tİ), teka eksterna (Tİ), atretik folikül (★), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (→), (A,B,C,D; H&E, x 200)



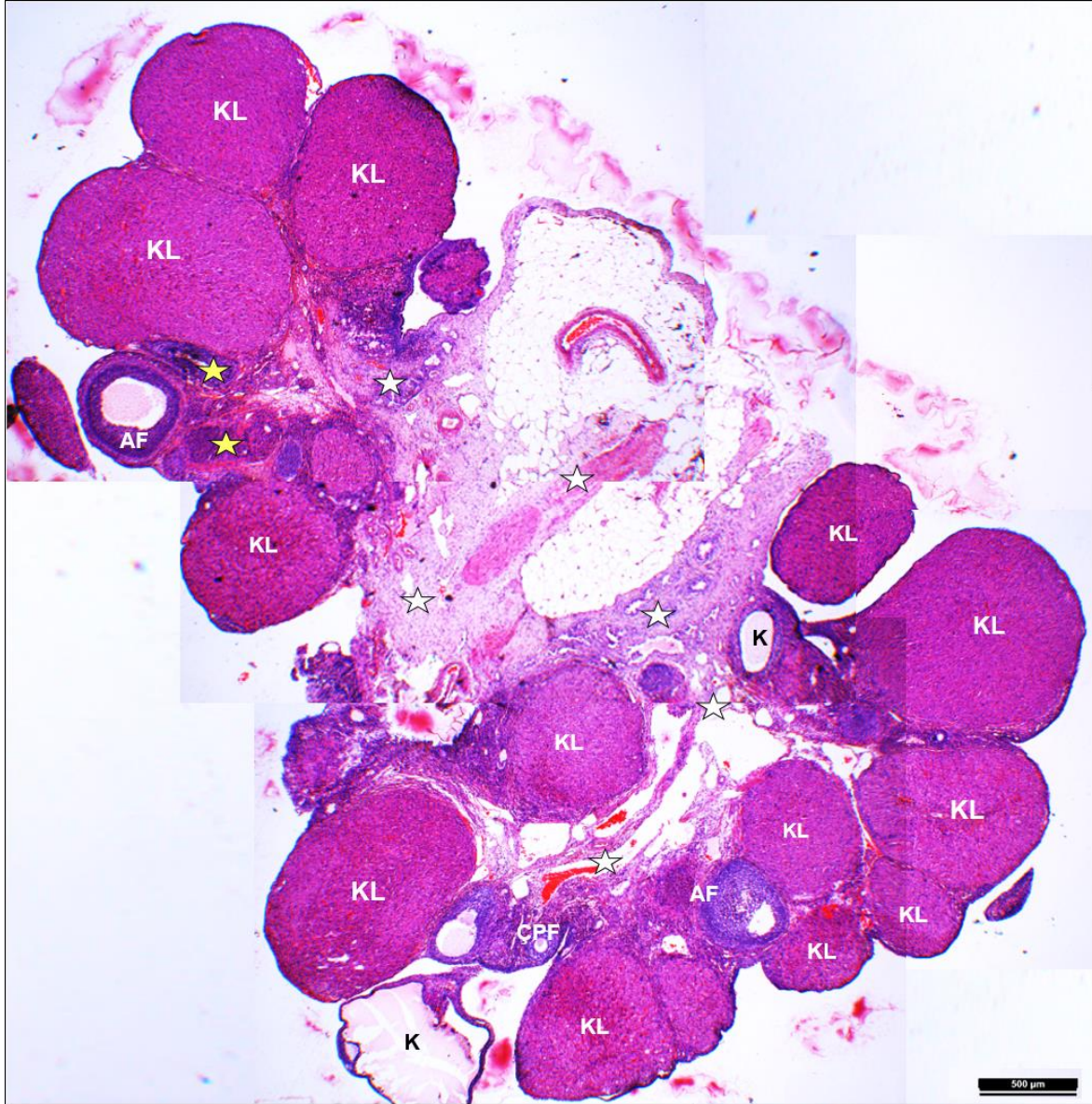
Resim 4.4. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), tek tabakalı primer folikül (TPF), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), oosit sitoplazması (▷), zona pellusida (▷), antrum (A), atretik folikül (★), germinal epitel (→), (A,B,C,D; H&E, x 400)

Deney-1 (3 tekrar) grubu

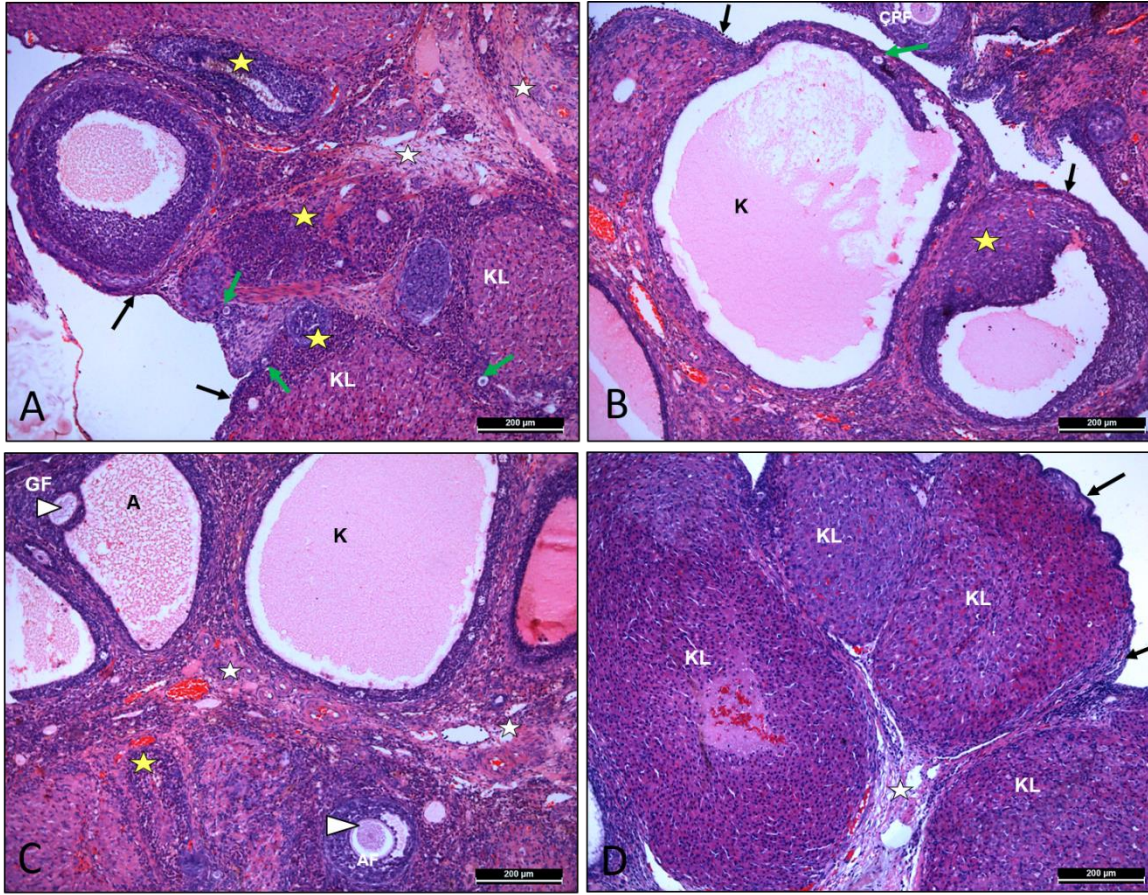
Kontrol'le karşılaştırıldığında *deney-1* grubunda, korpus luteum yapılarının oldukça artmış olduğu ve korteksin neredeyse tamamının yeni ve gerileyen korpus luteum yapıları ile dolu olduğu görüldü. Medulla venlerinin dilate ve ödemli olduğu, bununla birlikte medullada bulunan yağ dokusunun özellikle vasküler yapılar çevresinde oldukça artmış olduğu izlendi. Daha büyük büyütmelelerde, germinal epitelin altında yerleşik olan primordiyal foliküllerin daha çok normal yapılarında, ancak tek tabakalı primer folikülden itibaren neredeyse tüm foliküllerin atretik formda olduğu ve bunlardan bazılarının içinde hemosiderin birikimi olduğu görüldü. Bu grupta atretik foliküllerin yanı sıra normal yapıda tek tabakalı primer foliküller ve sekonder foliküller de izlendi. Kistik oluşumların teka interna ve teka eksterna yapılarında bozulmalar belirgindi ve nekrotik yapıda olan teka interna hücrelerinde vakuoller şeklinde, içinde çekirdek yapıları bulunan iri dejeneratif

oluşumlar izlendi. Bu gruba ait çoğu denekte, germinal epitelin altında ve tüm kortekste görülen yaygın lenfosit infiltrasyonu dikkat çekiciydi (Resim 4.5-4.6-4.7).



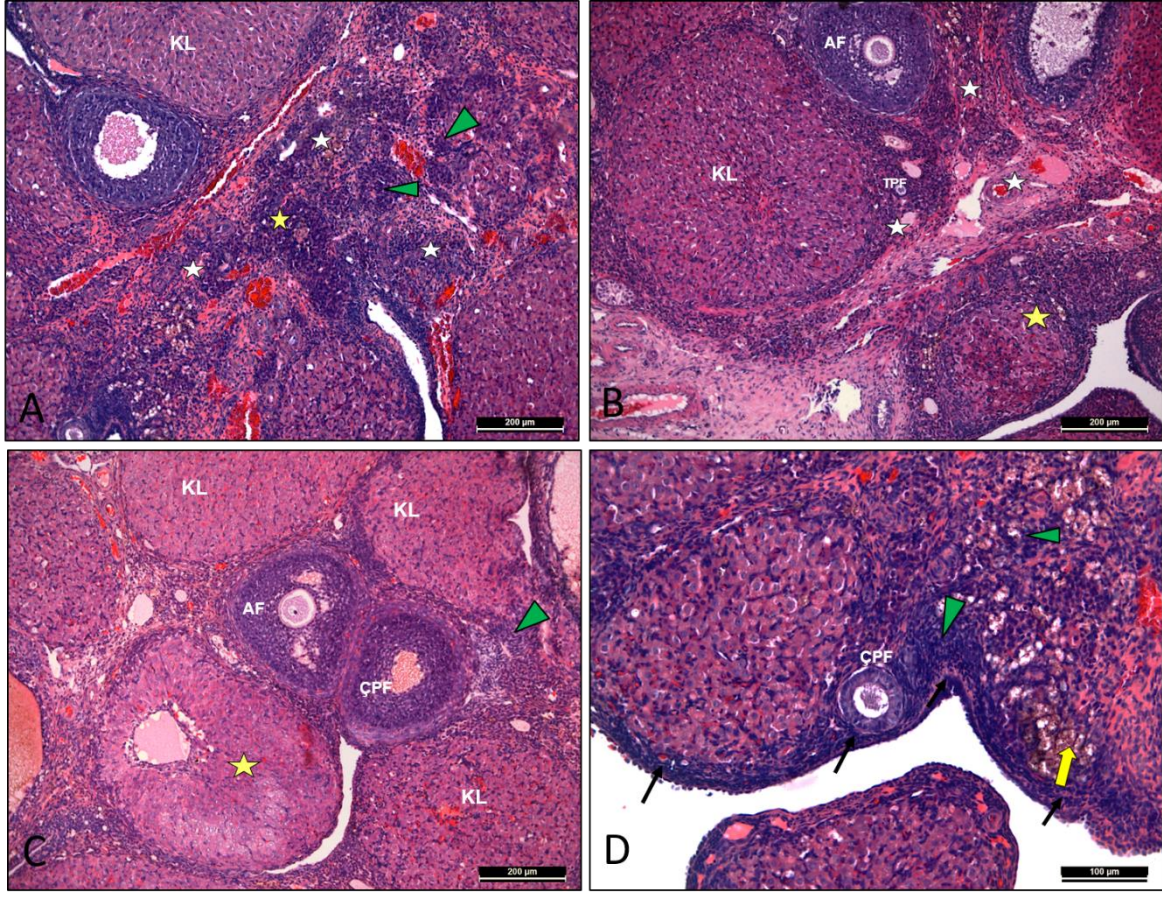
Resim 4.5. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu

Çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), atretik folikül (☆), kist (K), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (➡) (H&E, x 40)



Resim 4.6. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), graaf folikül (GF), oosit sitoplazması (▷), antrum (A), atretik folikül (★), germinal epitel (⇨), (A,B,C,D; H&E, x 100)

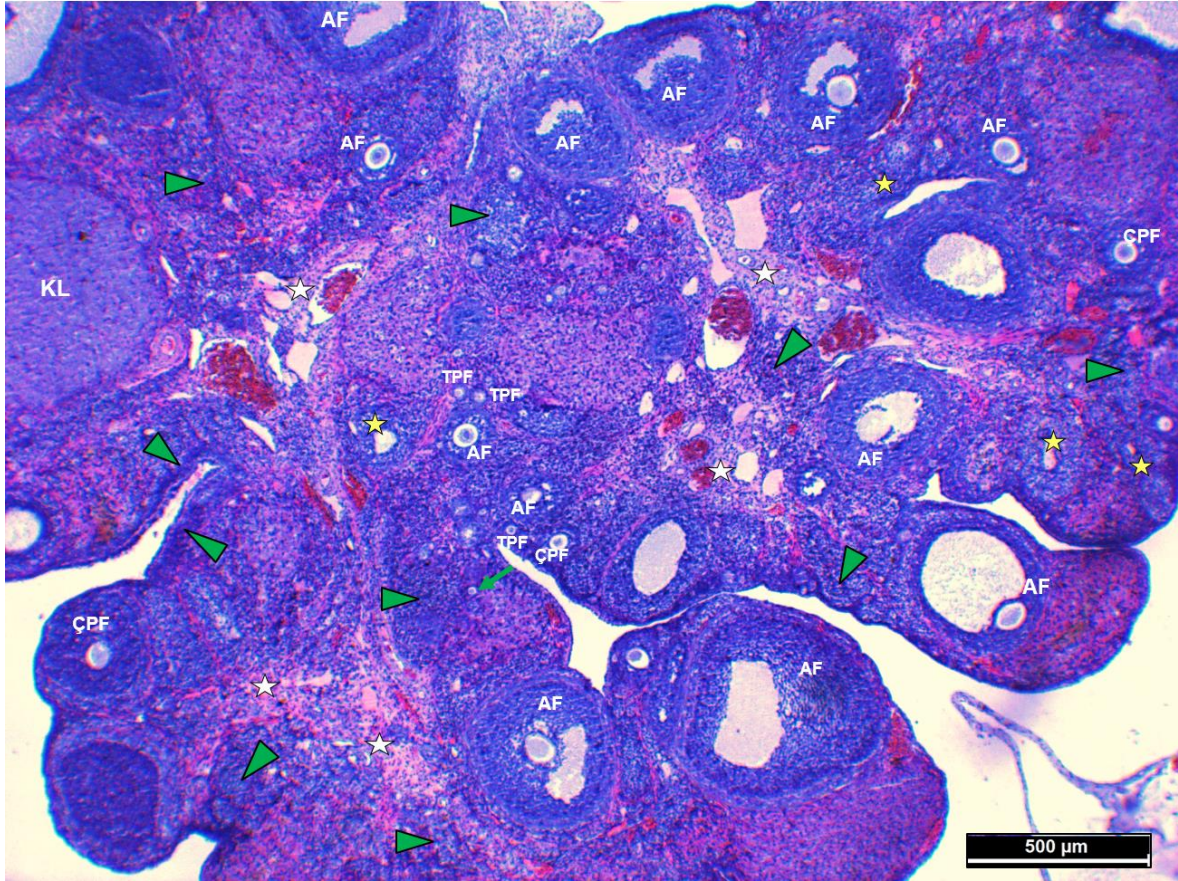


Resim 4.7. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu

Tek tabakalı primer folikül (TPF), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), atretik folikül (☆), korpus luteum (KL) stromal bağ doku (☆), bağ dokuda hemosiderin birikimi (▶), bağ dokuda lenfosit infiltrasyonu (⇒) germinal epitel (→), (A,B,C; H&E, x 100). (D; H&E, x 200)

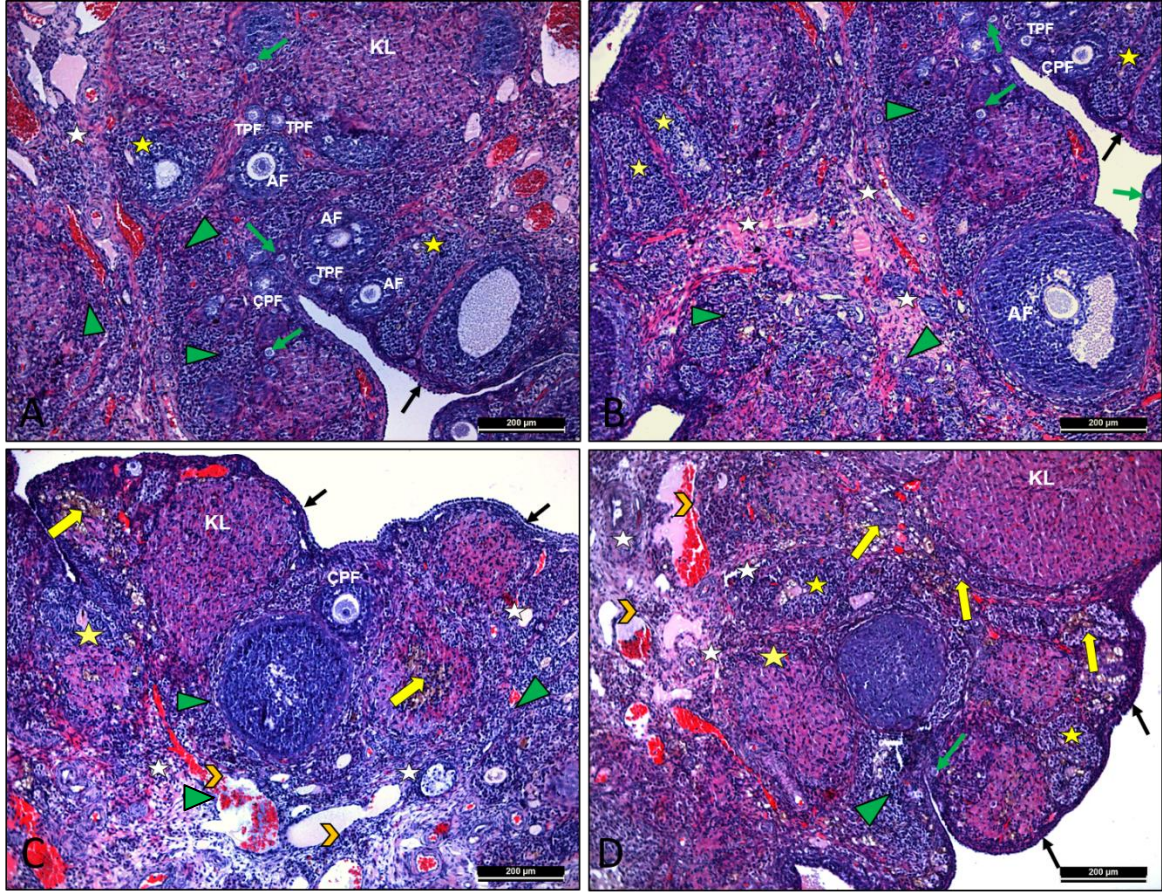
Deney-2 (5 tekrar) grubu

Deney-2 gurubunda, germinal epitel sınırlı bölgede kübik olmakla birlikte genellikle yassı görünümdeydi. Ayrıca, bazı bölgelerde epitel hücre tabakasındaki artış ve hücre kümelenmeleri dikkat çekiciydi. Medullaya ait kan damarlarının dilate olduğu izlenirken, kortekste özellikle de foliküllerin çevresinde damarlanmanın artmış olduğu görüldü. Lenfosit infiltrasyonu tüm korteks ve medullada oldukça yaygındı. Atretik foliküllerde, korpus luteumda ve bağ dokuda hemosiderin birikiminin de arttığı görüldü. Kistik oluşumların bu grupta da devam ettiği saptandı. Primordiyal foliküller genellikle normal yapılarındaydı bununla birlikte büyüyen foliküllerin büyük çoğunluğu atretik yapıda olsa da nadir olarak normal yapıda sekonder foliküllerde görüldü. Çoğu folikülde teka interna ve teka eksterna ayrımı ayırt edilemez durumdaydı (Resim 4.8-4.9-4.10-4.11).



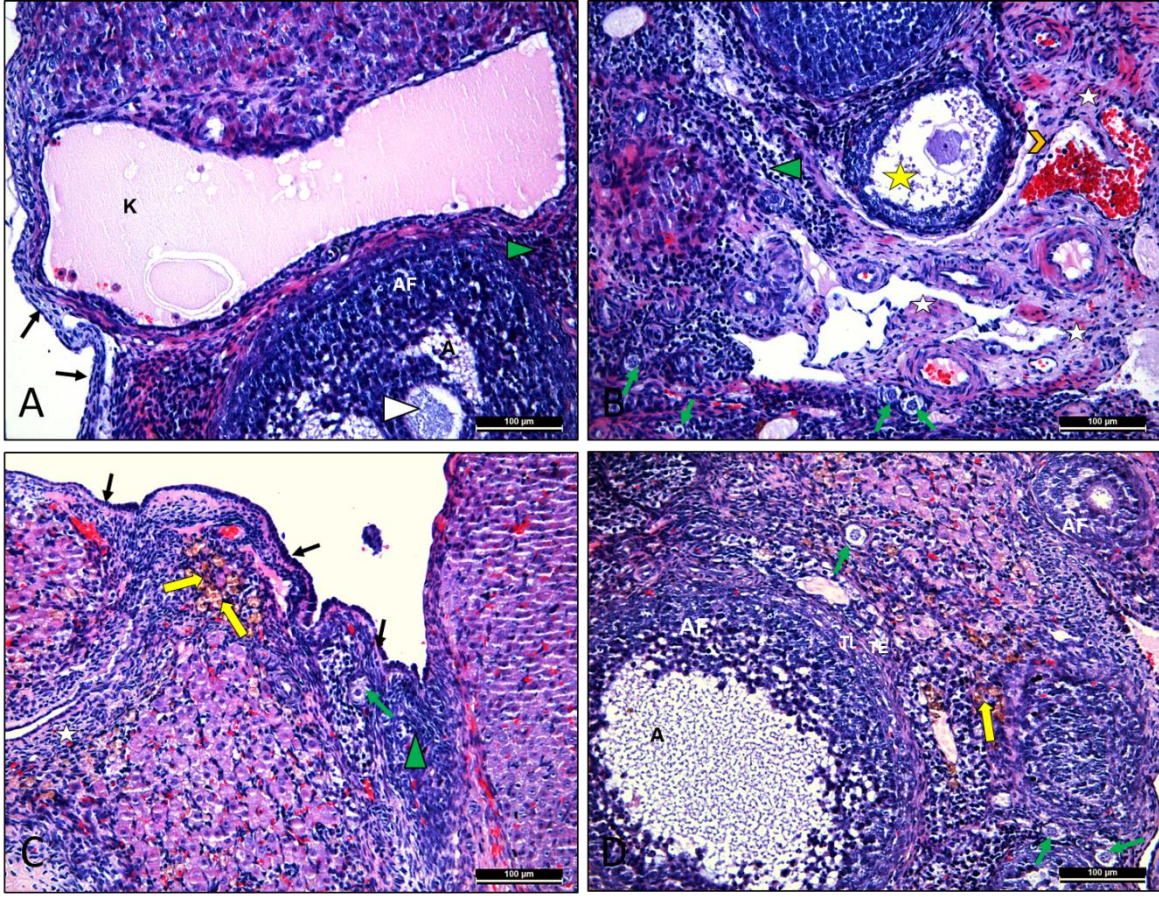
Resim 4.8. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (➡), tek tabakalı primer folikül (TPF), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), atretik folikül (☆), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), bağ dokuda lenfosit infiltrasyonu (▶), (H&E, x 40)



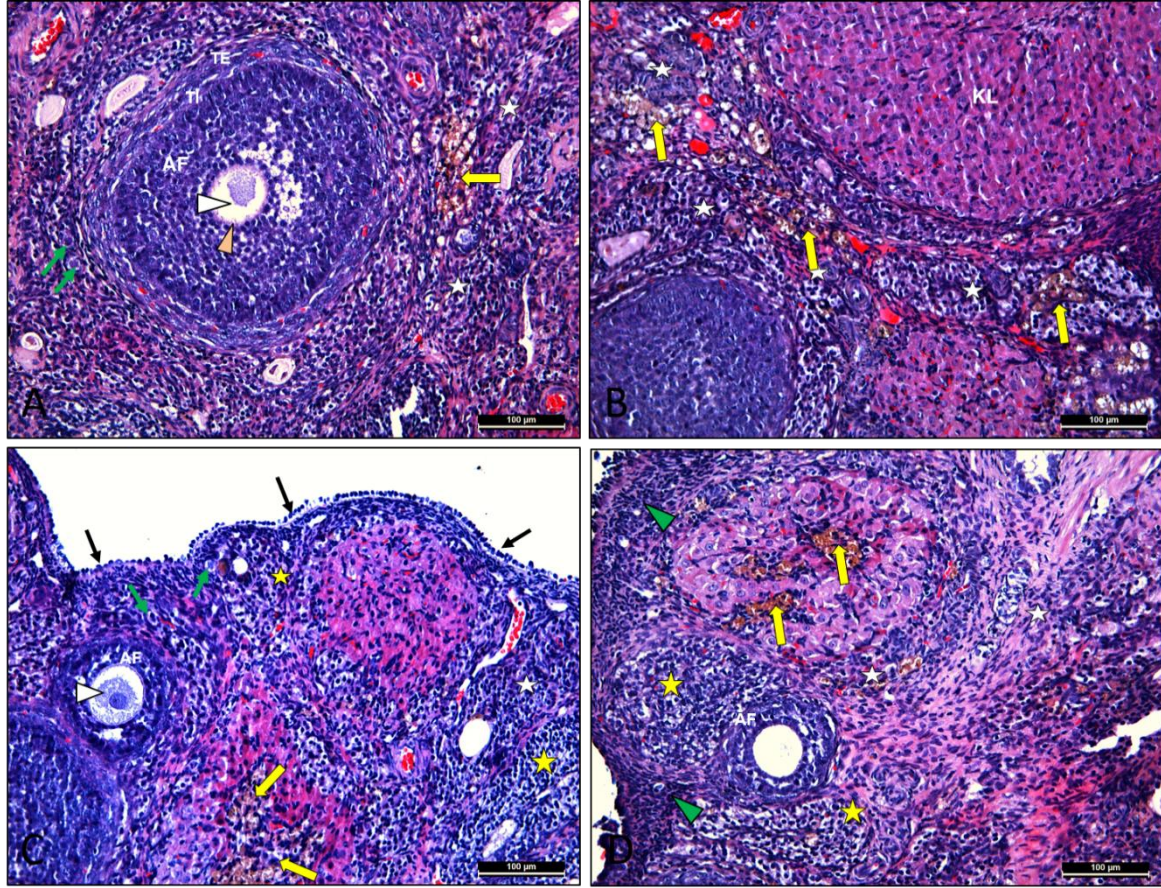
Resim 4.9. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), tek tabakalı primer folikül (TPF), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), atretik folikül (☆), korpus luteum (KL) stromal bağ dokusu (☆), bağ dokuda hemosiderin birikimi (⇒), bağ dokuda lenfosit infiltrasyonu (▶), damar dilatasyonu (➤), germinal epitel (➔), (A,B,C,D; H&E, x 100)



Resim 4.10. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), antral folikül (AF), antrum (A), teka interna (Tİ), teka eksterna (Tİ), atretik folikül (☆), kist (K), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), bağ dokuda hemosiderin birikimi (⇒), bağ dokuda lenfosit infiltrasyonu (▶), damar dilatasyonu (➤), germinal epitel (→), (A,B,C,D; H&E, x 200)



Resim 4.11. Hematoksilen–Eozin ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), antral folikül (AF), oosit sitoplazması (▷), zona pellusida (▷), teka interna (Tİ), teka eksterna (TE), atretik folikül (★), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), bağ dokuda hemosiderin birikimi (→), bağ dokuda lenfosit infiltrasyonu (▷), germinal epitel (→), (A,B,C,D; H&E, x 200)

Folikül sayımı bulguları

Kontrol, deney-1 ve deney-2 gruplarında, ovaryumdaki primordiyal, primer, antral ve graaf foliküller olmak üzere tüm foliküller ve kistik yapılar sayıldı. Bununla birlikte sağlam ve atretik foliküllerin oranları da değerlendirildi.

Over rezervini temsil eden primordiyal folikül sayısının *deney-1* grubunda *kontrole* kıyasla azalmış olduğu, ancak bu farkın anlamlı ölçüde olmadığı ($p=0,136$) görüldü. Buna karşın, *deney-2* grubunda primordiyal folikül sayısındaki azalma, *kontrole* kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$). *Deney-1* ve *deney-2* grupları arasında ise anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,198$).

KOH uygulaması sonrasında *deney-1* ve *deney-2* gruplarındaki toplam primer folikül sayılarının *kontrole* kıyasla artmış olduğu görüldü. Bu artış istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p<0,001$). Benzer şekilde, *deney-1* ve *deney-2* grupları arasında primer folikül sayısı açısından anlamlı bir fark yoktu ($p=0,135$).

Ancak, *deney-1* ve *deney-2* gruplarında, sağlıklı çok katlı primer folikül sayısının *kontrole* kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı ($p<0,001$), buna karşın atretik çok katlı primer folikül sayısının ise anlamlı ölçüde arttığı ($p<0,001$) izlendi.

Toplam sekonder folikül sayısı değerlendirildiğinde, gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,077$). Ancak, *deney-1* ve *deney-2* gruplarında, sağlıklı sekonder folikül sayısının *kontrole* kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı ($p<0,001$) izlendi. Bununla birlikte *deney-1* ve *deney-2* grubundaki atretik antral folikül sayısı *deney-1* 'e göre artmış bulundu ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=1,00$).

Graaf folikül sayıları açısından değerlendirilme yapıldığında, *deney-1* ve *deney-2* gruplarında, bu sayının *kontrole* kıyasla azaldığı görüldü. Ancak bu fark yalnızca *deney-2* ve *kontrol* grubu arasında istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$).

Buna ek olarak, kistik oluşumların hem *deney-1* hem de *deney-2* grubunda *kontrole* kıyasla anlamlı ölçüde arttığı dikkati çekti ($p<0,001$). *Deney-2* grubundaki kistik yapılar, *deney-1* 'e kıyasla artmıştı ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,001$).

- İstatistiksel sonuçlara ait tanımlayıcı veriler Çizelge 4.1. ve Çizelge 4.2. de özetlenmiştir.

Çizelge 4.1. Folikül sayımlarının istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler I

DEĞİŞKENLER	GRUPLAR	Mean±SD	(Median) Min-Max	p değeri
Primordiyal Folikül	Kontrol (n=6)	1967, 83±96, 28	(1963, 00) 1806, 00- 2090, 00	0.001 ^b
	D1 (3 tekrar) (n=6)	1243, 33±79, 68	(1221, 00) 1144, 00-1354, 00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	1060, 16±67, 07	(1034, 50) 1002, 00-1165, 00	
Primer Folikül	Kontrol (n=6)	348, 66±52, 38	(323, 50) 304, 00-428, 00	<0.001 ^a
	D1 (3 tekrar) (n=6)	538, 83±50, 08	(534, 00) 472, 00-610, 00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	606, 50±58, 00	(600, 50) 544, 00-679, 00	
Sekonder Folikül	Kontrol (n=6)	134, 33±201, 20	(53, 50) 480, 00- 545, 00	0.077 ^b
	D1 (3 tekrar) (n=6)	79, 16±7, 85	(79, 00) 70, 00-89, 00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	81, 50±5, 35	(81, 50) 74, 00-88, 00	
Graaf Folikül	Kontrol (n=6)	3,16±0,75	(3,00) 2,00- 4,00	<0.001 ^a
	D1 (3 tekrar) (n=6)	1,50±0,54	(1,50) 1,00-2,00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	0,83±0,75	(1,00) 0,00-2,00	

a: One Way ANOVA test b: Kruskal Wallis test

Çizelge 4.2. Folikül sayımlarının istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler II

DEĞİŞKENLER	GRUPLAR	Mean±SD	(Median) Min-Max	p değeri
Tek Katlı Primer Folikül	Kontrol (n=6)	274,66±46,81	(254,00) 232,00- 346,00	<0.001 ^a
	D1 (3 tekrar) (n=6)	453,33±47,86	(448,00) 396,00-520,00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	515,16±56,29	(511,50) 453,00-589,00	
Sağlıklı Çok Katlı Primer Folikül	Kontrol (n=6)	71,66±5,81	(69,00) 66,00-79,00	0.474 ^a
	D1 (3 tekrar) (n=6)	73,16±5,60	(74,00) 64,00-80,00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	75,66±5,31	(74,50) 47,00-85,00	
Atretik Çok Katlı Primer Folikül	Kontrol (n=6)	2,33±0,52	(2,00) 2,00- 4,00	<0.001 ^b
	D1 (3 tekrar) (n=6)	12,33±1,03	(12,00) 11,00- 14,00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	15,66±1,03	(16,00) 14,00- 17,00	

Çizelge 4.3. (devam) Folikül sayımlarının istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler II

Sağlıklı Sekonder Folikül	Kontrol (n=6)	50,16±3,06	(50,00) 46,00- 54,00	<0.001 ^a
	D1 (3 tekrar) (n=6)	70,50±8,09	(72,50) 60,00-87,00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	67,33±5,98	(68,50) 58,00-73,00	
Atretik Sekonder Folikül	Kontrol (n=6)	2,33±5,51	(2,00) 2,00- 3,00	0.001 ^b
	D1 (3 tekrar) (n=6)	9,6±2,33	(9,50) 6,00-13,00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	14,00±1,78	(14,50) 11,00-16,00	
Kistik Yapılar	Kontrol (n=6)	2,16±0,75	(2,00) 1,00-3,00	<0.001 ^a
	D1 (3 tekrar) (n=6)	7,83±1,16	(8,00) 6,00-9,00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	11,16±1,60	(11,00) 9,00-13,00	

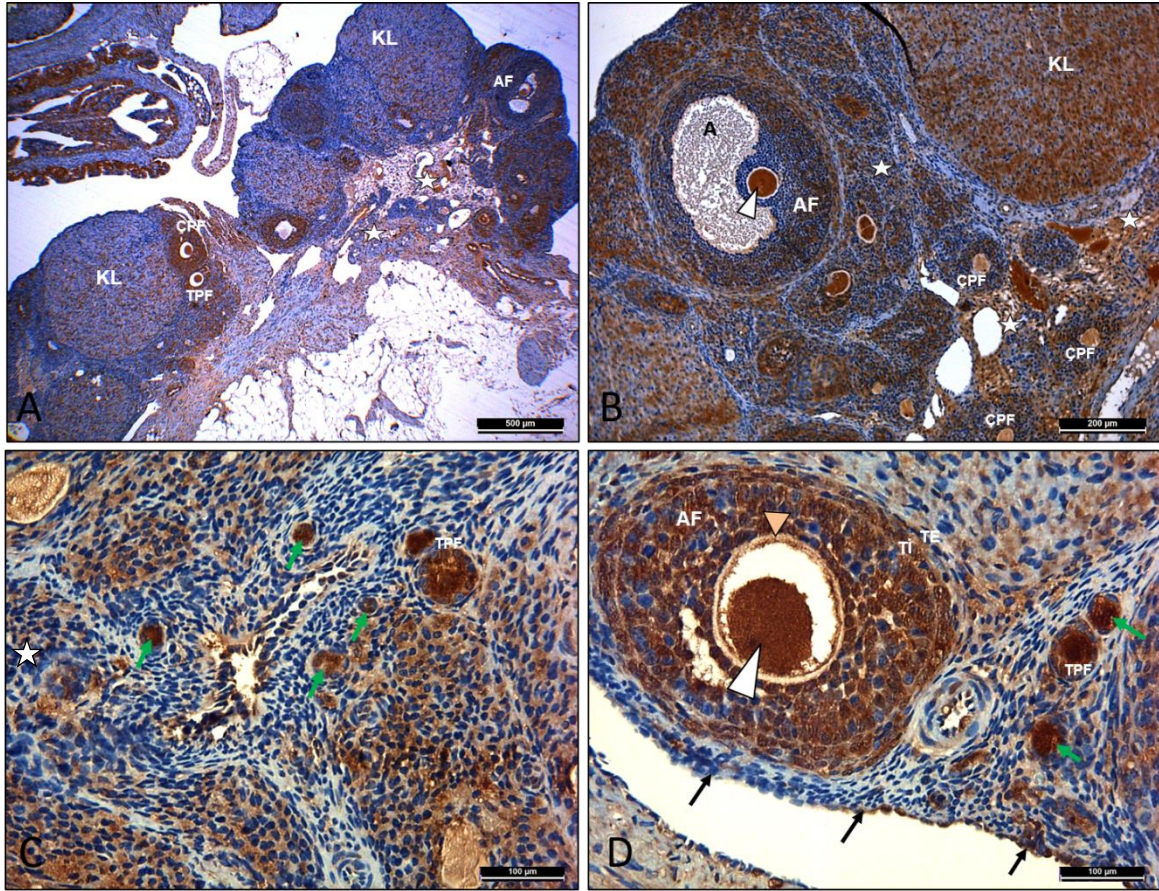
a: One Way ANOVA test b: Kruskal Wallis test

4.1.2. İmmunohistokimyal (IHK) bulgular

PTEN (Phosphatase and tensin homolog) bulguları

Foliküler gelişimin her basamağında foliküllerin; oosit, granüloza hücreleri ve teka hücrelerinde sitoplazmik ve nüklear olarak ifade edildiği bilinen PTEN proteininin immünreaktivitesi tüm deney gruplarında değerlendirildi.

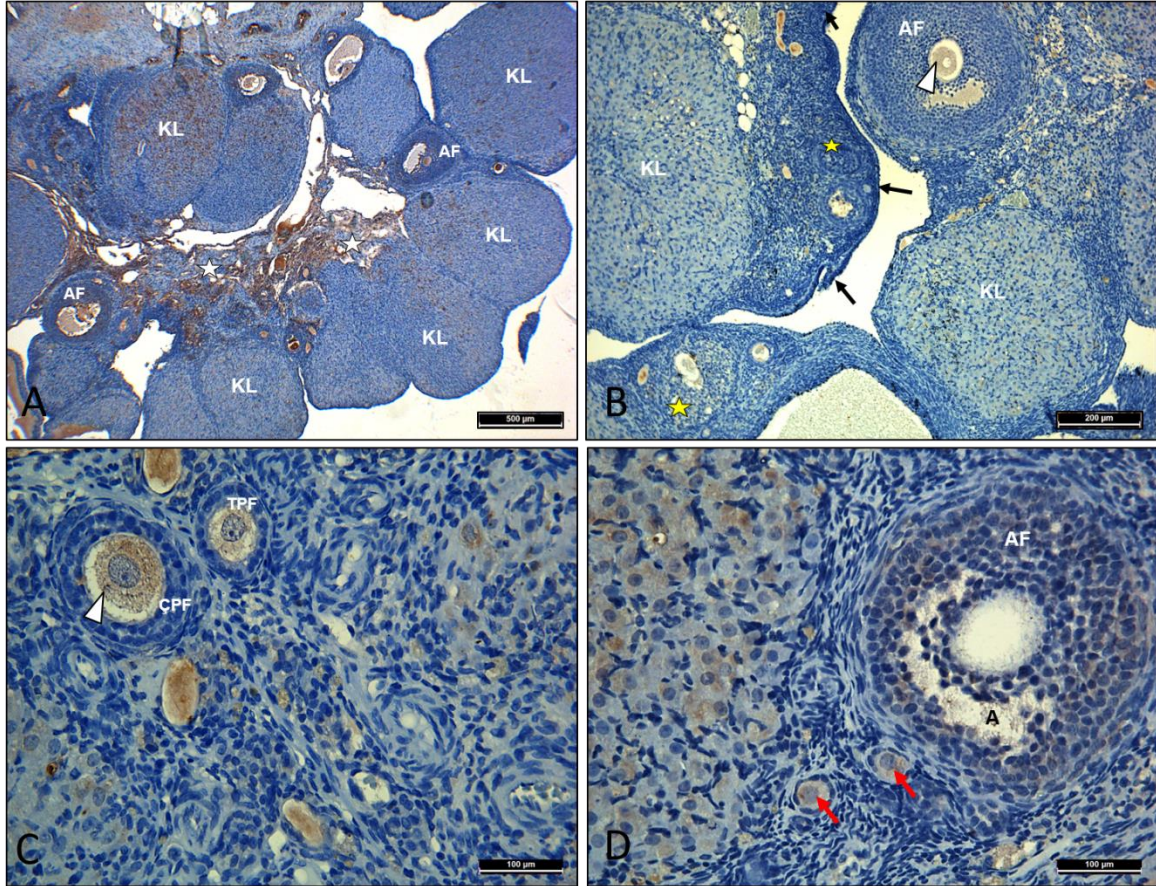
Kontrol grubunda; primordiyal foliküle ait oosit sitoplazmasında kuvvetli, ancak follikülü çevreleyen granüloza hücre sitoplazmasında zayıf PTEN tutulumu izlendi. PTEN ifadenin foliküller büyüdükçe, granüloza hücrelerinde yoğunlaşırken, oosit sitoplazmasında zayıfladığı dikkati çekti. Buna göre; PTEN immünreaktivitesinin, büyümekte olan primer foliküllere ait granüloza hücre sitoplazmasında orta dereceli iken antral folliküllerin granüloza hücrelerinde ise daha kuvvetli olduğu görüldü (Resim 4.12, A-B-C-D).



Resim 4.12. PTEN primer antikoru ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), tek tabakalı primer folikül (TPF), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), antrum (A), oosit sitoplazması (▷), zona pellusida (◀), teka interna (Tİ), teka eksterna (TE), atretik folikül (☆), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (→), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen; Ax40, Bx100, C,Dx200).

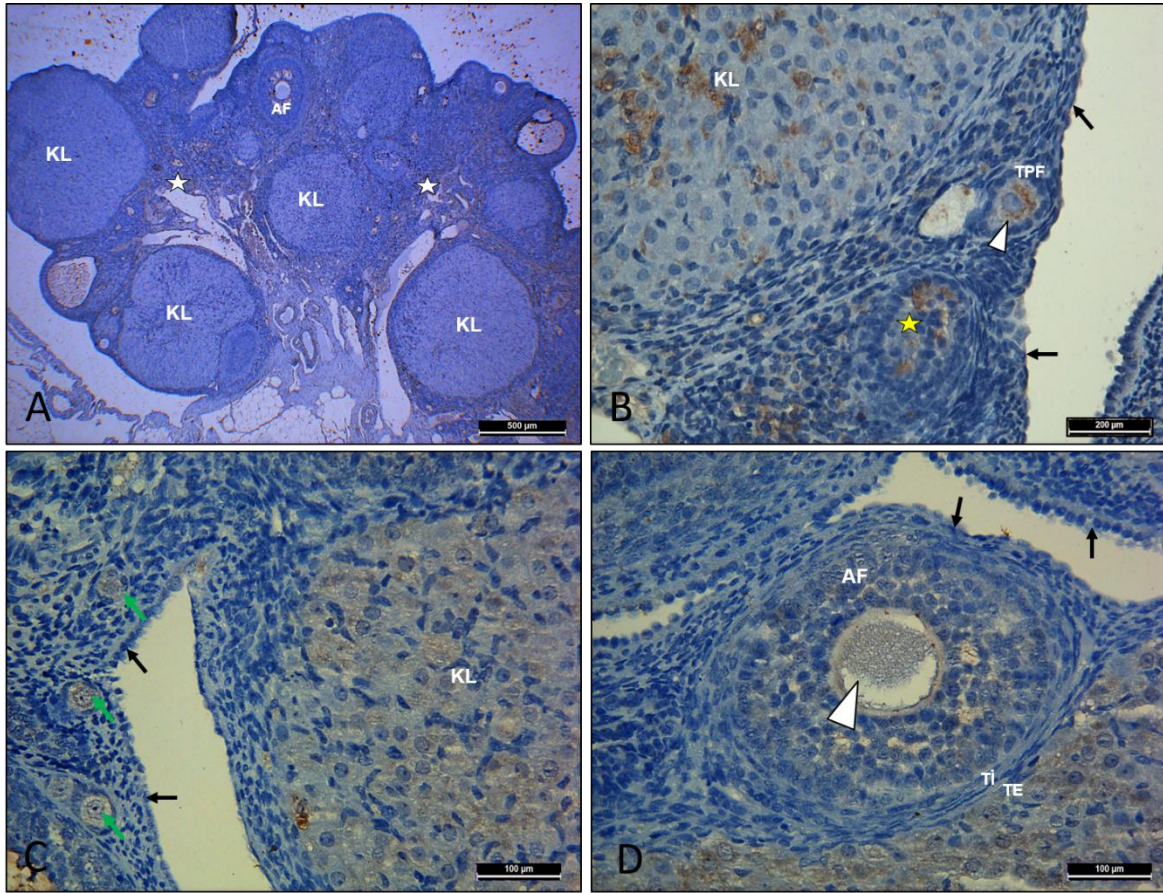
Deney-1 grubunda; primordiyal foliküle ait oositte sitoplazmik ifadenin kontrol grubuna göre azaldığı, nükleer ifadenin ise neredeyse kaybolduğu görüldü. Benzer şekilde, tek tabakalı ve çok tabakalı primer foliküller ile antral foliküllerin de oosit sitoplazmasındaki PTEN immünreaktivitesinin kontrole kıyasla azaldığı, granüloza hücrelerindeki tutulumun ise neredeyse ortadan kalktığı izlendi (Resim 4.13, A-B-C-D).



Resim 4.13. PTEN primer antikoru ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikülden tek tabakalı primer foliküle geçiş (➡), tek tabakalı primer folikül (TPF), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), antrum (A), oosit sitoplazması (▷), atretik folikül (★), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (➡), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen; Ax40, Bx100, C,Dx200).

Deney-2 grubunda; deney-1'e benzer şekilde PTEN'in hem primordiyal folikül oositindeki ifadenin hem de folikülü çevreleyen yassı granuloza hücre sitoplazmasındaki ifadenin belirgin şekilde azaldığı görüldü. Çevredeki antral folliküllerin granuloza hücre sitoplazmasında zayıf PTEN immünreaktivitesi görüldü. PTEN'in tüm yapılardaki nükleer ifadenin ise neredeyse tamamen ortadan kalktığı dikkati çekti (Resim 4.14, A-B-C-D).



Resim 4.14. PTEN primer antikoru ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), tek tabakalı primer folikül (TPF), antral folikül (AF), oosit sitoplazması (▷), teka interna (TI), teka eksterna (TE), atretik folikül (★), korpus luteum (KL), stromal bağ dokusu (☆), germinal epitel (→), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen; Ax40, Bx100, C,Dx200).

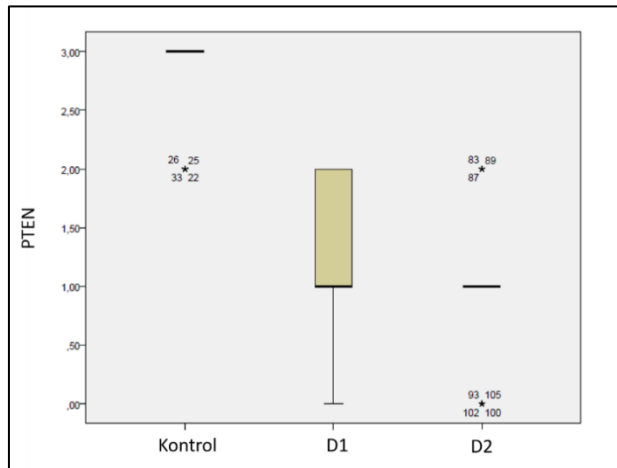
Primordiyal foliküllerin PTEN immünreaktivite seviyeleri tüm deney gruplarında H-Score yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı; *deney-1* ile *deney-2* grupları kıyaslandığında oosit ve granüloza hücresi sitoplazmasındaki PTEN ekspresyonunda anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,162$). Ancak, PTEN ifadenmesinin oosit sitoplazmasında, *deney-1* ile *deney-2* gruplarında kontrole kıyasla önemli ölçüde azaldığı ve bu bulgunun deney gruplarında azalan primordiyal follikül sayısı ile tutarlı olduğu izlendi ($p<0,001$).

- İstatistiksel sonuçlara ait tanımlayıcı veriler Çizelge 4.3’de özetlenmiştir.

Çizelge 4.4. PTEN immünreaktivite seviyelerinin istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler

GRUPLAR	PTEN			
	Mean $\pm$ SD	Min-Max	(Median) Interquartile Range	p değeri
Kontrol (n=6)	2,77 $\pm$ 0,42	2,00-3,00	(3,00) 0.00	<0,001 ^b
D1 (3 tekrar) (n=6)	1,36 $\pm$ 0,68	0,00-2,00	(1,00) 1.00	
D2 (5 tekrar) (n=6)	0,94 $\pm$ 0,58	0,00-2,00	(1,00) 0.00	

b: Kruskal Wallis test



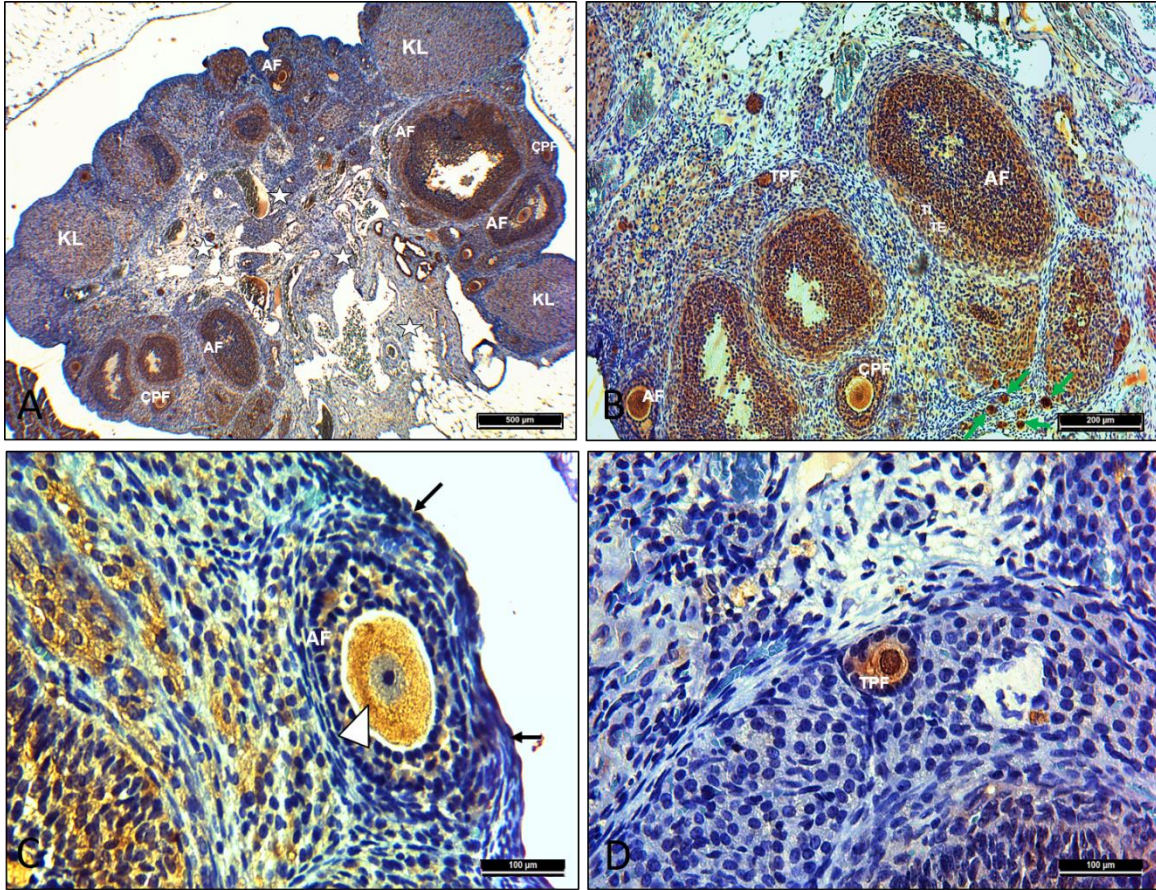
($p<0,05$ * işaretliyle gösterilmiştir)

Şekil 4.1. PTEN immünreaktivite seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması

FOXO3 (forkhead box O3) bulguları

PTEN ile benzer şekilde, foliküler gelişimin her basamağında foliküllerin; oosit, granüloza hücreleri ve teka hücrelerinde sitoplazmik ve nükleer olarak ifade edildiği bilinen FOXO3 proteininin de immünreaktivitesi tüm deney gruplarında değerlendirildi.

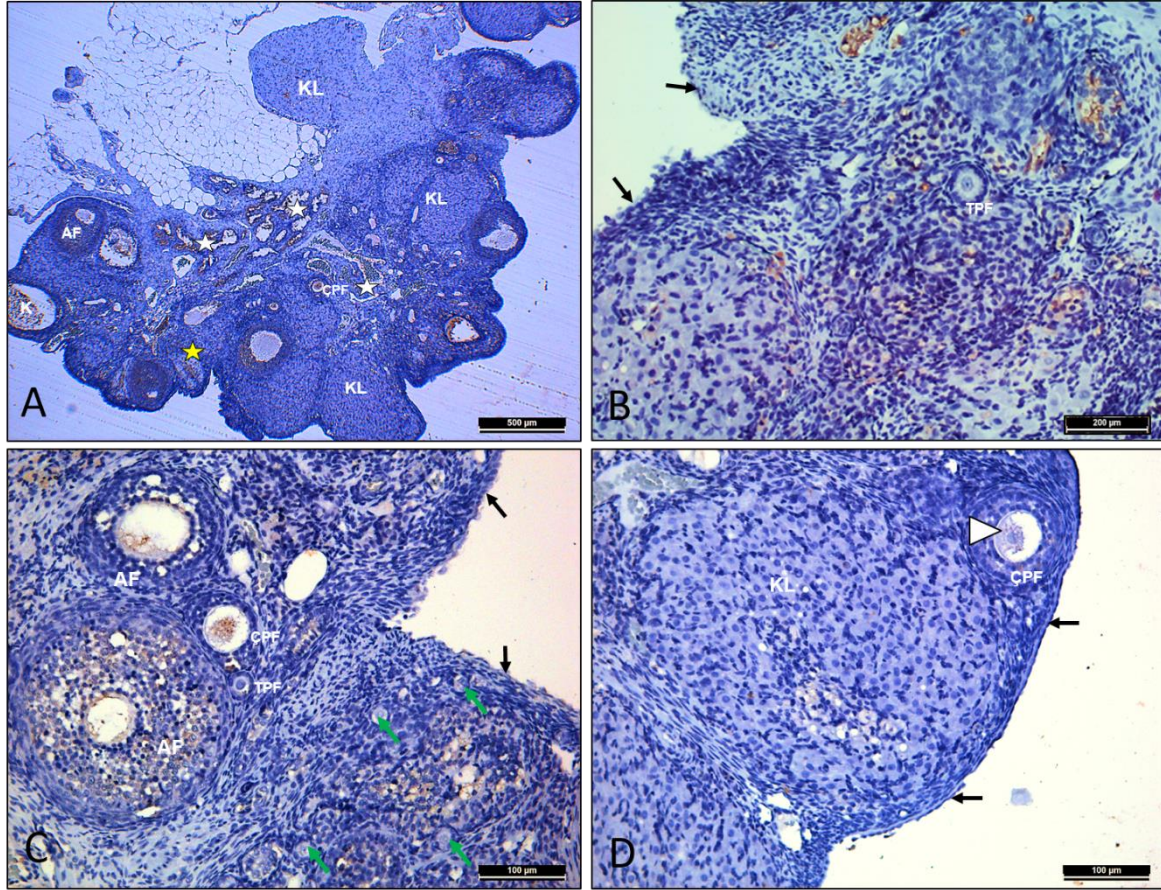
Kontrol grubunda; FOXO3 ifadenmesinin primordiyal foliküle ait oosit nükleusunda ve sitoplazmasında kuvvetli olduğu ancak, folikülü çevreleyen granüloza hücrelerinde bu tutulumun zayıf olduğu izlendi. Bu tutulum şiddetinin, büyüyen foliküllerin ve antral foliküllerin oositinde azalırken, granüloza hücrelerinde giderek arttığı görüldü (Resim 4.15, A-B-C-D).



Resim 4.15. FOXO3 primer antikoru ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), tek tabakalı primer folikül (TPF), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), oosit sitoplazması (▷), teka interna (Tİ), teka eksterna (TE), atretik folikül (★), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (→), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen; Ax40, Bx100, C,Dx200).

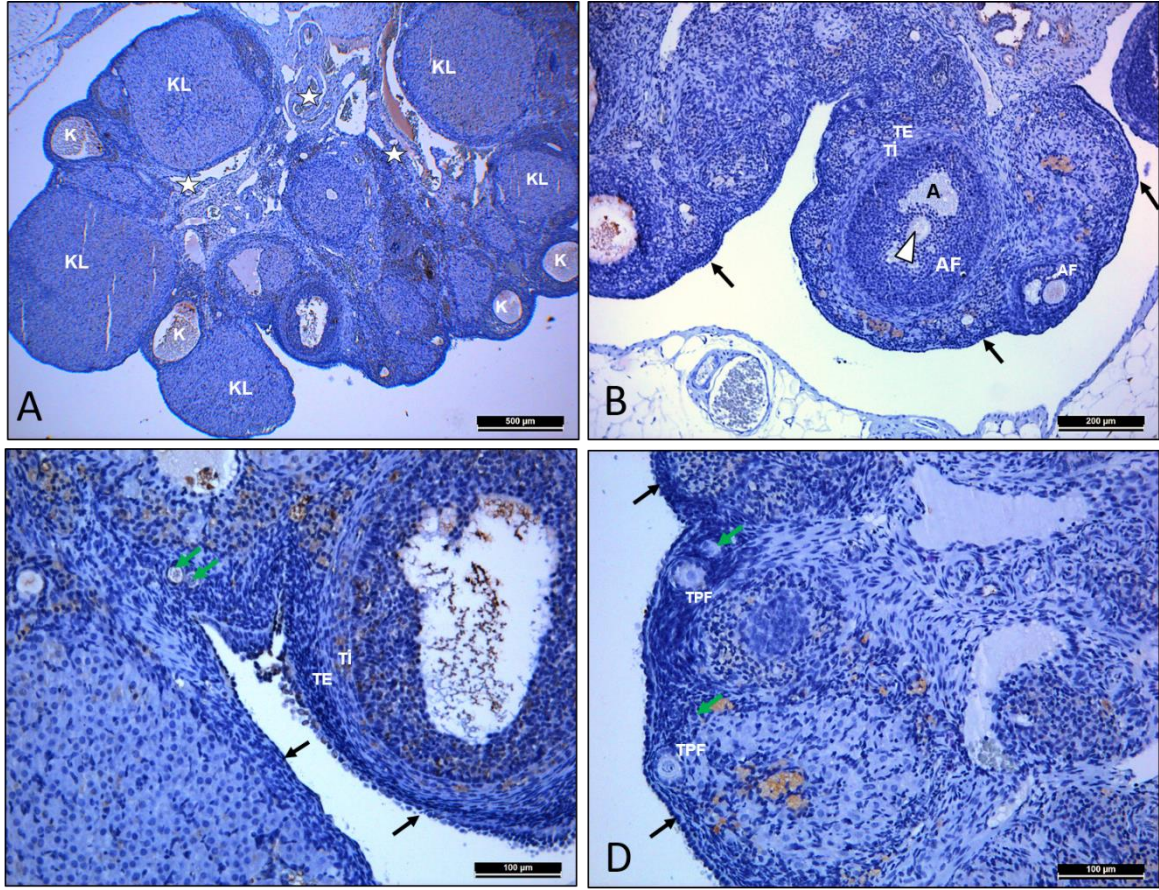
Deney-1 grubunda; hem primordiyal foliküle, hem de gelişinin diğer aşamalarındaki foliküllere ait oosit ve granüloza hücre yapılarında FOXO3'ün sitoplazmik ve nükleer ifadelenmesinin kontrol grubuna ile karşılaştırıldığında belirgin olarak azaldığı, teka tabakasında ise neredeyse ortadan kalktığı izlendi (Resim 4.16, A-B-C-D).



Resim 4.16. FOXO3 primer antikoru ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), tek tabakalı primer folikül (TPF), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), oosit sitoplazması (▷), atretik folikül (★), kist (K), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (→), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen; Ax40, Bx100, C,Dx200).

Deney-2 grubunda ise FOXO3 immünreaktivitesinin, tüm gelişim aşamalarındaki foliküllerde oosit, granüloza hücreleri ve teka hücreleri gibi tüm foliküler yapılarda neredeyse tamamen ortadan kalktığı saptanmıştır (Resim 4.17, A-B-C-D).



Resim 4.17. FOXO3 primer antikoru ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), tek tabakalı primer folikül (TPF), antral folikül (AF), antrum (A), oosit sitoplazması (▷), teka interna (Tİ), teka eksterna (TE), atretik folikül (☆), kist (K), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (→), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen; Ax40, Bx100, C,Dx200)

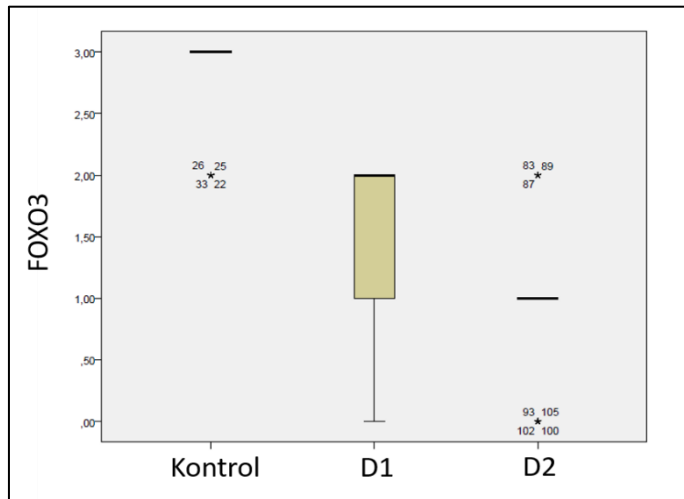
Primordiyal foliküllerin FOXO3 immünreaktivite seviyeleri tüm deney gruplarında H-Score yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı; deney-1 ile deney-2 grupları kıyaslandığında oosit ve granüloza hücresi sitoplazmasındaki FOXO3 ekspresyonunun deney-2 grubunda azalmış olduğu görüldü ($p<0,001$). Bununla birlikte, FOXO3 ifadenmesinin oosit sitoplazmasında, deney-1 ile deney-2 gruplarında kontrole kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı izlendi ($p<0,001$).

- İstatistiksel sonuçlara ait tanımlayıcı veriler Çizelge 4.4 de özetlenmiştir.

Çizelge 4.5. FOXO3 immünreaktivite seviyelerinin istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler

GRUPLAR	FOXO3			
	Mean $\pm$ SD	Min-Max	(Median) Interquartile Range	p değeri
Kontrol (n=6)	2,77 $\pm$ 0,43	2,00-3,00	(3,00) 0,00	<0,001 ^b
D1 (3 tekrar) (n=6)	1,61 $\pm$ 0,68	0,00-2,00	(2,00) 1,00	
D2 (5 tekrar) (n=6)	0,94 $\pm$ 0,58	0,00-2,00	(1,00) 0,00	

b: Kruskal Wallis test

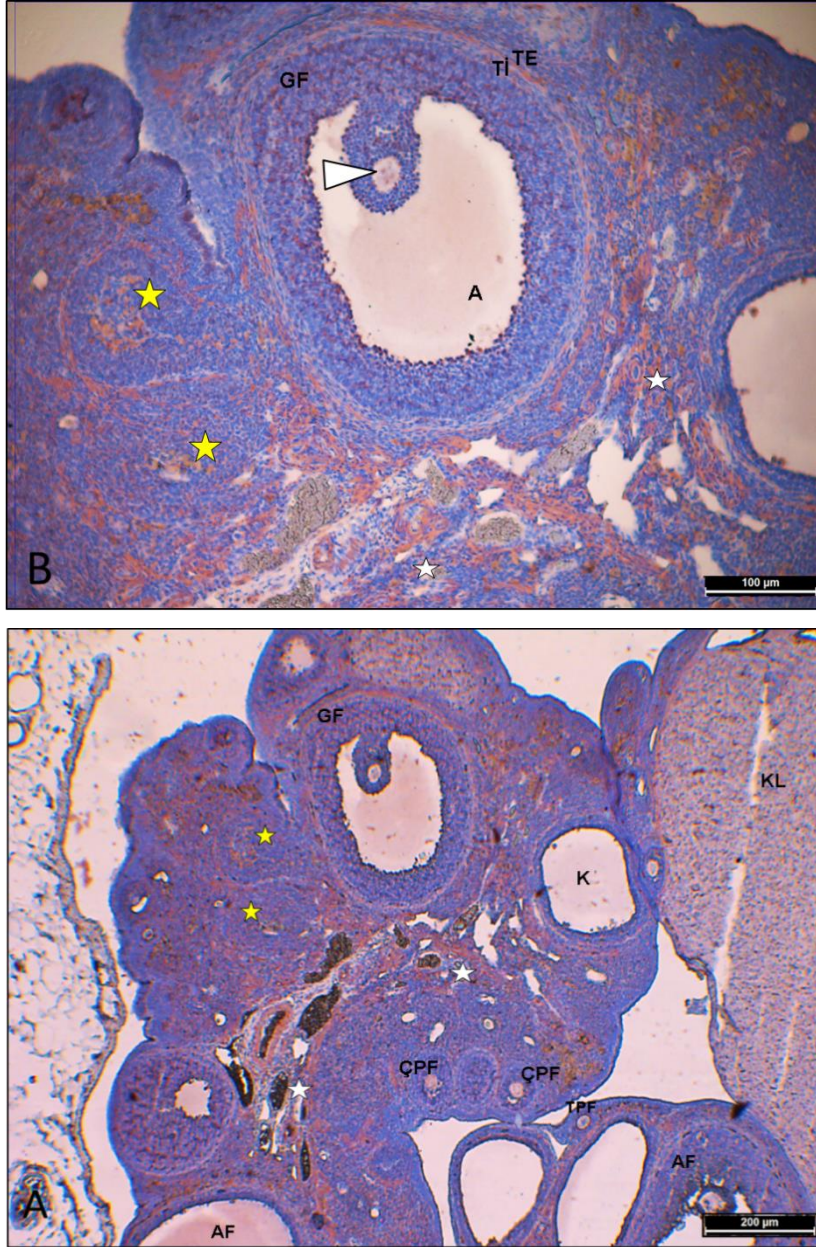


($p<0,05$ * işaretiyle gösterilmiştir)

Şekil 4.2. FOXO3 immünreaktivite seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması

LH-R (Luteinize edici hormon reseptörü) bulguları

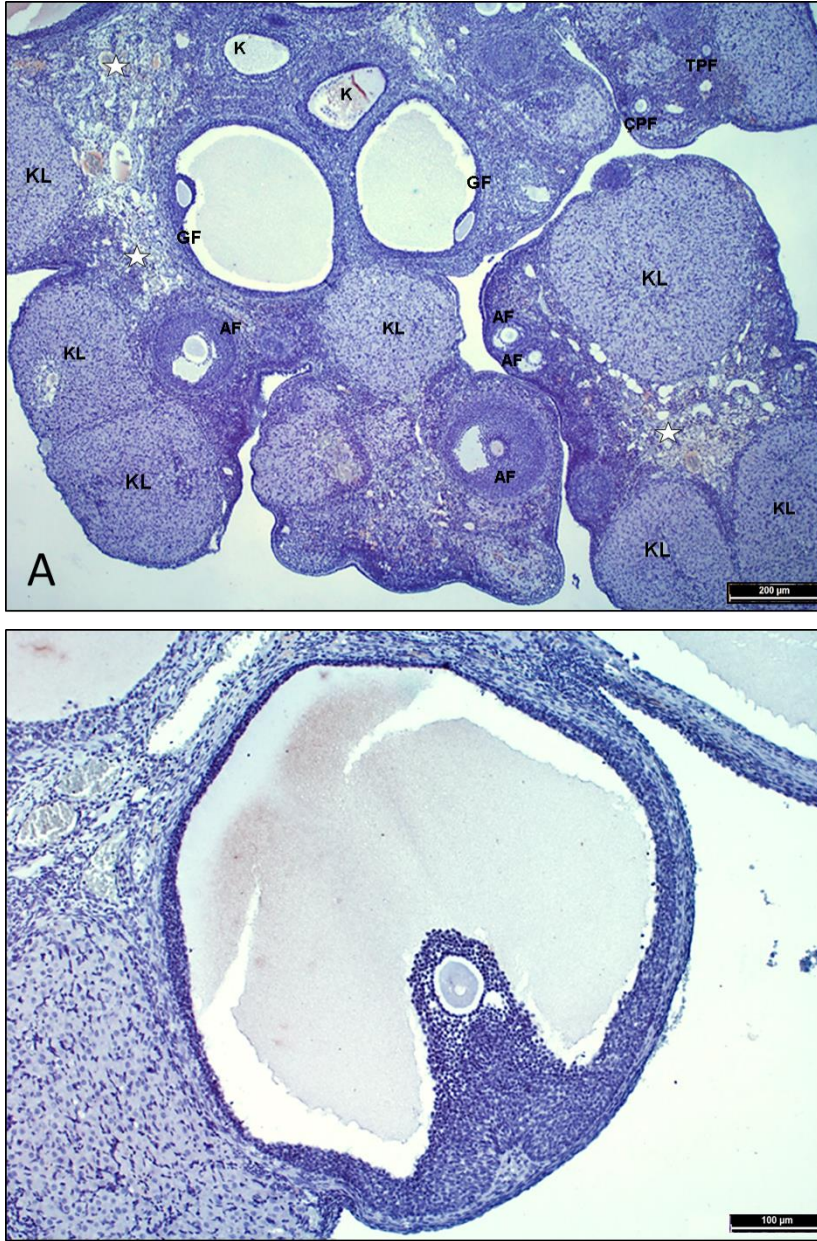
Ovaryumda, antral ve graaf foliküllerin teka interna ve granüloza hücrelerinde ve korpus luteum yapılarında ifade edilen LH-R'nin immünreaktivitesi tüm deney gruplarında değerlendirildi. *Kontrol grubunda*; antral ve graaf foliküllerin teka interna ve granüloza hücrelerinde kuvvetli nükleer ve sitoplazmik LH-R ifadenmesi görüldü (Şekil 4.18,A-B)



Resim 4.18. LH-R primer antikorı ile boyanmış kontrol grubuna ait ovaryum dokusu

Primordiyal folikül (→), tek tabakalı primer folikül (TPF), graaf folikül (GF), antrum (A), oosit sitoplazması (▷), teka interna (TI), teka eksterna (TE), atretik folikül (★), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (→), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen, Ax100, Bx200)

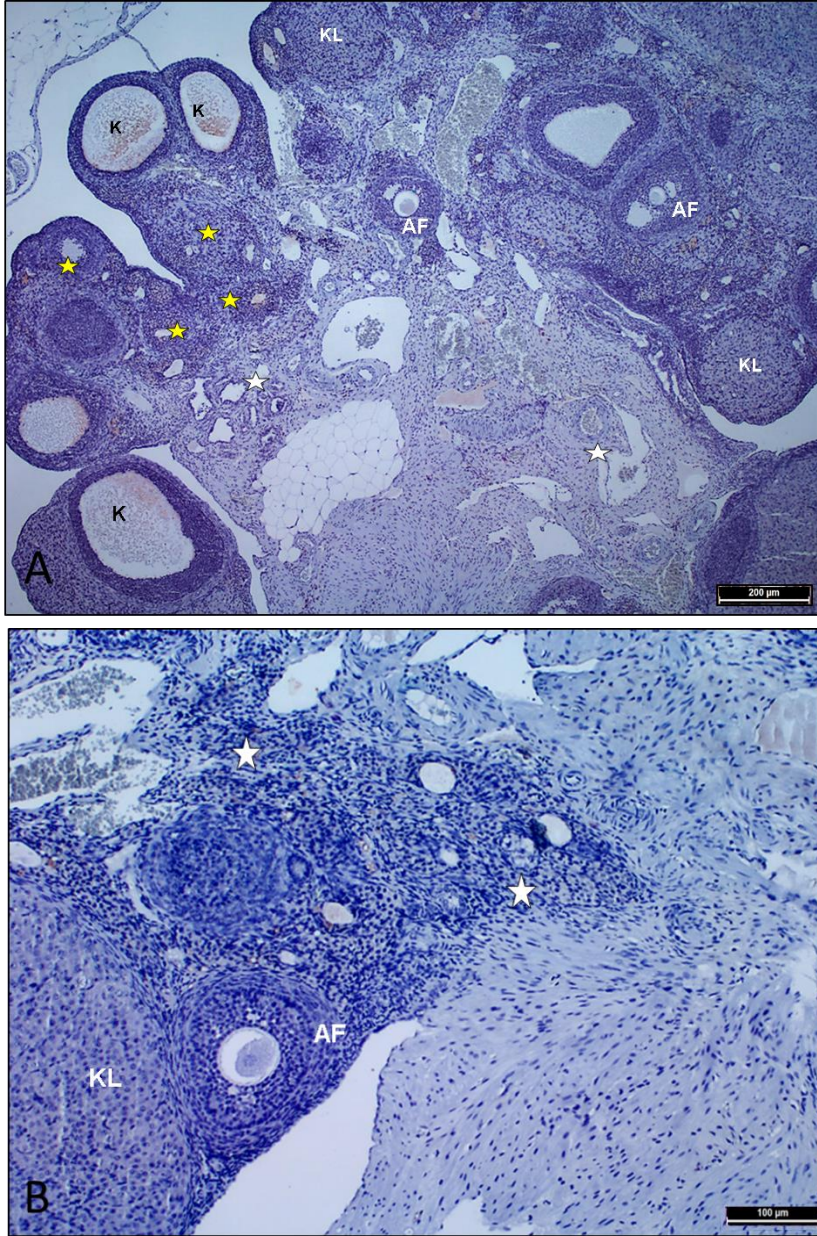
Deney-1 grubunda; antral ve graaf foliküllerin teka interna ve granüloza hücresi sitoplazmasında ve korpus luteum yapılarında LH-R tutulumunun neredeyse ortadan kalktığı izlendi (Şekil 4.19, A-B).



Resim 4.19. LH-R primer antikorı ile boyanmış D1 grubuna ait ovaryum dokusu

Tek tabakalı primer folikül (TPF), çok tabakalı primer folikül (ÇPF), antral folikül (AF), graaf folikül (GF), antrum (A), oosit sitoplazması (▷), teka interna (Tİ), teka eksterna (TE), atretik folikül (☆), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (→), (İmmünperoksidaz-Hematoksilen, Ax100, Bx200)

Deney-2 grubunda ise deney-1 ile benzer şekilde, antral foliküllerin teka interna ve granüloza hücresi sitoplazmasında, korpus luteum yapılarında ve kistik yapıların teka interna hücrelerinde LH-R ifadelenmesinin neredeyse ortadan kalktığı görüldü (Şekil 4.20, A-B).



Resim 4.20. LH-R primer antikoru ile boyanmış D2 grubuna ait ovaryum dokusu
Antral folikül (AF), atretik folikül (★), kist (K), korpus luteum (KL), stromal bağ doku (☆), germinal epitel (➔), (İmmünperoksidad-Hematoksilen, Ax100, Bx200)

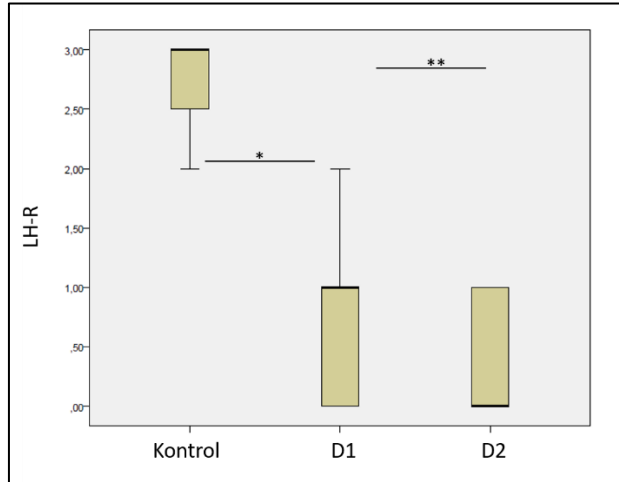
Antral ve graaf foliküllerin LH-R immünreaktivite seviyeleri tüm deney gruplarında H-Score yöntemi kullanılarak değerlendirildi ve istatistiksel olarak karşılaştırıldı; *deney-1* ile *deney-2 grupları* kıyaslandığında teka interna, granüloza hücreleri ve korpus luteum yapılarındaki LH-R ifadenmesinde anlamlı bir fark görülmedi ($p=0,134$) Ancak, teka interna ve granüloza hücrelerindeki LH-R ifadenme seviyesinin, *deney-1* ile *deney-2 gruplarında*, kontrole kıyasla anlamlı ölçüde azaldığı izlendi ($p<0,001$).

- İstatistiksel sonuçlara ait tanımlayıcı veriler Çizelge 4.5 de özetlenmiştir.

Çizelge 4.6. LH-R immünreaktivite seviyelerinin istatistiksel sonuçlarına ait tanımlayıcı veriler

GRUPLAR	LH-R			
	Mean $\pm$ SD	Min-Max	(Median) Interquartile Range	p değeri
Kontrol (n=6)	2,75 $\pm$ 0,43	2,00-3,00	(3,00) 0,75	<0,001 ^b
D1 (3 tekrar) (n=6)	0,88 $\pm$ 0,66	0,00-2,00	(1,00) 1,00	
D2 (5 tekrar) (n=6)	0,41 $\pm$ 0,50	0,00-1,00	(0,00) 1,00	

b: Kruskal Wallis test



($p<0,05$ * işaretiyle gösterilmiştir, *:grup 1-2 arası, **:1-3 arası anlamlı farklılıklar)

Şekil 4.3. LH-R immünreaktivite seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması

4.2. ELISA Bulguları

Deney gruplarında, E2 düzeyi *kontrol gruplarına* göre artmış şekilde izlendi ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmadı. Estradiol seviyeleri *deney-2* grubunda *deney-1 grubundan* fazla şekilde tespit edildi ancak bu grupların arasındaki farklılık anlamlı değildi.

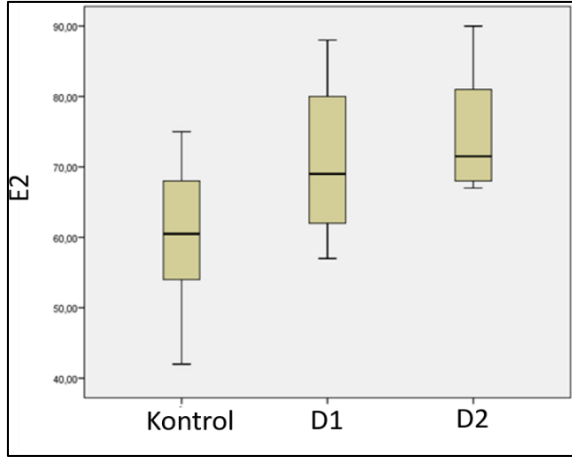
LH düzeyleri *kontrol* ve *deney-2* grupları arasında anlamlı görülmezken, *kontrol* ve *deney-1* grupları arasında anlamlı fark saptandı. LH açısından en fazla artış görülen grup *deney-1* grubu olarak izlendi. Deney gruplarındaki LH düzeyi, *kontrol* grubuna göre artmış şekilde tespit edildi ve *deney* grupları arasında anlamlı fark bulundu.

FSH düzeylerinde *kontrol* ve *deney-1* grupları arasında istatistik açıdan anlamlı fark tespit edildi ve en fazla FSH artışı *deney-1* grubunda gözlemlendi. FSH düzeyleri deney gruplarında artış gösterirken bu gruplar arasında anlamlı fark bulunamadı. *Deney-2* gruplarında FSH kontrol gruplarından fazla görüldüğü halde, iki grup arasında anlamlı fark saptanmadı.

- İstatistiksel sonuçlara ait tanımlayıcı veriler Çizelge 4.6. de özetlenmiştir.

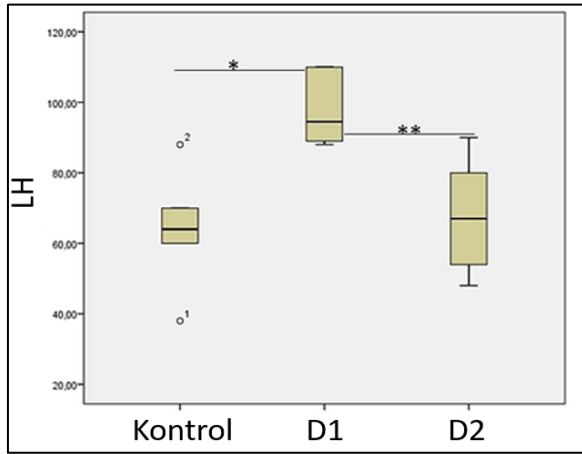
Çizelge 4.7. E2, LH ve FSH hormonların istatistiksel sonuçlara ait tanımlayıcı veriler

DEĞİŞKENLER	GRUPLAR	Mean±SD	(Median) Min-Max	p değeri
E2	Kontrol (n=6)	60,00±1,21	(60,50) 42,00- 5,00	0,085
	D1 (3 tekrar) (n=6)	70,83±1,14	(69,00) 57,00-88,00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	74,83±9,19	(71,50) 67,00-90,00	
LH	Kontrol (n=6)	64,00±1,61	(64,00) 38,00-88,00	0,003
	D1 (3 tekrar) (n=6)	97,66±1,05	(94,50) 88,00-110,00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	67,66±1,73	(67,00) 48,00-90,00	
FSH	Kontrol (n=6)	18,50±5,99	(19,50) 9,00- 25,00	0,013
	D1 (3 tekrar) (n=6)	42,50±1,50	(47,50) 18,00-56,00	
	D2 (5 tekrar) (n=6)	23,38±1,50	(23,00) 5,80-42,00	



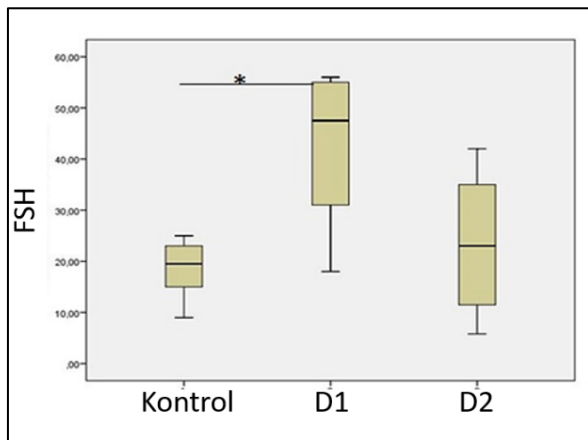
(Gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır.)

Şekil 4.4. E2 hormon seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması



($p < 0,05$ * işaretiyle gösterilmiştir, *:grup 1-2 arası, **:2,3 arası anlamlı farklılıklar)

Şekil 4.5. LH hormon seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması



($p < 0,05$ * işaretiyle gösterilmiştir, *:grup 1-2 arası, anlamlı farklılıklar)

Şekil 4.6. FSH'a hormon seviyelerinin tüm deney gruplarında karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Ovaryumlar, üreme döngüsü süresince önemli yapısal ve işlevsel değişiklikler gösteren, dişi üreme hücresi ovum'u üreten ve salgıladığı hormonlarla, dişi genital sistem organları üzerinde etkili olan bir organdır. Ovaryumların en önemli işlevsel birimleri ise ovaryum folikülleridir. Over rezervini temsil eden primordiyal foliküllerin çoğunluğu üretken dönem boyunca sessiz durumda beklerken, bir grup primordiyal folikülde ergenlik evresinden başlayarak, oosit, granüloza hücreleri ve folikülü çevreleyen stromal hücrelerdeki değişimleri kapsayan bir büyüme süreci başlar. Bu süreçte otokrin - parakrin şekilde hareket eden bazı ekstra-hücrel matriks bileşenleri ve büyüme faktörleri rol oynar [111-113]. Bu faktörleri kapsayan hücre içi sinyal yolları henüz tam olarak çözülmemiş olsa da son zamanlarda transgenik hayvan modellerini kullanarak yapılan çalışmalarla, primordiyal folikül havuzunun büyümesini tetikleyen moleküler mekanizmalar aydınlatılmaya çalışılmaktadır. Primordiyal folikül aktivasyonu ile ilgili en önemli mekanizmalardan biri *PI3K sinyal yolağı*'dır [114]. Bu sinyal yolağının bileşenleri olan ve folikül popülasyon dinamiklerinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülen moleküller temel olarak *PI3K*, *PIP2*, *PIP3*, *PDK-1*, *Akt*, *p27*, *TSC*, *mTOR*, *S6K1*, *Foxo3* ve *PTEN* 'dir [115-116].

Hücre proliferasyonu, canlılığı, göçü ve apoptoz gibi birçok hücrel süreçlerde kritik rol oynayan ve tümör baskılayıcı bir gen olduğu bilinen PTEN, PI3K sinyal yolağının negatif düzenleyicisidir. Mutant fareler üzerinde yapılan birçok çalışmada, PTEN'in bu sinyal yolağındaki diğer moleküller ile sinerjik ve koordineli bir şekilde çalışarak primordiyal foliküllerin büyümelerini baskıladığı ve bu şekilde over rezervini koruduğu gösterilmiştir.

PTEN ekspresyonundaki artış, hücre siklusu, apoptoz, büyüme ve farklılaşma gibi pek çok önemli yolda görevleri olan AKT ekspresyonunu baskılar. Akt memelilerde, hücre siklusunun G1 fazında tutuklu kalmasından sorumlu olan ve primordiyal folikülden primer foliküle geçişteki en önemli baskılayıcılardan birisi olan p27'yi inhibe eder [117]. Literatürdeki mevcut çalışmalar, p27 geninin memeli ovaryum gelişiminde önemli bir belirleyici olduğunu destekler niteliktedir. Deney hayvanları üzerinde yapılan bir çalışmada p27 geni silinmiş farelerin tüm primordiyal foliküllerinde erken aktivasyon görülmüştür [118]. Benzer bir çalışmada ise, p27 geni silinmiş farelerde, erken aktive

olan foliküllerde ovülasyon ve lüteal hücre farklılaşmasının gerçekleştirilemediği gösterilmiştir [119-120].

Akt memelilerde, primordiyal foliküllerin sessizliği ve aktivasyonunun düzenlenmesinde rol oynayan TSC'nin fosforilasyonunu düzenler. Literatürde PTEN ve TSC ile ilgili birçok çalışma bildirilmiştir. TSC molekülü mTORC1 yolağı üzerinden S6K1'in fosforilasyonunu inhibe eder. Bu inhibisyon sayesinde primordiyal foliküllerin aktivasyonu engellenir. PTEN molekülü TSC'ye benzer şekilde aynı inhibisyonu PDK1 yolağı üzerinden sağlar. PTEN, PDK1 inhibisyonu ile S6K1'in fosforile olmasını engeller. Daha açık bir ifadeyle, primordiyal havuzun korunması için PTEN molekülünün PDK1'i baskılaması gerekmektedir. PTEN ve TSC1 geni silinmiş farelerle yapılan çalışmalarda, PTEN ve TSC1 yokluğunun primordiyal foliküllerin aşırı aktivasyona neden olduğu ve buna bağlı olarak primordiyal folikül rezervin tükendiği gösterilmiştir [121-122].

FOXO3 primordiyal foliküllerde oosit çekirdeğinde yüksek düzeyde ekspres edilen ve over rezervinin korunmasında rol oynayan bir transkripsiyon faktörüdür. Akt memelilerde, FOXO3'ü fosforile ederek bu faktörün apoptotik transkripsiyonel aktivitesini etkileyebilir. Farelerde FOXO3'ün azalan ekspresyonunun, primordiyal foliküllerde apoptozu indüklediği ve böylece over rezervini azalttığı bilinmektedir [123]. Kemirgenler üzerinde yapılan benzer bir çalışmada, PTEN, Tsc1 ve Foxo3a genlerin oosit - spesifik delesyonunun dormant primordiyal foliküllerin toplu aktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir [124].

KOH yıllardır uygulanan bir teknik olmasına rağmen, literatürde tekrarlanan KOH uygulamalarının over rezervine olan etkisini *PI3K sinyal yolağı* üzerinden inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Biz de çalışmamızda, KOH uygulanan deney gruplarımızda primordiyal folikül havuzun azalması ile PTEN ve FOXO3 moleküllerinin ekspresyonlarındaki azalmasının doğru orantılı olduğunu düşünmekteyiz. KOH uygulamalarından sonra PTEN ve FOXO3 ekspresyonlarının azalması ile primordiyal folikül havuzunu koruyan mekanizma veya mekanizmaların dengesi bozuluyor olabilir. Çalışmamızın verileri de bu durumu destekler niteliktedir.

Günümüzde KOH uygulamaları, infertilite olgularının artması ile birlikte yardımla üreme tekniklerinin vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. Bu nedenle son zamanlarda, hiperstimülasyon uygulamalarının insan vücudu üzerine olan etkisi birçok araştırmacının ilgisini çekmektedir. Literatürde, tekralanan KOH uygulamalarının ovaryumların yapı ve fonksiyonu, over rezervi, foliküler histoloji, embriyo kalitesi, genetik mekanizmalar ve klinik gebelik oranı üzerinde olan olumlu ve/veya olumsuz etkilerinin incelendiği birçok çalışma bulunmaktadır [5,6,7].

Memelilerde ovaryum foliküllerinin büyümesi ve gelişmesi, çeşitli genetik ve epigenetik mekanizmaların kontrolü altındadır [125]. Hiperstimülasyon uygulamalarının bu mekanizmalar üzerindeki etkilerini inceleyen çeşitli çalışmalarda, süperovulasyon ile üretilen embriyoların normal yolla üretilenlerle farklı bir gen ekspresyon profillerine sahip oldukları gösterilmiştir. Yine bu çalışmalarda, süperovulasyonun olumsuz etkileri arasında DNA metilasyon kaybı, DNA metilasyon artışı ve DNA metilasyon gecikmesi gibi olgulara dikkat çekilmiştir [126-128].

Kemirgenler üzerinde yapılan bir çalışmada süperovulasyon ile elde edilen blastosistlerde DNA metilasyon düzeyinin kontrole göre özellikle iç hücre kitlesinde azaldığı bildirilirken [129]. Benzer bir çalışmada ise oositlerde, embriyolarda, fetüslerde ve plasentalarda değişmiş DNA metilasyonu hiperstimülasyon uygulamaları ile ilişkilendirilmiştir [130]. Literatürdeki bu çalışmalar, DNA metilasyonun fare gelişimi ve germ hücre farklılaşması için gerekliliğini ve yardımcı üreme tekniklerinin, embriyo gelişimi sırasında bu epigenetik düzenlemeyi aksatabileceğini vurgulamışlardır.

Oosit olgunlaşması nükleer ve sitoplazmik olgunlaşma olarak ikiye ayrılır. Nükleer olgunlaşma oositin germinal vezikül (GV) evresinden, metafaz II (MII) aşamasına kadar geçirdiği süreç olarak tanımlanırken, sitoplazmik olgunlaşma ise bu sırada meydana gelen yapısal değişiklikleri kapsayan süreçtir. Sitoplazmik olgunlaşma, oositin fertilizasyon, bölünme ve blastosist gelişimi aşamalarını düzgün bir şekilde gerçekleştirebilmesini sağlar [131,132]. Yapılan çalışmalarda, sitoplazmik olgunluğa ulaşamamış oositlerin yeterli kalitede olmadıkları ve normal gelişimsel süreçleri tamamlayamadıkları gözlemlenmiştir [133]. Oositlerin kaliteleri ve gelişim kapasiteleri, ovule olmadan önce içinde bulundukları folikülün çapından ve folikülün kalitesinden de etkilenir. Mevcut literatürde, büyük

foliküllerden elde edilen oositlerin gelişimsel kapasitelerinin küçük foliküllerden elde edilen oositlere oranla daha fazla olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur [134-136].

Biz de çalışmamızda, tekrarlanan KOH uygulanan deney gruplarından elde ettiğimiz olgun oosit çaplarının kontrol grubundan elde edilen olgun oosit çaplarına göre anlamlı derecede az olduğunu gözlemledik. Bu bilgiler ışığında klasik IVF uygulamasında da sıklıkla kullanılan hiperstimülasyon modelinin, elde edilen oosit ve olgun oosit sayısına, ovulasyon oranına ve olgun oositlerin çaplarına etkisi olduğunu düşünüyoruz.

Oosit çapı ile ilerleyen dönemdeki embriyonal gelişim süreci arasında da doğrudan bir ilişki vardır. Yeterli çapa ulaşamayan oositler mayotik yetenek kazansalar bile sitoplazmik olgunlaşma meydana gelmediğinden, ileri embriyonik gelişimi destekleyemezler.

Literatürde azalmış oosit kalitesi, gecikmiş embriyonik ve fetal gelişimi hiperstimülasyon uygulaması ile ilişkilendiren çalışmalar bulunmaktadır. Hansen M. ve arkadaşları, YÜT ile sağlanan gebeliklerde artmış gebelik komplikasyonları ve konjenital anomaliler rapor etmişlerdir [137-138]. Van der Auwera ve arkadaşları ise bu oositlerden elde edilen embriyolarda, gecikmiş embriyonik gelişim, artmış anormal blastosist oluşumu ve belirgin fetal büyüme geriliği gibi anomalilerin görüldüğünü belirtmişlerdir [139].

Normal ovulasyona sahip kadınlarda her menstüal döngüde bir grup antral folikül gonadotropinlerin etkisiyle büyür. Ancak bunlardan yalnızca bir tanesi tam olarak olgunlaşır. KOH protokollerinde ise aynı siklusta çok sayıda olgun oosit elde edebilmek amacıyla, insan menopozal gonadotropin (hMG) ve FSH gibi gonadotropinler ile klomifen sitrat (CC) gibi bazı medikal ajanlar kullanılmaktadır [140-144].

Ekzojen hormonların yüksek dozda kullanımının, over dokusu ve oosit maturasyonu üzerine olan etkisi birçok tartışmaya neden olmuştur. Literatürde genellikle, KOH ajanlarının over histolojisi ve oosit maturasyonu üzerine olumsuz etkilerinin olduğu gösterilse de, az olmakla birlikte olumsuz etkilerinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Örneğin, normal IVF uygulamasıyla, hiperstimülasyon protokolü kullanılarak yapılan IVF uygulamalarının karşılaştırıldığı bir çalışmada, her iki gruptaki embriyoların kalitesi ve yarıklanma kapasiteleri arasında bir fark olmadığı gösterilmiştir [145]. Benzer

bir çalışmada, yüksek seviyede gonadotropin uygulamasının oosit ve embriyo gelişimi üzerine doğrudan bir etkisinin olamadığı ifade edilmiştir [146].

Dinamik bir süreç olan foliküler gelişimin erken aşamaları, gonadotropinlerden bağımsız olarak gerçekleşse de aktive olmuş folikül grubu içinden tek bir baskın folikül seçiminde FSH ve LH'nin çok önemli etkileri vardır. Bu nedenle, gonadotropinler ve reseptörleri arasındaki etkileşim dışı üreme sistemi fonksiyonu üzerinde hayati rol oynar [147,148]. İnsanda, FSH-R ekspresyonu çok tabakalı primer folikül aşamasında, teka hücrelerinin görünümü ile birlikte granüloza hücrelerinin yüzeyinde başlar ve preantral folikülden antral foliküle gidildikçe artar [147-152].

FSH, FSH-R ile etkileşerek granüloza hücrelerini uyarmak amacıyla PI3K'in de içinde bulunduğu birçok hücre içi sinyal yolağını kullanır [153]. Literatürde, FSH'nin foliküler matürasyon sürecinde PI3K sinyal yolağını aktive ettiği [154-155] ve bu sinyal yolağında oluşan bir düzensizliğin foliküler atrezide artış [156]. ve steroid hormon sentezinde bozulma [157] ile sonuçlandığını gösteren çalışmalar mevcuttur.

FSH ile uyarılan mural granüloza hücrelerinden yanıt olarak, granüloza hücrelerinin çoğalması, büyümesi ve farklılaşmasında rol oynayan yüzden fazla hedef genin aktivasyonu sağlanır. Bu genlerden birisi de LH-R' dır. Foliküllerin sağlıklı şekilde ovulasyona doğru ilerlemesi için yeterli sayıda LH-R'ne sahip olması gerekmektedir [158-162].

Literatürdeki mevcut çalışmalarda, LH-R ekspresyonunun oosit matürasyonu, ovulasyon ve luteinizasyon için gerekli olduğu vurgulanmaktadır. Zhang ve arkadaşları, LH-R knockout farelerle yaptıkları bir çalışmada, bu farelerde kontrole kıyasla küçük ovaryum, ince uterus ve vajinal açıklık oluşumunda gecikme olduğu bildirilmişlerdir [163]. Bir diğer çalışmada ise LH-R knockout farelerin ovaryumunda antral folikül oluşumu gözlemlendiği ancak, preovulatar folikül ve KL oluşumunun görülmedi bildirilmiştir. Bu çalışmada, folliküller yüksek dozda FSH ile uyarılsalar bile foliküler gelişimlerinin antral folikülden öteye gitmediği görülmüş ve LH-R foliküler maturasyon için vazgeçilmez olduğu vurgulanmıştır [164].

Ovaryumda LH-R ekspresyonunun gerçekleşmesi için FSH indüksiyonu gereklidir. Sıçan granüloza hücrelerinde, bir FSH antagonisti olan FRBI (FSH-receptor binding inhibitör) aracılığı ile FSH - FSH-R etkileşiminin bloke edildiği bir in vivo deney modelinde, LH-R ekspresyonunun anlamlı ölçüde azaldığı [165]. benzer başka bir çalışmada ise azalmış LH-R ekspresyonu ile birlikte, bozulmuş granüloza hücre proliferasyonu ve artmış foliküler atrezi rapor edilmiştir [7]. Benzer bulgular FSH-R knockout farelerle yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir [166].

Bununla birlikte, ILGF-1, IL-6 ve östrojen gibi yerel faktörlerin de LH-R ifadenmesine üzerine önemli etkisi vardır. Bu etkileri inceleyen çeşitli çalışmalarda, foliküler gelişimin desteklenmesi için gerekli olan LH-R ifadenmesinin ancak, bu faktörlerin koordineli çalışması ile sağlanacağı vurgulanmıştır. Örneğin, granüloza hücrelerinde eksprese olan ER β geni içermeyen farelerle yapılan bir çalışmada, bu deneklerde LH-R ekspresyonu yetersiz olduğu ve FSH uyarımı ile indüklenen granüloza hücre farklılaşmasının duraksadığı görülmüştür [167]. Başka bir çalışmada ise, sıçan granüloza hücre kültür sistemine eklenen, IGF-1'in FSH-R [168] ve LH-R ekspresyonlarında artışa neden olduğu, bununla birlikte IGF-1 inhibitör uygulanan deneklerde ise LH-R ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir [169].

Biz de çalışmamızda, tekrarlanan KOH uygulanan gruplarda LH-R ekspresyonunun kontrole kıyasla anlamlı ölçüde azaldığını gözlemledik. LH-R ekspresyondaki bu azalmanın, KOH uygulamalarının PIK3 sinyal yolağında yarattığı düzensizlikten kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda elde ettiğimiz, PIK3 sinyal yolağın temel bileşenlerinden olan PTEN ve FOXO3 molekül ekspresyonlarındaki azalma bulguları da bu durumu destekler niteliktedir.

Bir kadının sahip olduğu toplam oosit sayısı genetik olarak belirlidir ve bu sayı yaşam boyu giderek azalır. Yardımla üreme tekniklerindeki ilerlemelere rağmen gebelik sağlamak amacıyla hastaların çoğunda birden fazla KOH uygulaması yapılması gerekmektedir. Bu durum tekrarlanan KOH uygulamaların, hastanın yumurtalık rezervini etkileyip etkilemeyeceği sorusunu gündeme getirmiştir. Literatürde yer alan birçok çalışmada, menstruel döngünün 3. gününde artmış E2 ve FSH seviyeleri, kötü over rezervinin göstergesi olarak kabul edilmektedir [76].

Biz de çalışmamızda, over rezervini belirlemek amacıyla KOH uygulanan gruplarda FSH, LH ve E2 seviyelerini kontrole kıyasla artmış olarak bulduk. Elde ettiğimiz bu veriler söz konusu gruplarda azalmış primordiyal folikül sayısı ve azalmış PTEN, FOXO3 ekspresyonlarındaki azalma bulguları ile de uyumluydu.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnfertilite olgularının artması ile birlikte KOH, yardımla üreme tekniklerinin vazgeçilmez bir parçası haline gelmiştir. YÜT çerçevesinde uygulanan KOH tekniği her ne kadar normal koşullarda çocuk sahibi olamayan çiftlere büyük ölçüde umut ışığı olsa da uzun vadedeki etkileri incelenmelidir. Bu uygulamaların dışı üreme sistemi üzerine olan etkisini inceleyen çalışmalar ise gün geçtikçe hız kazanmaktadır.

Bu çalışmada, tekrarlanan kontrollü ovaryan hiperstimülasyon'un, PIK3 hücre içi sinyal yolağının temel bileşenlerinden olan ve over rezervini koruduğu bilinen PTEN ve FOXO3 proteinleri ile LH-R ekspresyon düzeylerini azalttığı, over rezerv belirteçlerinden olan FSH, E2 ve LH gibi hormonların seviyelerini etkilediği, ovaryumun histolojik yapısı, oosit morfolojisi ve sayısı üzerinde olumsuz etkilere sebep olduğu izlenmiştir.

Elde ettiğimiz tüm bu veriler ışığında, fazla sayıda ve üst üste uygulanan KOH protokollerinin over rezervinin göstergesi olan primordiyal folikül havuzunu azaltarak menopoza yaşını öne çekebileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamız sonucunda elde edilen verilerin, KOH protokolleri sonrasında, over dokusunda önemli ölçüde azalan ya da tamamen yok olan proteinlerin korunmasına yönelik yeni tedavi ajanlarının/ilaçlarının geliştirilmesine katkı sağlayacağını ve böylece hastaların birçok yan etkisi olan ekzojen hormonlara etken kalmadan, alternatif yeni tedavi yöntemleri ile üretken dönemlerini sağlıklı olarak uzatabileceklerini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. İnternet: URL:
<http://www.webcitation.org/query?url=http%3A%2F%2Fwww.who.int%2Freproductivehealth%2Ftopics%2Finfertility%2Fdefinitions%2Fen%2F&date=2018-06-09>
 Son Erişim Tarihi: 18.01.2018.
2. Mosher, W.D. and Pratt, W.F. (1991). Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Fertility and Sterility*, 56(2), 192-3.
3. Barbieri, R.L. (2004). Female infertility. *Reproductive Endocrinology and Infertility*, (Fifth edition) USA: Elsevier Inc, 633-668.
4. Siristatidis, C. and Bhattacharya, B. (2007). Unexplained infertility: does it really exist? Does it matter?, *Human Reproduction*, 22(8), 2084–2087.
5. Singh, N., Naha, M., Malhotra, N., Lata, K., Vanamail, P. and Tiwari, A. (2014). Comparison of gonadotropin-releasing hormone agonist with GnRH antagonist in polycystic ovary syndrome patients undergoing *in vitro* fertilization cycle: Retrospective analysis from a tertiary center and review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 7(1), 52-57.
6. Caligara, C., Navarro, J., Vargas, G., Simon, C., Pellicer, A. and Remohi, J. (2001). The effect of repeated controlled ovarian stimulation in donors. *Human Reproduction*, 16, 2320–3.
7. Jain, A., Robins, J.C., Williams, D.B. and Thomas, M.A. (2005). The effect of multiple cycles in oocyte donors. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192(5), 1382-4.
8. Luk, J. and Arici, A. (2010). Does the ovarian reserve decrease from repeated ovulation stimulations?. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 22, 177–182.
9. Serna, J. and Garcí'a-Velasco, J.A. (2005). Effect of repeated assisted reproduction techniques on the ovarian response. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 17(3), 233-6.
10. Dong, G., Guo, Y., Cao, H., Zhou, T., Zhou, Z., Sha, J., Guo, X. and Zhu, H. (2014). Long-term effects of repeated superovulation on ovarian structure and function in rhesus monkeys. *Fertility and Sterility*, 102(5), 0015-0282.
11. Chao, H.T., Lee, S.Y., Lee, H.M., Liao, T.L., Wei, Y.H. and Kao, S.H. (2005). Repeated Ovarian Stimulations Induce Oxidative Damage and Mitochondrial DNA Mutations in Mouse Ovaries. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1042,148–156.
12. Ertzeid, G. and Storeng, R. (2001). The impact of ovarian stimulation on implantation and fetal development in mice. *Human Reproduction*. 16(2), 221-5.

13. Cakmak, E., Karakus, S., Demirpence, O. ve Demet Coskun, B. (2018). Ovarian Reserve Assessment in Celiac Patients of Reproductive Age. *Medical Science Monitor*, 24, 1152-1157.
14. Adhikari, D., Flohr, G., Gorre, N., Shen, Y., Yang, H., Lundin, E., Lan, Z., Gambello, M.J. and Liu, K. (2009). Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. *Molecular Human Reproduction*, 15(12), 765-70.
15. Adhikari, D., Zheng, W., Shen, Y., Gorre, N., Hamalainen, T., Cooney, A.J., Huhtaniemi, I., Lan, Z.J. And Liu, K. (2010). Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*, 19(3), 397-410.
16. Ouyang, J., L, T. Sun, H., Huang, J., Tang, D., Wu, L., Zheng, Y. and Zheng, L. (2013). RNA interference mediated pten knock-down inhibit the formation of polycystic ovary. *Molecular Cell Biochemistry*, 380(1-2), 195–202.
17. Wang, L., Liu, J., Chen, C., Cheng, S., Sun, X., Zhao, Y., Yin, S., Hou, Z., Pan, B., Ding, C., Shen, W. and Zhang, X. (2014). Regulation of primordial follicle recruitment by cross-talk between the Notch and phosphatase and tensin homologue (PTEN)/AKT pathways. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(6), 700-712.
18. Goto, M., Iwase, A., Ando, H., Kurotsuchi, S., Harata, T. And Kikkawa, F. (2007). PTEN and Akt expression during growth of human ovarian follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 24(11), 541–546.
19. Georgescu, M. (2010). PTEN Tumor Suppressor Network in PI3K-Akt Pathway Control. *Genes & Cancer*, 1(12), 1170–1177.
20. Putz, R. and Pobst, R. (2001). *Sabotta Atlas of Human Anatomy*. (Thirteenth edition). USA: Lippincott Williams & Wilkins.
21. Schünke, M., Schulte, E. and Schumacher, U. (2007). *Promethus Anatomi Atlası*. (Çev. Yıldırım, M.), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 240-256.
22. Arıncı, K ve Elhan, A. (2001). *Anatomi*. (İkinci baskı). Ankara: Güneş Kitap Evi, 426-429.
23. Cumhuriyet, M., Yener, N. Ve Tuncel, M. (2001). *Temel Anatomi*. Ankara: Odtü Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim, 281- 283.
24. Dere, F. (1996). *Anatomi*. (dördüncü baskı). Adana: Okullar Pazarı Kırtasiye ve Ticaret.
25. Gövsa, G.F. (2003). *Sistematik Anatomi*. (birinci baskı). İzmir: Güven Kitapevi.
26. Fritsch, H. and Kuehnel, W. (2013). *İnsan Anatomisi Renkli Atlası, İç Organlar* (Çev. Kopuz, C.) İstanbul: İstanbul Tıp Kitabevi. (Eserin orijinali 2008’ de yayımlandı). 248-262.

27. Yıldırım, M. (2006). *İnsan Anatomisi*. (ikinci baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 167-169.
28. Moore, L.K., Agur M.R.A. (2006). *Temel Klinik Anatomi*. (Çev. Elhan, A., Barut, Ç., ve Ersoy, M.). Ankara: Güneş Kitabevi, 246-247.
29. Snell, S.R. (1998). Tıp Fakültesi Öğrencileri İçin Klinik Anatomi. (Çev. Yıldırım, M.), İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri.
30. Mills, S.E. (2007). *Histology for Pathologists*. (Third edition). USA: Lippincott Williams & Wilkins. 1062- 1094.
31. Erdoğan, D., Hatipoğlu, M.T., Görgün, M., Ilgaz, C. (2007). *Özel Histoloji*. (ikinci baskı). Ankara: Hatipoğlu Yayınevi.
32. Junqueira, C.L. and Carneiro, J. (2006). *Temel Histoloji*. (Aytekin, Y., Solakoğlu, S.) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri; (Eserin orijinali 2003'te yayımlandı). 449- 459.
33. Erkoçak, A. (1984). *Özel Histoloji*. (dördüncü baskı.) Ankara: A.Ü. Tıp Fak. Basım Evi
34. Fawcett, D.W. and Jensh, R.P. (2002). Bloom & Fawcett's Concise Histology. (Second edition) Landon: A member of Hodder Headline Group. 282- 299.
35. Gartner, L.P. and Hiatt, J.L. (2007). *Color Textbook of Histology*, (Third edition). USA: Elsevier's, 489-500.
36. Henrikson, R.C, Kaye, I.G. and Mazurkiewicz, J.E. (1997). *National Medical Series for Independent Study*. (First edition). USA: Lippincott Williams & Wilkins. 373- 381.
37. Eşrefoğlu, M. (2016). *Özel Histoloji*. (ikinci baskı). İstanbul Tıp Kitabevi.
38. Sadler,T.W. (2011). *Langman's Medikal Embriyoloji*. (Çev. Başaklar, A.C.) Palme Yayınları, (Eserin orijinali 2009'da yayımlandı), 328- 354.
39. Cochard, L.R. and Netter, F.H. (2006). *Netter's atlas of Human Embryolog*. (First edition). USA: Icon Learning Systems Medimedia.
40. Yildirim, M., Okar, İ. ve Dalcik, H. (Editörler). (2002). *İnsan Embriyolojisi*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 323-324.
41. Kim, J. (2012). Control of ovarian primordial follicle activation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, 39(1), 10-14.
42. Oktem, O. and Urman, B. (2010). Understanding follicle growth in vivo. *Human Reproduction*, 25(12), 2944–2954.
43. Carlson, M.B. (2009). *Human Embryology and Developmental Biology*. (Fourth edition). Mosby Elsevier, 403-437.
44. Moore, K.L., Persaud, T.V.N. (2009). *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. (Çev. Yıldırım, M. ve Dalçık, H.), Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri, 262- 284.

45. Young, B. and, Heath, J.W. (2000). *Wheater's Functional Histology a Text and Colour Atlas*. (Third edition). London: Copyright Licensing Agency, 341-348.
46. Elvin, JA. and Matzuk, MM. (1998). Mouse models of ovarian failure. *Reviews of Reproduction*, 3, 183-95.
47. Guyton, C.A. and Hall, E.J. (2007). *Tıbbi Fizyoloji*. (Çev. Çavuşoğlu, H., Yeğen, Ç.B.), İstanbul: Nobel Tıp Kitap Evleri, 1011-1025.
48. Ganong, W.F. (2002). *Tıbbi Fizyoloji*. (Çev. Türk Fizyolojik Bilimler Derneği). Ankara: Nobel Tıp Kitap Evleri, 419- 433.
49. Erdoğan, G. (2005). *Endokrinoloji Temel ve Klinik*. (ikinci baskı). Ankara: Medikal & Nobel, 673- 689.
50. Kierszenbaum, A.L. (2006). Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş. (Çev. Ramazan Demir). Ankara: Palme Yayınları. (Eserin orijinali 2002'de yayımlandı). 531-564.
51. Ross, M.H. and Pawlina, W. (2011). *Histology A Text and Atlas*, (Sixth edition). USA: Lippincot Williams & Wilkins, 726-757.
52. Ovalle, W.K. and Patrick, C.N. (2009). *Netter Temel Histoloji*. (Çev. S. Müftüoğlu, P. Atilla ve F. Kaymaz). Ankara: Güneş Tıp Kitapevleri, 399-409.
53. Grazul-Bilska, AT., Reynolds, LP. And Redmer, DA. (1997). Gap Junctions in the Ovaries. *Biology Of Reproduction*, 57, 947-957.
54. Tanyolaç, A. (1999). *Özel Histoloji*. Ankara: Yorum Basımevi, 144-152.
55. Yılmaz, O.H., Valdez, R., Theisen, B.K, Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H. and Morrison, S.J. (2006). Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*, 441(7092), 475-82.
56. Chang, E., Lim, E., Yoon, S., Jeong, K., Bae, S., Lee, D.R., Yoon, T.K., Choi, Y. and Lee, W.S. (2015). Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/ AKT/FOXO3a Pathway which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice. *Plos One*, 10(12).
57. McGee, E.A. and Hsueh, A.J. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, 21(2), 200-14.
58. Eppig, J.J., Wigglesworth, K. and Pendola, F.L. (2002). The mammalian oocyte orchestrates the rate of ovarian follicular development. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(5), 2890-4.
59. Moniruzzaman, M. and Miyano, T., (2010). Growth of primordiyal Oocytes in Neonatal and Adult Mammals. *Journal of Reproduction and Development*, 56(6), 559-566
60. Driancourt, M.A., Reynaud, K., Cortvrindt, R. and Smitz, J.R. (2000). Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Reviews of Reproduction*, 5(3), 143-52.

61. Parrott, J.A and Skinner, M.K. (1999). Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, 140(9), 4262-71.
62. Hutt, K.J., McLaughlin, E.A. and Holland, M.K. (2006). Kit ligand and c-Kit have diverse roles during mammalian oogenesis and folliculogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 12(2), 61–69.
63. Reddy, P., Zheng, W. and Liu, K. (2010). Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 21(2), 96-103.
64. Liu, K., Rajareddy, S., Liu, L., Jagarlamudi, K., Boman, K. and Selstam, G. (2006). Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Developmental Biology*, 299(1), 1-11.
65. John, G.B., Gallardo, T.D., Shirley, L.J. and Castrillon, D.H. (2008). Foxo3 is a PI3K dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. *Developmental Biology*, 32(1), 197–204.
66. Reddy, P., Adhikari, D., Zheng, W., Liang, S., Hamalainen, T., Tohonen, V., Ogawa, W., Noda, T., Volarevic, S., Huhtaniemi, I. and Liu, K. (2009). PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*, 18(15), 2813–2824.
67. Edson, M.A., Nagaraja, A.K. and Matzuk, M.M. (2009). The Mammalian Ovary From Genesis To Revelation. *Endocrine Reviews*, 30(6), 624-712.
68. Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296(5573), 1655-7.
69. Reddy, P., Shen, L., Ren, C., Boman, K., Lundin, E. and Ottander, U. (2005). Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology*, 281(2), 160-70.
70. Sarbassov, D.D., Guertin, D.A., Ali, S.M. and Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307(5712), 1098-1101.
71. Wullschleger, S., Loewith, R. and Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, 124(3), 471-84.
72. Castrillon, D.H, Miao, L., Kollipara, R., Horner, J.W and DePinho, R.A. (2003). Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science*, 301(5630), 215-8.
73. Kezele, P.R, Nilsson, E.E and Skinner M.K. (2002). Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 192(1-2), 37-43.

74. Greer, E.L. and Brunet, A. (2005). FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene*, 24(50), 7410-7425.
75. Tran, H., Brunet, A. and Grenier, J.M. (2002). DNA repair pathway stimulated by the forkhead transcription factor FOXO3a through the Gadd45 protein. *Science*, 296(5567), 530-534
76. Kops, G.J., Dansen, T.B. and Polderman, P.E. (2002). Forkhead transcription factor FOXO3a protects quiescent cells from oxidative stress. *Nature*, 419(6904), 316-321.
77. Gilley, J., Coffey, P.J. and Ham, J. (2003). FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *The Journal of Cell Biology*, 162(4), 613-22.
78. Sandri, M., Sandri, C. and Gilbert, A. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117(3), 399-412.
79. Pelosi, E., Omari, S., Michel, M., Ding, J., Amano, T., Forabosco, A., Schlessinger, D. and Ottolenghi, C. (2013), Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice. *Nature Communications*, 4,1843.
80. Engelman, J.A., Luo, J. and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews. Genetics*, 7(8), 606-19.
81. Zheng, W., Nagaraju, G. and Liu, Z. (2012). Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 356(1-2), 24-30.
82. Sansal, I. and Sellers, W.R. (2004). The Biology and Clinical Relevance of the PTEN Tumor Suppressor Pathway. *American Society of Clinical Oncology*, 22(14), 2954-2963.
83. Chuang, C.C, Chen, C.D., Chao, K.H., Chen, S.U., Ho, H.N. and Yang, Y.S. (2003). Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, 79(1), 63-8.
84. Muttukrishna, S., McGarrigle, H., Wakim, R., Khadum, I., Ranieri, D.M. and Serhal, P. (2005). Antral follicle count, anti-mullerian hormone and inhibin B: predictors of ovarian response in assisted reproductive technology? *Bjog*, 112(10), 1384-90.
85. Mukherjee, T., Copperman, A.B. and Lapinski, R. (1996). An elevated day 3 follicle stimulating hormone:luteinizing hormone ratio (FSH:LH) in the presence of a normal day 3 FSH predicts a poor response to controlled ovarian hyperstimulation. *Fertility and Sterility*, 65(3), 588-93.
86. Bukman, A. and Heineman, M.J. (2001). Ovarian reserve testing and the use of prognostic models in patients with subfertility. *Human Reproduction Update*, 7(6), 581-90.

87. Dewailly, D., Andersen, C.Y., Balen, A., Broekmans, F., Dilaver, N., Fanchin, R., Griesinger, G., Kelsey, T.W., La-Marca, A., Lambalk, C., Mason, H., Nelson, S.M., Visser, J.A., Wallace, W.H. and Anderson, R.A. (2014). The physiology and clinical utility of anti-Mullerian hormone in women. *Human Reproduction Update*, 20(3), 370.
88. Mutlu, M.F. and Erdem, A. (2012). Evaluation of ovarian reserve in infertile patients. *Journal of the Turkish-German Gynecological Association*, 13(3), 196–203.
89. La-Marca, A., Sighinolfi, G., Radi, D., Argento, C., Baraldi, E., Artenisio, A.C., Stabile, G. and Volpe, A. (2010). Anti-Mullerian hormone (AMH) as a predictive marker in assisted reproductive technology (ART). *Human Reproduction Update*, 16(2), 113-30.
90. Durdağ, G. ve Berke, B. (2008). Over Rezervinin Değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik Özel Dergisi*, 18, 254-265.
91. Gülerman, C. ve Kahyaoğlu, İ. (2013). Overlerin durumu ve over rezervinin değerlendirilmesi. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji Obstetrik Özel Dergisi*, 6(1), 7-13.
92. Broekmans, F.J., Kwee, J., Hendriks, D.J., Mol, B.W. and Lambalk, C.B. (2006). A systematic review of tests predicting ovarian reserve and IVF outcome. *Human Reproduction Update*, 12(6):685-718.
93. Fritz, M.A. and Speroff, L. (2010) *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, (eighth edition). USA: Lippincott Williams & Wilkins.
94. Tarlatzis, B.C., Fauser, B.C., Kolibianakis, E.M., Diedrich, K., Rombauts, L. and Devroey, P. (2006). GnRH antagonists in ovarian stimulation for IVF. *Human reproduction Update*, 12(4), 333-40.
95. Albano, C., Smits, J., Camus, M., Riethmüller-Winzen, H., Van-Steirteghem, A. and Devroey, P. (1997). Comparison of different doses of gonadotropin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during controlled ovarian hyperstimulation. *Fertility and Sterility*, 67(5), 917-22.
96. Olivennes, F., Cunha-Filho, J.S., Fanchin, R., Bouchard, P. and Frydman, R. (2002). The use of GnRH antagonists in ovarian stimulation. *Human Reproductive Update*, 8(3), 279-90.
97. Papanikolaou, E.G., Polyzos, N.P., Humaidan, P., Pados, G., Bosch, E., Tournaye H., and Tarlatzis, B. (2011). Aromatase inhibitors in stimulated IVF cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 85.
98. Lee, V.C. and Ledger, W. (2011). Aromatase inhibitors for ovulation induction and ovarian stimulation. *Clinical Endocrinology* 74(5), 537-46.
99. Bosdou, J.K., Venetis, C.A., Kolibianakis, E.M., Toulis, K.A., Goulis, D.G., Zepiridis, L. and Tarlatzis, B.C. (2012). The use of androgens or androgen-modulating agents in poor responders undergoing in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *Human Reproductive Update*, 18(2), 127-45.

100. Alaçam, E., Dinç, D.A., Güler, M., Eröz, S. ve Sezer A.N. (1988). Anöstrüs döneminde MAP, PMSG ve GnRH ile senkronize edilen koyunlarda RIA yöntemi ile erken gebelik tanısı üzerine çalışma. *Selçuk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 4(1), 91-98.
101. Semacani A., Kaymaz. M., Fındık, M., Rişvanlı, A., Köker, A. (Editörler). (2012). *Çiftlik Hayvanlarında Doğum ve Jinekoloji. Üremenin Denetlenmesi*. Malatya: Medipres Yayıncılık, 99-124.
102. Gomez, R., Simon, C., Remohi, J. and Pellicer, A. (2003). Administration of moderate and high doses of gonadotropins to female rats increases ovarian vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF Receptor-2 expression that is associated to vascular hyperpermeability. *Biology of Reproduction*, 68(6), 2164-2171.
103. Xie, J.K, Wang, Q., Zhang,T.T., Yin, S., Zhang, C.L. and Ge, Z.J. (2016). Repeated superovulation may affect mitochondrial functions of cumulus cells in mice. *Scientific Reports*, 6, 1-7.
104. Quintana, R., Kopcow, L., Marconi, G., Young, E., Yovanovich, C. and Paz, D.A. (2008). Inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) by meloxicam decreases the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in a rat model. *Fertility and Sterility*, 90(2), 1511-1516.
105. Pedersen, T. and, Peters, H. (1968). Proposal For A Classification Of Oocytes and Follicles in The Mouse Ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 17(3), 555-7.
106. Myers, M., Britt, K.L., Wreford, N.G., Ebling, F.J. and Kerr, J.B. (2004). Methods for quantifying follicular numbers within the Mouse ovary. *Reproduction*, 127(5), 569-80.
107. Cruz, G., Barra, R., Gonzalez, D., Sotomayor-Zarate R. and Lara, H.E. (2012). Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertility and Sterility*, 98(5), 1283-90.
108. Clausen, H.V., Larsen, L.G. and Gundersen H.J.G. (1998). Simple and efficient stereological quantitation of some placental structures. *Trophoblast Research*, 19(2), 41-56.
109. Akalan, M. A. ve Demirkan, A. Ç. (2013). Stereoloji ve Veteriner Hekimlikte Kullanım Alanları. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 24 (2), 95 – 100.
110. Ishibashi, H., Suzuki, T., Suzuki, S., Moriya, T., Kaneko, C., Takizawa, T., Sunamori, M., Handa, M., Kondo, T. and Sasano, H. (2003). Sex Steroid Hormone Receptors in Human Thymoma. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 88(5), 2309–2317.
111. Li, J., Kawamura, K., Cheng, Y., Liu, S., Klein, C., Duan, E.K. and Hsueh, A.J. (2010). Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceeding*

- of the National Academy of Sciences of the United States of America, 107(22), 10280-4.
112. Eppig, J.J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), 829–838.
 113. Skinner, M.K. (2005). Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproductive Update*, 11(5), 461–471.
 114. Hsueh, A.J.W., Kawamura, K., Cheng, Y. and Fauser, B.C.J.M. (2015). Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*, 36(1), 1–24.
 115. Accili, D. and Arden, K.C. (2004). FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell*, 117(4), 421-6.
 116. Kalich-Philosoph, L., Roness, H., Carmely, A., Fishel-Bartal, M., Ligumsky, H., Paglin, S., Wolf, I., Kanety, H., Sredni, B. and Meirow, D. (2013). Cyclophosphamide Triggers Follicle Activation and "Burnout"; AS101 Prevents Follicle Loss and Preserves. *Fertility Science Translational Medicine*, 5(185), 185.
 117. Kiyokawa, H., Kineman, R.D., Manova-Todorova, K.O., Soares, V.C., Hoffman, E.S., Ono, M., Khanam, D., Hayday, A.C., Frohman, L.A. and Koff, A. (1996). Enhanced growth of mice lacking the cyclin-dependent kinase inhibitor function of p27(Kip1). *Cell*, 85(5), 721-32.
 118. Tong, W., Kiyokawa, H., Soos, T.J., Park, M.S., Soares, V.C., Manova, K., Pollard, J.W. and Koff, A. (1998). The absence of p27 Kip1, an inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases, uncouples differentiation and growth arrest during the granulosa luteal transition. *Cell Growth Differentiation*, 9(9), 787-94.
 119. Rajareddy, S., Reddy, P., Du, C., Liu, L., Jagarlamudi, K., Tang, W., Shen, Y., Berthet, C., Peng, S.L., Kaldis, P. and Liu, K. (2007), p27kip1 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1B) controls ovarian development by suppressing follicle endowment and activation and promoting follicle atresia in mice. *Molecular Endocrinology*, 21(9):2189-202.
 120. Sicari, B.M., Troxell, R., Salim, F., Tanwir, M., Takane, K.K and Fiaschi-Taesch, N. (2012). c-myc and skp2 coordinate p27 degradation, vascular smooth muscle proliferation, and neointima formation induced by the parathyroid hormone-related protein. *Endocrinology*, 153(2), 861-72.
 121. Adhikari, D. and Liu, K. (2009). Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocrine Reviews*, 30(5), 438-64.
 122. Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hamalainen, T., Peng, S.L., Lan, Z.J., Cooney, A.J., Huhtaniemi, I. And Liu, K. (2008). Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, 319(5863), 611-3.
 123. Richards, J.S., Sharma, S.C., Falender, A.E. and Lo, Y.H. (2002). Expression of FKHR, FKHL1, and AFX genes in the rodent ovary: evidence for regulation by IGF-I, estrogen, and the gonadotropins. *Molecular Endocrinology*, 6(3), 580-99.

124. Novella-Maestre, E., Herraiz, S., Rodríguez-Iglesias, B., Diaz-Garcia, C. and Pellicer, A. (2015). Short-Term PTEN Inhibition Improves In Vitro Activation of Primordial Follicles, Preserves Follicular Viability, and Restores AMH Levels in Cryopreserved Ovarian Tissue From Cancer Patients. *PLoS One*, 10(5).
125. Pan, Z., Zhang, J., Li, Q., Li, Y., Shi, F., Xie, Z. and Liu, H. (2012). Current advances in epigenetic modification and alteration during mammalian ovarian folliculogenesis. *Journal of Genetics and Genomics*, 39(3), 111-23.
126. Market-Velker, B.A., Zhang, L., Magri, L.S., Bonvissuto, A.C. and Mann, M.R. (2010). Dual effects of superovulation: loss of maternal and paternal imprinted methylation in a dose-dependent manner. *Human Molecular Genetics*, 19(1), 36-51.
127. Denomme, M.M., Zhang, L. and Mann, M.R. (2011). Embryonic imprinting perturbations do not originate from superovulation-induced defects in DNA methylation acquisition. *Fertility and Sterility*, 96(3), 734-738.
128. Fauque, P. (2013). Ovulation induction and epigenetic anomalies. *Fertility and Sterility*, 99(3), 616-23.
129. Bakhtari, A., Rahmani, H.R., Bonakdar, E., Jafarpour, F., Asgari, V., Hosseini, S.M., Hajian, M., Edriss, M.A. and Nasr-Esfahani, M.H. (2014). The interfering effects of superovulation and vitrification upon some important epigenetic biomarkers in mouse blastocyst. *Cryobiology*, 69(3), 419-27.
130. Fauque, P., Jouannet, P., Lesaffre, C., Ripoche, M.A., Dandolo, L., Vaiman, D., Jammes, H. (2007). Assisted Reproductive Technology affects developmental kinetics, H19 Imprinting Control Region methylation and H19 gene expression in individual mouse embryos. *BMC Developmental Biology*, 7,116.
131. De Loos, F.A., Zeinstra, E. and Bevers, M.M. (1994). Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 39(2),162-5.
132. Kubelka, M., Motlik, J., Fulka, J.J., Prochazka, R., Rimkevichova, Z. and Fulka, J. (1988). Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p-aminobenzamidine block. *Gamete Research*, 19(4), 423-431.
133. Krisher, R.L. (2004). The effect of oocyte quality on development. *Journal of Animal Science*, 82, 14-23.
134. Lonergan, P., Monaghan, P. Rizos, D., Boland, M.P. and Gordon, I. (1994). Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 37(1), 48-53.
135. Pavlok, A., A. Lucas-Hahn, and Niemann, H. (1992). Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, 31(1), 63-7.
136. Carolan, C., Lonergan, P. Monget, P., Monniaux, D. and Mermillod, P. (1996). Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support

- cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction and Development*, 43(4), 477-83.
137. Hansen, M., Kurinczuk, J.J., Bower, C. and Webb, S. (2002). The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *The New England Journal of Medicine*, 346(10), 725-30.
 138. Schieve, L.A., Meikle, S.F., Ferre, C., Peterson, H.B., Jeng, G. and Wilcox, L.S. (2002). Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *The New England Journal of Medicine*, 346(10), 731-7.
 139. Van der Auwera, I. and D'Hooghe, T. (2001). Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development. *Human Reproduction*, 16(6), 1237-43.
 140. Huirne, J.A. and Lambalk, C.B. (2001). Gonadotropin-releasing-hormonereceptor antagonists. *Lancet*, 358(9295), 1793-803.
 141. Filicori, M. (1994). Gonadotrophin-releasing hormone agonists. A guide to use and selection. *Drugs*, 48(1), 41-58.
 142. Fauser, B.C. and Devroey, P. (2003). Ovarian stimulation and luteal phase consequences. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 14(5), 236-42.
 143. Oehninger, S. and Hodgen, G.D. (1990). Induction of ovulation for assisted reproduction programmes. *Bailliere's Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 4(3), 541-73.
 144. Fauser, B.C., Devroey, P., Yen, S.S., Gosden, R., Crowley, W.F., Baird, D.T. and Bouchard, P. (1999). Minimal ovarian stimulation for IVF: appraisal of potential benefits and drawbacks. *Human Reproduction*, 14(11), 2681-6.
 145. Ziebe, S., Bangsboll S., Schmidt, K.L., Loft, A., Lindhard, A., Nyboe, A.A. (2004). Embryo quality in natural versus stimulated IVF cycles. *Human Reproduction*, 19(6), 1457-60.
 146. Ng, E.H., Lau, E.Y., Yeung, W.S. and Ho, P.C. (2003). Oocyte and embryo quality in patients with excessive ovarian response during in vitro fertilization treatment. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 20(5), 186-91.
 147. Minegishi, T., Nakamura, K., Takakura, Y., Ibuki, Y. and Igarashi, M. (1991). Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175(3), 1125-1130.
 148. Minegishi, T., Nakamura, K., Takakura, Y., Miyamoto, K., Hasegawa, Y., Ibuki, Y. and Igarashi, M. (1990). Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 172(3), 1049-1054.
 149. Yamoto, M., Shima, K. and Nakano, R. (1992). Gonadotropin receptors in human ovarian follicles and corpora lutea throughout the menstrual cycle. *Hormone Research*, 37(1), 5-11.

150. Jeppesen, J.V., Kristensen, S.G., Nielsen, M.E., Humaidan, P., Canto, M.D., Fadini, R., Schmidt, K. T. Ernst, E. and Andersen C.Y. (2012). LH-receptor gene expression in human granulosa and cumulus cells from antral and preovulatory follicles. *J Clin Endocrinol Metab. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 97(8), 524-31.
151. Gougeon A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*, 17(2),121-55.
152. Zhang, M., Shi, H., Segaloff, D.L., Voorhis, B.J. (2001). Expression and localization of luteinizing hormone receptor in the female mouse reproductive tract. *Biology of Reproduction*, 64(1), 179-87.
153. Gonzalez-Robayna, I.J., Falender, A.E., Ochsner, S., Firestone, G.L., and Richards, Jo.S. (2000). Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Stimulates Phosphorylation and Activation of Protein Kinase B (PKB/Akt) and Serum and Glucocorticoid-Induced Kinase (Sgk): Evidence for A Kinase- Independent Signaling by FSH in Granulosa Cells. *Molecular Endocrinology*, 14(8), 1283–1300.
154. Alam, H., Maizels, E.T., Park, Y., Ghaey, S., Feiger, Z.J., Chandel, N.S. and Hunzicker-Dunn, M. (2004), Follicle-stimulating Hormone Activation of Hypoxia-inducible Factor-1 by the Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT/Ras Homolog Enriched in Brain (Rheb)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway Is Necessary for Induction of Select Protein Markers of Follicular Differentiation. *The Journal Of Biological Chemistry*, 279(19), 19431–19440.
155. Maizels, E.T., Cottom, J., Jones, J.R. and Hunzicker-Dunn, M. (1998). Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 139(7), 3353-6.
156. Nandedkar, T.D., Wadia, P.R., Mahale, S.D., Moodbidri, S.B. and Iyer, K.S. (1997). Regulation of folliculogenesis by intraovarian peptide. *Molecular Endocrinology*, 11(13), 1934–1949.
157. Chitnis, S.S., Selvakumar, C., Jagtap, D.D., Barnwal, R.P., Chary, K.V., Mahale, S.D. and Nandedkar, T.D. (2009). Interaction of follicle-stimulating hormone (FSH) receptor binding inhibitor-8: a novel FSH-binding inhibitor, with FSH and its receptor. *Chemical Biology and Drug Desing*, 73(6), 637-43.
158. Tanaka, M., Hennebold, J.D., Miyakoshi, K., Teranishi, T., Ueno, K. and Adashi, E.Y. (2003). The generation and characterization of an ovary-selective cDNA library. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202(1–2), 67-69.
159. Zeleznik, A.J., Midgley, A.R. Jr. and Reichert, L.E. Jr. (1974). Granulosa Cell Maturation in the Rat: Increased Binding of Human Chorionic Gonadotropin Following Treatment with Follicle-Stimulating Hormone. *Endocrinology*, 95(3), 818-25.
160. Alliston, T.N., Maiyar, A.C., Buse, P., Firestone, G.L. and Richards, J.S. (1997) Follicle Stimulating Hormone-Regulated Expression of Serum/Glucocorticoid-

- Inducible Kinase in Rat Ovarian Granulosa Cells: A Functional Role for the Sp1 Family in Promoter Activity. *Molecular Endocrinology*, 11(13), 1934-49.
161. Mahmood, S., Fahimeh, K. and Maryam, Z. (2014). Determination of FSH-receptor antagonistic property of 6-amino-4-phenyltetrahydroquinoline derivatives by employing QSDAR method. *Physical chemistry*, 9(2), 1-6.
 162. Hobbs, R.J., Howard, J., Wildt, D.E. and Comizzoli, P. (2012). Absence of seasonal changes in FSHR gene expression in the cat cumulus–oocyte complex *in vivo* and *in vitro*. *Reproduction*, 144, 111-122.
 163. Hunzicker-Dunn, M. and Maizels, E.T. (2006). FSH signaling pathways in immature granulosa cells that regulate target gene expression: branching out from protein kinase A. *Cellular signalling*, 18(9), 1351-9.
 164. Yu, F.Q., Han, C.S., Yang, W., Jin, X., Hu, Z.Y. and Liu, Y.X. (2005). Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. *Journal of Endocrinology*, 186(1), 85-96.
 165. Swati, S.C., Chellasamy, S., Dhanashree, D.J., Ravi, P.B., Kandala, V.R.C., Smita, D.M. and Tarala, D.N. (2009). Interaction of Follicle- Stimulating Hormone (FSH) Receptor Binding Inhibitor-8, A Novel FRBbinding Inhibitor, with FSH and its Receptor. *Chemical Biology and Drug Desine*, 73(6), 637-43.
 166. Chu, S. and Ferro, T.J. (2005). Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene*, 28(348), 1-11.
 167. Carlone, D.L. and Richards, J.S. (1997). Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and constitutive expression of aromatase in gonadal cells. *Molecular Endocrinology*, 11(3), 292-304.
 168. Mukherjee, A., Park-Sarge, O.K. and Mayo, K.E. (1996). Gonadotropins induce rapid phosphorylation of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 137(8), 3234-45.
 169. DeManno, D.A., Cottom, J.E., Kline, M.P., Peters, C.A., Maizels, E.T. and Hunzicker-Dunn, M. (1999). Follicle-stimulating hormone promotes histone H3 phosphorylation on serine-10. *Molecular Endocrinology*, 276(43), 40146–40155.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 17/11/2017-E.164636



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Cigdem ELMAS
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Daha önce 10.05.2017 tarihli ve E.68429 sayılı yazınız ile onay alan, araştırmacı grubu Cigdem ELMAS ve Perihan YALÇINKAYA'dan oluşan G.Ü.ET-17.027 kod numaralı ve "Tekrarlanan Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon'un (KOH) Over Rezervi Üzerine Etkisinin PTEN Yoluyla Üzerinden Araştırılması" başlıklı çalışmanız ile ilgili alınan 09.11.2017 tarihli ve E.160196 sayılı dilekçeniz 10.11.2017 tarih ve 10 sayılı Kurul toplantısında incelenmiştir.

Çalışmanızın başlığının "Tekrarlanan Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon'un (KOH) Diyl Üreme Sistemi Organları Üzerine Etkisinin Çeşitli Yolaklar Üzerinden Araştırılması" olarak değiştirilmesi ile araştırmacı grubuna Latife SAKİNER'in dahil edilmesi ile ilgili talebinizin uygun bulunduğu oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Ek:1 Liste

Akademik
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 20 78
e-Posta: badiyik@gaziedu.tr İnternet Adresi: http://badiyik@gaziedu.tr

Bilgi için: Nazif Güner
Kurul Etik Sorumlusu
Telefon No: 202 20 57

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-2. Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

	30 Kasım-08 Aralık 2011	X. DENEY HAYVANLARI UYGULAMA VE ETİK KURSU
KATILIM SERTİFİKASI		
Sayın, <u>Perihan YALGINKAYA</u>		
Gazi Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi tarafından, 30 Kasım-08 Aralık 2011 tarihleri arasında düzenlenen "Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu X"a katılarak, Teorik ve Pratik Eğitimleri başarı ile tamamlamış ve bu sertifikayı almaya hak kazanmıştır.		
 Prof. Dr. Rıza AYHAN Rektör		
 Prof. Dr. Gökhan ALPASLAN Etik Kurul Başkanı	 Prof. Dr. Nürten TÜRKÖZKAN Merkez Müdürü	
Sertifika No. 2011/10-11		

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : YALÇINKAYA Perihan
 Uyruğu : T.C.
 Doğum Tarihi ve Yeri : 15.03.1987, MERSİN
 Medeni Hali : Bekar
 Telefon : +90 534 810 87 69
 e-mail: : peri-ylcnky@hotmail.com



Eğitim Bilgileri

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Histoloji ve Emb.	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Histoloji ve Emb.	2012
Lisans	Çanakkale Onsekiz Mart Ü./Biyoloji	2009
Lise	Alanya A.Feyzi Alaettinoğlu Süper Lisesi/ Fen Bilimleri	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2017-	İstanbul Okan Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Araştırma Görevlisi
2014-2015	Özel Güven Hastanesi Tüp Bebek Merkezi	Klinik Embriyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Bildiriler

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildirileri

Yalçinkaya, P., Elmas, Ç., Erdoğan, D., Göktaş, G. ve Şener, D. (2017-27-30 May). *Structure of collagen and blood vessels of ovarium, in teens and old, in diabetic and normal pregnant rats.* 15th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry.

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Poster Bildirileri

Sakiner, L., Yalçinkaya, P., Bulut, İ.D., Yılmaz, C. ve Elmas, Ç. (2018-10-13 Mayıs). *Tekrarlanan Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon'un (KOH) Endometriyum Reseptivitesi Üzerine Etkilerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi*. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Antalya.

Yalçinkaya, P., Elmas, Ç., Erdoğan, D., Göktaş, G. ve Şener, D. (2014-27-30 May). *Diyabetik, Normal, Genç ve Yaşlı Gebelerde Ovaryum Kollajenleri ve Damar Yapısı*. XII. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Ankara.

Yalçinkaya, P., Yılmaz, C. ve Elmas, Ç. (2018-10-13 Mayıs). *Tekrarlanan kontrollü ovaryan hiperstimülasyon'un (KOH) Over rezervi üzerine etkisinin Pten yolağı üzerinden araştırılması. "Ovaryum morfolojisi kontrollü ovaryanhiperstimülasyon'dan etkilenir mi?"* 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Antalya.

Ulusal Katılımlı Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiri

Kalem, N. M., Kalem, Z., Anadol, E., Yılmaz, C., Elmas, Ç., Yalçinkaya, P., Ruso, H., Bakırarar, B. ve Gürkan, T. (2018-10-13 Mayıs). *Maternal beslenmenin yavruların üreme fonksiyonları üzerindeki etkisi*. 14. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, Antalya.

Sertifikalar, Katıldığı Seminer ve Konferanslar

2017: Klinik Embriyoloji Derneği, "4. Uluslararası Klinik Embriyoloji Derneği Kongresi"

2016: Hacettepe Üniversitesi Kök Hücre Araştırma ve Uygulama Merkezi, "Kök Hücre Günü"

2015: Klinik Embriyoloji Derneği, "3. Uluslararası Klinik Embriyoloji Derneği Kongresi"

2014: Hacettepe Üni. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum AD ÜYTE Eğitim Merkezi' nde "T.C Sağlık Bakanlığı Embriyoloji Laboratuvar Sorumlusu Eğitimi."

2014: Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği, "Sağlık Bilimlerinde Bilimsel Proje Hazırlama Eğitimi."

2012: 11. Gamet Biyolojisi Makale Kulübü (GABİMAK) Toplantısı

2011: Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi, 10. Deney Hayvanları Uygulama ve Etik Kursu, "Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası"



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..

