

**DOKSORUBİSİN KAYNAKLI OVARYUM HASARINDA ADİPOZ
KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
PTEN/AKT/FOXO3A YOLAĞI VE FOLİKÜLOGENEZ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

ARŞ. GÖR. HATİCE ORUÇ DEMİRBAĞ

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

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
MART 2020**

**DOKSORUBİSİN KAYNAKLI OVARYUM HASARINDA ADİPOZ
KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN
PTEN/AKT/FOXO3A YOLAĞI VE FOLİKÜLOGENEZ ÜZERİNE
ETKİLERİNİN İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

ARŞ. GÖR. HATİCE ORUÇ DEMİRBAĞ

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

**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**






**DANIŞMAN
Prof. Dr. EBRU BALLI**

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
2016-2-TP3-2851 nolu proje olarak desteklenmiştir.

**MERSİN
2020**

ONAY

Hatice ORUÇ DEMİRBAĞ tarafından Prof. Dr. Ebru BALLI danışmanlığında “Doksorubisin kaynaklı ovaryum hasarında adiposit kökenli mezenkimal kök hücrelerin PTEN/AKT/FOXO3a yolağı ve follikülojeniz üzerine etkilerinin incelenmesi” başlıklı bu çalışmada aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından oy birliği ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Unvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Ebru BALLI	
Üye	Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ	
Üye	Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU	
Üye	Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE	
Üye	Prof. Dr. Özgül TAP	

Yukarıdaki jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsünün 03.03.2020 tarih ve 2020-05/121 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr.


Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine aykırıdır.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yaz tüm bilgi ve sonuçlar bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Baskılanın eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesine devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

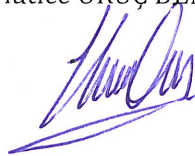
This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written information and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works. I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

2020

İmza

Hatice ORUÇ DEMİRBAĞ



ÖZET

Doksorubisin kaynaklı ovaryum hasarında adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin PTEN/AKT/FOXO3a yolağı ve follikülogenez üzerine etkilerinin incelenmesi

Kemoterapik ajan olan doksorubisin (DOX) primordiyal folikül havuzuna hasar vererek over rezervinin azalmasına ve infertiliteye neden olmaktadır. Kanser tedavisi gören hastalarda fertilitenin korunması için kök hücre uygulamalarıyla ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Over rezervinin korunmasını sağlayan PTEN/AKT/FOXO3a yolağının aşırı aktivasyonu over rezervinin tükenmesine ve buna bağlı olarak infertiliteye neden olmaktadır. Bu çalışmada sıçan over dokusunda doksorubisin PTEN/AKT/FOXO3a sinyal yolağı üzerine etkilerinin incelenmesi ve tedavi amaçlı verilen adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin (AKMKH) aynı yolak üzerinde etkili olup olmadığının araştırılması amaçlandı. Çalışma kapsamında 23 adet dişi sıçan 3 gruba ayrıldı; kontrol grubuna hiçbir işlem yapılmadı, DOX grubundaki deneklere 10 mg/kg DOX uygulandı, DOX+AKMKH grubundaki deneklere 10 mg/kg DOX verildikten bir gün sonra 2×10^6 AKMKH uygulandı. Denekler 21 gün sonra sakrifiye edildi ve ovaryum dokuları alındı. Ovaryum dokularından seri kesitler alındı ve her beşinci kesitteki foliküller sayıldı. Ayrıca AKT ve FOXO3a primer antikorlarıyla immün işaretleme ve RT-PCR yapıldı. Elde edilen veriler istatistiksel olarak değerlendirildi. Vücut ağırlığında üç grup arasında da istatistiksel olarak fark gözlemlendi. Deney boyunca kontrol grubunda düzenli östrus siklusu, DOX grubunda ise düzensiz sikluslar görüldü. Kontrol grubu normal over histomorfolojisine sahipti. DOX grubunda DOX+AKMKH grubundan daha az olmakla birlikte dejenere oosit ile granüloza hücrelerinde apoptoz gözlemlendi. DOX grubunda primordiyal, primer, sekonder foliküllerin kontrole göre azaldığı atretik foliküllerin ise arttığı bulundu. DOX+AKMKH grubunda ise sadece primordiyal ve primer foliküllerde azalma gözlemlendi. Primordiyal foliküllerde FOXO3a boyanması kontrol ve kök hücre grubunda nükleer, DOX grubunda ise sitoplazmikti. AKT boyanması ise kontrol ve DOX+AKMKH grubunda sitoplazmik, DOX grubunda hem nükleer hem de sitoplazmikti. Hem AKT hemde FOXO3a mRNA ekspresyon seviyeleri kontrol ve DOX+AKMKH grubunda benzer iken DOX grubunda azaldı. Sonuçlardan yola çıkarak DOX'un PTEN/AKT/FOXO3a yolağını aktive ettiği AKMKH'lerin ise bu aktivasyonu bloke ettiği düşünüldü.

Anahtar Kelimeler: Doksorubisin, prematür ovaryan yetmezlik, FOXO3a, mezenkimal kök hücre

Danışman: Prof. Dr. Ebru BALLI, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, Mersin Üniversitesi, Mersin.

ABSTRACT

Investigation of the effects of adipose derived mesenchymal stem cells on PTEN/AKT/FOXO3a pathway and folliculogenesis in doxorubicin-induced ovarian damage

Doxorubicin (DOX), a chemotherapeutic agent, is known to induce dormant primordial follicle pool depletion leading to a decrease in ovarian reserve and increase in infertility when used. There are numerous studies on stem cell applications to preserve fertility in patients undergoing cancer treatment. PTEN/AKT/FOXO3a pathway is one of the main regulatory pathway that ensures the protection of the ovarian reserve. Excessive activation of this pathway leads to ovarian reserve depletion and, eventually, infertility. The aim of the present study was to investigate the effects of doxorubicin on the PTEN/AKT/FOXO3a signal pathway in rat ovaries and also to determine whether adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSC) are effective on the same pathway. Within the scope of the study, 23 female rats were divided into 3 groups; Control rats were injected IP with saline, 10 mg/kg DOX was administered to the subjects in the DOX group, and 2×10^6 ADSC was administered one day after 10 mg/kg DOX was given to the subjects in the DOX+ADSC) group. Animals were sacrificed after 21 days and ovarian tissues removed. Serial sections were taken from the ovarian tissues and the follicles in each fifth section were counted. In addition, immunostaining and RT-PCR were performed with AKT and FOXO3a primary antibodies. The data obtained were evaluated statistically. A statistically significant difference was observed between the three groups in body weight. Throughout the experiment, regular oestrus cycles were observed in the control group and irregular cycles in the DOX group. The control group had normal ovarian histomorphology. Although the DOX group is less than the DOX+ADSC group, degenerated oocytes and apoptosis were observed in the granulosa cells. In the DOX group, it was found that the number of primordial, primary and secondary follicles decreased compared to control, while atretic follicles increased. In the DOX+ADSC group, there was a decrease in the number of primordial and primary follicles, only. FOXO3a staining of oocytes in primordial follicles was found to be nuclear in both control and stem cell treated groups, but cytoplasmic in DOX group. AKT staining was cytoplasmic in the control and stem cell treated groups whereas it was found to be nuclear and cytoplasmic in DOX group. While mRNA expression levels of AKT and FOXO3a were similar in the control and DOX + AKMKH groups, there was seen a significant decrease in the DOX group. Based on our results, it was thought that DOX activated the PTEN/AKT/FOXO3a pathway and ADSCs blocked this activation.

Keywords: Doxorubicin, premature ovarian insufficiency, FOXO3a, mesenchymal stem cell

Advisor: Prof. Dr. Ebru BALLI, Department of Histology and Embryology, Faculty of Medicine, Mersin University, Mersin.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, her konuda yanımda olan, manevi yönden desteğini hissettiren; tezimin planlanmasında, içeriğinin düzenlenmesinde, tez sonuçlarının yorumlanmasında ve tezin her aşamasında özverilerini, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Ebru BALLI'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneylerimin her aşamasında değerli bilgilerini ve zamanını benden esirgemeyerek her fırsatta çalışmamla yakından ilgilenen ve tez yazımı aşamasında önerileri ile bana yol gösterici olan, yardım ve desteğini eksik etmeyen Prof. Dr. Şakir Necat YILMAZ'a teşekkürü bir borç bilirim.

Anabilim dalımızın değerli hocaları; Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ'a ve Prof. Dr. Savaş AKTAŞ'a doktora eğitimim boyunca yaptıkları bilimsel ve akademik katkılarından dolayı teşekkür ederim. Aynı zamanda tez izleme komitemde yer alan ve fikirleriyle tezime katkı sunan Prof. Dr. Ülkü ÇÖMELEKOĞLU'na teşekkür ederim. Gerek yüksek lisans gerek doktora eğitimim boyunca her konuda yanımda olan, desteğini hep hissettiğim Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye ve Dr. Öğretim Üyesi Nazlı ÇİL'e teşekkür ederim.

Tezin deney aşamasından başlayıp son aşamasına gelene kadar her konuda desteğini ve yardımlarını benden esirgemeyen, enerjisiyle beni motive eden, gelecekte çok başarılı olacağına inandığım Arş. Gör. Deniz KİBAR'a teşekkürlerimi sunarım. Hayvan deneyleri kısmında beni yalnız bırakmayan, tanımaktan büyük mutluluk duyduğum arkadaşım Dr. İlkay KARAGÜL'e çok teşekkür ederim. Çalışma konusunun belirlenmesi aşamasında fikirlerini benden esirgemeyen Arş. Gör. Gülsen BAYRAK'a, deney hayvanları uygulamalarındaki yardımları için Dr. Veteriner Hekim Tamer YENER'e, tez aşamasında bana destek olan çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Benden hiçbir zaman desteğini esirgemeyen bu hayattaki en büyük şansım olan aileme, hayatımı birleştirmekten onur duyduğum, her şartta gösterdiği sevgi ve sabır için sevgili eşim Çağdaş DEMİRBAĞ'a, hayatımıza renk katan kızım Aden Duru'ya sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xi
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Ovaryum	3
2.1.1. Ovaryumun Yapısı	3
2.1.2. Ovaryumun Gelişimi	3
2.1.3 Ovaryumun Histolojisi	4
2.1.3.1 Folikül Gelişimi	4
2.1.3.1.1. Primordiyal Folikül	5
2.1.3.1.2. Primer Folikül	5
2.1.3.1.3. Sekonder Folikül	6
2.1.3.1.4. Tersiyer Folikül	6
2.2. PTEN/AKT/FOXO3a Sinyal Yolağı	7
2.3. Prematür Over Yetmezliğı	9
2.4. Doksorubisin	10
2.4.1. Doksorubisin Yapısı	10
2.4.2. Doksorubisinin Tarihçesi	11
2.4.3. Doksorubisinin Farmakokinetiğı	11
2.4.4. Doksorubisinin Etki Mekanizması	12
2.4.3. Doksorubisinin Toksik Etkisi	12
2.5. Mezenkimal Kök Hücreler	14
2.5.1. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler	15
3. MATERYAL VE YÖNTEM	17
3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi	17
3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	17
3.3. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	17
3.4. Dokuların Elde Edilmesi ve Fiksasyonu	18
3.5. Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi	18
3.6. Hematoksiklen-Eozin Boyama Protokolü	19
3.7. İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü	20
3.8. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) Analizleri	21
3.8.1. RNA İzolasyonu	21
3.8.2. Total RNA'dan cDNA Elde Edilmesi	22
3.8.3. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) Aşaması	23
3.9. İstatistiksel Analiz	24
4. BULGULAR	25
4.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi	25
4.2. Ovaryum Boyutlarının Değerlendirilmesi	26
4.3. Vajinal Smear Bulguları	27
4.4. Işık Mikroskopik Bulgular	30
4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular	42

4.5.1. FOXO3a'nın İmmünohistokimyasal Bulguları	42
4.5.2 AKT'in İmmünohistokimyasal Bulguları	48
4.6. Real-Time PCR Bulguları	54
4.6.1. FOXO3a mRNA Ekspresyon Düzeyi	54
4.6.2. AKT mRNA Ekspresyon Düzeyi	55
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	56
KAYNAKLAR	62
ÖZGEÇMİŞ	70



TABLolar DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1: cDNA sentezi reaksiyon karışımı	23
Tablo 4.1: Gruplara ait uygulama öncesi ve sonrası siklus sürelerinin ortalama değerleri	30



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1: Doksorubisinin moleküler yapısı	11
Şekil 4.1: Tüm grupların deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları	25
Şekil 4.2: Gruplar arası deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları	26
Şekil 4.3: Gruplara ait ovaryum boyutları	26
Şekil 4.4: Östrus siklusu evreleri	27
Şekil 4.5: Kontrol grubuna ait östrus siklusu	28
Şekil 4.6: DOX grubuna ait östrus siklusu	28
Şekil 4.7: DOX+AKMKH grubuna ait östrus siklusu	29
Şekil 4.8: Uygulama öncesi ve sonrası siklus sürelerinin grup içi karşılaştırması	29
Şekil 4.9: Uygulama öncesi ve sonrası siklus sürelerinin gruplar arası karşılaştırması.	30
Şekil 4.10: Kontrol grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	32
Şekil 4.11: Kontrol grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	33
Şekil 4.12: Doksorubisin grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	35
Şekil 4.13: Doksorubisin grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	36
Şekil 4.14: Doksorubisin grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	37
Şekil 4.15: Doksorubisin ve kök hücre grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	39
Şekil 4.16: Doksorubisin ve kök hücre grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü	40
Şekil 4.17: Folikül sayılarının gruplar arası karşılaştırması	41
Şekil 4.18: Kontrol grubu ovaryum dokusunda FOXO3a immün işaretlenmesi	43
Şekil 4.19: DOX grubu ovaryum dokusunda FOXO3a immün işaretlenmesi	45
Şekil 4.20: DOX+AKMKH grubu ovaryum dokusunda FOXO3a immün işaretlenmesi	47
Şekil 4.21: Kontrol grubu ovaryum dokusunda AKT immün işaretlenmesi	49
Şekil 4.22: DOX grubu ovaryum dokusunda AKT immün işaretlenmesi	51
Şekil 4.23: DOX+AKMKH grubu ovaryum dokusunda AKT immün işaretlenmesi	53
Şekil 4.24: Ovaryum dokusunda FOXO3a mRNA ekspresyon düzeylerinin bar grafiği	55
Şekil 4.25: Ovaryum dokusunda AKT mRNA ekspresyon düzeylerinin bar grafiği	55

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma/Simge	:Tanım
AKMKH	: Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre
AKT	: Protein kinaz B
AMH	: Anti-Müllerian hormon
bFGF	: Temel fibroblast büyüme faktörü
BMP	: Kemik morfogenetik faktör
BSA	: Sığır serum albümin
CD	: Farklılaşma yığılım molekülleri
CO ₂	: Karbondioksit
CX ₃ CL1	: Fraktalkin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
DOX	: Doksorubisin
FBS	: Fötal sığır serumu
FMR1	: Fragile X mental retardasyon
FOXO	: Forkhead transkripsiyon faktörü box proteini
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
GDF9	: Büyüme farklılaşma faktörü 9
Gsk3	: Glikojen sentaz kinaz 3
HGF	: Hepatosit büyüme faktörü
HLA	: İnsan lökosit antijeni
IFN- γ	: İnterferon-gama
IGF	: İnsülin büyüme faktörü
KGF	: Keratinosit büyüme faktörü
KL	: Kit ligand
L-DMEM	: Düşük glukozlu Dulbecco's Modified Eagles Medium
LH	: Lüteinleştirici hormon
LIF	: Lösemi inhibitör faktörü
MCP-1	: Monosit kemoatraktan protein-1
MDC	: Makrofaj inflamatuvar protein-1 α
MHC I	: Major doku uygunluk kompleksi I
MKH	: Mezenkimal kök hücreler
mL	: Mililitre
mRNA	: Messenger RNA
OMI	: Oosit maturasyon inhibitörü

PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PDK1	: Fosfatidilinositol bağımlı kinaz 1
PI3K	: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PIP2	: Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfat
PIP3	: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat
POF	: Prematür over yetmezliği
PTEN	: Fosfataz ve tensin homolog
RNA	: Ribonükleik asit
ROS	: Reaktif oksijen türleri
RT-PCR	: Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
RT-qPCR	: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDF-1	: Stromal kökenli faktör-1
SVF	: Stromal vasküler fraksiyon
Tsc	: Tuberoz skleroz
VCAM-1	: Vasküler hücre adezyon molekülü-1
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
ZP	: Zona pellusida
°C	:Santigrat derece

1. GİRİŞ

Dişilerde gametlerin üretilmesi oogenez olarak adlandırılmaktadır. Oogenezin erken evreleri fetal hayatta gerçekleşir [1]. Oogonyumların bir kısmı mitoz ile bölünürken bir kısmı da mayoz bölünmeye girerek primer oositlere dönüşürler. Primer oositler tek katlı yassı hücreler ile çevrilir ve primordiyal folikül adını alır. Primordiyal foliküller puberte döneminden başlayarak olgunlaşacakları zamana kadar I. mayoz bölünmenin profaz evresinde kalırlar[1, 2]. Primordiyal folikül havuzundan bazı foliküller puberteden menopoza kadar menstrual siklusta aktive olarak sırasıyla primer, sekonder ve antral faza girmek için gelişmektedirler [3, 4].

Primordiyal folikül havuzunun korunması için fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) çok önemli bir role sahiptir [5]. PI3K aktivitesi, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatın (PIP2) fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfata (PIP3) dönüşmesine yol açar. PIP3, daha sonra fosfatidilinositol bağımlı kinaz 1 (PDK1)'i ve bunu takiben protein kinaz B (AKT) aktivasyonunu sağlar. AKT'nin çekirdeğe translokasyonu forkhead transkripsiyon faktörü 3a (FOXO3a)'nın transkripsiyonel aktivitesini bastırır. FOXO3a ekspresyonunun bastırılması ile primordiyal foliküller aktifleşerek primer foliküllere dönüşürler. Bu yol, fosfataz ve tensin homolog (PTEN) proteininin PIP3'ü PIP2'ye defosforillemesi yoluyla inhibe edilir. PTEN enziminin bu yolu inhibe etmesiyle primordiyal foliküller uykuda kalmaya devam ederler [6]. PI3K yolağının bastırılması veya hızlanması, infertiliteye ve prematür over yetmezliğine (POF) neden olur. Bu yüzden bu yolak primordiyal foliküllerin kaderini belirler [7]. PI3K/AKT yolağının inhibitörleri olan PTEN ve FOXO3a'nın rolleri birbirleri uyumludur. PTEN nakavt durumunda PI3K/AKT yolağı yapısal olarak aktive olmakta ve doğumu takip eden haftalar içerisinde primordiyal foliküllerin aktivasyonu gerçekleşmektedir. Bu da POF'a neden olmaktadır. [8] Birçok araştırma neoplastik ilaç tedavisinin, kadın hastalarda PTEN/AKT/FOXO3a sinyal dengesini bozarak, POF'a ve infertiliteye neden olduğunu bildirmiştir [9].

Kanser hastalığının sık görülmesi ve yüksek oranda ölümlere yol açması, artan çevresel kanser yapıcı etkenler nedeniyle günümüzün önemli sağlık sorunlarından birisidir [10]. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ajanlar bazı yan etkiler göstererek organ toksisitelerine neden olabilir. Kemoterapik bir ajan olan doksorubisin (DOX) meme, mesane, tiroid, lösemi ve over gibi kanserleri tedavi etmek için kullanılan bir antrasiklidir. DOX, oksidatif stresi ve DNA parçalanmasını indükleyerek, farklı mekanizmalarla hücre ölümüne neden olur [11]. DOX'un tedavi edilebilir yan etkilerinin yanı sıra böbrek ve barsaklarda apoptoz, gastrointestinal epitelde hasar, pulmoner, hematolojik ve testiküler toksisite gibi etkilere de sahip olduğu bildirilmiştir [12-14]. Ayrıca DOX over rezervini olumsuz etkiler [15]. DOX uygulaması yapılan deneysel çalışmalarda primordiyal folikül havuzunun ciddi hasarlar görenek, bu folikül sayılarında önemli kayıplar olduğu bildirilmiştir [16]. Doksorubisinin primordiyal foliküllere verdiği bu hasarın

apoptozla mı yoksa PTEN/AKT/FOXO3a yolu üzerinden mi olduğu araştırmaya açık bir konudur.

Mezenkimal kök hücreler (MKH), kemik, kıkırdak, kas, ligament, tendon ve yağ doku gibi mezenkimal dokulara farklanabilen ve bu dokuların yenilenmesine katkıda bulunabilen hematopoetik olmayan stromal hücrelerdir. Günümüzde mezenkimal kök hücreler birçok memeli türünde yetişkin, yenidoğan ve fetüse ait çeşitli doku ve organlardan elde edilebilir [17]. MKH'ler sistemik bir şekilde vücuda verildiğinde hedef bölgeye yönelmekte ve yerleşmektedir. Vücut içerisinde farklılaşmasının yanı sıra salgıladıkları uyarıcı veya engelleyici maddeler ile de parakrin etki göstererek düzenleyici ve tedavi edici etki yapmaktadır. Klinikte kullanımları henüz yeni sayılsa da, farklı hayvan türlerinde gerçekleştirilmiş çok sayıda deney, MKH'lerin otolog ve allojenik olarak birçok hastalığın tedavisinde kullanılabilir olduğu konusunda umut vericidir. MKH'ler doku apoptozunu durdurarak doku iyileşmesinde önemli rol alırlar [17, 18].

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Ovaryum

Dişi iç üreme organlarından biri olan ovaryumun iki ana işlevi vardır: bunlardan biri gametlerin üretilmesi diğeri ise endokrin hormonları salgılamaktır [19]. Dişilerde gametlerin üretilmesi oogenez olarak isimlendirilmektedir. Gelişmekte olan gametlere oosit, olgun gametlere ise ovum denilmektedir [1].

Östrojen ve progesteron steroid hormonları ovaryumlardan salınmaktadır. Östrojenler, genital organların büyüüp olgunlaşmasını sağlar. Pubertede sekonder cinsiyet karakterlerinin gelişiminden sorumludur. Progesteronlar, iç genital organları özellikle uterusu gebeliğe, meme bezlerini de laktasyona hazırlar [1].

2.1.1. Ovaryumun Yapısı

Yaşla değişmekle birlikte ovaryumlar 2 cm eninde, 3,5 cm boyunda ve 1 cm kalınlığında yapılardır. Her ovaryum mezovaryum ile kalın ligamentin posteriyoruna, suspensor ligament ile vücut duvarına, proper ovaryan ligament ile uterusu bağlanır. Proper ligament gubernakulumun bir kalıntısıdır ve hiç damar içermez [20].

2.1.2. Ovaryumun Gelişimi

Embriyonun cinsiyeti fertilizasyonda belirlenir ancak gonadların erkek veya dişi morfolojik özellikleri 7. haftadan sonra gözlenir. Gonadlar mezonefrozun medialinde gonadal kabartı denilen kölomik epitelin ve altındaki mezenşimin proliferasyonu ile oluşmuş uzunlamasına şişkinlikler şeklinde görülür [21].

İnsanlarda gametlerin embriyonik öncüleri primordiyal germ hücreleridir. Primordiyal germ hücreleri gelişimin erken evrelerinde yolk kesesinin duvarında belirirler ve son bağırsağın mezenteriy boyunca ilerleyerek gonadal kabartılara göç ederler. Bu hücrelerin bazıları hedeflerine ulaşamazken bazıları da ektopik bölgelere ulaşır ve buralarda dejenere olurlar [22]. Primordiyal germ hücreleri gonadal kabartılara 5. haftada ulaşır. Primordiyal germ hücrelerinin gonadal kabartılara ulaşmasından hemen önce veya ulaşması sırasında gonadal kabartıda kölomik epitel altındaki mezenşim içine doğru proliferasyon olur ve primitif cinsiyet kordonlarını oluşturur. Bu evredeki gonadlar farklanmamış gonad olarak isimlendirilir [21]. Primitif cinsiyet kordonlarının oluşmasıyla farklanmamış gonadlar artık korteks ile medulladan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX kromozuna sahipse gonadın medullası, XY kromozuna sahipse gonadın korteksi geriler [2].

Dişi embriyolarda primitif cinsiyet kordonları medullaya doğru uzanır ve rudimenter rete ovariiyi oluşturur. 7. haftada dişi gonadın yüzey epiteli altındaki mezenşime doğru çoğalarak kortikal kordonlar adı verilen ikinci nesil kordonları oluşturur. Kortikal kordonlar büyüdükçe primordiyal germ hücreleri bunlara katılır [21]. Kortikal kordonlar, her biri kortikal kordondan gelişen tek bir tabaka foliküler hücreler ile sarılmış bir oogonyum içeren primordiyal foliküller adı verilen izole hücre kümelerine ayrılır [2].

Fetal hayat boyunca oogonyumlar mitozla çoğalarak sayılarını artırır. Gonadlarda intrauterin ikinci ayda yaklaşık 600.000, beşinci ayda 7 milyonun üzerinde oogonyum vardır. Üçüncü aydan başlayarak oogonyumlar birinci mayoz bölünmeye girmeye başlar ancak bölünme profazın diploten evresinde durur. Bu hücreler artık primer oosit olarak isimlendirilir. Doğumdan önce oogonyumlar primer oositlere dönüşür ancak primer oositlerin çoğu atreziye uğrayarak yok olurlar [23]. Yenidoğan overinde yaklaşık 700.000-2.000.000 primordiyal follikül bulunur. Bu sayı devam eden atreziler sebebiyle puberteye kadar 400.000'e düşer. Pubertede hipofizden salgılanan gonadotropinlerin etkisiyle her menstruel siklusta 5-15 primordiyal follikül gelişmeye başlar. Ovulasyon aşamasına kadar ilerleyen dominant follikül dışında gelişmeye başlayan diğer folliküller atreziye uğrar. Bu şekilde atrezi dişi üreme çağı boyunca sürer ve follikül sayısı menapoza kadar azalır ve ovaryumlarda hiç follikül kalmadığı zaman menapoz gerçekleşir. Puberteden menapoza kadar ancak 400-500 oosit ovulasyon ile atılır diğer tüm oositler atreziye uğrar [24].

2.1.3 Ovaryumun Histolojisi

Ovaryum, tek katlı yassıdan kübik epitele kadar değişkenlik gösteren germinal epitel ve epitelin hemen altındaki tunika albuginea adı verilen düzensiz sıkı bağ dokusu ile çevrilmiştir [25, 26]. Germinal epitel terimi yanlış bir isimlendirmedir çünkü bu hücreler germ hücrelerinin kaynağı değildir, peritonu örten modifiye mezotel hücreleridir [27].

Ovaryumlar sınırları tam olarak birbirinden ayırt edilemeyen korteks ve medulladan oluşmaktadır [28]. Korteks ovariumun periferinde, tunika albugineanın altında yer almaktadır ve ovarium foliküllerini içermektedir. Medulla ise ovariumun merkezinde bulunmaktadır. Medulla kan damarları, sinirler ve lenfatik damarları içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır [1].

2.1.3.1 Folikül Gelişimi

Gelişim aşamasına göre histolojik olarak 3 tip folikül bulunmaktadır: primordiyal foliküller, büyümekte olan foliküller (primer folikül ve sekonder folikül), tersiyer folikül ya da Graaf folikül [1].

2.1.3.1.1. Primordiyal Folikül

Fetal hayatta oluşmaya başlayan primordiyal foliküller folikül gelişiminin en erken evresidir. Üreme çağındaki kadınlarda, primordiyal foliküller yüzeysel kortekste dar bir bant boyunca düzensiz olarak bulunur [29]. Primordiyal folikül, mayoz bölünmenin profaz I'inde arreste uğramış bir primer oosit ve tek katlı yassı foliküler hücre tabakasına sahiptir [22]. Foliküler hücrelerin dış yüzeyi bazal lamina ile sınırlandırılmıştır. Primordiyal folikül içerisindeki primer oositin çapı yaklaşık 30 µm'dir. Primer oosit dağılmış kromatin ve bir ya da daha fazla nükleolus içeren eksantrik bir nükleusa sahiptir. Ayrıca oositin ooplazma adı verilen sitoplazması Golgi membranlarının ve veziküllerinin, endoplazmik retikulumun, mitokondrilerin ve lizozomların birlikte oluşturduğu Balbiani cisimciğini içermektedir [1].

Primordiyal foliküllerin toplam sayısı embriyonik gelişim sırasında belirlenir ve primordiyal foliküller ergenlik başlangıcından sonra gerçekleşen aktivasyona kadar I. mayoz bölünmenin profaz evresinde uykuda kalır. Bu uykuda olan primordiyal foliküller menopoza kadar folikül rezervi (over rezervi) görevi görür. Folikül rezervi bir dişinin üreme yaşamının uzunluğunu tanımlar [9]. Genetik kalıtım, kemoterapi, patolojik hastalıklar, farmakolojik, radyolojik ve cerrahi müdahaleler gibi durumlar folikül rezervini etkileyebilir [29]. Over rezervini oluşturan primordiyal foliküllerin anormal gelişimi, prematür over yetmezliğine veya erken menopoz başlangıcı gibi anormal koşullara yol açabilir [30]. Primordiyal folikül havuzundan bazı foliküller puberteden menopoza kadar menstrual siklusta aktive olarak sırasıyla primer, sekonder ve antral faza girmek için gelişmektedirler [9]. Primordiyal folikülden primer foliküle geçiş geri dönüşü olmayan bir süreçtir. Olgunlaşmaya başlayan folikül atrezi veya ovulasyona kadar büyümeye devam eder [30].

2.1.3.1.2. Primer Folikül

Hipofiz gonadotropinlerine yanıt olarak primordiyal foliküller folikülogenez sürecine girerler [31]. Yassı foliküler hücreleri prolifer olmaya başlar, hücreler kübik hale gelir ve granüloza hücrelerine dönüşür. Granüloza hücrelerinin kübik hale geldiği bu aşamada foliküle tek katlı (unilaminar) primer folikül denir [23, 30]. Granüloza hücreleri çoğalmayı sürdürür ve çok katlı granüloza tabakasını oluşturur. Bu tabakadaki hücreler gap junctionlar aracılığıyla iletişim kurar. Bu aşamadaki foliküle çok katlı (multilaminar) primer folikül denir [23]. Oosit büyüdükçe oosit ve granüloza tabakası arasında glikoprotein yapısında zona pellusida (ZP) görülür [22]. ZP dört glikoproteinden oluşmuştur. ZP1 glikoproteini tabakanın yapısal bütünlüğünü sağlayarak ZP'ye üç boyutlu yapı kazandırır. ZP2'nin sekonder sperm bağlanma proteini olarak işlev gördüğü düşünülmektedir[32]. Fertilizasyon sırasında ZP3 sperm bağlanma

reseptörü olarak işlev görür [33]. ZP4'ün akrozom reaksiyonundan sonra spermin oosite bağlanmasını sağladığı düşünülmektedir ancak yapılan çalışmalar ZP4'ün primer sperm reseptörü olmadığı ve sperm oosit etkileşimi sırasında ZP3 gibi etkin rolü bulunmadığını göstermektedir [34].

Granüloza hücreleri çoğalınca granüloza hücreleri çevresinde bulunan stromal hücreler bazal laminanın dışında teka foliküliyi oluşturmak üzere farklılaşırlar. Teka foliküli teka interna ve teka eksterna olarak iki tabakadan oluşur [1]. Teka interna tabakası granüloza hücrelerine yakın yerleşimlidir. Bu tabaka damardan zengindir, hücreleri luteinleştirici hormon (LH) reseptörüne sahiptir ve LH'ye yanıt olarak foliküler büyüme ve gelişme için gerekli olan estradiol-17 β sentezlerler [1, 31]. Teka eksterna teka internayı çevreleyen fibroblastların oluşturduğu katmandır. Teka interna ile eksterna arasındaki sınır belirgin değildir. Buna rağmen teka foliküli ve granüloza arasındaki sınır aralarındaki bazal membran bulunmasından ve hücrelerin morfolojilerinin farklı olmasından dolayı belirgindir [23].

2.1.3.1.3. Sekonder Folikül

Multilaminar primer folikülde granüloza tabakası 8-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştıkça hücreler arasında sıvı ile dolu düzensiz boşluklar oluşmaya başlar. Bu foliküle sekonder (antral) folikül denir. Sıvı dolu boşluklar birbiriyle birleşerek antrum adı verilen tek büyük bir boşluk oluşur [35]. Antrumun içerisinde bulunan folikül sıvısı hiyaluronan, steroidler, büyüme faktörleri ve gonadotropinlerce zengindir [36]. Yaklaşık 125 μ m çapına ulaşan oositin büyümesi granüloza hücreleri tarafından folikül sıvısına salgılanan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) tarafından baskılanır [1].

Antrum oluşurken granüloza hücre katmanında yer alan bazı hücreler folikül duvarında belirli bir yerde birikerek bir tepelik oluştururlar; antruma doğru uzanan bu yapıya kumulus ooforus adı verilir. Bir grup granüloza hücresi oositi çevreler ve korona radiatayı oluşturur. Bu granüloza hücreleri oositin atılması sırasında oosite eşlik eder [23].

Sekonder folikül aşamasında foliküllerin çoğu atretik dejenerasyona uğrarken, birkaçı daha da büyür ve siklik gonadotropin stimülasyonu altında preovülütör aşamaya ulaşır [3].

2.1.3.1.4. Tersiyer Folikül

Graaf folikülü olarak da bilinen tersiyer folikülün çapı yaklaşık 1,5-2,5 cm'dir, oosit ise yaklaşık 150 μ m çapında olup maksimum hacmine ulaşmış durumdadır. Tersiyer folikül ovaryum korteksini kalınlığınca kapsar ve ovaryumun yüzeyinden dışarı doğru çıkıntı yapar. Tunika albuginea ile teka eksternanın temas noktası olan stigmada yüzey incelmıştır [27]. Bu dönemde

folikül maksimum hacmine ulaşırken granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır ve granüloz tabakası incilir. Granüloza hücreleri arasındaki boşluk genişledikçe kumulus ooforus ile granüloza hücreleri gevşer ve ovulasyona hazırlanır [1]. Ovulasyondan önce primer oosit mayoz bölünmesine devam eder ve sekonder oosit ile birinci polar cisim oluşur. Oluşan sekonder oosit fertilizasyona kadar ikinci mayoz bölünmenin metafazında kalır. LH'nin ani artışı ovulasyondan önce bu mayoz bölünmeyi uyarır ve folikülün rüptürüne neden olur. Ovulasyonla atılan sekonder oosit tuba uterinaya geçerken ovaryumda kalan granüloza ve teka hücreleri korpus luteumu oluşturarak progesteron üretirler [1, 27].

2.2. PTEN/AKT/FOXO3a Sinyal Yolağı

Primordiyal folikül oluşumu insanlarda gebelik sırasında ve kemirgenlerde doğumdan sonra ortaya çıkar [37]. Her biri tek bir oosit ve onu çevreleyen somatik granüloza hücrelerinden oluşan primordiyal foliküller, yaşamın erken dönemlerinde oluşurken korunması ve verimli kullanılması gereken sınırlı bir kaynağı temsil eder [38]. Oluşan primordiyal foliküllerin çoğunluğu uyku halinde kalırken, bir kısmı ergenlikle birlikte dinlenme folikül rezervuarından büyüyen folikül havuzuna alınır. Bu fenomen primordiyal folikül aktivasyonu olarak tanımlanmıştır ve olgun oositlerin gelişimi için gerekli bir ön koşul olarak tüm memeli türlerinde üreme ömrünün kritik bir belirleyicisidir [39, 40].

Primordiyal folikül aktivasyonu, primordiyal foliküllerin olgunlaşmasını başlatmak için sürekli olarak kullanıldığı geri dönüşümsüz bir süreçtir [39]. Bu işlemin geri döndürülemez oluşu ve primordiyal foliküllerin sınırlı sayıda üretilmesi folikül aktivasyonunun sıkı bir şekilde düzenlenmesini gerektirir. Bu nedenle, primordiyal folikül aktivasyonunu düzenleyen moleküllerin iyi tanımlanmış olması kritik öneme sahiptir. Primordiyal foliküllerin aktivasyonunu baskılayarak uyku halinde kalmasını sağlayan moleküller, fosfataz ve tensin homolog (Phosphatase and tensin homolog-PTEN), tuberoz skleroz 1 (tuberous sclerosis-Tsc1) - Tsc2 kompleksi, Forkhead box proteini 3a (FOXO3a), p27, anti-Müllerian hormon (AMH) ve Foxl2 molekülleridir. Bu moleküllerin yokluğunda primordiyal foliküllerin hızla aktivasyonu gerçekleşir. Zamanından önce foliküllerin aktivasyonu primordiyal folikül havuzunun tükenmesine neden olur [41].

Primordiyal folikül aktivasyonu için birçok faktör gereklidir [42]. Kit ligand (KL), lösemi inhibitör faktörü (leukemia inhibitor factor-LIF), kemik morfogenetik proteinler (bone morphogenetic factors-BMP), keratinosit büyüme faktörü (keratinocyte growth factor-KGF), temel fibroblast büyüme faktörü (basic fibroblast growth factor-bFGF) ve insülin büyüme faktörü (insulin growth factor-IGF) gibi lokal olarak üretilen büyüme faktörleri, primordiyal folikülün primer folikül haline dönüşümüne yardımcı olmaktadır [4]. Bu büyüme faktörleri,

PTEN/AKT/FOXO3a yolağını etkiler ve primordiyal folikülün aktivasyonunu sağlayarak primer foliküle dönüşümüne yardımcı olurlar [3].

Primordiyal folikül havuzunun korunması için fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) önemli bir role sahiptir. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K), plazma membranında bulunan inositol fosfolipidlerinin inositol halkasındaki 3'OH grubunu fosforile eden bir lipid kinazdır [5]. Bu enzim plazma membranında ikincil mesajcı olan fosfatidilinositol-4,5-bifosfatın (PIP2) fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfata (PIP3) dönüştürülmesini katalize eder. Artan PIP3 fosfatidilinositol bağımlı kinaz 1 (PDK1) aktivasyonu ve devamında protein kinaz B (AKT)'nin fosforilasyon yoluyla aktivasyonuna yol açar [43]. Aktive edilmiş, fosforile AKT, glikojen sentaz kinaz 3 (Gsk3), Tsc2 ve FOXO dahil olmak üzere çok çeşitli doğrudan hücre içi hedefleri fosforile eder (en az 20 Akt substratı tanımlanmıştır) [44, 45]. AKT'ın çekirdeğe translokasyonu FOXO3a hiperfosforilasyonuna bu da FOXO3a'nın sitoplazmaya translokasyonuna yol açar. Sonuç olarak primordiyal folikül aktivasyonu gerçekleşir. PTEN ise, 3' fosfatın PIP3'ten ayrılması ve böylece AKT'ın baskılanması ile güçlü bir PI3K antagonisti olarak işlev görmektedir [46]. PTEN enziminin bu yolu inhibe etmesiyle primordiyal foliküller uykuda kalmaya devam eder [6]. Büyüme farklılaşma faktörü 9 (GDF9) promotörünün kontrolü altında Cre rekombinaz eksprese eden transgenik fareler kullanılarak yapılan bir çalışmada PTEN geninin oosit spesifik silinmesi ile PI3K sinyallemesinin aşırı aktivasyonunun, primordiyal foliküllerin tüm havuzunun erken aktivasyonuna ve bunun sonucunda erken dönemde sayıca azalmaya yol açtığı gözlemlenmiştir [8]. Bununla birlikte, PTEN geni, ZP3 promotör aracılı Cre rekombinazı eksprese eden transgenik farelerde primer ve daha gelişmiş foliküllerin oositlerinden koşullu olarak silindiğinde, foliküler gelişimin değişmemiş olduğu ve oosit olgunlaşmasının da normal olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak oositlerde PI3K sinyallemesinin aşırı aktivasyonunun büyüyen foliküllerin gelişimini etkilemediği ve PTEN/PI3K sinyallemesinin sadece primordiyal foliküler aktivasyonu kontrol eden bir fonksiyonu olduğu ileri sürülmüştür [47]. Yine de, çoğu deneysel sistemde PI3K-PTEN-AKT sinyalleşmesinin biyolojik etkilerine aracılık etmede ilgili substratların katkılarını tam olarak tanımlamak incelenen sistemin karmaşıklığı sebebiyle güçtür.

FOXO ailesi, hücre proliferasyonu, apoptoz, stres direnci, farklılaşma ve metabolizma gibi çeşitli süreçlere katıldığı bilinmektedir [48]. FOXO1, FOXO3 VE FOXO4 çoğu dokuda yüksek oranda eksprese edilip kısmen örtüşen fonksiyonları paylaşırken, FOXO6 ekspresyonu beyinle sınırlandırılmış gibi görünmektedir. Farklı süreçlere katılımlarıyla tutarlı olarak, Foxo ailesi üyeleri fosforilasyon, asetilasyon ve ubiquitinasyon dahil çeşitli mekanizmalar tarafından düzenlenmektedir [49]. Özellikle forkhead transkripsiyon faktörü FOXO3'ün, primordiyal folikül aktivasyonunun ana düzenleyicisi ve baskılayıcısı olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur [50]. Foxo3 nakavt farelerinde, primordiyal foliküller normal yolla oluşur ancak hemen global aktivasyona uğrar ve bu da belirgin over hiperplazisi, folikül tükenmesi, prematür over yetmezliği

ve infertilite sendromu ile sonuçlanır [51, 52]. Oositler içinde FOXO3a, nükleositoloplazmik mekik ile düzenlenir, esas olarak primordiyal folikül oluşumu sırasında nükleusa alınarak primordiyal foliküllerin uyku halinde kalmasını sağlar. Folikül aktivasyonu sırasında ise sitoplazmaya translokasyonu gerçekleşir. Oositlerde FOXO3a, overe özgü mekanizmaları etkileyerek foliküler büyümenin başlaması üzerinde baskılayıcı bir etkiye sahip olabilir [52]. Liu ve arkadaşları, fare oositlerinde aktif bir FOXO3a formunun ekspresyonunun sadece oosit büyümesini ve foliküler gelişimi geciktirmekle kalmadığı, aynı zamanda transgenik farelerde infertiliteye neden olan, sağlıklı foliküllerin anovülasyonuna ve luteinizasyonuna da yol açtığını göstermiştir [53]. Ancak, bu bulguların aksine Pelosi ve arkadaşları, rodentlerde yapısal olarak aktif FOXO3'ün aşırı ekspresyonunun, over rezervini ve üreme kapasitesini arttırdığını göstermiştir [54]. Bununla birlikte, FOXO3'ün primordiyal folikül aktivasyonunun düzenlenmesi ve baskılanmasındaki rolü ile ilgili birçok temel soru cevaplanmamıştır. Örneğin, FOXO3'ün oosit büyümesini tetikleme kararını aktif olarak kontrol eden bir mekanizmanın parçası olup olmadığı veya Foxo3 mutasyonunun, daha dolaylı bir yolla folikül aktivasyonunu destekleyip desteklemediği bilinmemektedir.

Sonuç olarak PTEN/AKT/FOXO3a yolağı primordiyal foliküllerin gelişimsel seyrinin belirlenmesinde kritik rol oynar. Bu yolağın aşırı aktivasyonu fazla sayıda primordiyal folikülün aktivasyonuna neden olur. Primordiyal foliküllerin aşırı aktivasyonu ise over rezervinin tükenmesine ve buna bağlı olarak prematür ovaryan yetmezliğe yol açar [7, 47].

2.3. Prematür Over Yetmezliği

Prematür over yetmezliği (POF), hipoöstrojenizm, oligomenore, amenore, subfertilite ve infertilite ile ilişkili olarak gonadlarda rezidüel folikül kaybına yol açan over disfonksiyonu ile karakterize bir hastalıktır [55]. Primer amenore olan kadınlar arasında POF sıklığı % 10-28 iken sekonder amenore olanlarda bu oran % 4-18'dir. Primer over yetmezliği olarak da bilinen bu bozukluk son derece karmaşık bir hastalıktır. Prevalansı 35 yaşın altındaki 250 kadından biri ve 40 yaşın altındaki 100 kadından biri şeklindedir [56]. POF için uygun tanı kriterleri henüz mevcut değildir; bununla birlikte, en az 4 ay boyunca oligomenore veya amenore ve 40 yaşın altındaki kadınlarda 4 haftalık aralıklarla iki defada 25-40 IU/L'yi aşan kalıcı olarak artmış folikül uyarıcı hormon (FSH) düzeyleri ile klinik olarak tanımlanmaktadır [57].

POF'un kökenindeki olası mekanizmalar: (a) başlangıçta yetersiz primordiyal folikül havuzu olması; (b) hızlandırılmış bir foliküler atrezi süreci; veya (c) primordiyal foliküllerin anormal matürasyonu olarak sınıflandırılabilir [8]. POF nedeni henüz tam olarak aydınlatılmamış olmasına rağmen, bu patogenezin tanımlandığı vakaların çoğunda, primordiyal foliküler havuzun hacminde dramatik bir azalma görülür [58]. Bu tür mekanizmaları aktive edebilecek etiyolojik

nedenler oldukça heterojendir ve nedeni çoğunlukla idiyopatiktir, ancak fragile x mental retardasyon (FMR1) genindeki premutasyonlar, X-kromozomunda delesyon anomalileri ve tek gen mutasyonu dahil olmak üzere genetik faktörler tanımlanmıştır [59]. Ek olarak otoimmün poliglandüler sendrom gibi otoimmün bozukluklar ve kemoterapi, radyasyon tedavisi ve over cerrahisi gibi iyatrojenik faktörler bilinen diğer nedenlerdir. Şu anda, tüm POF formlarının yaklaşık % 25'i iyatrojenik olarak sınıflandırılabilir ve kanser tedavisi ile ilişkilidir [60, 61].

Son zamanlarda, kemoterapi sonrası oluşan POF, antikanser tedavisinin, infertilite ve dejeneratif sağlık problemleri riskini arttıran majör ve uzun vadeli olumsuz etkisi olarak ortaya çıkmaktadır [48]. Kemoterapiye bu tür yanıtlar, özellikle genç kadınlarda önemli bir sorundur, çünkü over rezervinin kaybı infertilite riski ile yakından ilişkilidir. Antikanser ilaçların over toksisitesine yol açmada uyguladığı kesin mekanizma tam olarak belirlenmemiştir ve ilacın tipine ve test edilen hücre tipine bağlı olduğu bilinmektedir [62, 63]. Çoğu antikanser ilacının stroma ve granuloza hücrelerini, apoptoz yoluyla etkilediği, oositlerin ise bu toksisiteden, onları çevreleyen stroma ve granuloza hücreleri yoluyla dolaylı bir şekilde etkilendiği düşünülmektedir.

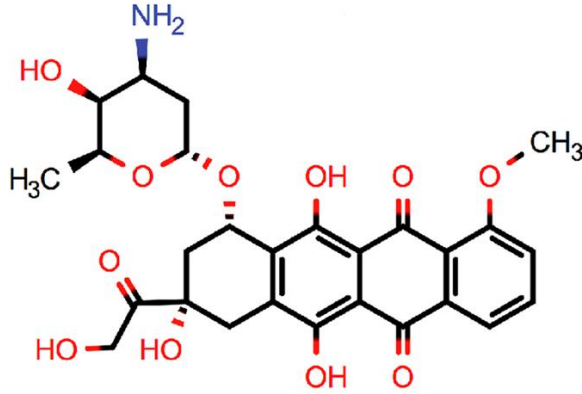
2.4. Doksorubisin

Kanser anormal hücre büyümesi ve çoğalması ile ortaya çıkan dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan karmaşık bir hastalıktır. [64, 65]. Kanser tedavisinde kemoterapi, cerrahi yöntemler ve radyoterapiye ek olarak hormon terapisi, gen terapisi ve hedeflenmiş terapiler gibi yöntemler de kullanılmaya başlanmıştır [64]. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi en başarılı terapötik stratejilerden biridir. Kemoterapötik ajanların etkinliği, çeşitli kanser türlerine sahip hastaların hayatta kalma oranlarında büyük bir artışa yol açmıştır [66].

Kemoterapötik bir ajan olan doksorubisin (DOX), diğer adıyla adriamisin, çeşitli kanser türlerinin tedavisinde yaygın olarak kullanılır [67, 68]. Bu ilaç antrasiklin antibiyotik ailesine aittir [69]. DOX en sık mesane, meme, mide, akciğer, over, tiroid ve Hodgkin lenfoma kanserlerini tedavi etmek için kullanılır [70].

2.4.1. Doksorubisin Yapısı

Antrasiklin molekülü, tetrasiklik çekirdek ile bu çekirdeğe glikosidik bir bağ ile bağlı aminoşekerden (daunosamin) oluşmaktadır. İlaça kırmızı rengini veren tetrasiklik çekirdektir. Antrasiklin grubunun tüm üyelerinde tetrasiklik halkaya komşu hidrokinon ve kinon grupları bulunmaktadır [71]. Bu gruplar elektron alma ve verme işlevi görür. Daunorubisin molekülünde bulunan 14. karbona hidroksil grubu eklenerek doksorubisin meydana gelmektedir (Şekil 2.1) [72].



Şekil 2.1: Doksorubisinin moleküler yapısı [73].

2.4.2. Doksorubisinin Tarihçesi

DOX'un tarihçesi 1950'lere kadar uzanır. Toprak bazlı mikroorganizmalardan antikanser bileşikler arayışı 1950'lerde başlamıştır [70]. 13. yüzyıldan kalma bir kale olan Castel del Monte civarından elde edilen bir toprak numunesinden parlak kırmızı bir pigment üreten yeni bir *Streptomyces peucetius* suşu izole edildi [74]. Bu bakteriden fare tümörlerine karşı iyi etkinliğe sahip olduğu bulunan kırmızı renkli bir antibiyotik üretildi. Yeni bileşik, daunorubisin olarak adlandırıldı [70]. Bu ad İtalya'da bu antibiyotik keşfedildiği bölgede yaşamış bir kabile olan Dauni ile antibiyotik renginin Fransızcası olan rubis sözcüğünün birleştirilmesi ile türetilmiştir [74]. Keşfedilen bu ilaç akut lösemi ve lenfoma tedavisinde başarıyla kullanılmıştır [70]. Daha sonra yeni başarılı antineoplastik ajanları keşfetmek amacıyla yapılan araştırmalarda *Streptomyces peucetius*'da genetik değişiklikler yapıldı ve bu yeni suş bakterilerin daunorubisin-ilişkili bileşik olan adriamisin (bu isim daha sonra DOX olarak değiştirildi) ürettiği keşfedilmiştir [70, 75]. Günümüzde ticari olarak önemli miktarda DOX elde etmek için bu ilaç esas olarak *Streptomyces peucetius* ATCC 27952'den izole edilmektedir [76].

2.4.3. Doksorubisinin Farmakokinetiği

DOX gastrointestinal sistemde absorbe edilemediği için intravenöz olarak uygulanır [77]. İntravenöz enjeksiyondan sonra DOX plazma proteinlerine bağlanarak dokulara dağılır. Dokular tarafından hızlı bir şekilde alındığı için plazmada konsantrasyonu hızlı bir şekilde düşer. DOX kan-beyin bariyerini geçemez ve bu nedenle merkezi sinir sistemindeki tümörlere etki etmez [78]. Dokulara fazla bağlanıp, bağlandığı dokulardan yavaş salındığından vücutta kalış süresi ve etkisi uzun sürer [77]. Enjeksiyondan 30 dakika sonra DOX'un kanda konsantrasyonu %50 oranında azalır ancak konsantrasyonu etkin seviyede devam eder [79].

DOX karaciğerde hidroliz, demetilasyon, glukuronidasyon gibi bir dizi reaksiyona girer [69]. İlacın büyük bir kısmı safradan doksorubisinol ve daunorubisinol olarak atılır [80]. DOX esas olarak karaciğerden safra yoluyla atılmasına rağmen böbreklerle (% 3-10) ve dışkıyla da (% 40-50) atılır. İlacın dışkıyla atılan kısmı değişmemiş ilaç şeklindedir. Böbreklerden atılımı ilaç uygulandıktan 1-2 gün sonra gerçekleşir. İlacın atılımı esnasında idrar geçici bir süre için kırmızıya boyanır ancak bunun klinik bir önemi yoktur [81].

2.4.4. Doksorubisinin Etki Mekanizması

DOX'un etki mekanizması hala tam anlamıyla anlaşılmamış olmakla beraber interlokasyon yoluyla DNA'nın çift sarmal yapısı ile etkileşime girdiği düşünülmektedir [82]. İnterlokasyon DNA fonksiyonunu ve RNA polimerazın (DNA replikasyonu ve RNA transkripsiyonu) fonksiyonunu inhibe ettiğinden DOX hücre bölünmesinin S fazındaki hücreler üzerinde önemli bir sitotoksik etki gösterir. Hücre bölünmesi üzerinde böylesine önemli bir etki uygulayarak, hem hızlı bölünen kanserli hem de kanserli olmayan hücreler hedeflenir [69]. Bunun dışında DOX transkripsiyon sırasında DNA'nın açılmasını sağlayan topoizomeraz II enziminin ilerlemesini engeller. DOX, DNA zincirinin replikasyon için kırılmasından sonra topoizomeraz II kompleksini stabilize eder, DNA çift sarmalının tekrar kapatılmasını önler ve böylece replikasyon işlemi durdurur. DOX'un bir başka mekanizması, DNA ve hücre zarı hasarını indükleyen serbest radikaller üretebilmesidir [70]. Ayrıca DOX hücre membranına bağlanarak, membranın fiziksel özelliklerini değiştirir ve hücrenin membran fonksiyonunu bozar [73]. Kümülatif olarak, bu mekanizmalar hücre canlılığında azalmaya, yavaş tümör büyümesine katkıda bulunur ancak oldukça ciddi yan etkilere neden olur [69].

2.4.5. Doksorubisinin Toksik Etkisi

Antineoplastik ilaçlar toksik ilaçlardır. Ancak dünya çapında önde gelen ölüm nedenlerinden biri olan kanser gibi son derece ciddi bir hastalıkta etkili olmaları bu sakıncalarının önemini azaltır [64, 77]. Antrasiklinlerin en sık gözlenen yan etkileri bulantı-kusma, saçlarda dökülme, mukozit, kemik iliği baskılanması ve deri pigmentasyonunda artıştır [83]. DOX vezikan bir ilaçtır. Damar dışına kaçışı yani ekstrevasasyonu dokuda geri dönüşümsüz hasara neden olur [77, 84].

Doksorubisinin akut yan etkilerinin yanı sıra böbrek, kalp, bağırsak, testis ve ovaryum gibi çeşitli dokulara toksik etkisi mevcuttur [69, 85-87]. DOX kullanımı ile ilişkili en ciddi komplikasyonlardan biri kardiyotoksisitedir [69]. Kardiyotoksisite gözlenmesi dozun sınırlandırılmasının ana nedenidir [87]. DOX, kardiyomiyositlerin yapısını değiştirip hacimce

genişlemesine neden olarak kardiyak hipertrofi, kardiyomiyopati ve kalp fonksiyonlarında bozulma ile sonuçlanan kardiyotoksositeye neden olur [69].

DOX böbrekte tübüllerde dilatasyon ve atrofiye, glomerül hasara ve renal fibrozise neden olmaktadır. Ayrıca, glomerüler endotelin incelmeye, endotel hücre porlarının çapının artmasına ve podosit hücrelerinde füzyona neden olarak glomerüler filtrasyon bariyerinde değişikliklere neden olur. Glomerüler hücrelerde glikozaminoglikan ve proteoglikan sentezinde azalma sonucu glikokaliks kalınlığı ve glomerüler seçicilik azalır [88].

DOX kullanımı sonucu oluşan serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonunu uyarır. Lipid peroksidasyonu ise erkek infertilitesinde kilit rol oynamaktadır. Erkek gonadlarında DOX spermatogonyumların şeklinin bozulmasına, seminifer tübül çapında daralmaya ve spermin hareketinde azalmaya neden olmaktadır [89-91].

DOX ovaryum üzerinde toksik etkiye sahiptir [92]. Oksidatif stres ve çift zincir DNA kırılmalarını indükleyerek hücre ölümüne neden olur [11]. Ovaryumlardaki DOX hasarı, hücre çekirdeğine DOX'un taşınması ve DNA interkalasyonu sonrasında topoizomerez II'ye bağlı çift zincir DNA kırılmalarının oluşumunu içerir [93].

Ovaryumlarda DOX kan damarlarının zarar görmesine ve stroma hücrelerinin apoptozuna neden olur [94]. DOX önce stromal hücrelerde birikir, daha sonra radyal olarak içe doğru kayar ve foliküllere nüfuz eder. Bu zamansal model göz önüne alındığında, DOX ile indüklenen çift zincir DNA kırılmaları ilk önce stromal hücrelerde, ardından oositleri besleyen granüloza hücrelerinde meydana gelir [11].

Granüloza hücrelerinde DOX kullanımı sonrasında ROS üretiminin arttığı, mitokondriyal membran potansiyelinin azaldığı, p53, Bcl-2 ve Bax mRNA ekspresyonunun arttığı ve buna bağlı olarak DOX'un granüloza hücrelerinde apoptozaya yol açtığı rapor edilmiştir [95]. DOX granüloza hücreleri dışında oositlerin de apoptozunu indüklemektedir. Farelerle yapılan in vitro çalışmalarda germinal vezikül ve metafaz II aşamasındaki oositlerde endoplazmik retikulum stresinin indüklenmesine, mitokondri aktivasyonunun artmasına ve hücre içi kalsiyum miktarının artmasına sebep olarak apoptozaya neden olduğu bildirilmiştir [96]. DOX ile yapılan başka bir çalışmada ise DOX uygulaması sonrası ovaryumda bulunan tüm foliküllerin sayısının azaldığı özellikle sekonder foliküllerin hasar gördüğü bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada DOX'un ovaryumda bulunan atretik folikül sayısını artırdığı buna bağlı olarak da ovulasyon hızında azalmanın gerçekleştiği saptanmıştır [97]. DOX tedavisi primordiyal folikül havuzuna ciddi hasar vererek over rezervini olumsuz etkiler [15, 16].

Primordiyal folikül sayısında azalma POF'a yol açabilir. Bu yüzden de kadın fertilitésinin korunması önem kazanır [98]. Kanser tedavisi gören hastalarda tedavi sonrasında fertilitésinin korunması için medikal ve cerrahi yöntemler mevcuttur [10]. Tedaviye başlamadan önce oosit ve embriyo dondurma işlemleri yapılabilir. Bunlara ek olarak antioksidanlar, GnRH antagonistleri,

gonadotropin analogları ve kök hücre uygulamaları gibi teknikler ile ilgili araştırmaların sayısı gün geçtikçe artmaktadır[99-102].

2.5. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH), organların bağ dokularında bulunan multipotent özellikteki erişkin kök hücre tipidir [103, 104]. Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği MKH'leri tanımlamak için üç kriter önermiştir. İlk olarak, MKH'ler standart kültür koşullarında plastik kültür kaplarına yapışabilir olmalıdır. İkinci olarak, MKH'lerin % 95'inden fazlası, farklılaşma yığılım molekülleri (CD) 105, CD73 ve CD90 yüzey belirteçlerini eksprese ederken CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 ve insan lökosit antijeni (HLA) sınıf II yüzey belirteçleri ekspresyonundan yoksun olmalıdır. Üçüncüsü, bu hücrelerin standart in vitro farklılaştırma koşulları altında osteoblastlar, adipositler ve kondroblastlara farklılaşabilmesi gerekir [105]. MKH'ler osteoblastlar, adipositler ve kondroblastlara ek olarak düz kas hücreleri, kardiyomyositler, endotel hücreleri, nöron benzeri hücreler, hepatositler gibi farklı hücre tiplerine farklılaştığı çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [106].

MKH'ler yağ dokusu, kemik iliği, plasenta, göbek kordon kanı, testisler, karaciğer, pankreas, dalak, amniyotik sıvı, diş pulpası, dermis ve akciğer de dahil olmak üzere çeşitli doku ve organlardan izole edilmektedir [106]. Bu kaynaklardan elde edilen MKH'lerin sayısı, fenotipleri, genotipleri, çoğalma, büyüme ve farklılaşma özellikleri birbirinden farklılık gösterir. MKH'lerin çeşitli dokulardan kolay elde edilebiliyor olması, farklılaşma ve kendini yenileyebilme özelliklerine sahip olması, etik açıdan çok problemi olmaması gibi özellikleri sayesinde rejeneratif tıp, hücre tedavileri ve doku tamiri konularında tercih edilmesini sağlamıştır [17, 103]. MKH'lerin klinikte kullanımları yenidir ancak şimdiye kadar birçok hayvan deneyi yapılmış ve bu deneylerde MKH'lerin birçok hastalıkta kullanılabileceği gösterilmiştir. MKH'ler organizmaya verilmeden önce laboratuvarında in vitro olarak farklılaştırılabilir. Ancak sıklıkla 1-3. pasajlarda farklılaştırmadan vücuda verilir [17]. MKH'ler vücuda verildikten sonra hasarlı bölgeye yönelir ve burada bir takım biyoaktif maddeler salgırlar [107]. Ayrıca bu hücrelerin immünomodülasyon ve immünoşüpresyon fonksiyonuna sahip olmaları hücresel tedavide yer bulmalarını sağlamıştır [108].

MKH'ler vücuda verildikten sonra hasarlı bölgeden salınan monosit kemoatraktan protein-1 (MCP-1) ve stromal kökenli faktör-1 (SDF-1) gibi faktörlerin etkisiyle hasarlı bölgeye göç ederler ve yüzeylerinde eksprese ettikleri çeşitli hücre adezyon molekülleri sayesinde bağışıklık hücrelerine benzer şekilde kan damarlarından ekstravazasyon yaparlar [107, 109]. Bu hücre adezyon moleküllerinden $\alpha 4\beta 1$ integrini endotel hücreleri yüzeyinde bulunan vasküler hücre adezyon molekülü-1 (VCAM-1) ile etkileşime girer. Bu etkileşim sonucunda MKH'ler

endotel hücreleri üzerinde yuvarlanıp bu hücrelere bağlanır ve perivasküler niş bölgesine ulaşırlar [17, 109].

MKH'ler hasarlı bölgeye ulaştıktan sonra farklılaşmalarının yanı sıra bir dizi sinyal molekülü (sitokinler, büyüme faktörleri, anti-apoptotik faktörler ve hücre adezyon molekülleri) salgılayarak mevcut hücreler üzerinde parakrin etki gösterir ve bu parakrin etkiler trofik etkiler olarak adlandırılır [17, 110]. Hasarlı bölgede etkin hale gelen MKH'ler trofik etkileriyle iskemik bölgede anti- antiapoptotik bir dizi molekül salgılar, skar oluşumunu engeller, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) salgılayarak anjiyogenezi uyarır, mitoz bölünmeyi uyarıcı moleküller salgılayarak dokunun öncü hücrelerinin çoğalmasını sağlar. Böylece bu hücreler hasarın büyümesini önlerler ve bu bölgeye kan akımını artırarak dokunun onarımında rol oynarlar [17]. MKH'ler trofik etkilerine ek olarak kemoatraktan maddeler salgırlar. Birçok çalışmada MKH'lerin monosit kemoatraktan protein-1 (MCP), makrofaj inflamatuvar protein-1 α (MIP-1 α), kemokin ligandı 5 (RANTES), makrofaj kaynaklı kemokin (MDC), fraktalkin (CX₃CL1) içeren birçok kemoatraktan molekülü salgıladığı bulunmuştur. Bu kemoatraktan moleküller monositler, eozinofiller, nötrofiller, bazofiller, T-hücreleri, B-hücreleri, doğal öldürücü hücrelerini etkileyerek hasarlı bölgenin onarımında katkı sağlar [111].

MKH'ler immünolojik reaksiyonları hem arttırıcı hem de baskılayıcı yeteneğe sahiptir [112]. Bu immün düzenleyici etkilerini salgıladıkları sitokinler ve kemokinler etkisiyle gerçekleştirirler [17]. İmmünolojik reaksiyonları arttırmak üzere otokrin etkili interferon-gama (IFN- γ) aracılığıyla antijen sunan hücre olarak fonksiyon görürler. Bununla birlikte, eğer IFN- γ seviyesi belirli bir düzeyin üzerine çıkarsa antijen sunumu direkt olarak baskılanır ve böylece immünolojik reaksiyonlar baskılanır. İmmün aktiviteyi düzenlemedeki bu etkileri aracılığıyla MKH'lerin hem yabancı antijenlere karşı koruma sağladığı hem de aşırı immün yanıtın kaynaklanan hasarı sınırlandırdığı düşünülmektedir [107]. Ayrıca antijeni T hücrelerine iletmede görevli major doku uygunluk kompleksi I (MHC I) yüzey molekülü MKH'lerde az eksprese edildiği için immün yanıtı neden olmazlar [113]. Bunun dışında MKH'lerde humoral veya hücre aracılı immün yanıtların kontrolünde rol alan MHC II ve CD40, CD80 ve CD86 gibi kostimülatörler bulunmadığı için in vivo kullanımda doku uyumu aranmaz [112].

2.5.1. Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücreler

Adipoz dokusu, stromal vasküler fraksiyon (SVF) ve olgun adipositler dahil olmak üzere fazla sayıda hücre tipi içeren çok işlevli bir organdır. SVF'de fibroblastlar, dolaşımdaki kırmızı kan hücreleri, perisitler, endotel hücreleri, preadipositler ve MKH'ler bulunur [114]. Bu dokuda bulunan kök hücrelere adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler (AKMKH) ya da kısaca adipoz kök hücreler denilmektedir. Bu hücrelerde CD9, CD13, CD29, CD44, CD54, CD73, CD90,

CD105, CD106, CD117, CD140b, CD146, CD166, HLA1 yüzey belirteçleri bulunurken CD11b, CD14, CD19, CD31, CD34, CD45, CD79 α , CD133, CD144 yüzey belirteçleri bulunmaz [17]. AKMKH'ler mezoderm kaynaklı osteoblastlara, kondroblastlara, kardiyomiyositlere, endotel hücrelerine, ektoderm kaynaklı keratinositlere, retina pigment epiteline, kornea epiteline, endoderm kaynaklı hepatositlere dönüşebilirler [115].

Rejeneratif tıp, hücre tedavileri ve doku tamirinde kullanılan erişkin kök hücreler arasında en avantajlısı AKMKH'ler görülmektedir. En önemli avantajları hastada fazla miktarda bulunması ve hastadan kolaylıkla elde edilebiliyor olmasıdır [115, 116]. Adipoz doku liposuction, lipoplasti ve lipotomi ile elde edilebilir [17]. Bu yöntemler kullanılarak yüksek hacimde doku elde edilebilirken kemik iliği aspirasyonundan ya da biyopsisinden elde edilen materyal oldukça azdır. Ayrıca kemik iliğinde hücrelerin sadece % 0.001-0.004 MKH iken lipoaspiratta çekirdekli hücrelerin %2'si MKH'dir. Lipoaspiratın mililitresinde bulunan kök hücre sayısı kemik iliğinden yaklaşık sekiz kat daha yüksektir [117].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda kırık ve kemik onarımı, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, bağışıklık sistemi hastalıkları ve nörolojik bozukluklar dahil olmak üzere çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kemik iliği, adipoz doku gibi çeşitli kaynaklardan elde edilen MKH'ler kullanılmaktadır [118]. Bu hastalıkların dışında MKH'ler kadınlarda infertiliteyi tedavi etmek veya ovaryum fonksiyonunu düzeltmek için yeni bir seçenek olarak kabul edilmektedir. Birçok çalışmada POF oluşturulan hayvan modellerine çeşitli kaynaklardan elde edilen MKH uygulanmış ve ovaryum fonksiyonunun düzeldiği rapor edilmiştir [119-122]. MKH'lerin VEGF, insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF-1) ve hepatosit büyüme faktörünü (HGF) gibi büyüme faktörleri salgılayarak germ hücresi ve stromal hücre apoptozunu azalttığını ve mikroçevredeki bu iyileştirmelerle folikülogenezi arttırdığı bulunmuştur [123, 124]. Ayrıca MKH'ler granüloza hücrelerinde AMH ve folikül uyarıcı hormon (FSH) reseptörü ekspresyonunun yukarı regülasyonunu sağlayarak foliküler atreziyi ve granüloza hücre apoptozunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Ovaryum fonksiyonunu iyileştirmek için MKH'lerin rejeneratif kullanımına ilişkin devam eden araştırmalar POF hastaları, infertil ve subfertil kadınlar için umut kaynağı olabilir [125].

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanlarının Elde Edilmesi

Bu çalışma Mersin Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından 10.04.2017 tarih ve 08 sayılı kararıyla onaylandı. Çalışmamızda düzenli östrus siklusuna sahip 10 haftalık 23 adet Wistar Albino dişi sıçan kullanıldı. Bu denekler Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarından temin edildi. Denekler deney süresince yine bu merkezde sıcaklığı 22 ± 2 °C, nem oranı %45-65 ve 12 saat aydınlık 12 saat karanlık olan ortam koşullarında, standart 35 cm X 45 cm X 25 cm boyutlarındaki plastik kafeslerde tutuldu. Ayrıca denekler çeşme suyu ve %21 ham protein içeren pellet yemle ad libitum beslendi.

3.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Denekler kontrol grubu, doksorubisin (DOX) grubu, doksorubisin ve kök hücre (DOX+AKMKH) grubu olmak üzere 3 gruba ayrıldı.

- Kontrol grubundaki (n=7) deneklere hiçbir işlem yapılmadı.
- Doksorubisin grubundaki (n=8) deneklere tek doz 10 mg/kg doksorubisin[97] intraperitoneal olarak enjekte edildi.
- Doksorubisin ve kök hücre grubundaki (n=8) deneklere ise tek doz 10 mg/kg doksorubisin intraperitoneal olarak enjekte edildikten bir gün sonra 2×10^6 adipoz kökenli kök hücre [119] intraperitoneal olarak uygulandı.

Tüm gruplardaki deneklerin siklus takibi için deney süresince sabah saat 9.00'da günlük vajinal smear alındı. Alınan vajinal smear örnekleri %1'lik toluidin mavisi ile boyanıp değerlendirildi. Ayrıca tüm deneklerin ağırlıkları çalışmanın başında ve sonunda tartılarak değerlendirildi.

3.3. Adipoz Kökenli Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

Adipoz kökenli kök hücrelerin izolasyonu aşağıdaki protokole göre yapıldı.

Adipoz kökenli kök hücrelerin izolasyonu için 8 haftalık Wistar Albino cinsi dişi sıçana intraperitoneal olarak ksilazin (10 mg/kg) ve ketamin (100 mg/kg) anestezi ajanları verildi. Anestezi altındaki deney hayvanının inguinal bölgesinden adipoz doku alındı. Alınan adipoz doku steril tuzlu fosfat tamponu (PBS) ile yıkandı ve steril ortamda küçük parçalara ayrıldı. Parçalan

dokular % 0,1'lik konsantrasyonda kollajenaz I (Sigma, Collagenase, C-6885, Lot 114K8633) içeren besiyerine koyularak 37 °C'de 45 dakika inkübe edildi. Bu süre sonunda enzimatik yöntemle ayrılan hücreler ile parçalanmamış doku parçaları 70 µm'lik naylon hücre süzgeci yardımıyla ayrıldı. Altta kalan süspansiyon 200 g'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Pellet ise %10 fetal sığır serumu (FBS, S181G-100, Biowest), %2 L-glutamin (Lonza, cat DE17-602E, Lot 5MB135, Belçika) ve %1 penisilin-streptomisin (Lonza, cat BE17-605E, Lot 5MB180, Belçika) içeren düşük glukozlu Dulbecco's Modified Eagles Medium (L-DMEM, Biological Industries, Lot 1910372, İsrail) ile resüspanse edildi. Hücreler tripan mavisini ile boyanıp Thoma TM lamı ile sayıldıktan sonra cm² başına 5x10⁴ hücre olacak şekilde uygun flasklara ekim yapıldı. Flasklar 37 °C'de %5 CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Besiyeri 3 günde bir değiştirildi. Hücreler %70-80 konfluent hale geldiğinde pasajlama yapıldı ve hücreler 3. pasaja kadar getirildi.

3. pasajdaki hücreler tripan blue ile boyandıktan sonra Thoma TM lamı ile sayıldı. Mezenkimal kök hücreler DOX+AKMKH grubundaki her bir sıçana 10 µL serum fizyolojik içerisinde 2x10⁶ kök hücre olacak şekilde intraperitoneal olarak uygulandı.

3.4. Dokuların Elde Edilmesi ve Fiksasyonu

21 günün sonunda tüm grupları oluşturan deneklere intraperitoneal olarak ksilazin (10 mg/kg) ve ketamin (100 mg/kg) anestezi ajanları verildi. Deneklerin derin anestezi altında olduğu tespit edildikten sonra abdominal bölgeleri açıldı ve iki taraflı olarak ovaryumları dissekte edildi. Deneklerden alınan sağ ovaryumlar morfolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler için %10'luk tamponlanmış formaldehitte 48 saat fikse edildi. Deneklerin sol ovaryumları ise gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) için -80 °C'ye alındı.

3.5. Işık Mikroskopik Doku Takip İşlemi

Işık mikroskopik değerlendirmeler için fikse edilen dokular musluk suyunda 12 saat yıkandıktan sonra rutin doku takibi yapıldı. Dokular aşağıdaki takip protokolüne göre hazırlandı.

- | | |
|-----------------------|-----------|
| 1. %70'lik etil alkol | 45 dakika |
| 2. %80'lik etil alkol | 45 dakika |
| 3. %90'lik etil alkol | 45 dakika |
| 4. %96'lik etil alkol | 45 dakika |
| 5. %96'lik etil alkol | 45 dakika |
| 6. %96'lik etil alkol | 45 dakika |

- | | |
|---------------------------------|-----------|
| 7. %96'lik etil alkol | 45 dakika |
| 8. Ksilen | 15 dakika |
| 9. Ksilen | 15 dakika |
| 10. 1:1 ksilen-parafin karışımı | 1 saat |
| 11. Parafin | 1 saat |
| 12. Parafin | 2 saat |
| 13. Bloklama | |

Doku takibi sonucu elde edilen parafin bloklardan rotary mikrotom (Leica® RM2125RT, Leica Avusturya-Viyana) ile 5 µm'lik kalınlıkta seri kesitler adheziv lamlara (Superior Marienfeld-HistoBond®) alındı.

3.6. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

Folikül sayımı için tüm over dokusundan alınan seri kesitlerden her beşinci kesit hematoksilen- eozin ile aşağıdaki protokole göre boyandı.

1. Kesitler fiziksel deparafinizasyon için 60°C'lik etüvde 30 dakika bekletildi.
2. Kimyasal deparafinizasyon için ise 2 x 20 dakika ksilende bekletildi.
3. Rehidratasyon işlemi için %96, %90, %80'lik alkol serilerinde 10'ar dakika tutuldu.
4. Kesitler distile suda yıkandı.
5. Hematoksilen boya solüsyonunda 90 saniye tutuldu.
6. Kesitler akarsuda yıkandı.
7. Kesitler asit alkol ve amonyak solüsyonlarından geçirildi.
8. Eozin ile 35 saniye (s) boyama sağlandı.
9. Kesitler %80, %90, %96'lık alkol serilerinden geçirildi.
10. Kesitler 20 dakika ksilende bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

H-E ile boyanan ortalama 80 kesitte primordiyal, primer, sekonder, tersiyer foliküllerin ve atretik foliküllerin sayımı yapıldı. Follikül sayımı aşağıdaki kriterler dikkate alınarak gerçekleştirildi [1].

- Oosit tek katlı yassı foliküler hücre tabakasıyla çevrili ise primordiyal folikül,
- Primer oosit tek katlı ya da daha fazla kübik granüloza hücre tabakasıyla çevriliyse primer folikül,

- Granüloza hücrelerinin arasında sıvı dolu kaviteler oluşmaya başladıysa, bu kaviteler birleşip antrum adı verilen hilal biçimli tek bir kavite oluşmuş ise sekonder folikül,
- Folikül çapı ve antrumu maksimum boyuta ulaşmış, granülozum tabakası incelmış, korona radyata ve kumulus ooforus yapıları belirginleşmiş ise tersiyer folikül olarak isimlendirildi.

Hazırlanan kesitler Olympus BX50TM (Olympus GmbH, Almanya) ışık mikroskobu ile incelenip Olympus LC30 dijital kamera (Olympus LC30 Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Almanya) ile görüntülendi.

3.7. İmmünohistokimyasal İşaretleme Protokolü

Tüm gruplardan elde edilen ovaryum dokularındaki FOXO3a ve AKT ekspresyonunu incelemek için aşağıdaki protokole göre immünohistokimyasal işaretleme yapıldı.

1. Adeziv lamlara 5 µm kalınlığında alınan kesitlerdeki parafini uzaklaştırmak için kesitler 60 °C'lik etüvde 10 dakika ve oda ısındaki ksilende 40 dakika bekletildi.
2. Rehidratasyon işlemi için kesitler %90, %80 ve %70'lik azalan alkol serilerinden geçirildi ve distile su ile yıkama yapıldı.
3. Antijen maskeleyişini ortadan kaldırmak için dokular pH=6 olan %1'lik sitrat tamponu içinde mikrodalga fırında kaynayana kadar bekletildi. Kesitler kaynadıktan sonra aynı sitrat tamponu içinde oda ısısında soğuması için bırakıldı.
4. PBS ile 3x5 dakika yıkama yapıldı.
5. Endojen peroksit inaktivasyonu için kesitler metanol ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksitte (H₂O₂) 10 dakika bekletildi.
6. PBS ile 3x5 dakika yıkama yapıldı.
7. Nonspesifik antikor bağlanmasını önlemek için protein blok (Abcam, fare ve tavşan özel HRP (Horseradish Peroxidase), katalog no: ab93697, Birleşik Krallık) damlatıldı ve 20 dakika inkübe edildi.
8. Protein blok uzaklaştırıldı ve %0,1 Tween-20, %1,5'lik sığır serum albümin (BSA) içeren PBS içinde uygun dilüsyon oranlarında sulandırılmış FOXO3a (1:50, Abcam, katalog no ab23683, Birleşik Krallık) ve AKT (1:1500, Abcam, katalog no ab8805, Birleşik Krallık) primer antikorları damlatıldı. Kesitler +4 °C'de buzdolabında bir gece inkübe edildi. Negatif kontrol için kesitler primer antikor yerine %1,5'lük BSA ve %0,1'lik Tween-20 içeren PBS ile inkübe edildi.
9. PBS ile 3x5 dakika yıkama yapıldı.

10. Biotin ile bağlanmış sekonder antikor (Abcam, katalog no:ab93697, Birleşik krallık) damlatılarak oda ısısında 10 dakika bekletildi.
11. PBS ile 3x5 dakika yıkama yapıldı.
12. Streptavidin peroksidaz enzim solüsyonu damlatıldı ve 10 dakika bekletildi.
13. PBS ile 3x5 dakika yıkama yapıldı.
14. Peroksidaz substratı 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (Abcam, katalog no:94665, Birleşik krallık) damlatılarak antikor bağlanması görülür hale getirildi.
13. Distile su ile 3x5 dakika yıkama yapıldı.
13. Kesitler zıt boyama için hematoksilende 5 saniye bekletildi ve çeşme suyunda yıkandı.
13. Dehidratasyon işlemi %80, %90, %96'lık alkollerden geçirilerek yapıldı.
13. Kesitler ksilende 10 dakika bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal işaretleme yapıldıktan sonra ışık mikroskopunda rastgele seçilen 25 primordiyal folikül aşağıdaki semikantitatif değerlendirme yöntemine göre değerlendirilmiştir.

- 0= boyanma yok
- 1=hafif boyanma
- 2=orta boyanma
- 3=yoğun boyanma

3.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-qPCR) Analizleri

Tüm gruplara ait ovaryum dokularındaki FOXO3a ve AKT gen ekspresyon düzeylerinin gösterilmesi için ilk olarak örneklerden total RNA izolasyonu high pure RNA izolasyon kiti kullanılarak, firmanın önerdiği protokol ile yapıldı.

3.8.1. RNA İzolasyonu

1. -80 °C'de saklanan ovaryum dokularından yaklaşık 25 mg alınarak MagNA Lyser Green Beads (Roche katalog no: 03358941001, Almanya) tüplerine konuldu. Dokuların üzerine 600 µL doku lizis tamponu eklendi.
2. MagNA Lyser (Roche, Almanya) cihazında 40 s boyunca 6500 devirde homojenize edildi. +4°C' de 2 dakika soğuk blok üzerinde tutuldu.
3. Dokular tekrar 6500 devirde 40 s homojenize edildi ve +4°C' de 5-10 dakika soğuk blok üzerinde tutuldu.
4. Tüpler 13.000 g'de 2 dakika santrifüj edildi ve üst faz bir ependorf tüpüne alındı.

5. Tüplerin üzerine 600 µL %70'lik etanol ve 6 µL 50 mM'lık 2- mercaptoetanol eklenir.
6. Altlarında toplama tüpleri bulunan filtreli tüplere homojenize edilen örnekten 600 µL alınarak 12000 g' de 15 s santrifüj edildi.
7. Filtreli tüpler aynı tüplere yerleştirildi ve içerisine 700 µl yıkama tamponu I konulup 12000 g'de 15 s çevrildi.
8. Toplama tüpleri boşaltılarak filtreli tüpler bu toplama tüplerine aktarıldı.
9. Filtreli tüplerin içerisine 500 µL yıkama tamponu II konulup 15 s 12000 g' de çevrildi.
10. Toplama tüpleri boşaltıldı ve filtreli tüpler bu tüplere aktarıldı. Tüplerin içerisine 500 µL yıkama tamponu II eklenerek 15 s 12000 g' de çevrildi.
11. Filtreli tüpler tekrar 2 dakika 12000 g'de çevrildi.
12. Filtreli tüpler 1,5 mL'lik ependorf tüplere aktarıldı.
13. Her örneğe 100 µL RNaz free su eklendi ve oda ısısında 1dakika bekletildi.
14. 12000 g'de 2 dakika santrifüj edildi.
15. Elde edilen RNA'lar -80°C'de saklandı.

3.8.2. Total RNA'dan cDNA Elde Edilmesi

RNA örneklerinden komplementer DNA (complementer DNA, cDNA;) elde etmek için high-capacity cDNA reverse transcription kiti (LifeTech Cat. No: 4368814) kullanıldı. Kitin kullanımına başlamadan önce bütün reaktifler ve RNA örnekleri oda ısısına alınarak erimeye bırakıldı daha sonra erimiş örnekler ve reaktifler 3 s çevrildi. Bu aşamada bütün reaktifler ve örnekler buz üzerinde muhafaza edildi. cDNA sentezi 2 basamakta tamamlandı.

1. Basamak:

Her örnek için ayrı ayrı 0,2 mL'lik PCR tüpleri kullanıldı. Tablo 3.1'de belirtilen bileşenler ve hacimlere göre 1. karışım hazırlandı. Bu karışım 65°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldı.

2. Basamak:

Tablo 3.1'de belirtilen 2. karışım hazırlandı ve inkübasyondan çıkan 1. karışımın üzerine aktarıldı. Daha sonra oluşan karışım Thermal cycler'da 25°C'de 10 dakika, 50°C'de 60 dakika, 85°C'de 5 dakika işleme alındı. Oluşan cDNA örnekleri -20°C'de muhafaza edildi.

Tablo 3.1. cDNA sentezi reaksiyon karışımı

İçerik	Hacim
1. karışım:	
Total RNA veya poly (A) mRNA	9 µL
Random primer	2 µL
Su, PCR grade	2 µL
Total hacim	13 µL
2. karışım:	
Transcriptor Reverse Trascriptase Reaction Buffer 5x conc.	4 µL
Protector Rnase Inhibitor	0,5 µL
Deoxynukleotid Mix	2 µL
Transcriptor Reverse Trascriptase enzim	0,5 µL
Total hacim	7 µL

3.8.3. Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR) Aşaması

RT- PCR'da kullanılan karışım;

- 4 µL distile su
- 10 µL reaksiyon enzimi (Probe master mix)
- 1 µL primer-probe karışımı (Real Time Ready Assay)
- 5 µL cDNA

RT PCR protokolünün aşamaları;

1. İnkübasyon aşaması; 95 °C'de 10 dakika DNA polimerazın aktive olması için bekletildi.
2. Amplifikasyon aşaması; 2 aşamada gerçekleştirildi, aşağıdaki döngü 40 defa tekrarlandı.
 - 1. basamak; 95 °C'de 15 s bekletilerek DNA'nın çift iplikli yapıdan tek iplikli yapıya geçmesi (denatürasyon)
 - 2. basamak; 60 °C'de 1 dakika bekletilerek çoğaltılması istenilen spesifik bölgeye uygun primerlerin bağlanması (annealing)
3. Soğutma aşaması; 40 °C'de 30 s bekletildi.

Çalışma sonunda çıkan sonuçların amplifikasyon eğrileri kantitatif modda crossing point (Cp) değerleri belirlendi. Kontrole göre gen ekspresyon değişimleri $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı.

3.9. İstatistiksel Analiz

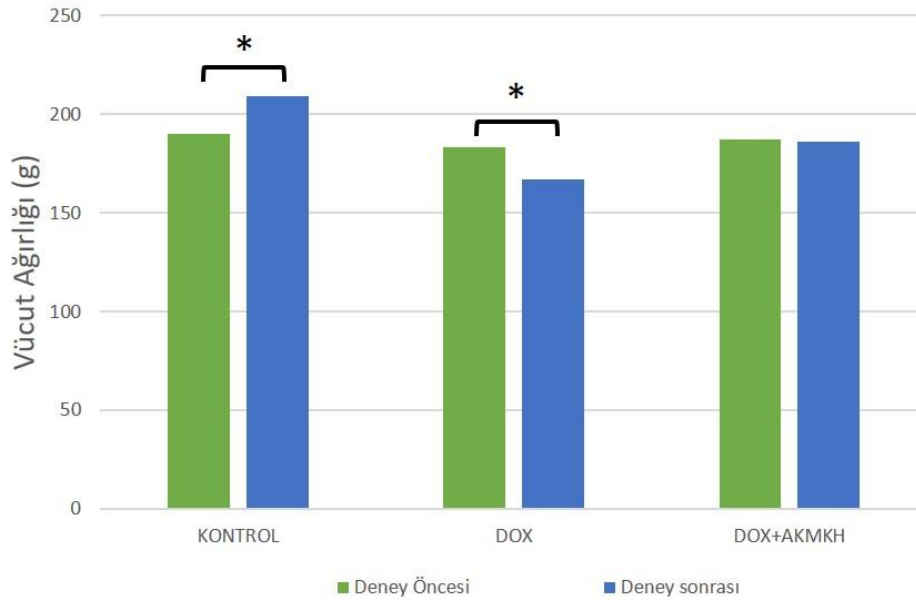
İstatistiksel analiz için SPSS 11.5 paket programı kullanıldı. Verilerin her grupta normal dağılıma uygunluk kontrollerine Shapiro Wilk testi ile bakıldı. Tanımlayıcı istatistik olarak ortalama ve standart sapma değerleri verildi. Verileri içeren tablo ve grafikler Microsoft excel yardımıyla oluşturuldu. Grup ortalamaları arasındaki farklılık grafiği için sütun grafiği kullanıldı. Normalite testine göre $p>0,05$ anlamlılık değeri elde edilen veri setleri normal olarak kabul edilip, One-Way ANOVA testi ile parametrik olarak analiz edildi. One-Way ANOVA testinde anlamlı bulunan parametreler için, anlamlılığın hangi ikili gruplar arasındaki farklılıktan kaynaklandığını gözlemlemek için Tukey post-hoc testi uygulandı. Gruplar arasında ikili karşılaştırmalarda Student-t testi kullanıldı. Student-t testi içerisindeki Levene testinde anlamlılık düzeyi $p>0,05$ çıkan veri setleri varyans değişkenliği açısından eşit, $p<0,05$ olanlar ise varyans değişkenliği açısından eşit olmayan şeklinde değerlendirildi. Student-t testi uygulanmış veri setlerini temsil eden nihai p değerleri Levene testine göre belirlendi.

4. BULGULAR

4.1. Vücut Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

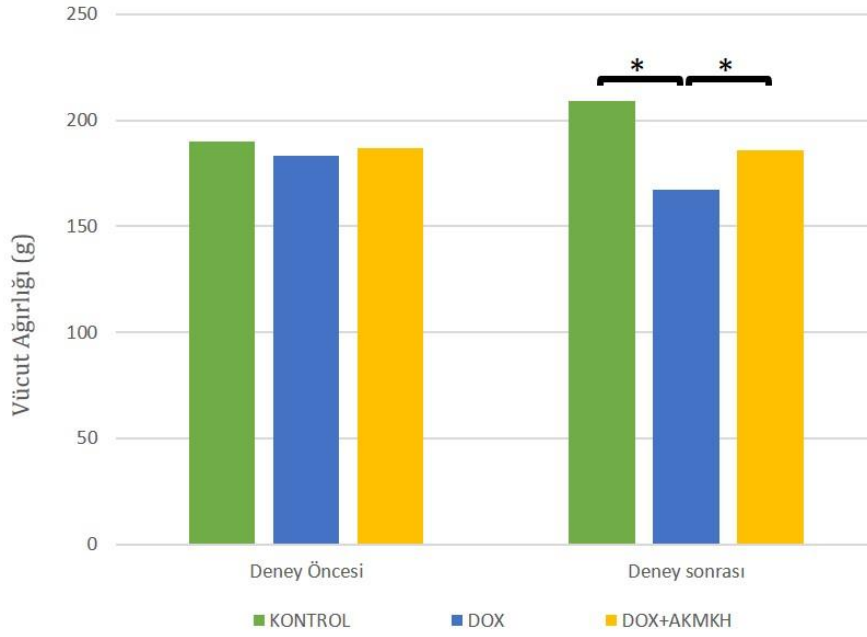
Tüm gruplara ait deneklerin deney başlangıcında ve deney sonunda yapılan ağırlık ölçümleri istatistiksel olarak değerlendirildi.

Kontrol grubu sıçanların ortalama vücut ağırlıkları $190 \pm 7,07$ 'den $209,17 \pm 10,2$ 'ye yükseldi. Bu artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,004$). DOX uygulanan grupta ise sıçanların ortalama vücut ağırlıkları $183 \pm 8,36$ 'den $167,33 \pm 8,54$ 'e düştü ve bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,005$). DOX uygulamasından sonra kök hücre verilen grupta ise deney başlangıcı ($187,5 \pm 12,84$) ile deney sonu ($186,25 \pm 1,57$) ortalama vücut ağırlıkları arasında herhangi bir fark gözlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: Tüm grupların deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları.

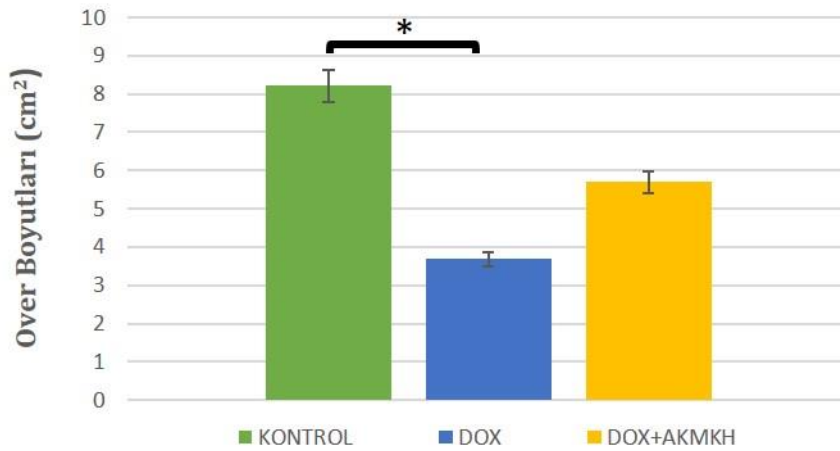
Gruplar arası vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde her üç grup için de deneklerin deney öncesi vücut ağırlıklarında bir fark gözlenmedi ($p>0,05$). Ancak deney sonrası vücut ağırlıklarında her üç grup arasında da istatistiksel olarak fark gözlemlendi. DOX ve DOX+AKMKH grubu deneklerin vücut ağırlıklarının kontrol grubuna göre düşük olduğu saptandı. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). DOX ve DOX+AKMKH grubu kıyaslandığında kök hücre grubu deneklerin vücut ağırlığının daha fazla olduğu gözlemlendi. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,001$) (Şekil 4.2).



Şekil 4.2: Gruplar arası deney öncesi ve deney sonrası vücut ağırlıkları.

4.2. Ovaryum Boyutlarının Değerlendirilmesi

Deney sonunda elde edilen tüm gruplara ait ovaryum dokularının en ve boyları ölçülerek ortalama ovaryum boyutları hesaplandı ve gruplar arası kıyaslamalar için istatistiksel analizleri yapıldı. Bu analizlerin sonucunda DOX grubunun ($3,68 \pm 0,31$) ortalama ovaryum boyutlarının diğer gruplara göre daha az olduğu gözlemlendi. Bu azalma kontrol grubu ($8,21 \pm 1,21$) ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı iken ($p=0,025$) DOX+AKMKH grubuna ($5,7 \pm 0,74$) göre anlamlı bulunmadı ($p>0,05$). Kök hücre transplantasyonu yapılan grup ile kontrol grubu ortalama ovaryum boyutları arasında ise herhangi bir fark gözlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 4.3).

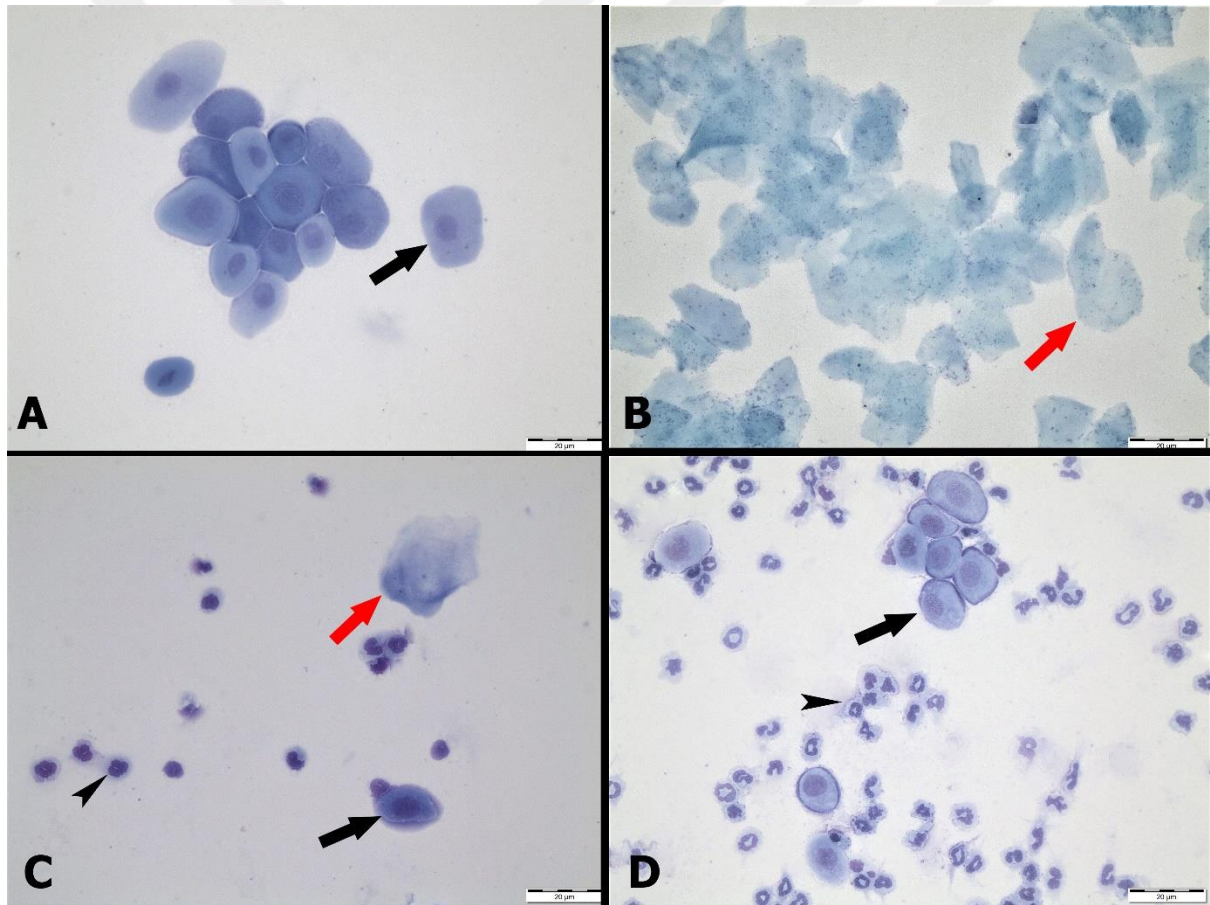


Şekil 4.3: Gruplara ait ovaryum boyutları.

4.3. Vajinal Smear Bulguları

Deneye başlamadan önce deneklerin düzenli östrus siklusuna sahip olup olmadığını belirlemek için 21 gün boyunca vajinal smear alınarak östrus siklusu takibi yapıldı. 4-5 günlük düzenli östrus siklusuna sahip denekler deneye dahil edildi.

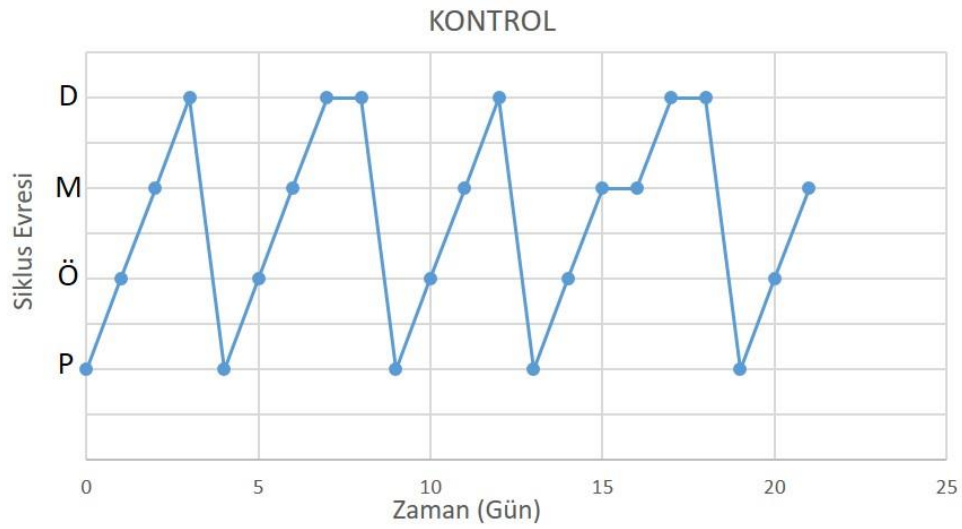
Östrus siklusunun evreleri yaymalarda gözlenen hücre tiplerine göre belirlendi [126]. Proöstrus evresinde nükleuslu epitel hücre grupları görülürken (Şekil 4.4A) östrus evresinde kümeler oluşturmuş kornifiye hücreler gözlemlendi (Şekil 4.4B). Metöstrus fazında dağınık halde bulunan nükleuslu epitel hücreleri ile kornifiye hücreleri arasında lökositler bulunmaktaydı (Şekil 4.4C). Diöstrus fazında az sayıda nükleuslu epitel hücrelerine ve çok sayıda lökositte rastlandı (Şekil 4.4D).



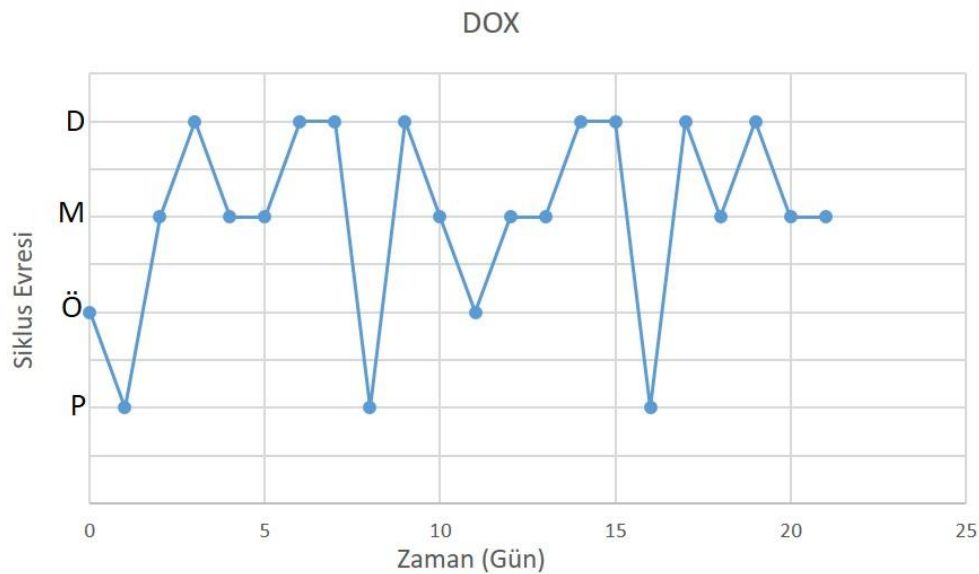
Şekil 4.4: Östrus siklusu evreleri. Proöstrus (A), östrus (B), metöstrus (C) ve diöstrus aşamaları (D). Nükleuslu epitel hücreleri (siyah oklar), kornifiye hücreler (kırmızı oklar), lökositler (ok başları) (Toluidin mavisi x400).

Deney süresince tüm deneklerden vajinal smear alınarak östrus siklusu takibi yapıldı.

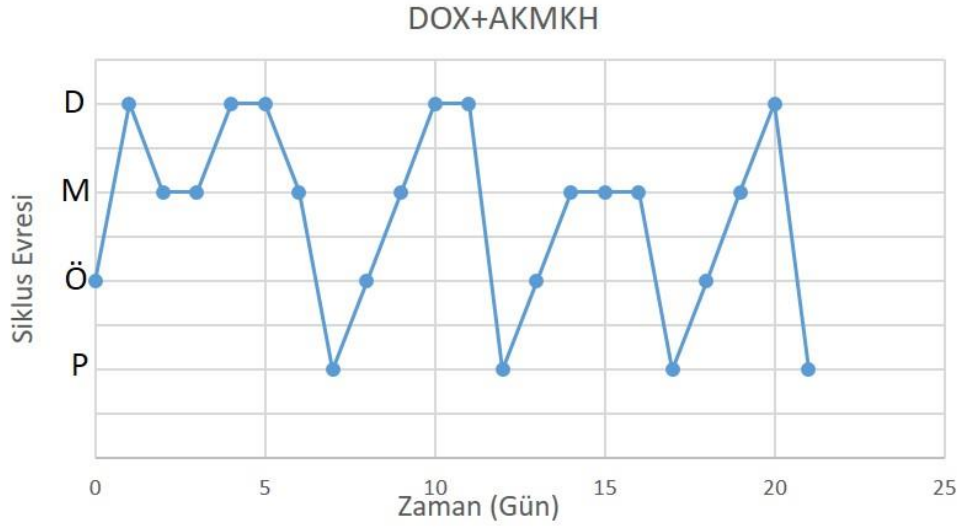
Kontrol grubu denekler deney öncesinde olduğu gibi deney süresi boyunca da 4-5 günlük östrus siklusu sergiledi ($p>0,005$) (Şekil 4.5). DOX verilen grupta ise siklus süreleri uzadı ve bu uzamış östrus siklusu deney öncesiyle kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Siklustaki bu uzamanın nedeni ise diöstrus ve metöstrus fazlarının uzamasından kaynaklanıyordu (Şekil 4.6). DOX+AKMKH grubunda da uzamış diöstrus ve metöstrus fazlarından dolayı östrus siklusunun süresinde artış gözlemlendi ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (Tablo 4.1, Şekil 4.7, Şekil 4.8).



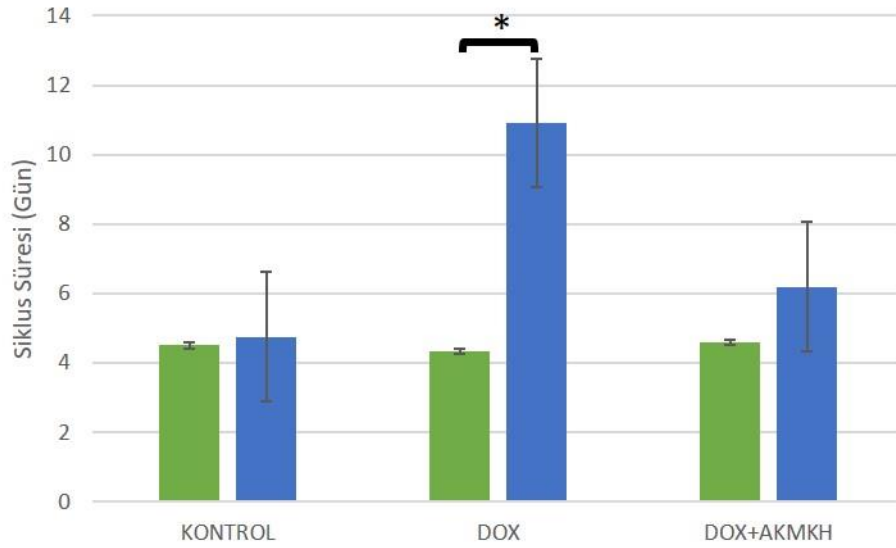
Şekil 4.5: Kontrol grubuna ait östrus siklusu. Proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M), diöstrus (D).



Şekil 4.6: DOX grubuna ait östrus siklusu. Proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M), diöstrus (D).



Şekil 4.7: DOX+AKMKH grubuna ait östrus siklusu. Proöstrus (P), östrus (Ö), metöstrus (M), diöstrus (D).

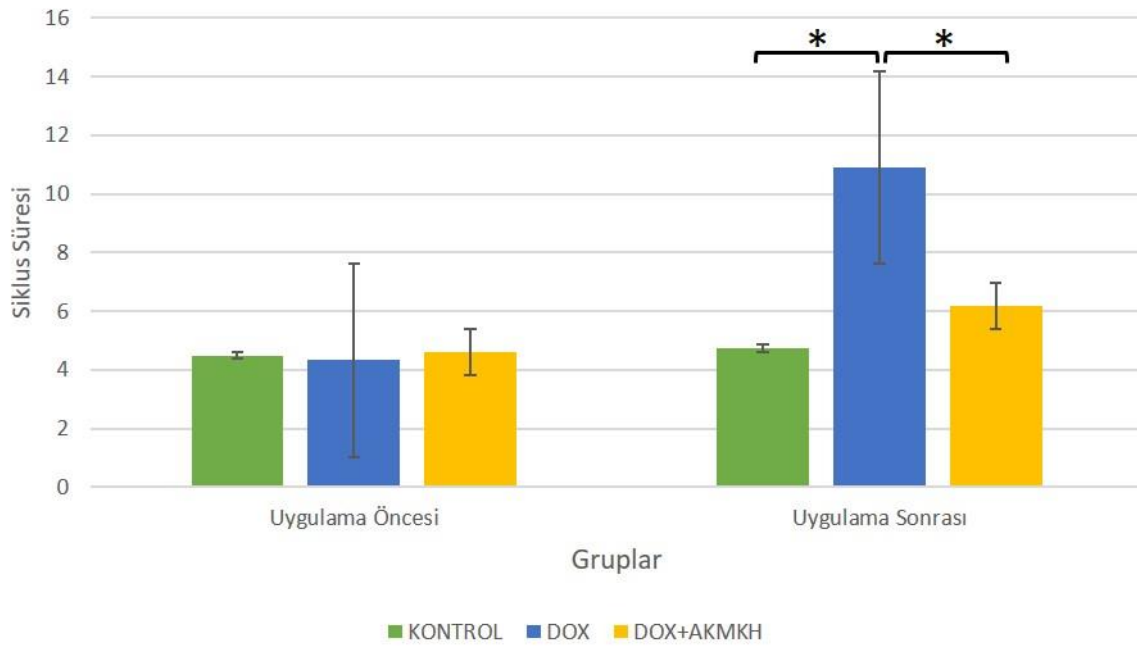


Şekil 4.8: Uygulama öncesi ve sonrası siklus sürelerinin grup içi karşılaştırması.

Tablo 4.1: Gruplara ait uygulama öncesi ve sonrası siklus sürelerinin ortalama değerleri.

		Uygulama Öncesi Siklus Süresi (Gün)	Uygulama Sonrası Siklus Süresi (Gün)	p değeri
KONTROL	Ort ±Ss	4,5±0,57	4,75±0,95	0,761
DOX	Ort ±Ss	4,33±0,51	10,91±4,36	0,018*
DOX+AKMKH	Ort ±Ss	4,6±0,51	6,19±2,21	0,159

Gruplar arası ortalama östrus siklusu süreleri karşılaştırıldığında deney öncesinde her üç grupta da anlamlı bir değişiklik gözlenmedi ($p>0,05$). Deney süresi boyunca alınan vajinal smearler değerlendirildiğinde kontrol grubuna ve kök hücre grubuna göre doksorubisin grubunun östrus siklusu süresinin arttığı ve bu artışın anlamlı olduğu bulundu (sırasıyla $p=0,021$, $p=0,048$) (Şekil 4.9).



Şekil 4.9: Uygulama öncesi ve sonrası siklus sürelerinin gruplar arası karşılaştırması.

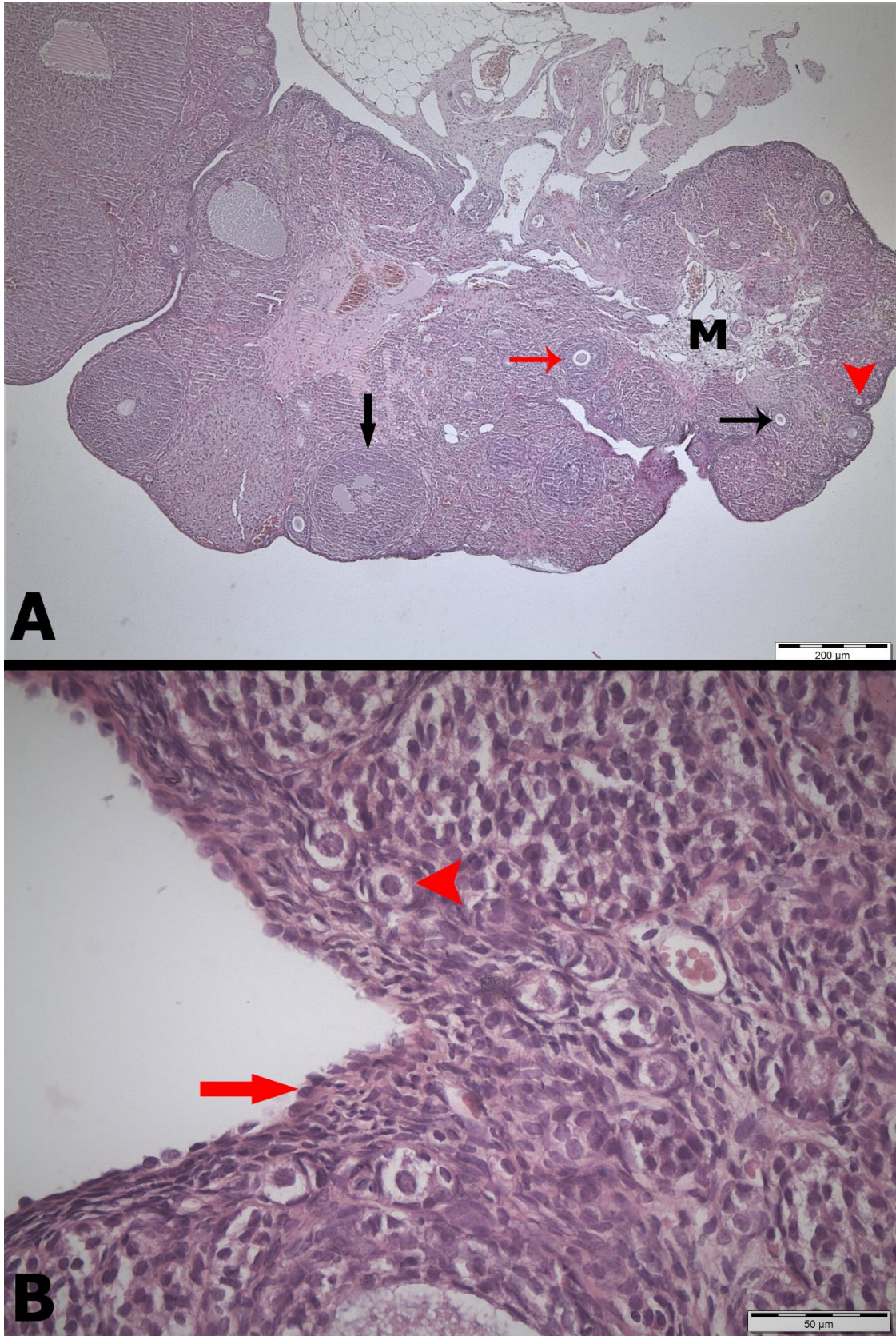
4.4. Işık Mikroskopik Bulgular

Tüm deney gruplarına ait over dokularından alınan seri kesitler hematoksilin eozin ile boyandıktan sonra ışık mikroskopunda incelenerek histolojik değerlendirme yapıldı ve primordial, primer, sekonder, tersiyer ve atretik foliküler sayıldı.

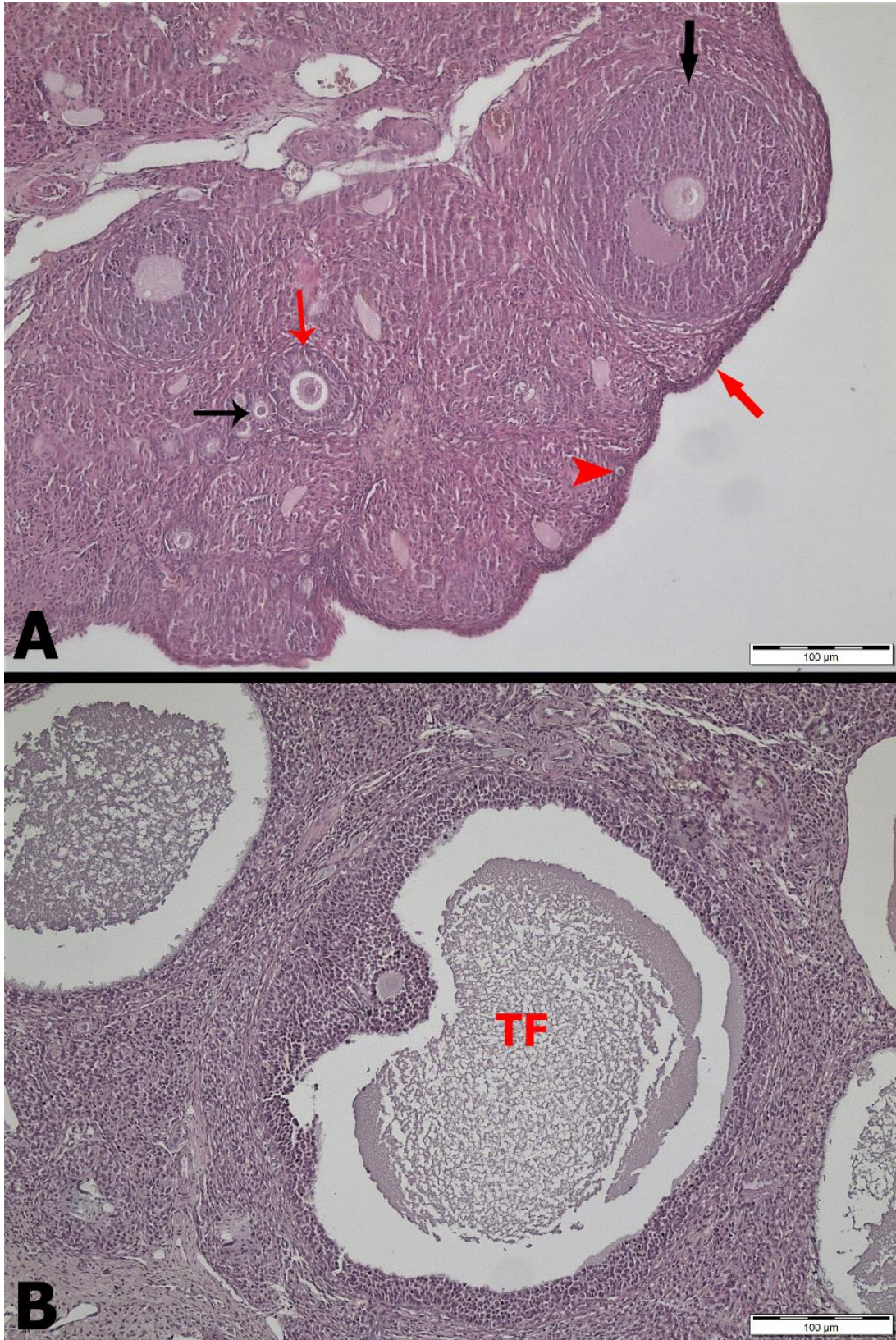
İncelemeler sonucu kontrol grubunda ovaryumun yüzeyinin germinal epitel olarak adlandırılan tek katlı kübik, bazı bölgelerde tek katlı yassı epitel ile örtülü olduğu görüldü.

Germinal epitelin altında sıkı bağ dokusundan oluşan tunika albuginea yer almaktaydı. Korteks stromasında oosit ve etrafındaki tek katlı yassı folikül hücrelerinden oluşan primordial foliküller ayırt edildi. Primer oositi çevreleyen tek katlı kübik epitele sahip unilaminar primer folikül ile çok katlı kübik granüloza hücreleriyle çevrili multilaminar primer foliküllere rastlandı. Granüloza hücrelerinin arasında sıvı dolu kaviterin oluşmaya başladığı teka interna ve teka eksterna ile çevrili sekonder foliküller görüldü. Ayrıca geniş tek bir antruma sahip tersiyer foliküller izlendi. Farklı gelişim aşamalarındaki foliküller dışında korpus luteum ve atretik foliküller görüldü. Medulla ise bol miktarda kan damarlarını içeren gevşek bağ dokusundan oluşmaktaydı (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



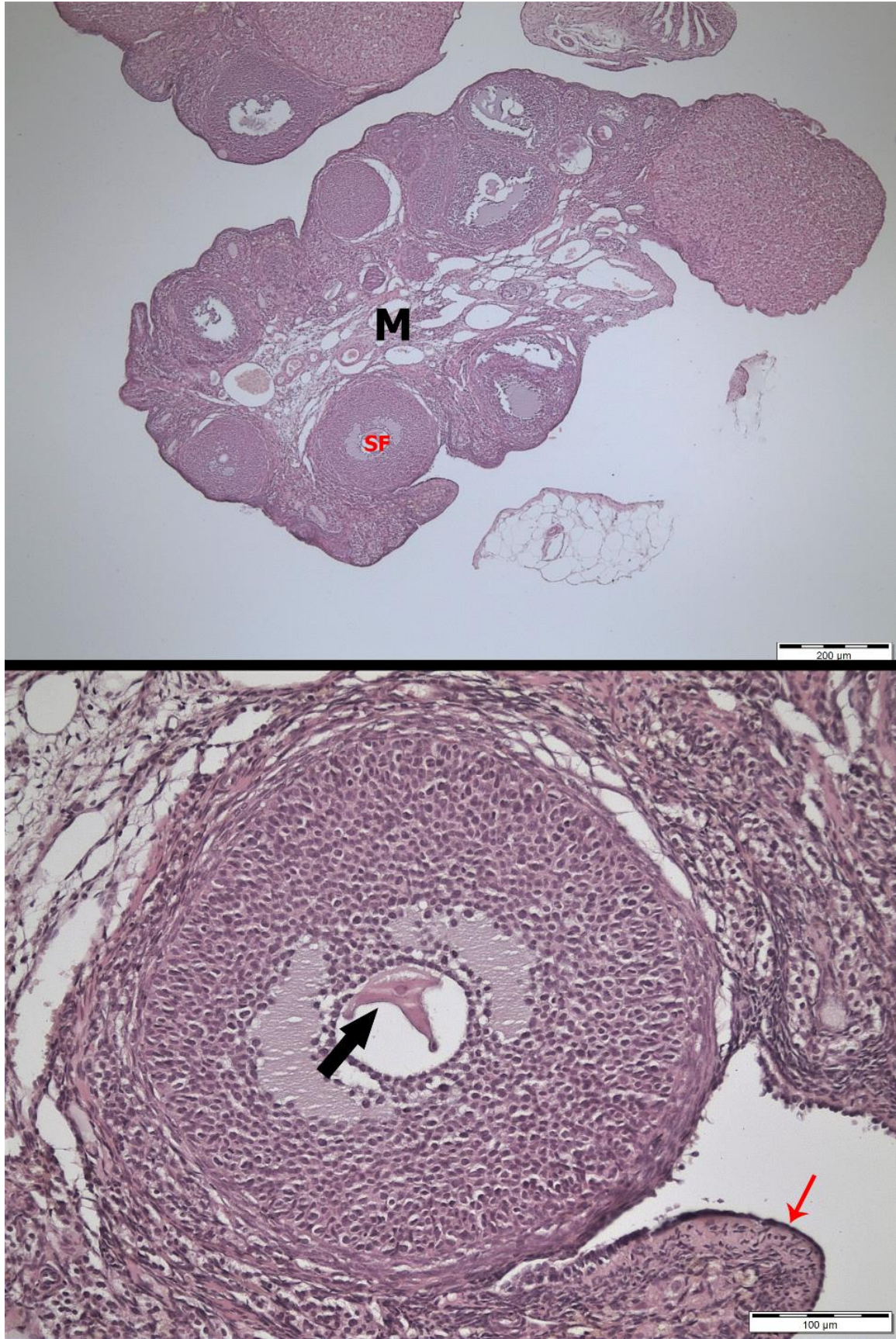


Şekil 4.10: Kontrol grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Primordiyal foliküller (ok başları), unilaminar primer folikül (ince siyah ok), multilaminar primer folikül (ince kırmızı ok) ve sekonder folikül (kalın siyah ok), germinal epitel (kalın kırmızı ok), medulla (M). (A) x40, (B) x400 (Hematoksilen-Eozin).

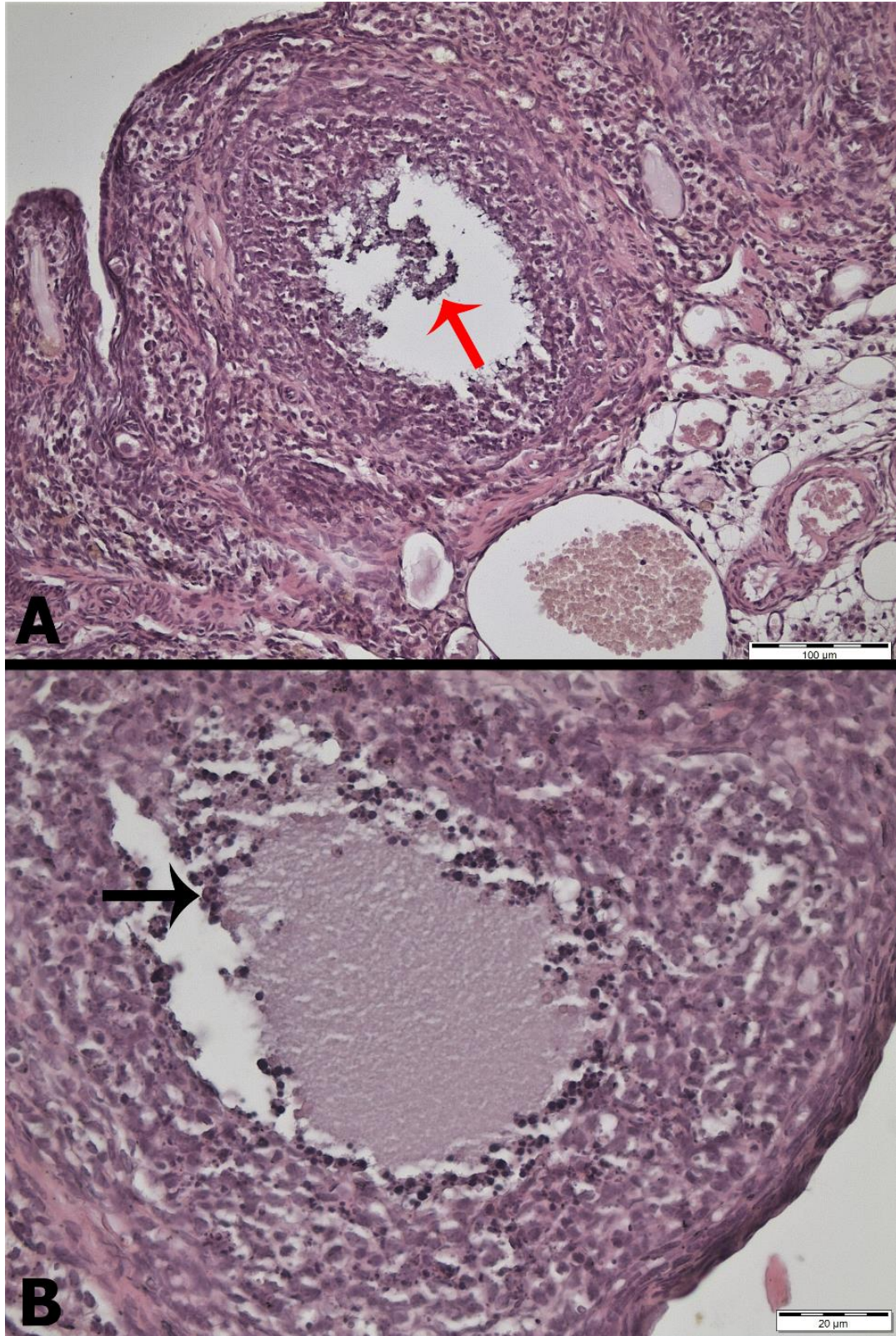


Şekil 4.11: Kontrol grubuna ait over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. Primordiyal folikül (ok başı), unilaminar primer folikül (ince siyah ok), multilaminar primer folikül (ince kırmızı ok) ve sekonder folikül (kalın siyah ok), germinal epitel (kalın kırmızı ok), tersiyer folikül (TF). (A) x100, (B) x200 (Hematoksilen-Eozin).

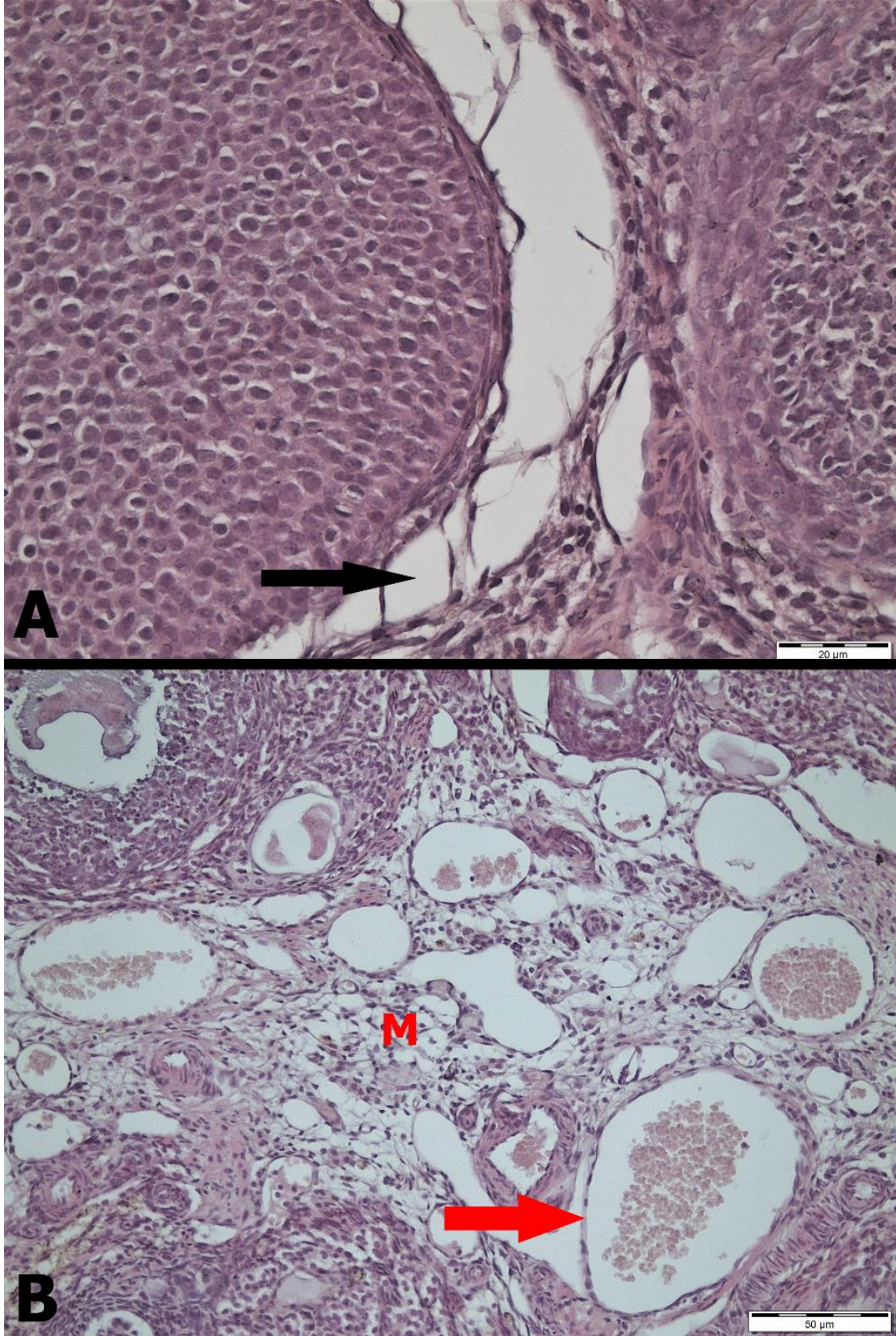
DOX uygulanan grupta germinal epitelin ve tunika albugineanın normal yapıda olduğu izlendi. Tunika albugineanın altında yer alan kortekste normal morfolojiye sahip primordial, primer, sekonder, tersiyer foliküler bulunmaktaydı. Ayrıca bu gruba ait over dokularında gelişmekte olan foliküllerin çoğunun morfolojisinin bozuk olduğu saptandı. Bu foliküllerin bazılarında primer oositlerin piknotik çekirdeğe sahip olduğu ve primer oosit ile granüloza hücrelerinin arasında yer alan ZP'nın yapısının bozuk olduğu gözlemlendi. Foliküllerin çoğunda primer oositleri çevreleyen granüloza hücrelerinde dejenarasyon gözlemlendi. Bu hücrelerin sitoplazmalarında kayıpların olduğu, hücrelerin arasındaki interselüler mesafenin arttığı saptandı. Ayrıca granüloza hücre tabakasında piknotik çekirdekli hücreler yer almaktaydı. Apoptotik granüloza hücreleri özellikle sekonder ve tersiyer foliküllerin antruma yakın bölgesinde yoğunlaşmıştı. Ayrıca bu foliküllerin antrumunda apoptotik granüloza hücrelerinden oluşan debris materyali izlendi. Granüloza hücre tabakasının dışında stromal hücrelerin farklılaşmasıyla oluşan teka tabasında ayrılmaların olduğu gözlemlendi. Medullada ise kan damarlarının belirgin şekilde genişlemiş olduğu dikkat çekti (Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14).



Şekil 4.12: Doksorubisin grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. A) Genel görüntü. B) Dejenere oosite (kalın siyah ok) sahip sekonder folikül. Germinal epitel (ince kırmızı ok), sekonder folikül (SF), medulla (M). (A) x40, (B) x200. (Hematoksilen-Eozin).



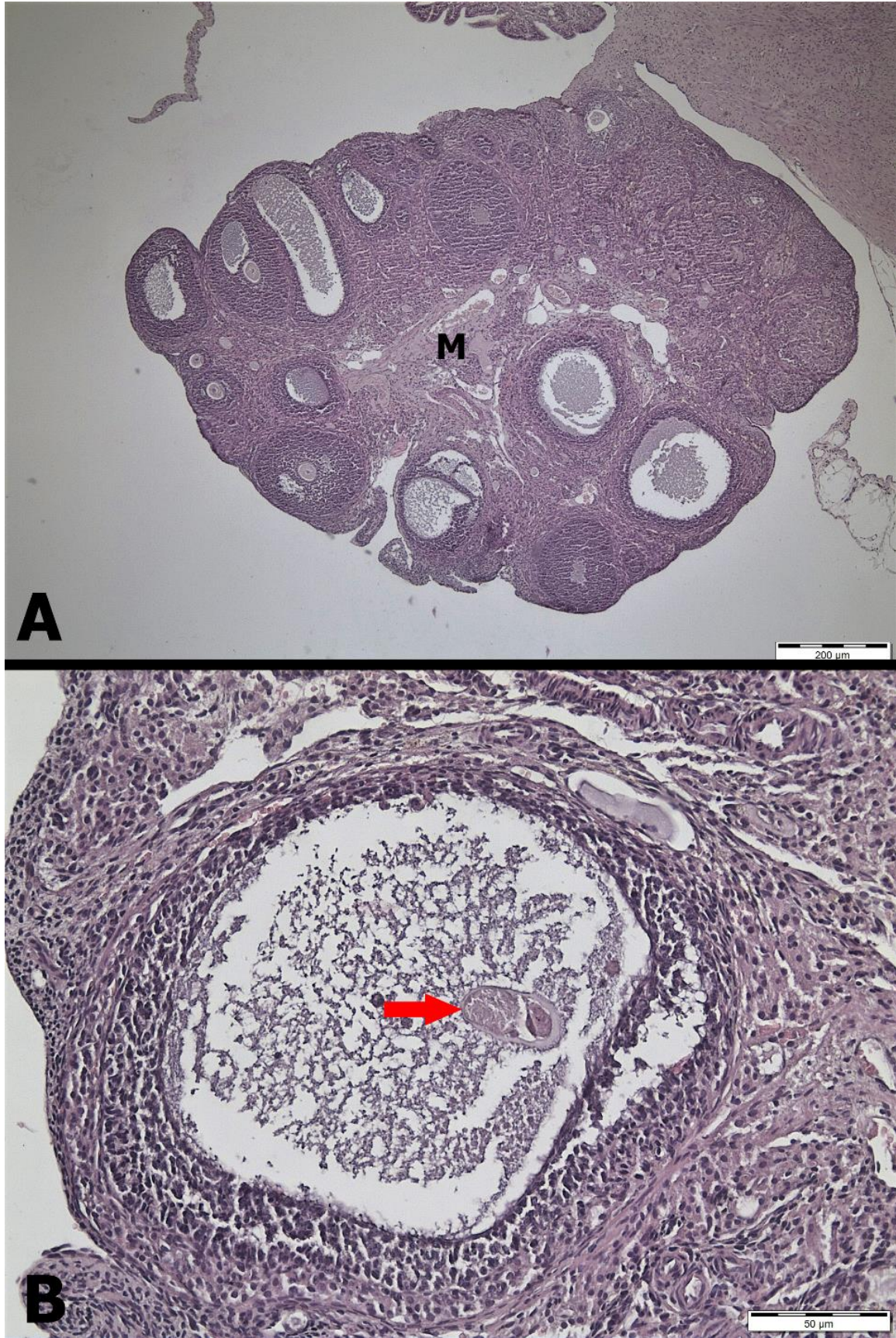
Şekil 4.13: Doksorubisin grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. A) Antrumda dökülmüş granüloza hücrelerinden oluşan debrisin (ince kırmızı ok) bulunduğu folikül. B) Granüloza hücre tabakasında piknotik çekirdekli hücrelerin (ince siyah ok) yer aldığı dejenere folikül. (A) x200, (B) x400. (Hematoksilen-Eozin).



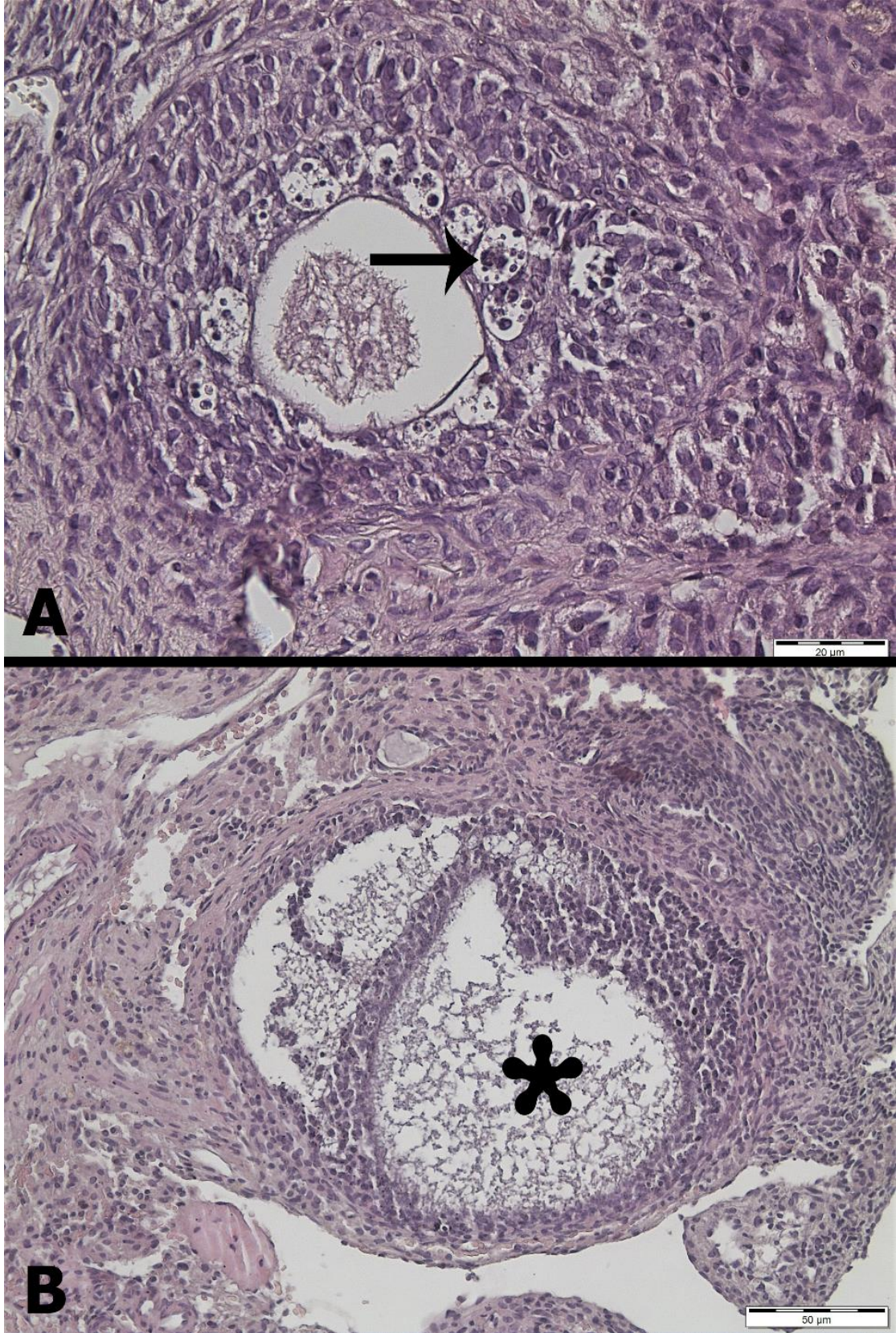
Şekil 4.14: Doksorubisin grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. A) Teka tabasında ayrılma (siyah ok). B) Medullada (M) bulunan kan damarlarında genişleme (kırmızı ok) (A) x400, (B) x200. (Hematoksilen-Eozin).

Kök hücre verilen grupta ovaryumun genel morfolojisinin kontrol grubuna daha benzer olduğu gözlemlendi. Bu grupta da hem kontrol hemde DOX grubunda olduğu gibi germinal epitel ve tunika albuginea normal morfolojide izlendi. Korteks stromasında normal yapıya sahip gelişimin farklı aşamasındaki foliküller ile dejenere foliküller görüldü. DOX grubundan daha az olmakla birlikte DOX+AKMKH grubunda da dejenere oosit ve ZP, piknotik çekirdeğe sahip granüloza hücreleri sekonder ve tersiyer foliküllerin antrumlarında debris materyali saptandı. DOX grubundan farklı olarak bu grupta teka tabakası ve medulla normal görünümüne sahipti (Şekil 4.15, Şekil 4.16).





Şekil 4.15: Doksorubisin ve kök hücre grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. A) Genel görüntü. B) Dejenere oosite (kırmızı ok), sahip folikül. Medulla (M). (A) x40, (B) x200, (C), x400. (Hematoksilen-Eozin).



Şekil 4.16: Doksorubisin ve kök hücre grubu over dokusunun ışık mikroskopik görüntüsü. A) Dejenere granüloza hücrelerine (siyah ok) sahip folikül. B) Dejenere folikül (asteriks). (A) x400, (B) x200. (Hematoksilen-Eozin).

Gruplar arasındaki primordiyal, primer, sekonder, tersiyer ve atretik folikül sayıları kıyaslandığında;

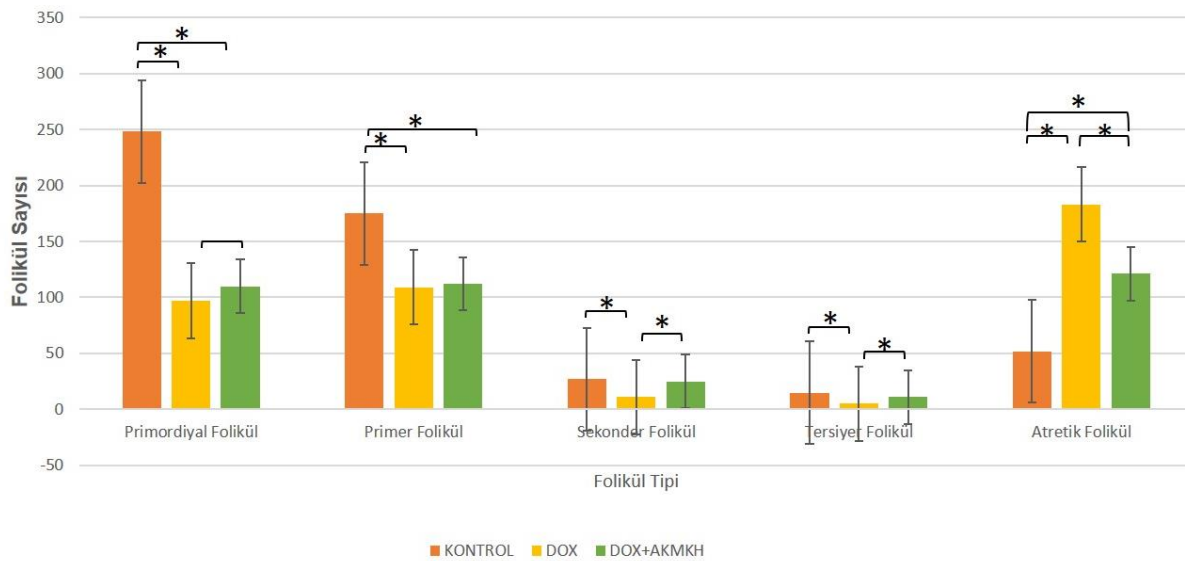
Primordiyal folikül sayısının kontrol grubunda ($248 \pm 32,19$) fazla, DOX ($97 \pm 7,70$) ve DOX+AKMKH ($11 \pm 8,08$) gruplarında ise daha az olduğu bulundu. Kontrol grubuyla kıyaslandığında her iki grup içinde bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,001$). DOX ve DOX+AKMKH gruplarında primordiyal folikül sayısı azalmış olsada kök hücre uygulanan grupta daha fazla sayıda primordiyal folikül bulunmaktaydı ve bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0,001$).

Primer folikül sayısı kontrol grubuna ($175 \pm 22,82$) göre hem DOX ($109 \pm 7,44$) hem de DOX+AKMKH ($112 \pm 10,58$) grubunda azaldı ve bu azalmanın anlamlı olduğu bulundu ($p < 0,001$). Ayrıca DOX ve DOX+AKMKH grupları arasında da istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi ($p > 0,001$).

Sekonder folikül sayısı kontrol grubuyla ($27 \pm 7,53$) kıyaslandığında DOX grubunda ($11 \pm 1,83$) anlamlı bir şekilde azaldığı gözlenirken ($p < 0,001$), kontrol ile DOX+AKMKH ($25 \pm 6,58$) grubu arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,001$). DOX grubunun sekonder folikül sayısının DOX+AKMKH grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu ($p < 0,001$).

Tersiyer folikül sayısı kontrol ($15 \pm 2,94$) ile kök hücre uygulanan grupta benzer bulundu ($p > 0,001$). Kontrol ve DOX+AKMKH grubuna ($11 \pm 2,16$) göre DOX ($5 \pm 2,16$) uygulanan grupta ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p < 0,001$).

Atretik folikül sayısı en yüksek DOX grubunda ($183 \pm 5,95$) en az ise kontrol grubunda ($52 \pm 5,72$) görüldü. Kontrol, DOX ve DOX+AKMKH ($121 \pm 7,11$) grupları arasındaki fark anlamlı bulundu ($p < 0,001$) (Şekil 14.17).



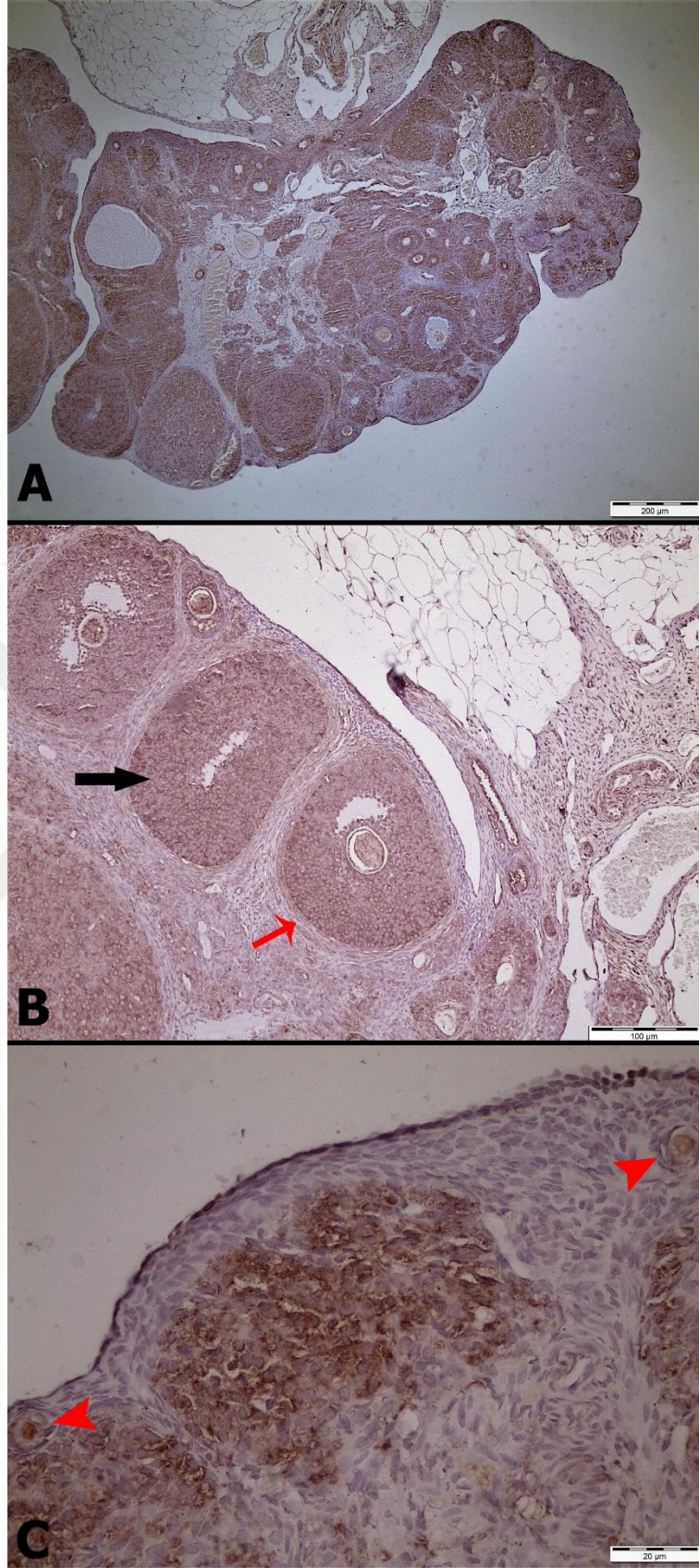
Şekil 4.17: Folikül sayılarının gruplar arası karşılaştırması.

4.5. İmmünohistokimyasal Bulgular

Kontrol ve deney gruplarındaki tüm hayvanların ovaryum dokularında AKT ve FOXO3a'nın immünoaktivitesi incelendi.

4.5.1. FOXO3a'nın İmmünohistokimyasal Bulguları

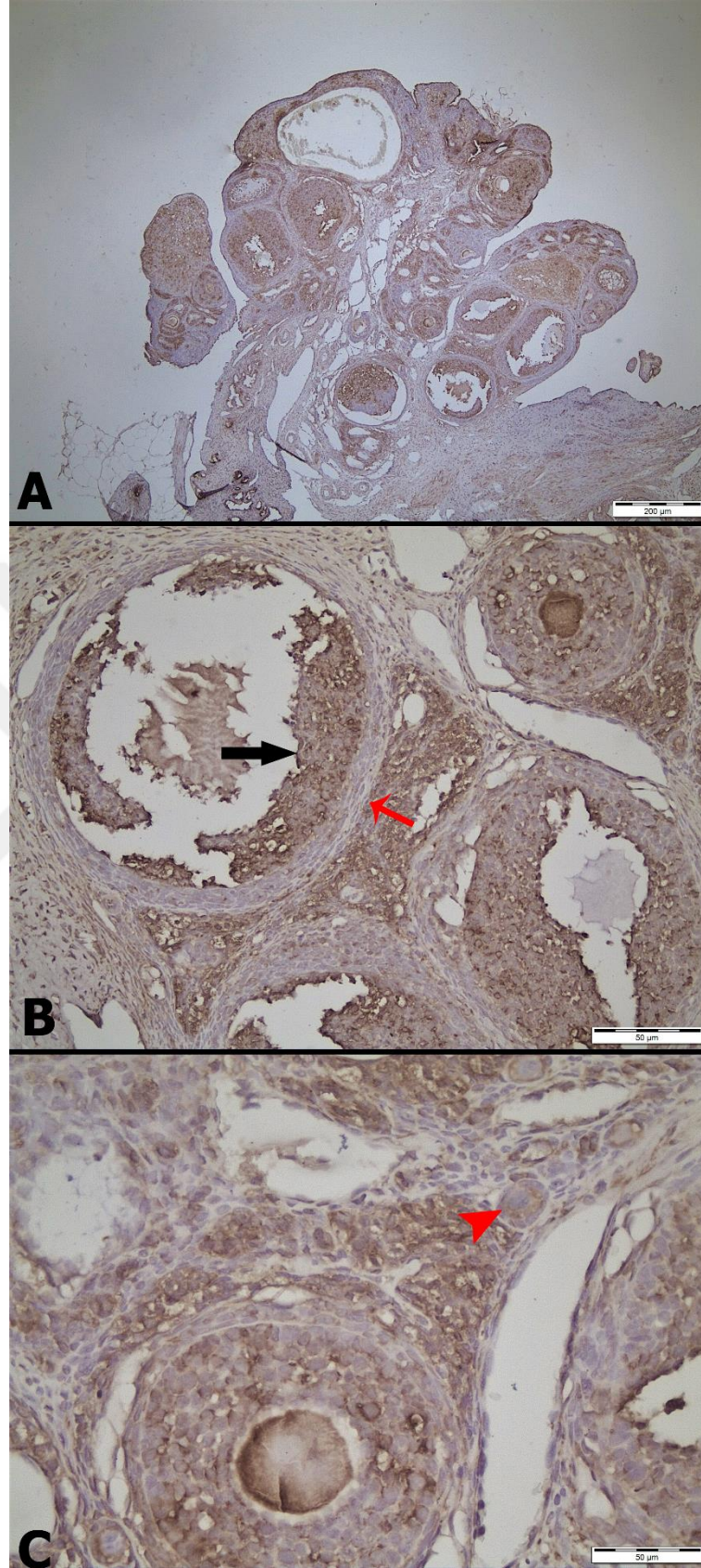
Kontrol grubunda; FOXO3a immün işaretlemesi ovaryumu çevreleyen germinal epitel hücrelerinin nükleusunda gözlenirken tunika albuginea gözlenmedi. Primordiyal foliküllerdeki oositlerin nükleusunda yoğunla yakın immün reaksiyon gözlenirken foliküler hücrelerde immün reaksiyon gözlenmedi. Primordiyal folikül dışındaki diğer foliküllerde oositi çevreleyen granuloza hücrelerinde kuvvetli sitoplazmik boyanma saptandı. Teka tabakasında ise immün işaretleme çoğu hücrede negatif iken bazı hücrelerde zayıf sitoplazmik boyanma gözlemlendi. Stromal hücrelerde immün işaretleme negatifti (Şekil 4.18).



Şekil 4.18: Kontrol grubu ovaryum dokusunda FOXO3a immün işaretlenmesi. Primordiyal foliküller (ok başı), immün pozitif granüloza hücreleri (siyah ok), teka tabakası (kırmızı ok). (A) X40, (B) X100, (C) X400.

Doksorubisin uygulanan grupta; FOXO3a immünoreaktivitesi kontrole benzer şekilde germinal epitelde nükleusta pozitif, tunika albugineada negatifti. Primordial foliküllerde foliküler hücrelerde ve oositlerin nükleusunda FOXO3a immün işaretlenmesinin negatif olduğu gözlenirken, oositlerin sitoplazmasında orta yoğunlukta boyanma saptandı. Diğer foliküllerde ise granüloza hücrelerinde kuvvetli sitoplazmik boyanma saptanırken teka tabakasında immün işaretlenme gözlenmedi. Stromal hücrelerin genelinde FOXO3a boyanması gözlenmezken yer yer sitoplazmik boyanma gözlendi (Şekil 4.19).

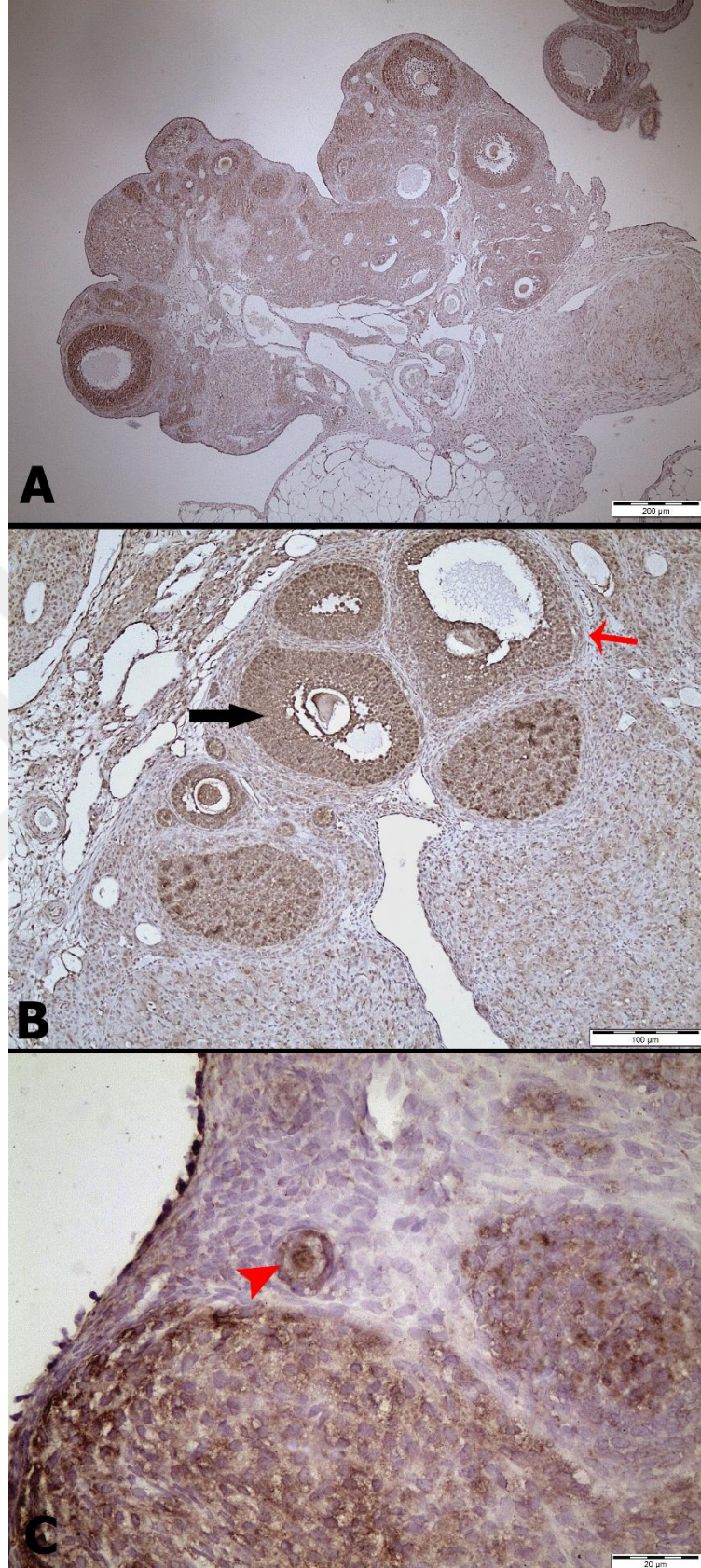




Şekil 4.19: DOX grubu ovaryum dokusunda FOXO3a immün işaretlenmesi. Primordiyal folikül (ok başı), immün pozitif granüloza hücreleri (siyah ok), immün negatif teka tabakası (kırmızı ok). (A) X40, (B) X200, (C) X400.

Kök hücre uygulanan grupta; germinal epitel ve tunika albuginea FOXO3a işaretlenmesi kontrol ve DOX grubuyla benzerdi. Primordial folikülde boyanma foliküler hücrelerin ve oositin nükleusunda, diğer foliküllerde ise granüloza hücrelerinin sitoplazmasında gözlendi. Teka tabakasında ve stromal hücrelerin çoğunda FOXO3a immün işaretlemesi saptanmadı. Stromal hücrelerin bir kısmında ise zayıf sitoplazmik ve nükleer boyanma gözlendi (Şekil 4.20).





Şekil 4.20: DOX+AKMKH grubu ovaryum dokusunda FOXO3a immün işaretlenmesi. Primordiyal folikül (ok başı), immün pozitif granuloza hücreleri (siyah ok), immün negatif teka tabakası (kırmızı ok). (A) X40, (B) X100, (C) X400.

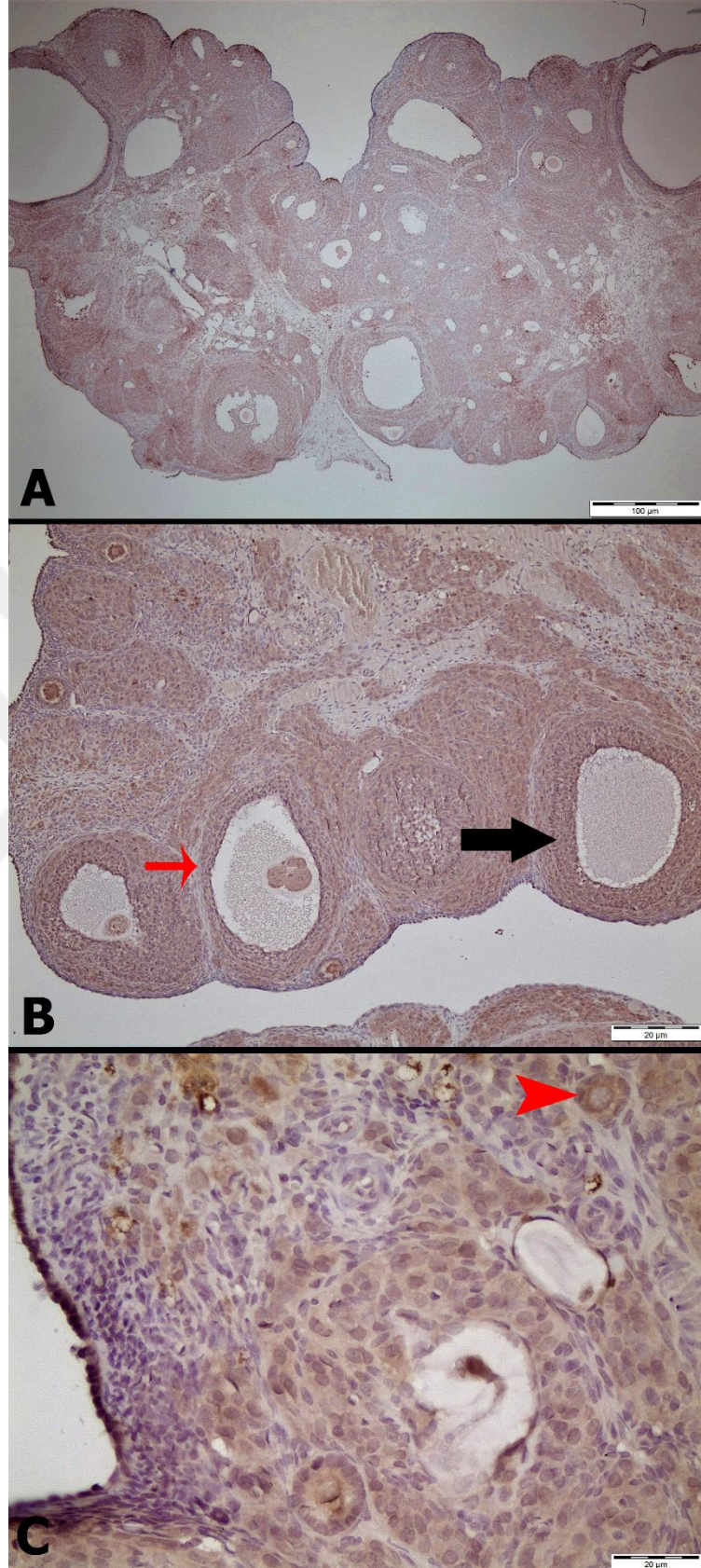
FOXO3a'nın boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında;

Primordiyal folikül oosit sitoplazması: Kontrol grubunun boyanma yoğunluğu $0,82 \pm 0,12$ iken, DOX ve DOX+AKMKH grubunun boyanma yoğunlukları sırasıyla $2,17 \pm 0,14$ ve $1,51 \pm 0,32$ olduğu saptanmıştır. Gruplar arası ortalama boyanma yoğunlukları kıyaslandığında DOX grubunda kontrol ve DOX+AKMKH grubuna kıyasla anlamlı bir artış saptandı ($p < 0,05$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DOX+AKMKH grubunda da anlamlı bir artış bulundu ($p < 0,05$) ancak bu artış DOX grubu kadar belirgin değildi.

Primordiyal folikül oosit nükleusu: Kontrol grubunun boyanma yoğunluğu $2,82 \pm 0,13$ iken, DOX ve DOX+AKMKH grubunun boyanma yoğunlukları sırasıyla $1,08 \pm 0,24$ ve $2,09 \pm 0,31$ bulundu. Gruplar arası ortalama boyanma yoğunlukları kıyaslandığında hem DOX hemde DOX+AKMKH grubunda kontrole göre anlamlı bir azalma saptandı ($p < 0,05$).

4.5.2 AKT'in İmmünohistokimyasal Bulguları

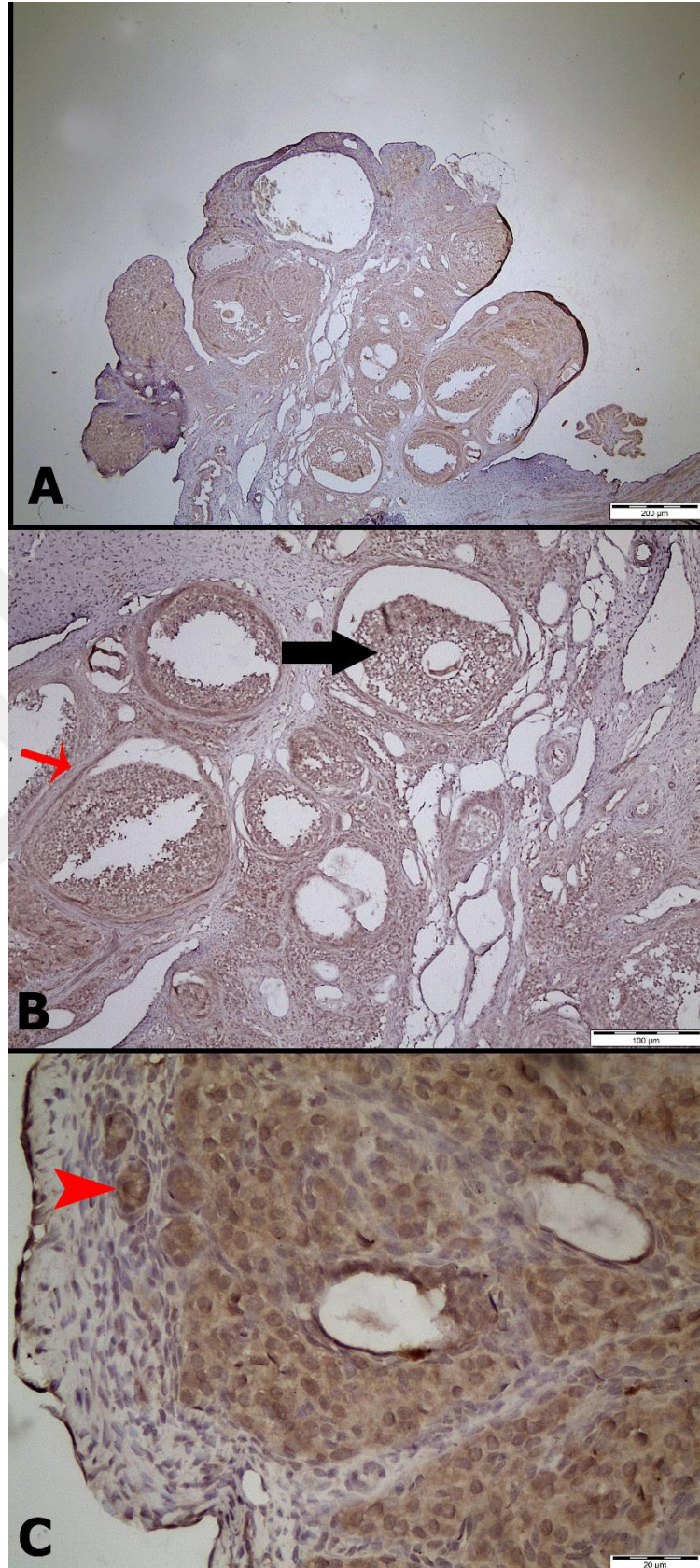
Kontrol grubunda; AKT'in immün boyanması germinal epitel hücrelerinin hem sitoplazmasında hemde nükleusunda gözlenirken tunika albugineada gözlenmedi. Primordiyal foliküllerde foliküler hücrelerin ve oositlerin sitoplazmasında yoğunla yakın immün reaksiyon gözlemlendi. Primordiyal folikül dışındaki diğer foliküllerde oositi çevreleyen granüloza hücrelerinde kuvvetli sitoplazmik boyanma saptandı. Teka tabakasında ise zayıf sitoplazmik boyanma gözlemlendi. Stromal hücrelerin bazılarında immün işaretlenme negatif iken bazılarında pozitif boyanma gözlemlendi (Şekil 4.21).



Şekil 4.21: Kontrol grubu ovaryum dokusunda AKT immün işaretlenmesi. Primordiyal folikül (ok başı), immün pozitif granuloza hücreleri (siyah ok), immün pozitif teka tabakası (kırmızı ok). (A) X40, (B) X100, (C) X400.

Doksorubisin uygulanan grupta; AKT immünoaktivitesi kontrole benzer şekilde germinal epitelde nükleusta hem de sitoplazmada pozitif, tunika albuginea da negatifti. Primordial foliküllerde oositlerin nükleusunda AKT'ın immün boyanması yoğun gözlenirken, sitoplazmasında orta yoğunlukta boyanma saptandı. Ayrıca primordiyal folikülde foliküler hücrelerde hem sitoplazmik hem de nükleer boyanma gözlemlendi. Diğer foliküllerde ise granuloza hücrelerinde kuvvetli sitoplazmik boyanma saptandı. Teka tabakasında ve stromada negatif hücrelerin yanı sıra pozitif boyanma gösteren hücreler gözlemlendi (Şekil 4.22).

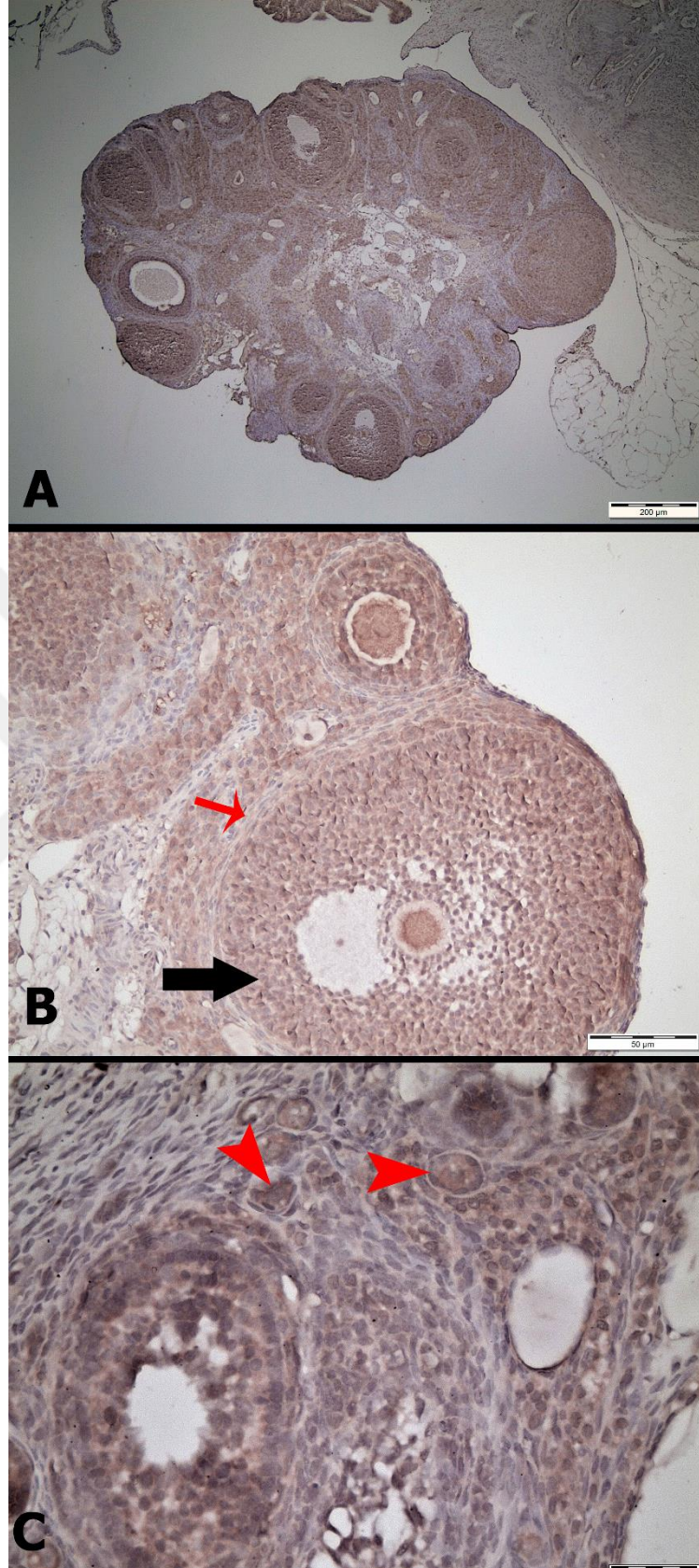




Şekil 4.22: DOX grubu ovaryum dokusunda AKT immün işaretlenmesi. Primordiyal folikül (ok başı), immün pozitif granuloza hücreleri (siyah ok), teka tabakası (kırmızı ok). (A) X40, (B) X100, (C) X400.

Kök hücre uygulanan grupta; germinal epitel ve tunika albugineada AKT işaretlenmesi kontrol ve DOX grubuyla benzerdi. Primordial folikülde boyanma foliküler hücrelerin ve oositin sitoplazmasında, diğer foliküllerde ise granüloza hücrelerinin sitoplazmasında gözlemlendi. Teka tabakasında negatif immün reaktivite gösteren hücrelerin dışında pozitif reaksiyon gösteren hücreler saptandı. Stromal hücrelerin genelinde AKT boyanması gözlenmezken yer yer sitoplazmik ve nükleer boyanmış hücreler gözlemlendi (Şekil 4.23).





Şekil 4.23: DOX+AKMKH grubu ovaryum dokusunda AKT immün işaretlenmesi. Primordiyal foliküller (ok başı), immün pozitif granüloza hücreleri (siyah ok), teka tabakası (kırmızı ok). (A) X40, (B) X200, (C) X400.

AKT'ın boyanma yoğunluğu karşılaştırıldığında;

Primordiyal folikül oosit sitoplazması: Kontrol grubunun boyanma yoğunluğu $2,76 \pm 0,25$ iken, DOX ve DOX+AKMKH grubunun boyanma yoğunlukları sırasıyla $1,98 \pm 0,12$ ve $2,11 \pm 0,22$ olduğu saptanmıştır. Gruplar arası ortalama boyanma yoğunlukları kıyaslandığında DOX ve DOX+AKMKH gruplarında kontrole kıyasla anlamlı bir azalma görüldü ($p < 0,05$). Ayrıca DOX grubu ile DOX+AKMKH grubu kıyaslandığında DOX grubunun ortalama boyanma yoğunluğunun istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaldığı bulundu ($p < 0,05$).

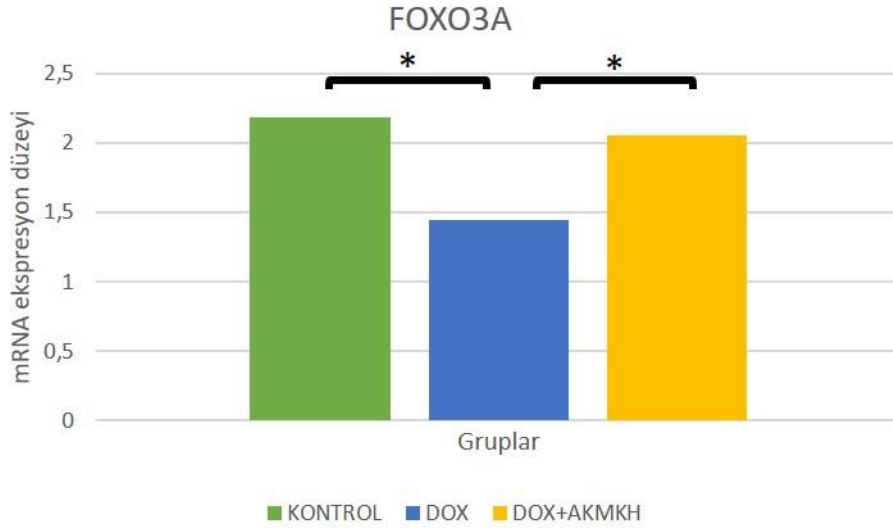
Primordiyal folikül oosit nükleusu: Kontrol grubunun boyanma yoğunluğu $1,12 \pm 0,23$ iken, DOX ve DOX+AKMKH grubunun boyanma yoğunlukları sırasıyla $2,79 \pm 0,24$ ve $0,98 \pm 0,19$ bulundu. Gruplar arası ortalama boyanma yoğunlukları kıyaslandığında DOX grubunda kontrol ve DOX+AKMKH grubuna göre anlamlı bir artış saptandı ($p = < 0,05$).

4.6. Real-Time PCR Bulguları

Kontrol, DOX ve DOX+AKMKH gruplarından alınan ovaryum dokularında FOXO3a ve AKT mRNA ekspresyon düzeyleri analiz edildi.

4.6.1. FOXO3a mRNA Ekspresyon Düzeyi

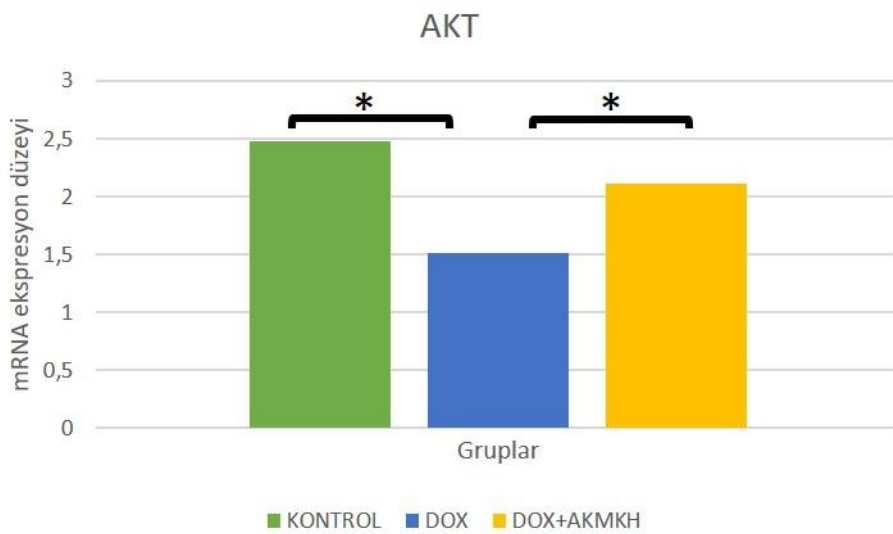
Ovaryum dokusunda FOXO3a mRNA ekspresyon düzeyi ortalamaları, kontrol, DOX ve DOX+ AKMKH gruplarında sırasıyla $2,478 \pm 0,42$, $1,44 \pm 0,217$ ve $2,05 \pm 0,20$ şeklindedir. Bu ekspresyon seviyelerinin gruplar arası ikili karşıştırmalarında DOX uygulanan grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p = 0,007$). Kök hücre uygulanan grupta ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark gözlenmezken ($p > 0,05$), DOX grubu seviyelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p = 0,033$) (Şekil 4.24).



Şekil 4.24: Ovaryum dokusunda FOXO3a mRNA ekspresyon düzeylerinin bar grafiği.

4.6.2. AKT mRNA Ekspresyon Düzeyi

Ovaryum dokusu AKT mRNA ekspresyon düzeyleri, kontrol, DOX ve DOX+AKMKH gruplarında sırasıyla $2,478 \pm 0,42$, $1,51 \pm 0,217$ ve $2,11 \pm 0,17$ şeklindedir. Bu ekspresyon seviyelerinin gruplar arası karşılaştırmalarında DOX uygulanan grupta kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptandı ($p=0,001$). Kök hücre uygulanan grupta ise kontrole göre anlamlı bir fark gözlenmezken, DOX grubu seviyelerine kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir ($p=0,043$) (Şekil 4.25).



Şekil 4.25: Ovaryum dokusunda AKT mRNA ekspresyon düzeylerinin bar grafiği.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Uluslararası Kanser Araştırmaları Ajansı tarafından yayınlanan GLOBOCAN-2018 verilerine göre; 2018 yılında dünyada 9 milyon kadına kanser teşhisi konmuştur ve bunların %1'inin puberte öncesi, %14'ünün ise reproduktif dönemde olduğu rapor edilmiştir [127]. Kanser tedavisinde sıklıkla kullanılan kemoterapi ve radyoterapi puberte öncesi ve reproduktif dönemdeki kadınlarda POF'a neden olabilmektedir [128-130]. Kemoterapi ve radyoterapi sonrası oluşan POF'un kesin mekanizması belisizdir. Çeşitli çalışmalar kemoterapinin uykuda olan primordial foliküllerin apoptozunu tetikleyerek POF'a neden olduğunu ileri sürerken [131, 132] bazı çalışmalar ise primordiyal foliküllerin aşırı aktivasyonu ile POF'un oluştuğunu raporlamışlardır [133]. Bizde çalışmamızda kemoterapik bir ajan olan doksorubisini kullanarak oluşturduğumuz POF modelinde; doksorubisinin primordiyal foliküllerin aktivasyonunda görevli PTEN/AKT/FOXO3a sinyal yolağı üzerine olası etkilerinin incelenmesini ve tedavi amacıyla verilen adipoz kökenli mezenkimal kök hücrelerin aynı yolak üzerindeki teröpatik etkinliğinin araştırılmasını amaçladık.

DOX'da dahil olmak üzere antineoplastik ilaçların pek çoğunun kanser hücrelerinin yanı sıra sağlıklı dokulardaki hücreleri de etkilediği bilinmektedir [134]. Özellikle hücre yenileme hızının yüksek olduğu gastrointestinal kanalda bu etkileri daha belirgindir. En sık rapor edilen toksik etkileri ise gastrointestinal mukozit yani gastrointestinal mukozada gözlenen inflamasyon ve/veya ülserdir [135]. Buna bağlı olarak antineoplastik tedavilerin gastrointestinal mukozit kaynaklı diyare, disfaji, mide bulantısı, malnütrisyon, sıvı-elektrolit düzeyinde bozulma ve kilo kaybı gibi çeşitli patolojilere yol açtığını rapor eden pek çok çalışma bulunmaktadır [136]. Jacevic ve ark. sıçanlarda DOX'un çoklu organ sistemlerinde olası toksik etkilerini inceledikleri çalışmalarında üç haftalık DOX uygulamasından sonra deneklerde anlamlı düzeyde kilo kaybı tespit etmişlerdir [137]. Bir başka çalışmada ise sıçanlarda DOX ile oluşturulmuş nefrotoksisite modelinde tek doz DOX uygulamasının deneklerin final vücut ağırlığında önemli düzeyde azalmaya yol açtığı rapor edilmiştir [138]. Mohamed ve ark. bisülfan ve siklofosfamid uygulamasından sonra kemik iliğinden elde edilen insan mezenkimal kök hücrelerinin farelere tansplantasyonunun over ve vücut ağırlığında artışa yol açtığını göstermiştir [139]. Bizde bu çalışmamızda literatürle benzer şekilde DOX uygulamasının deneklerde kilo kaybına neden olduğunu ve tedavi amacıyla verilen AKMKH'lerin kilo kaybını azalttığını saptadık.

Sıçan vajinal epitelinin, over steroidlerinin stimülasyonuna yanıt olarak histolojik varyasyonlar gösterdiği 60 yıldan uzun süredir bilinmektedir. Bu değişiklikler uygun boyama yöntemleri kullanılarak vajinal smear yöntemi ile izlenebilir [140]. Bu yöntem kullanılarak sıçanların östrus siklusları belirlenir. Östrus siklusu etkileşen üç bileşenin kontrolü altındadır: hipotalamus, ön hipofiz ve gonadotropin salgılatıcı hormon. [141]. Bu nedenle ovaryum

fonksiyonu ile ilgili yapılan çalışmalarda serumdaki FSH, AMH ve östradiol seviyelerinin belirlenmesinin yanı sıra östrus siklusu takibi de yapılmaktadır [142]. Anti-kanser ilaçları dişilerde ovaryumun fonksiyonunun bozulmasına neden olmaktadır [143]. Alkilleyici bir anti-kanser ilacı olan siklofosfamid farelere enjekte edildiği çalışmada siklofosfamid enjeksiyonu yapılan grupta östrus siklusunun 18 güne kadar uzadığı bulunmuştur. Bu gruptaki farelerde östrus siklusunun tüm fazlarının uzadığı ama proöstrus ve diöstrus fazlarındaki uzamanın daha fazla olduğu saptanmıştır [144]. Nishi ve ark. yaptıkları çalışmada 3 mg/kg DOX uyguladıkları sıçanların östrus siklusunun 10, 6 mg/kg DOX uyguladıkları sıçanların ise östrus siklusunun 13 güne kadar uzadıklarını bulmuşlardır. Özellikle yüksek doz uygulamasında kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha uzun diöstrus fazı görülmüştür [145]. Bu çalışmada DOX uygulanan grupta östrus siklusunun 10,9 güne kadar uzadığı ve bu uzamanın diöstrus ile metöstrus fazlarından kaynaklandığı bulundu.

Son zamanlarda, rejeneratif tıp araştırmaları MSC transplantasyonunun antineoplastik ilaçların kullanımına bağlı oluşan POF'lu hayvanlarda ovaryum fonksiyonunu düzeltmede etkili bir tedavi yöntemi sağlayabileceğini göstermiştir [146, 147]. Kemoterapiye bağlı POF sıçan modelini oluşturmak için siklofosfamid kullanılan bir çalışmada ovaryum fonksiyonunun düzeltilmesi amacıyla insan amnion kaynaklı mezenkimal kök hücre verilmiş ve transplantasyondan 1 hafta sonra POF grubuna göre düzensiz östrus siklusuna sahip sıçanların yüzdesinin daha düşük olduğu bulunmuştur [142]. Lai ve ark. menstrüasyon kanından izole edilen insan endometriyal mezenkimal kök hücrelerinin kemoterapi ilacı uygulanan farelerde östrus siklusunun 1 hafta sonra düzelmeye başladığını, 4 hafta sonra da kontrol grubuyla benzer olduğunu rapor etmişlerdir [148]. Bizim çalışmamızda da AKMKH transplantasyonu yapılan grupta bir denekte düzensiz östrus siklusu görülürken diğer deneklerde östrus siklusunun ortalama 9 günden sonra düzelmeye başladığı görüldü.

Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapik ajanların gonadlar üzerine toksik etki gösterdiği bilinmektedir. Özellikle alkilleyici ajanlar (siklofosfamid, dakarbazin, bisülfan) ve antrasiklinler (daunorubisin, doksorubisin, epirubisin) oldukça gonadotoksiktirler [149]. Antrasiklin bir ilaç olan DOX ovaryumlarda kan damarlarının zarar görmesine, stroma hücrelerinin apoptozuna neden olmaktadır [94]. DOX'un ovulasyon aşamasındaki oositlerin apoptozunu indüklediği düşünülmektedir. Farelerle yapılan in vitro çalışmalarda germinal vezikül ve metafaz II aşamasındaki oositlerde endoplazmik retikulum stresinin indüklenmesine, mitokondri aktivasyonunun ve hücre içi kalsiyum miktarının artmasına sebep olarak apoptozu neden olduğu bildirilmiştir [96]. Ayrıca DOX kullanımı sonrasında granüloza hücrelerinde ROS üretiminin ve p53, Bcl-2 ve Bax mRNA ekspresyonunun arttığı ve buna bağlı olarak DOX'un granüloza hücrelerinde apoptozu yol açtığı rapor edilmiştir [95]. Folliküllerde oosit ve granüloza hücreleri karşılıklı etkileşim halindedir. Granüloza hücrelerinde gelişen apoptoz oosit gelişimi ve

matürasyonunu da olumsuz yönde etkilemektedir. Dolayısıyla granüloza hücresinde oluşan hasar aşırı folikül atrezisine ve follikül kaybına neden olabilmektedir [150]. Bu olumsuz etkilerine ilaveten DOX primordiyal folikül havuzunu etkileyerek over rezervinin azalmasına neden olmaktadır [15, 16]. DOX ile yapılan bir çalışmada DOX uygulaması sonrası ovaryumda bulunan tüm foliküllerin sayısının azaldığı özellikle sekonder foliküllerin hasar gördüğü bulunmuştur. Aynı çalışmada DOX'un ovaryumda bulunan atretik folikül sayısını artırdığı buna bağlı olarak da ovulasyon hızında azalmanın gerçekleştiği saptanmıştır. Ayrıca DOX uygulaması sonrasında ovaryumdaki apoptozu belirlemek için TUNEL yapılmış ve primordiyal foliküllerde boyanma gözlenmezken, primer foliküllerde hafif boyanma gözlenmiştir, sekonder ve tersiyer foliküllerde ise belirgin boyanma gözlenmiştir [97]. Benzer şekilde Vaskivuo ve ark. yetişkin insan ovaryumunda apoptozu tanımlamak için in situ DNA 3'- ucu etiketleme kiti ile işaretleme yapmışlardır. Sekonder ve tersiyer foliküllerin granüloza tabakasında apoptotik hücreler tespit edilirken primordiyal ve primer foliküllerde apoptoz belirtisi gözlememişlerdir [151].

Bu çalışma kapsamında, sıçanlarda doksorubisinin gonadotoksisiteyi uyardığı görüldü. DOX grubu ovaryum dokularının folikülleri değerlendirildiğinde; kontrol grubuna göre primordiyal folikül sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir azalma görüldü. Gelişmekte olan foliküller arasında, primer foliküllerde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmamasına rağmen, sekonder ve tersiyer folikül sayılarında anlamlı oranda azalma saptandı. Sekonder ve tersiyer foliküllerdeki sayısal azalmaların nedeninin granüloza hücrelerindeki apoptozla bağlı olarak gelişen foliküler atrezinin olabileceği düşünüldü.

Sun ve ark. yapmış oldukları çalışmada kemoterapik bir ilaç olan siklofosfamidi intraperitoneal olarak uygulayarak over hasarı oluşturdukları farelere tedavi amacıyla AKMKH vermişler ve kök hücrelerin onarıcı etkilerini incelemişlerdir. Kök hücre uygulanan çalışma gruplarından bir tanesini kök hücre transplantasyonundan bir hafta sonra, diğer grubu ise bir ay sonra sakrifiye etmişler ve elde edilen ovaryum dokularındaki folikülleri saymışlardır. Her iki grupta da siklofosfamid grubuna kıyasla tüm foliküllerin sayısının anlamlı bir şekilde arttığını bulmuşlardır [102]. Bizim çalışmamızda da DOX+AKMKH grubunda DOX uygulanan gruba göre primordiyal, sekonder ve tersiyer folikül sayısının anlamlı bir şekilde fazla olduğu, primer folikül sayısının benzer olduğu, atretik follikül sayısının anlamlı derecede azaldığı saptandı. Dolayısıyla AKMKH'lerin DOX'a bağlı gonadotoksisitede primordiyal ve gelişmekte olan folliküller seviyesinde tedavi edici bir etki gösterdiği, DOX'un meydana getirdiği ovaryum doku hasarını ve foliküler kaybı azaltmak, ovaryan rezervi korumak amacıyla AKMKH uygulamasının olumlu sonuçlar verdiği hem ışık mikroskopik hem de istatistiksel olarak gösterilmiştir.

Primordiyal foliküller, reproduktif dönemde olgunlaşacakları zamana kadar uykuda kalan kalan tek katlı yassı pregranuloza hücre tabakasıyla çevrili bir primer oosit içerir. Folikül gelişimi çoklu, karmaşık aşamalardan oluşur ve bu aşamaların herhangi birindeki bozulma üreme

bozukluklarına ve infertiliteye yol açabilir. Bu nedenle, bu aşamaları kontrol eden kesin mekanizmaların açıklanması, kadın hastalarda fertilitiyi korumak ve infertiliteyi tedavi etmek için kritik öneme sahiptir [131, 132].

Yapılan birçok çalışmada kemoterapinin uykuda olan primordiyal foliküllerin sayısının azalmasına ve buna bağlı olarakta prematür over yetmezliğine (POF) neden olduğu gösterilmiştir. Kemoterapi sonrası over yetmezliğinin varlığı birçok çalışma ile belirlenmiş olsa da, kesin mekanizması belirsizdir. Çeşitli çalışmalar kemoterapinin uykuda olan primordial foliküllerin apoptozunu tetikleyerek POF'a ve infertiliteye neden olduğunu ileri sürmektedir [131, 132]. Bununla birlikte, Kalich-Philosoph ve ark. alkilleyici kemoterapötik bir ajan olan siklofosfamidin primordial foliküllerin apoptozunu indüklediğini bildirmiştir. Bunun yerine, siklofosfamid tedavisinin aktif olarak büyüyen foliküllerin apoptozunu indükler ve primordial folikülleri primer foliküllere aktive ederek primordial folikül havuzunun 'yok olmasına (burn-out)' yol açtığını raporlamışlardır [133]. Bu mekanizma oldukça mantıklı görünüyor çünkü teorik olarak kemoterapi aktif olarak bölünen hücreleri etkiler bu da kemoterapinin uyku halindeki foliküller için daha az toksik olacağını düşündürür [152].

Primordiyal foliküllerin primer foliküle dönüşmesini sağlayan en önemli yolak PTEN/AKT/FOXO3a yolağıdır. Fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K)'ın aktivitesi, protein kinaz B (AKT) aktivasyonunu sağlar. Aktive edilmiş AKT çekirdeğe geçer. AKT'in çekirdeğe translokasyonu forkhead box proteini 3a (FOXO3a)'nın sitoplazmaya translokasyonuna yol açar. Sonuç olarak primordiyal folikül aktivasyonu gerçekleşir [44, 45]. Fosfataz ve tensin homolog enzimi (PTEN)'nin bu yolu inhibe etmesiyle primordiyal foliküller uykuda kalmaya devam eder [6]. PTEN/ AKT/ FOXO3a yolağının aşırı aktivasyonu fazla sayıda primordiyal folikülün aktivasyonuna neden olarak primordial folikül havuzunun tükenmesine ve buna bağlı olarakta POF'a yol açar [7, 47].

Sözen ve ark yaptıkları çalışmada galaktoz ile POF modeli oluşturmuşlar ve folikül aktivasyonu için bir belirteç olduğu bilinen FOXO3a'nın ekspresyonunu immünohistokimyasal olarak incelemişlerdir. Kontrol grubunda FOXO3a'nın esas olarak granüloza hücrelerinin çekirdeklerinde ve primordial foliküllerin oositlerinde eksprese edildiği bulunmuştur. Galaktoza maruz kalmış grupta da FOXO3a'nın ekspresyonunun büyük ölçüde azaldığı bulunmuştur [153].

Chang ve ark. sisplatin kaynaklı primordial folikül tükenmesinde PTEN/AKT/FOXO3 yolağının rolünü araştırdıkları çalışmalarında bu yolaktaki anahtar proteinleri western blot ile analiz etmişler ve sisplatinin PTEN seviyesini kademeli bir şekilde azalttığını saptamışlardır. Yaptıkları immünohistokimyasal boyamalarda ise kontrol ovaryum dokularında primordiyal foliküllerde FOXO3a'nın nükleusta yerleşim gösterdiğini saptamışlardır. Bununla birlikte, sisplatin uygulanan gruptan elde edilen ovaryumlarda ise FOXO3a'nın nükleer exportunu gözlemlemişlerdir [152]. Jang ve ark.'da yapmış oldukları çalışmada sisplatin uyguladıkları

farelerde PI3K yolağında görevli moleküller olarak bilinen AKT, GSK3b ve FOXO3a'nın fosforilasyonun kontrole göre 1.2-2.5 kat arttığını bulmuşlardır. Gerek immünohistokimyasal gerekse western blot analizlerinde elde ettikleri veriler doğrultusunda sisplatinin PTEN/AKT/FOXO3 yolağının aşırı aktivasyonuna neden olarak primordiyal folikül sayısının azalmaya neden olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar antioksidan olan melatoninin sisplatin aracılı folikül aktivasyonuna karşı koruyucu bir etki sağlayıp sağlayamadığını araştırmışlardır. Melatonin, sisplatin ile indüklenen PTEN/AKT/FOXO3a yolağının aşırı aktivasyonunu bloke ederek, primordiyal foliküller üzerinde koruyucu bir etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir [9].

Biz de çalışmamızda doksorubisin kaynaklı primordiyal folikül tükenmesinde PTEN/AKT/FOXO3a yolağının etkili olup olmadığını incelemek için bu yolakta görevli AKT ve FOXO3a moleküllerini immünohistokimya ve PCR yöntemlerini kullanarak analiz ettik. İmmünohistokimya analizleri sonucunda kontrol grubuna ait ovaryum dokularında FOXO3a'nın immün reaktivitesini esas olarak primordiyal foliküllerin oositlerinin nükleusunda olduğunu bulduk. Bununla birlikte doksorubisin uygulanan grupta ise primordiyal foliküllerin oositlerinin nükleusundaki FOXO3a ekspresyonunun büyük ölçüde azaldığını saptadık. Doksorubisin verildikten bir gün sonra adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre transplantasyonu yapılan grupta ise oositlerde FOXO3a'nın sitoplazmik translokasyonunun azaldığını gözlemledik. Kontrol grubunda AKT'in immün işaretlenmesini primordiyal foliküllerin oositlerinin sitoplazmasında saptadık. DOX grubunda ise AKT'in immün reaktivitesinin nükleusta arttığını sitoplazmada azaldığını bulduk. Tedavi amacıyla kök hücre verilen grupta AKT'in immün boyanmasının kontrol grubuyla benzer olduğunu belirledik. PCR analizlerimiz sonucunda ise hem FOXO3a'nın hem de AKT'in mRNA ekspresyon seviyelerinin DOX grubunda azaldığını, DOX+AKMKH grubunda ise kontrol grubuyla benzer olduğunu belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlardan doksorubisin PTEN/AKT/FOXO3a yolağının aşırı aktivasyonuna neden olarak primordiyal folikül sayısında azalmaya neden olduğunu, kök hücre uygulamasının doksorubisin ile indüklenen bu yolağın aktivasyonunu düzenleyerek primordiyal folikül havuzunu koruduğunu düşündük.

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen bulgular doksorubisin'in sıçan ovaryumu üzerinde toksik etkiye sahip olduğunu, adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulamasının ise bu etkileri azaltabileceğini göstermektedir. Doksorubisin tarafından indüklenen ovaryum toksisitesine karşı adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin koruyucu etkinliği östrus siklusu, ovaryum boyutları ve genel doku morfolojisi incelenerek ışık mikroskopik olarak gösterildi. Ayrıca, ovaryan folikül sayıları incelendiğinde doksorubisin'in hem primordiyal hem de gelişmekte olan folikül sayılarında azalmaya yol açtığı, AKMKH uygulamasının ise folikül sayılarında artışa yol açtığı saptandı. Dolayısıyla, DOX'şa bağlı gelişen gonadotoksositeye karşı AKMKH uygulamasının etkili olduğu düşünüldü. Ek olarak, bu çalışma, önceki çalışmalarda

gösterilmeyen over rezervi ile ilişkili PTEN/AKT/FOXO3A yolağının FOXO3A ve AKT protein ifadelerini değerlendirerek doksorubisine bağlı primordiyal folikül havuzundaki azalmanın moleküler temelini anlaşılmasına yönelik fikir sunan ilk çalışma olma niteliğindedir. Yapılan immünohistokimyasal işaretlemeler ve RT-PCR analizleri sonucunda doksorubisin grubunda FOXO3a ve AKT moleküllerinin ekspresyonlarında azalma saptanırken AKMKH uygulamasının bu moleküllerin ekspresyonunda artışa yol açtığı bulundu. Kısaca, doksorubisine bağlı over rezervi kaybının AKMKH uygulaması ile ölçüde iyileştirildiğine işaret etmektedir. Bu çalışma doksorubisin uygulaması sonrasında meydana gelen over rezervinin azalmasının ve over rezervini korumada alternatif olarak sunulan mezenkimal kök hücrelerin teröpatik etkinliğinin altında yatan moleküler mekanizmayı anlamak için bir fikir vermektedir. Ancak bu mekanizmanın daha kapsamlı anlaşılabilmesi için, adipoz kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin primordiyal ve gelişen foliküllerdeki oositlerde ve granüloza hücrelerinde etki ettiği gen bölgeleri ile primordiyal foliküler aktivasyon ile ilişkili promotör bölgelerinin saptanması için ileri moleküler genetik analizlerin de dahil edildiği çalışmaların planlanması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]. Ross, M. H.; Pawlina, W., *Histology a text and atlas*. 6th ed.; Wolters Kluwer, Lippincott Williams&Wilkins: London, 2011; p 830-894.
- [2]. Moore, K.L.; Persaud, T.V.N.; Torchia, M.G., *The Developing Human Clinically Oriented Embryology*. 10th ed.; Elsevier: United States of America, 2016; p 260-267.
- [3]. Adhikari, D.; Liu, K., Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev* 2009, 30, (5), 438-464.
- [4]. Skinner, M.K., Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* 2005, 11, (5), 461-471.
- [5]. Zheng, W.; Nagaraju, G.; Liu, Z.; Liu, K., Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2012, 356, (1-2), 24-30.
- [6]. Hsueh, A. J.; Kawamura, K.; Cheng, Y.; Fauser, B. C., Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev* 2015, 36, (1), 1-24.
- [7]. Edson, M. A.; Nagaraja, A. K.; Matzuk, M. M., The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009, 30, (6), 624-712.
- [8]. 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.; Liu, K., Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science* 2008, 319, (5863), 611-613.
- [9]. Jang, H.; Lee, O. H.; Lee, Y.; Yoon, H.; Chang, E. M.; Park, M.; Lee, J. W.; Hong, K.; Kim, J. O.; Kim, N. K.; Ko, J. J.; Lee, D. R.; Yoon, T. K.; Lee, W. S.; Choi, Y., Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. *J Pineal Res* 2016, 60, (3), 336-347.
- [10]. Yavuzkır, Ş.; Akyol, A.; Kuloğlu, T., Doksorubisin ve Siklofosfamid Uygulanmasının Sıçan Over Dokularında Meydana Getirdiği Değişiklikler Üzerine Vitamin D'nin Etkileri. *F Ü Sağ Bil Tıp Derg* 2015, 29, (2), 57-62.
- [11]. Roti, E. C. R.; Ringelstetter, A. K.; Kropp, J.; Abbott, D. H.; Salih, S. M., Bortezomib prevents acute doxorubicin ovarian insult and follicle demise, improving the fertility window and pup birth weight in mice. *PLoS One* 2014, 9, (9).
- [12]. Karapehlivan, M.; Uzu, E.; Atakişi, O.; Erdoğan, H. M.; Uzun, M.; Çitil, M., Doksorubisin uygulanan tavşanlarda plazma sialik asit, malondialdehit ve redükte glutatyon düzeylerine L-karnitinin etkileri. *Kafkas Üniv Vet Fak Der* 2007, 13, (2), 155-160.
- [13]. Ayla, S.; Seckin, I.; Tanriverdi, G.; Cengiz, M.; Eser, M.; Soner, B. C.; Oktem, G., Doxorubicin induced nephrotoxicity: protective effect of nicotinamide. *Int J Cell Biol* 2011.
- [14]. Fahim, M. A.; Kataya, H.; El-Kharrag, R.; Amer, D. A.; Al-Ramadi, B.; Karam, S. M., Ghrelin attenuates gastrointestinal epithelial damage induced by doxorubicin. *World J Gastroenterol* 2011, 17, (33): p. 3836-3841s.
- [15]. Maltaris, T., Seufert R, Fischl F, Schaffrath M, Pollow K, Koelbl H, Dittrich R., The effect of cancer treatment on female fertility and strategies for preserving fertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2007, 130, (2), 148-155.
- [16]. Kerr, J.; Brogan, L.; Myers, M.; Hutt, K. J.; Mladenovska, T.; Ricardo, S.; Hamza, K.; Scott, C. L.; Strasser, A.; Findlay, J. K., The primordial follicle reserve is not renewed after chemical or irradiation mediated depletion. *Reproduction* 2012, 143, (4), 469-476.
- [17]. Can, A., *Kök Hücre: Biyolojisi, Türleri ve Tedavide Kullanımları*. Akademisyen Tıp Kitabevleri: Ankara, 2014; p 363-410.
- [18]. Devine, S. M.; Cobbs, C.; Jennings, M.; Bartholomew, A.; Hoffman, R., Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood* 2003, 101, (8), 2999-3001.
- [19]. Ying, J.; Feng, J.; Hu, J.; Wang, S.; Han, P.; Huang, Y.; Zhao, W.; Qian, J., Can ovaries be preserved after an ovarian arteriovenous disconnection? One case report and a review of surgical treatment using Da Vinci robots for aggressive ovarian fibromatosis. *J Ovarian Res* 2019, 12, (1), 52.

- [20]. Gibson, E., H. Mahdy, Anatomy, Abdomen and Pelvis, Ovary. In StatPearls, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK545187/> (02.02.2020).
- [21]. Sadler, T.W., Langman's Medical Embryology. Palme Yayıncılık: Ankara, 2011; p 257-260.
- [22]. Maheshwari, A.; Fowler, P. A., Primordial follicular assembly in humans revisited. *Zygote* 2008, 16, (4), 285-296.
- [23]. Junqueira, L. C.; Carneiro, J., Temel Histoloji. 11 th ed.; Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul, 2006; p 435-455.
- [24]. Kuyucu, Y.; Ta, Ö., Oosit Olgunlaşma Süreci ve Düzenleyici Faktörler. *DergiPark* 2009, 18, 227-240.
- [25]. Eroschenko, V., diFiore Histoloji Atlası Fonksiyonel İlişlileriyle. 10. baskı; Palme Yayınevi: Ankara, 2008; p 375-381.
- [26]. Kierszenbaum, A.L, Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş. Palme Yayınevi: Ankara, 2006; p 565-575.
- [27]. Ovalle, W. K.; Nahirney P.C., Netter Temel Histoloji. Güneş Tıp Kitabevleri: Ankara, 2009; p 399-409.
- [28]. Gartner, L.P.; Hiatt L.J., BRS Hücre Biyolojisi ve Histoloji. 7. baskı; İstanbul Tıp Kitapevi: İstanbul, 2016; p 330-338.
- [29]. Kitajima, M.; Murakami, N.; Taniguchi, K.; Kitajima, Y.; Tsukamoto, O.; Miura, K.; Masuzaki H., Histomorphological aspects of the ovarian cortex regarding ovarian reserve and local pelvic inflammation. *J of Mammalian Ova Research* 2018, 35, (1), 21-26
- [30]. Kezele, P.; Skinner M.K., Regulation of ovarian primordial follicle assembly and development by estrogen and progesterone: endocrine model of follicle assembly. *Endocrinology* 2003, 144, (8), 3329-3337.
- [31]. Yadav, A.K.; Yadav, P. K.; Chaudhary, G. R.; Tiwari, M.; Gupta, A.; Sharma, A.; Pandey, A. N.; Pandey, A. K.; Chaube, S. K., Autophagy in hypoxic ovary. *Cell Mol Life Sci* 2019. 76(17), 3311-3322.
- [32]. Gupta, S. K.; Bansal, P.; Ganguly, A.; Bhandari, B.; Chakrabarti, K., Human zona pellucida glycoproteins: functional relevance during fertilization. *J Reprod Immunol* 2009, 83, (1-2), 50-55.
- [33]. Familiari, G.; Relucanti, M.; Heyn, R.; Micara, G.; Correr, S., Three-dimensional structure of the zona pellucida at ovulation. *Microsc Res Tech* 2006, 69, (6), 415-426.
- [34]. Yauger, B.; Boggs, N. A.; Dean, J., Human ZP4 is not sufficient for taxon-specific sperm recognition of the zona pellucida in transgenic mice. *Reproduction* 2011, 141, (3), 313-319.
- [35]. Eşrefoğlu, M., Özel Histoloji. 2. baskı; İstanbul Tıp Kitapevi: İstanbul, 2016; p 289-310.
- [36]. Picton, H. M.; Harris, S. E.; Muruvi, W.; Chambers, E. L., The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*, 2008, 136, (6), 703-715.
- [37]. Block, E., Quantitative morphological investigations of the follicular system in women. *Acta Anat (Basel)* 1952, 14, (1-2), 108-123.
- [38]. Katz, V. L.; Gretchen, L. M.; Rogerio, A.; Lobo, R. A.; Gershenson, D., Comprehensive Gynecology. 5th ed.; Mosby, United States, 2007.
- [39]. McGee, E. A.; Hsueh, A. J., Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000, 21, (2), 200-214.
- [40]. Zheng, W., Zhang, H.; Gorre, N.; Risal, S.; Shen, Y.; Liu, K., Two classes of ovarian primordial follicles exhibit distinct developmental dynamics and physiological functions. *Hum Mol Genet* 2014, 23, (4), 920-928.
- [41]. Reddy, P.; Zheng, W.; Liu, K., Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. *Trends Endocrinol Metab* 2010, 21, (2), 96-103
- [42]. Huang, E.J.; Manova, K.; Packer, A.I.; Sanchez, S.; Bachvarova, R. F.; Besmer, P., The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 1993, 157, (1), 100-109.
- [43]. Engelman, J.A.; Luo, J.; Cantley, L. C., The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 2006, 7, (8), 606-619.
- [44]. Brunet, A.; Bonni, A.; Zigmond, M.J.; Lin, M. Z.; Juo, P.; Hu, L. S.; Anderson, M. J.; Arden, K. C.; Blenis, J.; Greenberg, M. E., Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 1999, 96, (6), 857-868.

- [45].Manning, B. D.; Cantley, L.C., AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007, 129, (7), 1261-1274.
- [46].Cully, M.; You, H.; Levine, A. J.; Mak, T. W., Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2006, 6, (3), 184-192
- [47].Jagarlamudi, K.; Liu, L.; Adhikari, D.; Reddy, P.; Idahl, A.; Ottander, U.; Lundin, E.; Liu, K., Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. *PLoS One* 2009, 4, (7), e6186.
- [48].Accili, D.; Arden, K. C., FoxOs at the crossroads of cellular metabolism, differentiation, and transformation. *Cell* 2004, 117, (4), 421-426.
- [49].Van der Horst, A.; Burgering, B.M., Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007, 8, (6), 440-450.
- [50].John, G. B.; Shirley, L. J.; Gallardo, T. D.; Castrillon, D. H., Specificity of the requirement for Foxo3 in primordial follicle activation. *Reproduction* 2007, 133, (5), 855-863.
- [51].Castrillon, D. H.; Miao, L.; Kollipara, R.; Horner, J. W.; DePinho, R. A., Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 2003, 301, (5630), 215-218.
- [52].Hosaka, T.; Biggs, W. H.; Tieu, D.; Boyer, A. D.; Varki, N. M.; Cavenee, W. K.; Arden, K. C., Disruption of forkhead transcription factor (FOXO) family members in mice reveals their functional diversification. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101, (9), 2975-2980
- [53].Liu, L.; Rajareddy, S.; Reddy, P.; Du, C.; Jagarlamudi, K.; Shen, Y.; Gunnarsson, D.; Selstam, G.; Boman, K.; Liu, K., Infertility caused by retardation of follicular development in mice with oocyte-specific expression of Foxo3a. *Development* 2007, 134, (1), 199-209.
- [54].Pelosi, E.; Omari, S.; Michel, M.; Ding, J.; Amano, T.; Forabosco, A.; Schlessinger, D.; Ottolenghi, C., Constitutively active Foxo3 in oocytes preserves ovarian reserve in mice. *Nat Commun*, 2013, 4, 1843.
- [55].Anasti, J.N., Premature ovarian failure: an update. *Fertil Steril* 1998, 70, (1), 1-15.
- [56].Cramer, D.W.; Xu, H., Predicting age at menopause. *Maturitas* 1996, 23, (3), 319-326.
- [57].Komorowska, B., Autoimmune premature ovarian failure. *Prz Menopauzalny* 2016, 15, (4), 210-214
- [58].Nelson, L.M.; Covington, S.N.; Rebar, R.W., An update: spontaneous premature ovarian failure is not an early menopause. *Fertil Steril* 2005, 83, (5), 1327-1332.
- [59].Sullivan, A.K.; Marcus, M.; Epstein, M. P.; Allen, E. G.; Anido, A. E.; Paquin, J. J.; Yadav-Shah, M.; Sherman, S. L., Association of FMR1 repeat size with ovarian dysfunction. *Hum Reprod* 2005, 20, (2), 402-412.
- [60].Fortuno, C.; Labarta, E., Genetics of primary ovarian insufficiency: a review. *J Assist Reprod Genet* 2014, 31, (12), 1573-1585.
- [61].Goswami, D.; Conway, G.S. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update* 2005, 11, (4), 391-410.
- [62].Ebrahimi, M.; Akbari A. F., Pathogenesis and causes of premature ovarian failure: an update. *Int J Fertil Steril* 2011, 5, (2), 54-65.
- [63].Larsen, E. C.; Muller, J.; Schmiegelow, K.; Rechnitzer, C.; Andersen, A. N., Reduced ovarian function in long-term survivors of radiation- and chemotherapy-treated childhood cancer. *J Clin Endocrinol Metab* 2003, 88, (11), 5307-5314.
- [64].Baykara, O., Kanser Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. *Balıkesir Sağlık Bil Derg* 2016, 5, (3), 154-165.
- [65].Benjanuwattra, J.; Siri-Angkul, N.; Chattipakorn, S. C.; Chattipakorn, N., Doxorubicin and its proarrhythmic effects: A comprehensive review of the evidence from experimental and clinical studies. *Pharmacol Res* 2020, 151, p. 104542.
- [66].Ongnok, B.; Chattipakorn, N.; Chattipakorn, S. C., Doxorubicin and cisplatin induced cognitive impairment: The possible mechanisms and interventions. *Exp Neurol* 2020, 324, 113-118.
- [67].Mohan, P.; Rapoport, N. Doxorubicin as a molecular nanotheranostic agent: effect of doxorubicin encapsulation in micelles or nanoemulsions on the ultrasound-mediated intracellular delivery and nuclear trafficking. *Mol Pharm* 2010, 7, (6), 1959-1973.
- [68].Keizer, H.; Pinedo, H.; Schuurhuis, G.; Joenje, H., Doxorubicin (adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. *Pharmacol Ther* 1990, 47, (2), 219-231.

- [69].Armstrong, J.; Dass, C.R., Doxorubicin Action on Mitochondria: Relevance to Osteosarcoma Therapy? *Curr Drug Targets* 2018, 19, (5), 432-438.
- [70].Rivankar, S., An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *J Cancer Res Ther* 2014, 10, (4), 853-858.
- [71].Aubel-Sadron, G.; Londos-Gagliardi D., Daunorubicin and doxorubicin, anthracycline antibiotics, a physicochemical and biological review. *Biochimie* 1984, 66, (5), 333-352.
- [72].Patrick, K.S., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw Hill: New York, 2001.
- [73].Alves, A.C.; Magarkar, A.; Horta, M.; Lima, J. L. F. C.; Bunker, A.; Nunes, C.; Reis, S., Influence of doxorubicin on model cell membrane properties: insights from in vitro and in silico studies. *Sci Rep* 2017, 7, (1).
- [74].Weiss, R.B., The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? *Semin Oncol* 1992, 19, (6), 670-686.
- [75].Arcamone, F.; Cassinelli, G.; Fantini, G.; Grein, A.; Orezzi, P.; Pol, C.; Spalla, C., Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. Reprinted from *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. XI, Issue 6, Pages 1101-1110 (1969). *Biotechnol Bioeng* 2000, 67(6), 704-713.
- [76].Niraula, N. P.; Kim, S. H.; Sohng, J. K.; Kim, E. S., Biotechnological doxorubicin production: pathway and regulation engineering of strains for enhanced production. *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, 87, (4), 1187-1194.
- [77].Kayaalp, S. O., Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 10. baskı; Pelikan Yayınları: Ankara, 2002: p 549-553.
- [78].Speth, P.; Van Hoesel, Q.; Haanen, C., Clinical pharmacokinetics of doxorubicin. *Clin pharmacokinet* 1988, 15, (1), 15-31.
- [79].Katzung, B., Basic And Clinical Pharmacology. 14th ed.; McGraw-Hill Education: United States of America, 2018; p 948-977.
- [80].Camitta, B., Childhood Leukemias by CH Pui, MD (ed); Cambridge University Press, 1999, 567 pages. *Leukemia* 2000, 14, (7), 1332.
- [81].Kılınç, Z., Doksorubisin ile oluşturulan deneysel böbrek hasarında oksolamin'in etkilerinin incelenmesi, Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ, 2015.
- [82].Fornari, F. A.; Randolph, J. K.; Yalowich, J. C.; Ritke, M. K.; Gewirtz, D. A., Interference by doxorubicin with DNA unwinding in MCF-7 breast tumor cells. *Mol Pharmacol* 1994, 45, (4), 649-656.
- [83].Pizzo, P. A.; Poplack, D. G., Principle and Practice Pediatric Oncology. 4th ed.; Lippincott Company: North America, 1989.
- [84].Khan, M. S.; Holmes, J., Reducing the morbidity from extravasation injuries. *Annals of Plastic Surgery* 2002, 48, (6), 628-632.
- [85].Fahim, M.A.; Kataya, H.; El-Kharrag, R.; Amer, D. A.; Al-Ramadi, B.; Karam, S. M., Ghrelin attenuates gastrointestinal epithelial damage induced by doxorubicin. *World J Gastroenterol* 2011, 17, (33), 3836-3841.
- [86].Smart, E.; Lopes, F.; Rice, S.; Nagy, B.; Anderson, R. A.; Mitchell, R. T.; Spears, N., Chemotherapy drugs cyclophosphamide, cisplatin and doxorubicin induce germ cell loss in an in vitro model of the prepubertal testis. *Sci Rep* 2018, 8, (1), 1773.
- [87].Kano, M.; Sosulski, A. E.; Zhang, L.; Saatcioglu, H. D.; Wang, D.; Nagykerly, N.; Sabatini, M. E.; Gao, G3.; Donahoe, P. K.; Pépin, D., AMH/MIS as a contraceptive that protects the ovarian reserve during chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017, 114, (9), E1688-E1697.
- [88].Jeansson, M.; Bjorck, K.; Tenstad, O.; Haraldsson, B., Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol* 2009, 20, (1), 114-122.
- [89].Lee, K.M.; Lee, I. C.; Kim, S. H.; Moon, C.; Park, S. H.; Shin, D. H.; Kim, S. H.; Park, S. C.; Kim, H. C.; Kim, J. C., Melatonin attenuates doxorubicin-induced testicular toxicity in rats. *Andrologia* 2012, 44, (1), 796-803.
- [90].Hozayen, W.G., Effect of hesperidin and rutin on doxorubicin induced testicular toxicity in male rats. *Int J Food Nutr Sci* 2012, 1, (1), 31-42.

- [91].Sridevi, T.; Nisha, P. G.; Arulnathan, A., Effect of Doxorubicin on the morphology, histology and karyology of male reproductive system of white mice, *Mus musculus*. *Indian J Sci Technol* 2012, 5, (4), 2614-2618.
- [92].Morgan, S.; Lopes, F.; Gourley, C.; Anderson, R.; Spears, A., Cisplatin and doxorubicin induce distinct mechanisms of ovarian follicle loss; imatinib provides selective protection only against cisplatin. *PLoS One* 2013, 8, (7), e70117.
- [93].Roti R. E. C.; Salih, S. M., Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced injury in mouse ovarian cells. *Biol Reprod* 2012, 86, (3), 1-11.
- [94].Lopes, F.; Liu, J.; Morgan, S.; Matthews, R.; Nevin, L.; Anderson, R. A.; Spears, N., Single and combined effects of cisplatin and doxorubicin on the human and mouse ovary in vitro. *Reproduction* 2020, 159, (2), 193-204.
- [95].Zhang, T.; He, W. H.; Feng, L. L.; Huang, H. G., Effect of doxorubicin-induced ovarian toxicity on mouse ovarian granulosa cells. *Toxicol Pharmacol* 2017, 86, 1-10.
- [96].Bar-Joseph, H.; Ben-Aharon, I.; Rizel, S.; Stemmer, S. M.; Tzabari, M.; Shalgi, R., Doxorubicin-induced apoptosis in germinal vesicle (GV) oocytes. *Reprod Toxicol* 2010, 30, (4), 566-572.
- [97].Ben-Aharon, I.; Bar-Joseph, H.; Tzarfaty, G.; Kuchinsky, L.; Rizel, S.; Stemmer, S. M.; Shalgi, R., Doxorubicin-induced ovarian toxicity. *Reprod Biol Endocrinol* 2010, 8, (1), 20.
- [98].Familiari, G.; Caggiati, A.; Nottola, S. A.; Ermini, M.; Di Benedetto, M. R.; Motta, P. M., Infertility: ultrastructure of human ovarian primordial follicles after combination chemotherapy for Hodgkin's disease. *Hum Reprod* 1993, 8, (12), 2080-2087.
- [99].Azem, F.; Samara, N.; Cohen, T.; Ben-Yosef, D.; Almog, B.; Lessing, J. B.; Goor, O.; Amit, A., Assessment of ovarian reserve following ovarian tissue banking and/or GnRH-a co-treatment prior to chemotherapy in patients with Hodgkin's disease. *J Assist Reprod Genet* 2008, 25, (11-12), 535-538.
- [100].Meirow, D.; Assad, G.; Dor, J.; Rabinovici, J., The GnRH antagonist cetrorelix reduces cyclophosphamide-induced ovarian follicular destruction in mice. *Hum Reprod* 2004, 19, (6), 1294-1299.
- [101].Yeh, J.; Kim, B. S.; Peresie, J., Protection against cisplatin-induced ovarian damage by the antioxidant sodium 2-mercaptoethanesulfonate (mesna) in female rats. *Am J Obstet Gynecol* 2008, 198, (4), 463.E1-463.E7.
- [102].Sun, M.; Wang, S.; Li, Y.; Yu, L.; Gu, F.; Wang, C.; Yao, Y., Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem Cell Res Ther* 2013, 4, (4), 80.
- [103].Horwitz, E.; Le Blanc, K.; Dominici, M.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F. C.; Deans, R. J.; Krause, D. S.; Keating, A., Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2005, 7, (5), 393-395.
- [104].Akgün, I., Mezenkimal kök hücre. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016, 1, (1), 29-32.
- [105].Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E., Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006, 8, (4), 315-317.
- [106].Almalki, S. G.; Agrawal, D.K., Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. *Differentiation* 2016, 92, (1-2), 41-51.
- [107].Matur, İ.; Solmaz, S., Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2011, 20, (3), 168-186.
- [108].Rasmusson, I.; Ringden, O.; Sundberg, B.; Le Blanc, K., Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp Cell Res* 2005, 305, (1), 33-41.
- [109].Uccelli, A.; Moretta L.; Pistoia, V., Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2008, 8, (9), 726-736.
- [110].Karaöz, E.; Turaç, G., Mezenkimal Kök Hücre Biyolojisi ve Tanımlanması. *Türkiye Klinikleri J Hematol-Special Topics* 2014, 7, (4), 1-9.

- [111].Vanden B. W. S., In situ tissue regeneration: chemoattractants for endogenous stem cell recruitment. *Tissue Eng Part B: Rev* 2014, 20, (1), 28-39.
- [112].Rastegar, F.; Shenaq, D.; Huang, J.; Zhang, W.; Zhang, B. Q.; He, B. C.; Chen, L.; Zuo, G. W.; Luo, Q.; Shi, Q.; Wagner, E. R.; Huang, E.; Gao, Y.; Gao, J. L.; Kim, S. H.; Zhou, J. Z.; Bi, Y.; Su, Y.; Zhu, G.; Luo, J.; Luo, X.; Qin, J.; Reid, R. R.; Luu, H. H.; Haydon, R. C.; Deng, Z. L.; He, T. C., Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications. *World J Stem Cells* 2010, 2, (4), 67-80.
- [113].Tekeli, S.; Arisu, N. E; Gokce, B.; Sir, G.; Yigitturk, G.; Cavusoglu, T.; Uyanikgil, Y., Kök Hücreler; Mezenkimal Kök Hücreler ve Güncel Klinik Uygulamaları. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016, 1, (2), 72-83.
- [114].Han, S.; Sun, H. M.; Hwang, K. C.; Kim, S. W., Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction Cells: Update on Clinical Utility and Efficacy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2015, 25, (2), 145-152.
- [115].Bacakova, L.; Zarubova, J.; Travnickova, M.; Musilkova, J.; Pajorova, J.; Slepicka, P.; Kasalkova, N. S.; Svorcik, V.; Kolska, Z.; Motarjemi, H.; Molitor, M., Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells—a review. *Biotechnol Adv* 2018, 36, (4), 1111-1126.
- [116].Mizuno, H., Adipose-derived stem cells for regenerative medicine in the field of plastic and reconstructive surgery. *J Oral Biosci* 2013, 55, (3), 132-136.
- [117].Mahmoudifar, N.; Doran, P. M., Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue. *Methods Mol Biol* 2015, 1340, 53-64.
- [118].Fan, X. L.; Zhang, Y.; Li, X.; Fu, Q. L., Mechanisms underlying the protective effects of mesenchymal stem cell-based therapy. *Cell Mol Life Sci* 2020.
- [119].Takehara, Y.; Yabuuchi, A.; Ezoe, K.; Kuroda, T.; Yamadera, R.; Sano, C.; Murata, N.; Aida, T.; Nakama, K.; Aono, F.; Aoyama, N.; Kato, K.; Kato, O., The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Lab Invest* 2013, 93, (2), 181-193.
- [120].Pan, Y.; Zhang, L.; Zhang, X.; Hu, C.; Liu, R., Biological and biomechanical analysis of two types of mesenchymal stem cells for intervention in chemotherapy-induced ovarian dysfunction. *Arch Gynecology Obstet* 2017, 295, (1), 247-252.
- [121].Yin, N.; Zhao, W.; Luo, Q.; Yuan, W.; Luan, X.; Zhang, H., Restoring Ovarian Function With Human Placenta-Derived Mesenchymal Stem Cells in Autoimmune-Induced Premature Ovarian Failure Mice Mediated by Treg Cells and Associated Cytokines. *Reprod Sci* 2018, 25, (7), 1073-1082.
- [122].Gabr, H.; Elkheir, W.; El-Gazzar, A., Autologous stem cell transplantation in patients with idiopathic premature ovarian failure. *J Tissue Sci Eng* 2016, 7, (3), 27.
- [123].Elfayomy, A. K.; Almasry, S. M.; El-Tarhouny, S. A.; Eldomiaty, M. A., Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: Possible direct and indirect effects. *Tissue Cell* 2016, 48, (4), 370-382.
- [124].Fu, X.; He, Y.; Xie, C.; Liu, W., Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy* 2008, 10, (4), 353-363.
- [125].Yoon, S.Y., Mesenchymal stem cells for restoration of ovarian function. *Clin Exp Reprod Med* 2019, 46, (1), 1-7.
- [126].Nelson, J. F.; Felicio, L. S.; Randall, P. K.; Sims, C.; Finch, C. E., A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod* 1982, 27, (2), 327-339.
- [127].Ferlay, J.; Colombet, M.; Soerjomataram, I.; Mathers, C.; Parkin, D. M.; Piñeros, M.; Znaor, A.; Bray F., Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer* 2019, 144, (8), 1941-1953.
- [128].Gonzalez-Angulo, A.M.; Morales-Vasquez, F.; Hortobagyi, G.N., Overview of resistance to systemic therapy in patients with breast cancer. *Adv Exp Med Biol* 2007, 608, 1-22.
- [129].Ataya, K.; Moghissi, K., Chemotherapy-induced premature ovarian failure: mechanisms and prevention. *Steroids* 1989, 54, (6), 607-626.
- [130].Shalet, S. M.; Beardwell, C. G.; Jones, P. H.; Pearson, D.; Orrell, D. H., Ovarian failure following abdominal irradiation in childhood. *Br J Cancer* 1976, 33, (6), 655-658.

- [131].Tilly, J. L., Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod* 1996, 1(3): p. 162-172.
- [132].Morgan, S.; Anderson, R.; Gourley, C.; Wallace, W.; Spears, N., How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Hum Reprod Update* 2012, 18, (5), 525-535.
- [133].Kalich-Philosoph, L.; Roness, H.; Carmely, A.; Fishel-Bartal, M.; Ligumsky, H.; Paglin, S.; Wolf, I.; Kanety, H.; Sredni, B.; Meiorow, D., Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med* 2013, 5, (185), 185ra62.
- [134].Patel, A.G.; Kaufmann, S. H., How does doxorubicin work? *Elife* 2012, 1, e00387.
- [135].Toucheffeu, Y.; Montassier, E.; Nieman, K.; Gastinne, T.; Potel, G.; Bruley, V. S.; Le Vacon, F.; De La Cochetière, M. F., Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy- or radiation-induced gastrointestinal mucositis - current evidence and potential clinical applications. *Aliment Pharmacol Ther* 2014, 40, (5), 409-421.
- [136].Basile, D.; Di Nardo, P.; Corvaja, C.; Garattini, S. K.; Pelizzari, G.; Lisanti, C.; Bortot, L.; Da Ros, L.; Bartoletti, M.; Borghi, M.; Gerratana, L.; Lombardi, D.; Puglisi, F., Mucosal Injury during Anti-Cancer Treatment: From Pathobiology to Bedside. *Cancers (Basel)* 2019,11, (6).
- [137].Jacevic, V.; Dragojevic-Simic, V.; Tatomirovic, Z.; Dobric, S.; Bokonjic, D.; Kovacevic, A.; Nepovimova, E.; Valis, M.; Kuca, K., The Efficacy of Amifostine against Multiple-Dose Doxorubicin-Induced Toxicity in Rats. *Int J Mol Sci* 2018, 19, (8).
- [138].El-Sayed, E. M.; Mansour, A. M.; El-Sawy, W.S., Protective effect of proanthocyanidins against doxorubicin-induced nephrotoxicity in rats. *J Biochem Mol Toxicol* 2017, 31, (11).
- [139].Mohamed, S. A.; Shalaby, S. M.; Abdelaziz, M.; Brakta, S.; Hill, W. D.; Ismail, N.; Al-Hendy, A1., Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. *Reprod Sci* 2018, 25, (1), 51-63.
- [140].Montes, G. S.; Luque, E.H., Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)* 1988, 133, (3), 192-199.
- [141].Smith, M.S., Estrus and menstrual cycles: neuroendocrine control. In *Encyclopedia of Neuroscience* 2010, 1-5.
- [142].Ling, L.; Feng, X.; Wei, T.; Wang, Y.; Wang, Y.; Wang, Z.; Tang, D.; Luo, Y.; Xiong, Z., Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism. *Stem Cell Res Ther* 2019, 10, (1), 46.
- [143].Spears, N.; Lopes, F.; Stefansdottir, A.; Rossi, V.; De Felici, M.; Anderson, R. A.; Klinger, F. G., Ovarian damage from chemotherapy and current approaches to its protection. *Hum Reprod Update* 2019, 25, (6), 673-693.
- [144].El Andaloussi, A.; Igboeli, P.; Amer, A.; Al-Hendy, A., Intravenous Infusion of Nucleated Peripheral Blood Cells Restores Fertility in Mice with Chemotherapy-Induced Premature Ovarian Failure. *Biomedicines* 2018, 6, (3).
- [145].Nishi, K.; Gunasekaran, V. P.; Arunachalam, J.; Ganeshan, M., Doxorubicin-induced female reproductive toxicity: an assessment of ovarian follicular apoptosis, cyclicity and reproductive tissue histology in Wistar rats. *Drug Chem Toxicol* 2018, 41, (1), 72-81.
- [146].Wang, Z.; Wang, Y.; Yang, T.; Li, J.; Yang, X., Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res Ther* 2017, 8, (1), 11.
- [147].Liu, J.; Zhang, H.; Zhang, Y.; Li, N.; Wen, Y.; Cao, F.; Ai, H.; Xue, X., Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Mol Cells* 2014, 37, (12), 865-872.
- [148].Lai, D.; Wang, F.; Yao, X.; Zhang, Q.; Wu, X.; Xiang, C., Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *J Transl Med* 2015, 13, 155.
- [149].Oeffinger, K. C.; Hudson, M. M., Long-term complications following childhood and adolescent cancer: foundations for providing risk-based health care for survivors. *CA Cancer J Clin* 2004, 54, (4), 208-236.
- [150].Oktay, K.; Oktem, O.; Reh, A.; Vahdat, L., Measuring the impact of chemotherapy on fertility in women with breast cancer. *J Clin Oncol* 2006, 24, (24), 4044-4046
- [151].Vaskivuo, T. E.; Anttonen, M.; Herva, R.; Billig, H.; Dorland, M.; Te Velde, E. R.; Stenbäck, F.; Heikinheimo, M.; Tapanainen, J. S., Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life:

apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. J Clin Endocrinol Metab 2001, 86, (7), 3421-3429.

[152].Chang, E. M.; Lim, E.; Yoon, S.; Jeong, K.; Bae, S.; Lee, D. R.; Yoon, T. K.; Choi, Y.; Lee, W. S., Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/AKT/FOXO3a Pathway which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice. PLoS One 2015, 10, (12), e0144245.

[153].Sozen, B.; Ozekinci, M.; Erman, M.; Gunduz, T.; Demir, N.; Akouri, R., Dehydroepiandrosterone supplementation attenuates ovarian ageing in a galactose-induced primary ovarian insufficiency rat model. J Assist Reprod Genet 2019, 36, (10), 2181-2189.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : Hatice ORUÇ DEMİRBAĞ

Doğum Tarihi : 23.07.1987

E-mail: hatice_oruc87@hotmail.com

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Akdeniz Üniversitesi	2005-2010
Yüksek Lisans	Histoloji ve Embriyoloji	Pamukkale Üniversitesi	2010-2013
Doktora	Histoloji ve Embriyoloji	Mersin Üniversitesi	2013-2020

Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş.Gör.	Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı	2012-

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1. Aydinoglu Fatma, Dalkir Fatma Tugce, Oruç Hatice, Ogulener Nuran (2017). The interaction of L-cysteine/H2S pathway and muscarinic acetylcholine receptors (mAChRs) in mouse corpus cavernosum. Nitric Oxide- Biology And Chemistry, 70(null), 51-58., Doi: 10.1016/j.niox.2017.08.005 (Yayın No: 3902730)

Ulusal Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler:

1. Usta Asiye, Oruç Hatice, Mete Gülçin (2012). Leptinin yenidoğan sıçanların testis germ hücrelerine etkisinin ışık mikroskop düzeyinde incelenmesi. Pamukkale Tıp Dergisi, 5(2), 75-83., Doi: 20125(2):75-83 (Yayın No: 3937265)

Diğer Yayınlar

1. Ünal Murat Serkant, Özer Mehmet Caner, Hacıoğlu Sönmez Ferhan, Bayrak Gülsen, Oruç Hatice (2017). Seminal sıvının fertilizasyondaki rolü. Androloji Bülteni, 19(4), 138-143., Doi: 10.24898/tandro.2017.35403 (Yayın No: 3907757)

Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

1. Abban Mete Gülçin, Oruç Hatice, Mete Ergün, Gök Duygu (2012). Fare Endometriyumda Tra-1-60, Tra-1-81, Stro-1, CD34, CD73, CD105 İfadelerinin İmmünohistokimyasal Olarak Gösterilmesi. 11. Ulusal Histoloji ve Embriyoloji Kongresi (Tam Metin Bildiri/Poster)
2. Bayrak Gülsen, Oruç Hatice, Özkaya Tülay, Coşkun Yılmaz Banu (2015). 1800 Mhz Elektromanyetik Alan Uygulanmış Sıçan Böbreklerinin Işık Mikroskopik Olarak Değerlendirilmesi. Elektromanyetik Alanlar ve Etkileri (Tam Metin Bildiri/Poster) (Yayın No:3938218)
3. Ünal Murat Serkant, Özer Mehmet Caner, Çil Nazlı, Tan Semih, Oruç Hatice, Mete Gülçin (2016). İnsan Adipoz Dokusundan Mezenkimal Kök Hücrelerinin Eksplant Kültür Tekniğiyle İzolasyonu. 13th National Histology and Embryology Congress with International Participation (Tam Metin Bildiri/Poster)(Yayın No:3937615)

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitaplarında Basılan Bildiriler:

1. Mete Ergun, Mete Gulcin, Oguz Emin Oguzhan, Oruc Hatice (2012). Immunohistochemical Detection of C-Kit, Tra-1-60, Tra-1-81, Stro-1, CD34, CD73, CD105 Expression in Ovarian Tissue. ISEH 41st Annual Scientific Meeting/ Experimental Hematology (Tam Metin Bildiri/Poster)
2. Demirbağ Oruç Hatice, Mete Gülçin, Çil Nazlı, Tan Semih (2018). Hiyaluronik asitin endometriyum dokusunda $\alpha V\beta 3$ integrin ve metalloproteinaz ekspresyonuna etkisi. 2. International Scientific Researches Congress (Sözlü Bildiri)