



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



SIÇAN İN VIVO DÜŞÜK OVER REZERVİ MODELİNDE
ANDROJEN TEDAVİSİNİN OVARYAN FOLİKÜLLERİN
GELİŞİMİNE ETKİSİ

Dr. Cihan ÇAKIR

(DOKTORA TEZİ)

BURSA-2019

Dr. Cihan ÇAKIR

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI DOKTORA TEZİ

2019



T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ
ANABİLİM DALI



**SIÇAN İN VİVO DÜŞÜK OVER REZERVİ MODELİNDE
ANDROJEN TEDAVİSİNİN OVARYAN FOLİKÜLLERİN
GELİŞİMİNE ETKİSİ**

Dr. Cihan ÇAKIR

(DOKTORA TEZİ)

DANIŞMAN:

Doç. Dr. Berrin AVCI

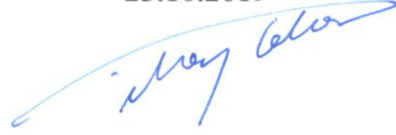
BURSA-2019

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK BEYANI





Doktora tezi olarak sunduğum “Sıçan İn Vivo Düşük Over Rezervi Modelinde Androjen Tedavisinin Ovaryan Foliküllerin Gelişimine Etkisi” adlı çalışmanın, proje safhasından sonuçlanmasına kadar geçen bütün süreçlerde bilimsel etik kurallarına uygun bir şekilde hazırlandığını ve yararlandığım eserlerin kaynaklar bölümünde gösterilenlerden oluştuğunu belirtir ve beyan ederim.

Dr. Cihan ÇAKIR
23.10.2019




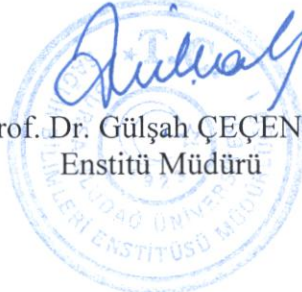
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tıp- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Dr. Cihan ÇAKIR tarafından hazırlanan “Sıçan İn Vivo Düşük Over Rezervi Modelinde Androjen Tedavisinin Ovaryan Foliküllerin Gelişimine Etkisi” konulu Doktora tezi 25/11/2019 günü, 11,00-12,00 saatleri arasında yapılan tez savunma sınavında jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

	<u>Adı-Soyadı</u>	<u>İmza</u>
Tez Danışmanı	Doç. Dr. Berrin AVCI	
Üye	Prof. Dr. Zehra MİNBAY	
Üye	Prof. Dr. Tülin ALKAN	
Üye	Prof. Dr. Meltem KURUS	
Üye	Dr. Öğr. Üyesi Fatma Bahar SUNAY	

Bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun03.12.2019..... tarih ve2019/33..... sayılı toplantısında alınan01..... numaralı kararı ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Gülşah ÇEÇENER
Enstitü Müdürü



TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU

23/10/2019

Adı Soyadı: Dr. Cihan ÇAKIR

Anabilim Dalı: Tıp- Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Konusu: Sıçan İn Vivo Düşük Over Rezervi Modelinde Androjen Tedavisinin

Ovaryan Foliküllerin Gelişimine Etkisi

ÖZELLİKLER	UYGUNDUR	UYGUN DEĞİLDİR	AÇIKLAMA
Tezin Boyutları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Dış Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İç Kapak Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kabul Onay Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Düzeni	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
İçindekiler Sayfası	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yazı Karakteri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Satır Aralıkları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Başlıklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Sayfa Numaraları	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Eklerin Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Tabloların Yerleştirilmesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Kaynaklar	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

DANIŞMAN ONAYI

Unvanı Adı Soyadı: Doç. Dr. Berrin AVCI

İmza:

İÇİNDEKİLER

Dış Kapak	
İç Kapak	
ETİK BEYANI.....	II
KABUL ONAY.....	III
TEZ KONTROL ve BEYAN FORMU	IV
İÇİNDEKİLER	V
TÜRKÇE ÖZET	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ovaryum	3
2.1.1. Ovaryumun Anatomisi	3
2.1.2. Ovaryum Embriyolojisi	4
2.1.3. Ovaryumun Histolojisi	5
2.1.3.1. Primordiyal Foliküller	6
2.1.3.2. Büyümekte Olan Foliküller	6
2.1.3.2.1. Primer Foliküller.....	6
2.1.3.2.1.1. Unilaminar primer foliküller	7
2.1.3.2.1.2. Multilaminar Primer Foliküller:	7
2.1.3.2.2. Sekonder (Antral) Foliküller.....	8
2.1.3.2.3. Matür (Graaf) foliküller	8
2.1.3.2.4. Atretik Foliküller:	9
2.2. Sıçanlarda Dişi Üreme Sistemi.....	10
2.2.1. Sıçanlarda Ovaryum Anatomisi	10
2.2.2. Sıçanlarda Ovaryum Embriyolojisi.....	11
2.2.3. Sıçanlarda Foliküler Gelişim	11
2.2.4. Östrus Siklusunu	13
2.3. Ovaryum Rezervi	15
2.4. İnfertilite ve Düşük Over Rezervi.....	15
2.5. DOR Hayvan Modelleri.....	17
2.6. VCD	17
2.7. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon	19
2.7.1. DOR Olgularında KOH Protokolleri.....	20
2.7.2. DOR Olgularında KOH Protokollerine Eklenen Adjuvan Ajanlar.....	21
2.8. Dehidroepiandrosteron.....	21
2.8.1. DOR Olgularında DHEA Kullanımı	22
2.9. Siklooksijenaz-2 (COX-2).....	23
2.9.1. DHEA ile COX-2 Etkileşimi.....	25
2.10. Çalışmanın Amacı	26
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	27
3.1. Deney Hayvanları.....	27
3.2. Deney Grupları.....	27
3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulanması.....	30
3.4. DOR Hayvan Modeli Oluşturulması.....	30

3.5. Östrus Siklus Evrelerinin Saptanması	30
3.6. Deneklerden Kan Örneklerinin Alınması.....	31
3.7. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon Protokolü	31
3.8. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Doku Eldesi	31
3.9. Doku Takibi	32
3.10. Kesit Alınması	32
3.11. Hematoksilen-Eozin Boyaması	32
3.12. Ovaryan Folikül Sayımı.....	33
3.13. Gen Ekspresyon Analizi	33
3.13.1. RNA Eldesi.....	34
3.13.2. RNA Saflık Tayini.....	34
3.13.3. cDNA Eldesi.....	34
3.13.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)	34
3.14. ELISA.....	35
3.15. İstatistiksel Analiz	36
4. BULGULAR	37
4.1. Ağırlık Ölçümleri	37
4.1.1. Vücut Ağırlık Ölçümleri.....	37
4.1.1.1. Kontrol, Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerin Vücut Ağırlık Ölçümleri.....	37
4.1.1.2. Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Vücut Ağırlık Ölçümleri	38
4.1.1.3. Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Vücut Ağırlık Ölçümleri .	39
4.1.2. Ovaryum Ağırlık Ölçümleri.....	41
4.1.2.1. Kontrol, Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerin Toplam Ovaryum Ağırlık Ölçümleri.....	41
4.1.2.2. Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Toplam Ovaryum Ağırlık Ölçümleri	42
4.1.2.3. Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Toplam Ovaryum Ağırlık Ölçümleri	43
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular	44
4.2.1. Histomorfolojik Bulgular	44
4.2.1.1. Kontrol, Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerin Ovaryum Dokusu Histomorfolojik Bulguları.....	45
4.2.1.2. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Ovaryum Dokusu Histomorfolojik Bulguları.....	50
4.2.1.3. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Ovaryum Dokusu Histomorfolojik Bulguları.....	51
4.2.1.4. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Ovaryum Dokusu Histomorfolojik Bulguları.....	54

4.2.1.5. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Ovaryum Dokusu Histomorfolojik Bulguları.....	55
4.2.2. Morfometrik Bulgular	59
4.2.2.1. Kontrol, Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerin Folikül Sayıları	59
4.2.2.2. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Folikül Sayıları	60
4.2.2.3. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Folikül Sayıları	61
4.2.2.4. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Folikül Sayıları	62
4.2.2.5. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Folikül Sayıları	63
4.3. Biyokimyasal Bulgular	65
4.3.1. Gen Ekspresyon Analizi	65
4.3.1.1. Kontrol, Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerin COX-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri.....	65
4.3.1.2. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların COX-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri.....	66
4.3.1.3. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların COX-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri	68
4.3.1.4. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların COX-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri	69
4.3.1.5. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların COX-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri	70
4.3.2. ELISA.....	72
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	73
5.1. DOR Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Vücut Ağırlığına Etkisi.....	73
5.2. DOR Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Toplam Ovaryum Ağırlığına Etkisi.....	75
5.3. DOR Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Ovaryan Folikül Sayılarına Etkisi.....	76
5.4. DOR Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Ovaryum Dokusunda Histomorfolojik Etkileri	79
5.5. DOR Modelinin ve Tedavi Protokollerinin COX-2 Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkisi	82
5.6. Sonuç	87
6. KAYNAKLAR	88
7. SİMGELER VE KISALTMALAR	105
8. TEŞEKKÜR	106
9. ÖZGEÇMİŞ.....	107

TÜRKÇE ÖZET

Bu çalışmanın amacı infertilite sebeplerinden biri olan düşük over rezervi (DOR) olgularında, kontrollü ovaryan hiperstimülasyon (KOH) protokolüne eklenen dehidroepiandrosteronun (DHEA) etkinliğinin gösterilmesi ve moleküler etki mekanizmasının belirlenmesidir.

Düşük ve normal over rezervine sahip deney gruplarında, DHEA'nın hem tek başına ve hem de KOH protokolü birlikteliğinde etkinliğinin belirlenmesi amacıyla 75 adet Spraque-Dawley cinsi dişi sıçan 15 gruba ayrılmıştır. Çalışmamızda DOR hayvan modeli 15 gün boyunca 160 mg/kg/gün dozunda 4-Vinylcyclohexene diepoxide (VCD) enjeksiyonları ile oluşturulmuştur. Normal over rezervine sahip deneklere ise aynı süre boyunca Dimetil Sülfoksit (DMSO) enjeksiyonu yapılmıştır. VCD veya DMSO enjeksiyonları sonrasında DHEA enjeksiyonları 45 gün süresince 60 mg/kg/gün dozunda uygulanmıştır. Ardından deneklere KOH protokolü uygulanmıştır. Sakrifiye edilen deneklerden elde edilen ovaryum dokularında, Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniğiyle Siklooksijenaz-2 (COX-2) gen ekspresyon düzeyleri, hematoksilen-eozin boyamasıyla ise morfolojik değerlendirme ve ovaryan folikül sayımı gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen ovaryum dokularında VCD enjeksiyonlarının gelişiminin farklı evrelerdeki tüm foliküllerin sayılarında azalışa, atretik folikül sayılarında ve COX-2 gen ekspresyon düzeyinde artışa neden olduğu tespit edilmiştir. DHEA enjeksiyonları, normal over rezervine sahip deneklerde folikülogenez ve COX-2 gen ekspresyon düzeyine etki göstermezken, düşük over rezervli deneklerde DHEA'nın atretik folikül sayılarında azalışa, diğer tüm folikül tiplerinde ve COX-2 gen ekspresyon düzeyinde artışa neden olduğu saptanmıştır. Hem düşük hem de normal over rezervine sahip deney gruplarında KOH protokolü öncesinde DHEA uygulanması folikülogenezi olumlu yönde etkileyip KOH protokolü etkinliğini arttırmıştır. Ayrıca DHEA tüm deneklerde COX-2 gen ekspresyon düzeyini azaltıcı etki göstermiştir.

Bu çalışma; DOR hasta grubunda kullanılan DHEA'nın ovaryan mikroçevre üzerine olan etkinliği ve etki mekanizmasının aydınlatılmasında ve DHEA'nın KOH protokolüne eklenebilirliğiyle ilgili literatüre katkı sağlamıştır.

Anahtar Kelimeler: DOR, VCD, DHEA, KOH, COX-2

İNGİLİZCE ÖZET

Effect of Androgen Treatment on Ovarian Follicular Development in Diminished Ovarian Reserve in Vivo Rat Model

The aim of this study was to determine the efficacy and molecular mechanism of dehydroepiandrosterone (DHEA) that added to the controlled ovarian hyperstimulation (COH) protocol in cases of diminished ovarian reserve (DOR), which is one of the causes of infertility.

In order to determine the efficacy of DHEA both alone and combination with the COH protocol in the low and normal ovarian reserve experimental groups, 75 Sprague Dawley female rats were divided into 15 groups. In our study, the experimental animal model of DOR was composed by 4-Vinylcyclohexene diepoxide (VCD) injections at a dose of 160 mg/kg/day for 15 days. Subjects with normal ovarian reserve were injected with Dimethyl Sulfoxide (DMSO) for the same period. After VCD or DMSO injections, DHEA injections were administered at a dose of 60 mg/kg/day for 45 days. COH protocol was then applied to the subjects. In ovarian tissues obtained from sacrificed subjects, Cyclooxygenase-2 (COX-2) gene expression levels were analyzed by Polymerase Chain Reaction technique, morphological evaluation and ovarian follicle count were performed by hematoxylin-eosin staining.

It was determined that VCD injections caused a decrease in the number of follicles at different stages of development and an increase in the number of atretic follicles and COX-2 gene expression levels in the ovarian tissues. While DHEA injections did not affect folliculogenesis and COX-2 gene expression levels in subjects with normal ovarian reserve, it was determined that DHEA injections caused a decrease in atretic follicle counts and an increase in COX-2 gene expression levels in subjects with low ovarian reserve. DHEA injections before the COH protocol affected folliculogenesis positively in both low and normal ovarian reserve experimental groups, and thus enhanced the efficiency of the COH protocol. Also, DHEA decreased COX-2 gene expression levels in all subjects.

This study contributed to the literature on the effectiveness and molecular mechanism of the DHEA on the ovarian microenvironment and the appendability of DHEA in the COH protocol.

Key words: DOR, VCD, DHEA, COH, COX-2

1. GİRİŞ

İnfertilite üreme çağındaki çiftlerin büyük bir oranını ilgilendiren toplumsal bir sorundur. İnfertilite nedenleri arasında bulunan DOR tedavi protokollerinin tartışmalı olması, tedavi sonrası klinik başarının düşük olması ve insidansının giderek artması sebebiyle araştırmalara konu olmaktadır. Azalan folikül sayısı ve oosit kalitesi nedeniyle fertilizasyon, implantasyon, klinik gebelik ve canlı doğum oranlarında azalma, gelişen embriyolarda anöploidi görülme oranında ve embriyo transferi sonrası abortus insidansında artış görülmektedir. Belirtilen parametrelerin iyileştirilmesi amacıyla uygulanan tedavi protokolleri tartışmalı olup, en etkin tedavi yöntemi henüz tanımlanmamıştır. DOR olgularında klinik başarının sağlanacağı kalitede ve sayıda oosit elde edilebilmesi için ileri araştırmaların yapılması, bu imkânı sağlayacak KOH protokolü ve adjuvan tedavilerin etkinliği ve etki mekanizmalarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu çalışmada KOH protokolüne eklenen adjuvan ajanlardan biri olan, ancak etkinliği netlik kazanmamış DHEA'nın DOR olgularında klinik rolü ve etki mekanizması araştırılacaktır.

Endüstriyel bir kimyasal olan VCD, tekrarlayan dozlarla belirli bir süre kullanımının, selektif olarak sıçan ve fare primordiyal ve primer foliküllerinin sayısını apoptoz sürecini başlatarak azalttığı gösterilmiştir (Hu ve ark., 2001a; Hu ve ark., 2001b; Springer ve ark., 1996a; Springer ve ark., 1996b). KOH ise yardımcı üreme tedavileri dahilinde overlerden en ideal sayı ve kalitede oosit elde etmek amacı ile aynı siklusta çok sayıda folikülün geliştirilmesi tekniğidir. Yardımcı üreme teknikleri ile DOR tedavisinde ovaryan yanıtın iyileştirilmesi, çok sayıda folikülün geliştirilmesi, ideal sayı ve kalitede oosit elde edilmesi ve canlı doğum oranlarının artırılması amacıyla farklı KOH protokolleri geliştirilmiştir. DHEA adrenal bezlerde, ayrıca gonad dokusu ve beyinde üretilen bir androjendir. DHEA'nın, androstenedion, testosteron ve östradiolün öncülü olmakla birlikte, pubertenin başlangıcında rol oynadığı ve artan yaşla birlikte azaldığı bilinmektedir (Gleicher ve ark., 2010b). DOR olgularında DHEA kullanımının potansiyel yararları hakkında tartışmalar devam etmesine rağmen, dünyadaki birçok in vitro fertilizasyon (IVF) merkezleri

tarafından giderek daha fazla kullanılmakta ve ovaryan stimülasyona yanıt ve klinik sonuçlar üzerinde olumlu etkileri olacağı öngörülmektedir.

Perinükleer alanda lokalize bir enzim olan COX-2 (PTGS-2) ise araşidonik asiti prostaglandin H₂'ye (PGH₂) dönüştürür. PGH₂, PGE sentaz enzimi ile prostoglandin E₂'ye (PGE₂) dönüşür. PGE₂ ise folikül rüptürü ve ovaryum duvarındaki düz kas hücrelerinin kasılması sonucu ovulasyon ve fertilizasyonda etkilidir. Luteinizan hormone (LH) piki sonrası artan COX-2 granüloza hücrelerinde araşidonik asitten prostaglandin sentezine yol açar. Androjen ve COX-2 birlikteliği üzerine yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, androjen/androjen reseptör yolağının, periovuluar granüloza hücrelerinde COX-2 ekspresyonu yoluyla ovulatuvar süreçte yer aldığı gösterilmiştir.

Bu bulgular ışığında bu çalışmada, düşük ovaryan rezerv olgularında, KOH protokolüne eklenen DHEA'nın ovaryan foliküllerin gelişimine etkisi ovaryan mikroçevre düzeyinde COX-2 ekspresyonu üzerinden gerçekleşir hipotezinden yola çıkılarak; sıçan düşük ovaryan rezerv modeli oluşturulmuş ve kontrol deneklerde DHEA'nın tek başına ve kontrollü ovaryan stimülasyon protokolü ile birlikte kullanımının ovaryan folikül gelişimi ve COX-2 gen ekspresyon düzeyi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

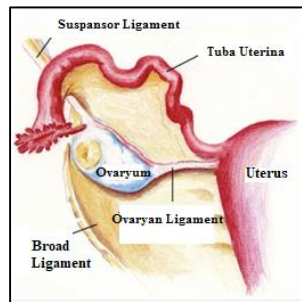
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum

Ovaryumlar, dişi üreme sisteminde pelvik boşluğun yan duvarlarına dayalı, uterusun her iki yanında yerleşmiş olan organlardır. Ovaryumun, gametlerin üretilmesi (gametogenez) ve steroid yapıdaki hormonların (östrojen ve progesteron) sentezlenip salgılanması olarak birbiri ile ilişkili iki fonksiyonu bulunmaktadır. Ovaryum tarafından salınan steroid hormonların; iç ve dış genital organların büyümesi ve olgunlaşması, meme bezinin gelişimi ve menstrual siklusun düzenlenmesi gibi önemli görevleri vardır. Ovaryumdaki değişimlerin büyük kısmı ön hipofizden salgılanan gonadotropik hormonlar olan folikül stimulan hormon (FSH) ve LH tarafından kontrol edilir (Ross ve Pawlina, 2014).

2.1.1. Ovaryumun Anatomisi

Ovaryumlar bir çift, badem şekilli, pembemsi beyaz renkli, 3 cm boyunda, 1,5 cm eninde ve 1 cm kalınlığında organlardır. Her ovaryum, mezovaryum denen peritoneal katlantı tarafından broad ligamentin posterior yüzeyine bağlanır. Ovaryumun üst kutbu, ovaryumun sinirlerini ve damarlarını taşıyan suspensor ligament tarafından pelvis duvarına bağlanır. Ovaryumun alt kutbu ise ovaryan ligament tarafından uterusu bağlanır. Bu ligament, gelişmekte olan gonadı pelvisin tabanına bağlayan embriyonik fibröz kordon olan gubernakulumun bir kalıntısıdır. Puberteden önce ovaryum yüzeyi düzgün iken, üreme çağında tekrarlanan ovulasyonlar nedeniyle skarlı ve düzensiz bir hal alır (Şekil 1) (Ross ve Pawlina, 2014; Saksouk ve Johnson, 2004).



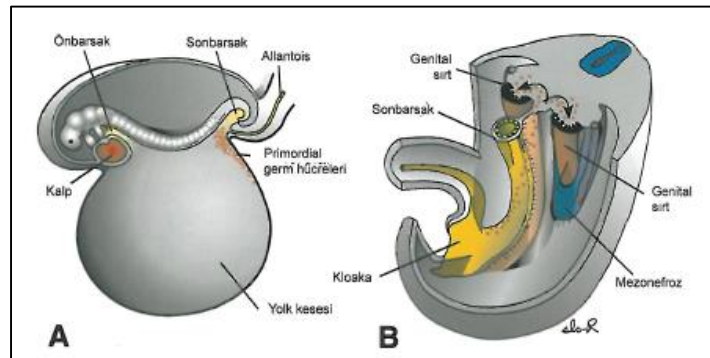
Şekil 1. Ovaryumun anatomisi (Saksouk ve Johnson, 2004).

2.1.2. Ovaryum Embriyolojisi

Çok sayıda genin rol oynadığı cinsiyet farklılaşma süreci, Y kromozomunun kısa kolunda lokalize SR Y geni (p11, Y kromozomundaki seks belirleyici bölge) tarafından kontrol edilir. SR Y geninin kodladığı Testis Belirleyici Faktör'ün (TBF) varlığında embriyonun cinsiyeti erkek, bulunmaması durumunda embriyonun cinsiyeti dişi yönünde gelişir.

Gonadlar (testisler ve ovaryumlar) posterior abdominal duvarı döşeyen sölom epiteli, altındaki mezenşim (embriyonik bağ dokusu) ve primordiyal germ hücreleri (PGH) olmak üzere üç kaynaktan köken alır (Şeftalioğlu, 1998). Ovaryan gelişim; farklılaşmamış gonad aşaması, primordiyal germ hücrelerin oluşumu sonrası göçü ve ovaryumların farklılaşması olmak üzere üç aşamada gerçekleşir (Moore ve ark., 2008).

Gonadlar başlangıçta sölomik epitelin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla uzunlamasına oluşmuş bir çift genital kabartı olarak belirirler. Primordiyal germ hücreleri ise gelişimin 3. haftasında yolk kesesinin allontoise yakın olan duvarındaki endoderm hücreleri arasında görülürler. Son bağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ilerleyerek 5. haftanın başında primitif gonadlara, 6. haftada ise genital kabartılara ulaşırlar. Primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi ile gonadlar ovaryum veya testis yönünde diferansiye olur ve bu hücrelerin genital kabartılara göçünün gerçekleşmediği durumda gonadal gelişim gerçekleşmez (Moore ve ark., 2008; Sadler, 1993). Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara göçü ile genital kabartı epiteli proliferer olur ve epitel hücreleri mezenşimin içine gömülürler. Bu şekilde irregular şekilli primitif cinsiyet kordonları oluşur. Bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır. Bu aşamadaki gonadlar farklılaşmamış gonad olarak isimlendirilir (Sadler, 1993).



Şekil 2. Ovaryum embriyolojisi (Sadler, 1993)

Primitif cinsiyet kordonları farklanmamış ovaryum dokusunun meduller bölgesinde kaybolarak yerlerini vasküler bir stromaya (ovaryan medulla) bırakırlar. Dişi gonadın yüzey epiteli çoğalmaya devam ederek yüzeye yakın ikinci nesil kordonlar olan kortikal kordonların oluşumunda katılır. Dördüncü ayda bu kordonlar her biri bir veya daha çok sayıda primitif germ hücrelerini çevreleyen izole hücre toplulukları haline gelirler. Bu germ hücreleri zamanla oogoniaya dönüşürken, yüzey epitelinde göç eden ve germ hücrelerini çevreleyen epitel hücrelerinden de foliküler hücreler meydana gelir.

PGH öncelikle oogonyumlara, sonrasında gestasyonun 12. haftasında primer oositlere dönüşürler. Primer oosit gelişimi ile birlikte mayoz bölünme süreci başlar. Primordiyal folikül en basit folikül yapısı olup, I. mayoz bölünmenin profaz safhasında bekleyen primer oosit ve çevresindeki pregranüloza olarak da adlandırılan yassı tek katlı epitel hücrelerinden oluşur. Folikülogenez süreci gestasyonun 18. haftasında pregranüloza hücrelerinin aktivasyonu ile başlar. İntrauterin dönemde bulunan yaklaşık 7 000 000 oogonyum, yenidoğan dönemine kadar geçen sürede atreziye uğrar ve ovaryumda 1 000 000 primordiyal folikül kalır. Puberteye kadar geçen sürede atrezi devam ederek primordiyal folikül sayısı yaklaşık 400 000'e düşer. Her bir menstruel siklusta primordiyal foliküller aktive olarak büyümeye ve gelişimlerine devam ederler. Siklusun ortasında gelişen foliküllerden bir tanesi dominant folikül olarak seçilir ve ovulasyona uğrar (De Felici, 2013).

2.1.3. Ovaryumun Histolojisi

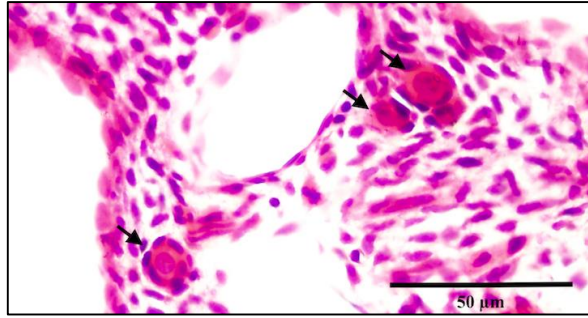
Ovaryum yüzeyi tek katlı yassı ya da tek katlı alçak kübik epitel ile döşelidir. Germinal epitel olarak isimlendirilen bu hücre katman, mezovaryumu örten mezotelyum ile devamlılık gösterir. Germinal epitel ile altındaki korteks arasında tunika albuginea olarak isimlendirilen kollajen ve retiküler liflerden zengin sıkı bağ dokusu tabakası bulunur. Ovaryum, sınırları net ayırt edilemeyen korteks ve medulla olmak üzere iki ayrı bölgeden oluşur. Medulla ovaryumun merkezi bölgesinde yer alır ve gevşek bağ dokusu ile hilus boyunca ovaryuma ulaşan kan damarları, lenf damarları ve sinirleri içerir. Medullayı çevreleyen periferik kısım olan korteks ise gelişiminin değişik aşamalarındaki folikülleri içerir (Şekil 3). Foliküller ovaryan rezervi oluşturan primordiyal foliküller ve büyümekte olan foliküller olmak üzere sınıflandırılırlar (Ross ve Pawlina, 2014).



Şekil 3. Ovaryum doku kesitinde genel görünüm

2.1.3.1. Primordiyal Foliküller

Primordiyal foliküller fetal gelişimin 3. ayında ortaya çıkar ve foliküler gelişimin en erken aşamasıdır. Gelişimleri gonadotropinlerden bağımsız olan primordiyal foliküller puberteden önce bulunan tek folikül tipi olarak ovaryan rezervi oluştururlar. Korteks stromasında tunika albugineanın altında yer alırlar. Tek tabaka halindeki yassı folikül hücreleri olan pregranüloza hücreleri ve bu hücrelerin çevrelediği primer oositin oluşur. Folikül hücrelerinin dış yüzeyi bazal lamina ile sınırlanmıştır. Folikül içerisindeki primer oositin çapı 30 µm olup, iyi dağılmış kromatin ve bir ya da daha fazla nukleolus içeren eksantrik bir nukleusa sahiptir (Şekil 4) (Lazar, 2002; Ross ve Pawlina, 2014).



Şekil 4. Primordiyal foliküller (siyah ok)

2.1.3.2. Büyümekte Olan Foliküller

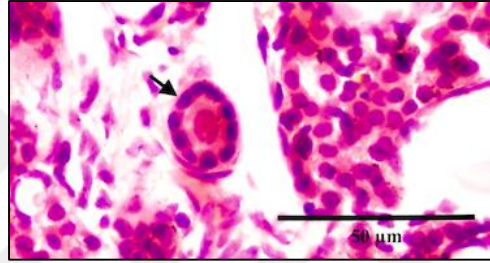
2.1.3.2.1. Primer Foliküller

Primordiyal folikül endokrin etkileşimlerin etkisi altında büyümekte olan foliküle dönüşürken, oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler

meydana gelir. İlk olarak oositin hücresel olarak çapı artar, çevresindeki yassı folikül hücreleri proliferasyon olarak kübik hale gelirler. Kübik formda bulunan folikül hücreleri granuloza hücreleri, gelişen bu folikül ise primer folikül olarak isimlendirilir. Primer foliküller granuloza hücrelerinin bölünme oranına bağlı olarak unilaminar ve multilaminar olmak üzere iki farklı aşamada değerlendirilirler.

2.1.3.2.1.1. Unilaminar primer foliküller

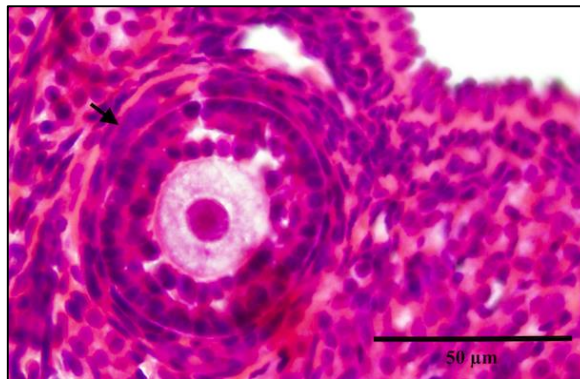
Primer oosit ve onu çevreleyen tek tabakalı kübik granuloza hücrelerinden oluşur. Bu aşamada, oosit ve folikül hücreleri arasında glikojenden zengin zona pellucida oluşmaya başlar (Şekil 5).



Şekil 5. Unilaminar primer folikül (siyah ok)

2.1.3.2.1.2. Multilaminar Primer Foliküller:

Primer oosit ve onu çevreleyen birden çok hücre tabakalı kübik granuloza hücrelerinden oluşur. Bu aşamada zona pellucida kalınlaşır, folikülü çevreleyen stromal hücreleri farklılaşır ve teka folikülü oluşmaya başlar (Şekil 6).



Şekil 6. Multilaminar primer folikül

2.1.3.2.2. Sekonder (Antral) Foliküller

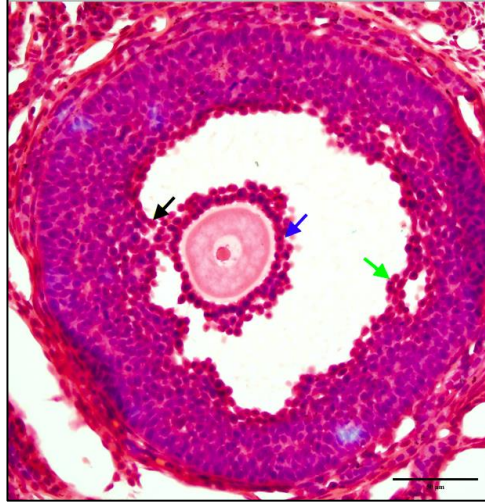
Multilaminar primer folikül granüloza hücrelerinin proliferasyonu ile büyür. Büyümekte olan folikül ovaryan stromanın derinlerine doğru yerleşim gösterir. Granüloza hücre tabakası 6-12 sıralı hücre katmanına ulaştığında hücreler arasında oluşan boşluklar, granüloza hücreleri kaynaklı hyaluronandan zengin sıvı (liquor folliculi) ile dolmaya başlar. Daha sonra kaviteler birleşerek tek, yarım ay şeklinde antrum olarak isimlendirilen bir boşluğa dönüşür. Bu aşamadaki foliküle sekonder veya antral folikül adı verilir. Folikülün etrafındaki stromal hücreler granüloza hücrelerinin proliferasyonu sonrası teka foliküliyi oluştururlar. Teka folikülünün diferansiyasyonu sonrası teka interna ve teka eksterna olarak isimlendirilen iki tabaka meydana gelir. Teka interna steroid sentezinden sorumlu kübik hücrelerden oluşan yüksek oranda vaskülarize iç tabakadır. Teka eksterna ise vasküler bağ dokusu özelliğinde, düz kas hücreleri ve kollajen lifler içeren dış tabakadır (Şekil 7) (Lazar, 2002; Ross ve Pawlina, 2014; Young ve ark., 1967).



Şekil 7. Sekonder (Antral) folikül

2.1.3.2.3. Matür (Graaf) foliküller

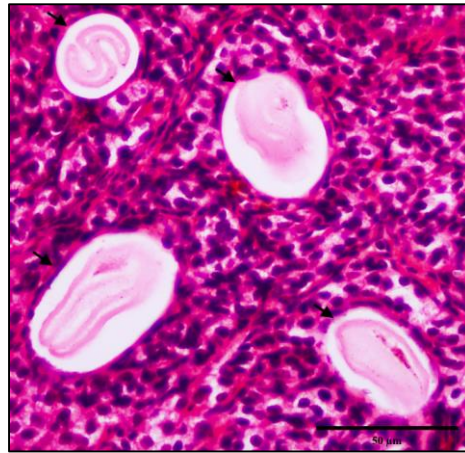
Sekonder folikülün boyut artışına antrumdaki genişleme eşlik eder. Granüloza hücreleri oositle ilişkili olduğu bölgede antruma doğru kumulus ooforus adı verilen tepeciği oluştururlar. Oosit folikülün bir tarafına çekilir ve etrafını birkaç sıra granüloza hücresi (korona radiata) çevreler. Bu aşamadaki folikül matür (graaf) folikül olarak isimlendirilir (Şekil 8).



Şekil 8. Matür (Graaf) folikül. (Kumulus ooforus (siyah ok), korona radiata (mavi ok) ve mural granüloza tabakası (yeşil ok))

2.1.3.2.4. Atretik Foliküller:

Folikülogenez sürecinde her menstrual siklusta sadece bir folikül tam olarak olgunlaşır. Foliküllerin büyük bir kısmı gelişimin farklı evrelerinde atreziye uğrar. Atrezi sürecinde önce oosit, sonra granüloza hücreleri dejenere olur. Primordiyal foliküllerin atrezisi sonrası oluşan boşluklar hızlı bir şekilde ovaryan stroma ile doldurulduğu için, ovaryum kesitlerinde atretik primordiyal foliküller görülmez. Atretik foliküllerin kalıntıları makrofajlar tarafından fagosite edilir ve kalan boşluklar stromal hücreler tarafından doldurup kollajenöz skar dokusu oluşur. Sonuç olarak camsı membran olarak isimlendirilen dalgalı hyalinize bant yapısı oluşur (Şekil 9).



Şekil 9. Atretik foliküller (siyah ok)

2.2. Sıçanlarda Dişi Üreme Sistemi

Sıçan ve insanda doğum sonrası gelişim dönemleri farklı sürelerde gerçekleşir (Tablo1) (Elmore, 2016). Dişi üreme sistemi açısından değerlendirildiğinde ise sıçanlarda ovaryum, tuba uterina, uterus, serviks ve vajina prenatal dönemde immatür olup, postnatal süreçte gelişimini tamamlar.

Tablo 1. Sıçan ve insanda doğum sonrası gelişim dönemleri (Elmore, 2016)

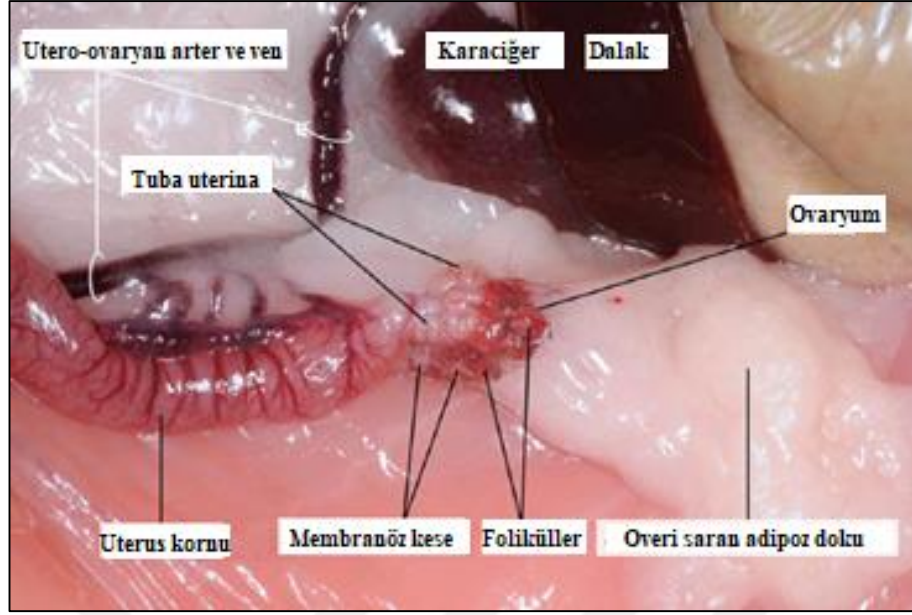
Sıçan/İnsan Dönem Adı	Sıçan	İnsan
Neonatal / Yenidoğan	0-7 gün	0-28 gün
İnfantil / İnfant	8-20 gün	1-2 ay
Juvenil / Çocuk	21-32 gün	2-12 ay
Peripubertal / Adölesan	33-37 gün	12-16 yaş
Geç pubertal / Adölesan	38-46 gün	

2.2.1. Sıçanlarda Ovaryum Anatomisi

Sıçanlarda ovaryum bilateral olarak, orta hattan yaklaşık 1 cm lateralde ve böbreğin birkaç milimetre kaudalinde bulunur. Sıçan ovaryumu yaklaşık 5 mm çapında ve ortalama 60 mg ağırlığındadır (Şekil 10, 11) (Elmore, 2016; Löw ve ark., 2016).



Şekil 10. Sıçanlarda dişi üreme sistem anatomisi (Löw ve ark., 2016)



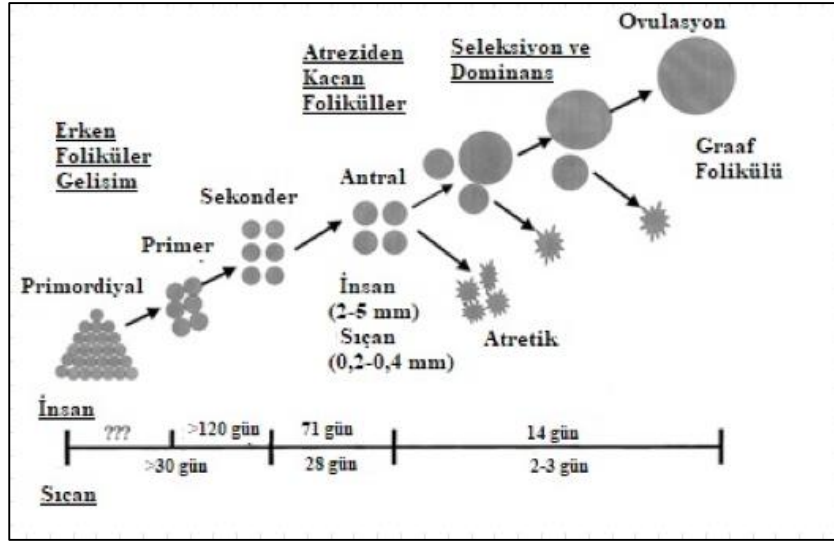
Şekil 11. Sıçanlarda uterus, tuba uterina ve ovaryum anatomisi (Löw ve ark., 2016)

2.2.2. Sıçanlarda Ovaryum Embriyolojisi

Sıçanlarda ovaryum gelişimi insanlardakine benzemekle birlikte zamanlama farklılıkları bulunmaktadır. Sıçanlarda gebeliğin 10. gününde genital çıkıntılar belirmeye başlar (Guigon ve Magre, 2006). Prenatal 11. günde primordiyal germ hücreleri genital çıkıntılara göç ederler ve mitotik bölünmeler ile sayıları artar. Doğumda, sıçan ovaryumu kordonlar ve oogonyalardan oluşur. Primordiyal foliküller doğumdan sonra, 3. günün sonunda oluşurlar. Postnatal 3. günden sonra ovaryumda her biri az miktarda yassı pregranuloza hücresi ile çevrili 27 000 civarında oosit bulunur. Postnatal 18,5 günde sayıları yaklaşık 75 000 civarındadır (Cappellen, 1998).

2.2.3. Sıçanlarda Foliküler Gelişim

Sıçanlarda folikül gelişimi postnatal 10. güne kadar hipofizden salgılanan hormonlardan bağımsız olup, sonrasında gonadotropin bağımlı gerçekleşir. Korteks ve medulla ayrımı postnatal 27. günde belirginleşir. Sıçan ovaryumunda folikülogenez süreci primordiyal folikülden (25 µm) matür foliküle (500-800 µm), yaklaşık 60 günde gerçekleşir (Şekil 12) (McGee ve Hsueh, 2000).



Şekil 12. Sıçan ve insan ovaryumunda folikülojeniz süreleri (McGee ve Hsueh, 2000)

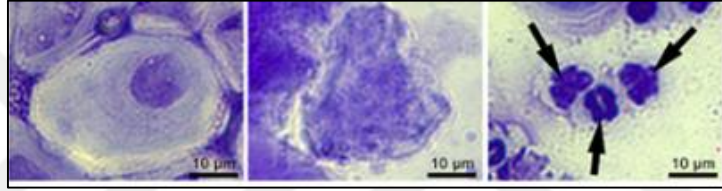
Sıçan ovaryumunda ilk olarak postnatal 3.günde kortekste, tunika albugineanın hemen altında, 11-15 μm çapındaki primer oositi çevreleyen 17-20 μm çapında olan primordiyal foliküller gözlemlenir (Boubekri ve ark., 2007). Foliküler hücreleri çevreleyen bazal lamina foliküler hücreler ile stromal hücreler arasında ayırım yapılmasını sağlar. Unilaminer primer folikül aşamasında folikül çapı 27,5 μm 'ye ulaşır ve 8-13 adet granüloza hücresi ile çevrili 16,3 μm çapında oosit içerir (Boubekri ve ark., 2007). Multilaminer primer folikül aşamasında ise folikül çapı 63,6 μm 'ye ulaşır. Bu aşamadaki folikül 25-29 adet granüloza hücresi ile çevrili 38,5 μm çapında oosit içerir. Antral folikül aşamasında folikül boyutu 70 μm 'ye, matür folikül aşamasında ise 500 μm 'ye ulaşır (Boubekri ve ark., 2007).

Postnatal 35. günde ilk ovulasyon meydana gelir. İnsanlardan farklı olarak, sıçanlarda ovulasyon sürecinde birden çok oosit atılır (Helke, 2018) ve östrus fazından 8-11 saat sonra gerçekleşir (Cossigny ve ark., 2012). Ovulasyonun başarılı olarak gerçekleşmiş olduğu, ovaryum doku kesitlerinde korpus luteumun gözlemlenmesi ile tespit edilir. Korpus luteum birkaç östrus döngüsü boyunca varlığını sürdürmesi sebebiyle ovaryum doku kesitlerinde eski ve yeni sıklusa ait korpus luteumlar gözlemlenebilir. Sıçanlarda premenapozal dönemde gözlemlenen düzensiz östrus siklusları, Wistar-Albino cinsinde postnatal 12. ayda, Sprague-Dawley cinsinde ise 8. ayda başlar. Wistar-Albino cinsi sıçanlar 12. ayın sonunda

persistent sıklusa girerler. Sonrasında persistent diöstrus ve ardından anöstrus dönemleri gözlemlenir (Suttie ve ark., 2017).

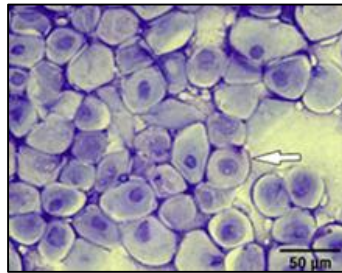
2.2.4. Östrus Siklusu

İnsanlarda yaklaşık 28 gün süren menstrual siklus, sıçanlarda 4-5 günde insanlardakine benzer olarak çeşitli hormonların kontrolü altında tamamlanır ve östrus siklusu olarak isimlendirilir. Sıçanlarda gerçekleşen bu üreme siklusu proöstrus, östrus, metöstrus ve diöstrus olmak üzere 4 evreden oluşur. Bu evreler vajinal smear yöntemi ile elde edilen vajinal epitel hücrelerinin farklı histolojik görünüşleri sayesinde ayırt edilir (Şekil 13) (Marcondes ve ark., 2002; McLean ve ark., 2012).



Şekil 13. Sıçan vajinal smear örneğinde hücre tipleri. (A) Nükleuslu epitel hücresi (B) Keratinize epitel hücresi (C) Lökositler (siyah ok) (McLean ve ark., 2012)

Östrus siklusunun proöstrus evresi 12-14 saat sürmekle birlikte, bu evrede alınan vajinal smear örneğinde yoğun olarak küçük, yassı, nükleuslu epitel hücreleri gözlemlenir (Şekil 14) (McLean ve ark., 2012).



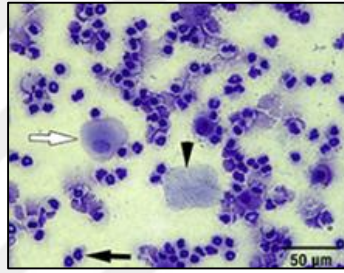
Şekil 14. Sıçan vajinal smear örneğinde nükleuslu epitel hücreleri (beyaz ok) ile karakterize proöstrus evre değerlendirilmesi (McLean ve ark., 2012)

Östrus evresi ise nükleusunu kaybetmiş keratinize epitel hücrelerin varlığı ile karakterizedir ve 25-27 saat sürer (Şekil 15) (McLean ve ark., 2012).



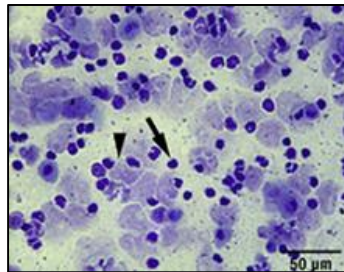
Şekil 15. Sıçan vajinal smear örneğinde keratinize epitel hücreleri (siyah ok başı) ile karakterize östrus evre değerlendirilmesi (McLean ve ark., 2012)

Östrus evresini metaöstrus evresi izler ve 6-8 saat sürer. Metaöstrus evresinde epitel hücrelerinin yoğun olduğu ve bu hücelere çok sayıda lökositin eşlik ettiği tespit edilir (Şekil 16) (McLean ve ark., 2012).



Şekil 16. Sıçan vajinal smear örneğinde nükleuslu epitel hücresi (beyaz ok), keratinize epitel hücresi (siyah ok başı) ve lökosit (siyah ok) birlikteliği ile karakterize metaöstrus evre değerlendirilmesi (McLean ve ark., 2012)

Diöstrus evresi 55-57 saat sürer ve ağırlıklı olarak lökositler, çok az sayıda nükleuslu epitel hücreleri gözlemlenir (Şekil 17) (McLean ve ark., 2012; Singletary ve ark., 2005).



Şekil 17. Sıçanlarda vajinal smear ile az sayıda nükleuslu epitel hücresi (siyah ok başı) ve çok sayıda lökosit (siyah ok) ile karakterize diöstrus değerlendirilmesi (McLean ve ark., 2012)

2.3. Ovaryum Rezervi

Ovaryum rezervi folikülogenez ve steroidogenez fonksiyonlarını gerçekleştirecek foliküllerin kantitatif ve kalitatif durumunu gösteren ve ovaryumun potansiyel kapasitesini belirleyen bir tanımdır. Primordiyal folikül havuzu ovaryan potansiyelin belirlenmesinde en önemli parametredir (Lass, 2001; Seifer ve ark., 1997).

İntrauterin dönemde yaklaşık 7 000 000 oogonyum bulunmasına rağmen, yeni doğan döneminde 1 000 000 primordiyal folikül kalır. Puberteye kadar primordiyal foliküllerin büyük bir oranı atreziye uğrar ve puberte başlangıcında ovaryumda bulunan folikül sayısı yaklaşık 400 000 düşerek primordiyal havuzu temsil eder. Ovaryum rezervinin belirlenmesinde, yaşa bağlı değerlendirme gibi klinik bulgular, bazal serum FSH, antimüllerian hormon (AMH), inhibin B, östradiol gibi biyokimyasal parametreler ve ultrasonografik olarak ovaryum hacmi, antral folikül sayısının ölçümü gibi yöntemler kullanılır.

2.4. İnfertilite ve Düşük Over Rezervi

Dünya Sağlık Örgütüne (WHO) göre düzenli ve korunmasız cinsel ilişkiye rağmen 1 yıl boyunca gebe kalınmaması olarak tanımlanan infertilite, reproduktif periyotta olan çiftlerin %15'ini ilgilendiren toplumsal bir sorundur (Thoma ve ark., 2013). WHO infertilitenin küresel bir sağlık sorunu olduğunu ve bu yüzyılda kanser ve kardiyovasküler hastalıklardan sonra üçüncü en ciddi sağlık sorunu olacağını öngörmektedir. ABD'de 2011-2013 yılları arasında 15-44 yaş aralığındaki 61 000 000 kadının yaklaşık 7 000 000'u hayatlarında bir süre infertiliteye yönelik tedavi hizmeti aldığı raporlanmıştır (Centers for National Disease Control and Prevention, 2009).

İnfertilitenin hem erkek hem de kadın faktör ilişkili birçok nedeni bulunmakla birlikte, DOR olguları infertil çiftlerin %11,5 gibi büyük bir bölümünü oluşturmaktadır (Centers for National Disease Control and Prevention, 2009). DOR primordiyal folikül sayısında ve oosit kalitesinde azalmayı ifade eder. İmplantasyon oranında azalma, embriyoda artan kromozomal anomali insidansı ve abortus oranının artması gibi sorunlarla birlikte görülür (Broekmans ve ark., 2009). İlerleyen yaşlarda görülmekle birlikte genç hastalarda da görülebilmektedir (Te Velde ve Pearson,

2002). DOR tedavisinde; overlerde folikülogenez ve steroidogenez fonksiyonunu yerine getirecek foliküllerin sayısını, kalitesini ve yeterliliğini artırma amaçlı yardımcı üreme tekniklerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ancak olguların ovaryan stimülasyona zayıf yanıt vermesi sorun oluşturmaktadır (Reed ve ark., 2015). ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) 2014 raporunda tüm IVF sikluslarında canlı doğum oranının % 27 olduğu, infertilitenin nedenlerine göre canlı doğum oranının azaldığı ve DOR tanılı hasta grubunda bu oranın en düşük olup, %14,6 olduğu rapor edilmiştir (Centers for National Disease Control and Prevention, 2009). Aynı raporda oosit donasyonunun en çok DOR hasta grubunda kullanılan tedavi seçeneği olduğu belirtilmiştir. Tüm bu veriler göz önüne alındığında, DOR olgularında klinik başarının elde edileceği kalitede ve sayıda oosit elde edilebilmesi için ileri araştırmaların yapılması, bu imkânı sağlayacak KOH protokolü ve protokole eklenebilecek adjuvan tedaviler geliştirilmesi gerekmektedir. Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında DOR olgularında uygulanan tedavi yaklaşımları tartışmalıdır (Ubaldi ve ark., 2014). Araştırmacıların DOR olgularında en etkin tedavi protokolünü seçmekte karşılaştıkları güçlükler Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 2. Araştırmacıların DOR olgularında en etkin tedavi protokolünü seçmekte karşılaştıkları güçlükler

1	Birçok çalışmada hasta sayısının az olması sebebiyle uygulanan tedavi protokolleri arasında anlamlı fark saptanma oranının düşük olması
2	DOR tanımlama kriterlerinin çalışmalarda standart olmaması, literatürde homojen bir hasta grubunun olmaması
3	Genetik faktörler, yaşlanma, otoimmün hastalıklar, adrenal bez bozuklukları ve iatrojenik nedenler gibi nedenler dışında, DOR etyolojisinin tespit edilemediği durumlarda DOR gelişme mekanizmasının bilinmemesi
4	DOR olgularında uygulanan adjuvan ajanların etki mekanizmalarının henüz tam olarak tespit edilememiş olması
5	Çalışmalarda sonuçların değerlendirilmesi için farklı bitiş noktaları kullanılmış olması
6	Kısıtlı sayıda ve tartışmalı randomize kontrollü çalışma (RCT) varlığı
7	Kısıtlı sayıda çalışmanın dahil edilmesi ile yapılan meta-analizlerin sınırlı anlamlılık değeri

Literatür incelendiğinde DOR kriterleri ve tanımlamaları üzerinde tam bir fikir birliği bulunmamaktadır. Yapılan çalışmalarda DOR olgularının tanımlamasında kriter olarak; bazal FSH ve estradiol (E2) seviyesi, antral folikül sayısı (AFC), AMH seviyesi, FSH/ LH oranı ve bir önceki stimülasyon protokolünde az sayıda oosit elde edilmesi gibi farklı kriterler kullanılmıştır (Tablo3). Evrensel tek bir tanımın olmaması, yapılmış olan çalışmalarda uygulanmış olan tedavi protokollerini karşılaştırmayı zorlaştıran en önemli faktörlerden biridir. Tablo 3’de farklı çalışmalarda DOR tanımlamasında kullanılan kriterler özetlenmiştir.

Tablo 3. Çalışmalarda DOR tanımlamasında kullanılan kriterler

	FSH	Estradiol	AFC	AMH	FSH/LH oranı	Önceki IVF sonuçları
(Merhi ve ark., 2013)	>10 IU/l					
(Buyuk ve ark., 2011)	>10 IU/l					
(Gleicher ve ark., 2009) (Gleicher ve ark., 2010b)	<33 yaş-->7 IU/l 33-37 yaş-->7.9 IU/l 38-40 yaş-->8.4 IU/l			<0.8 ng/ml		
(Lu ve ark., 2014)	>10 IU/l				>3	
(Gleicher ve Barad, 2006)	>9.9 IU/l	>74.9 IU/l				<7 oosit ya da <4 embriyo
(Kara ve ark., 2014)	>15 IU/l		<4	<1 ng/ml		
(Yılmaz ve ark., 2013)			<5	<1.1 ng/ml		≤3 oosit
(Check ve ark., 2007)	>12 IU/l		≤3			
(Kumbak ve ark., 2005)			<6			
(H. H. Zhang ve ark., 2014)	>10 IU/l		<5		>3	<5 oosit
(Narkwichean ve ark., 2013)			≤10	≤5 pmol/l		

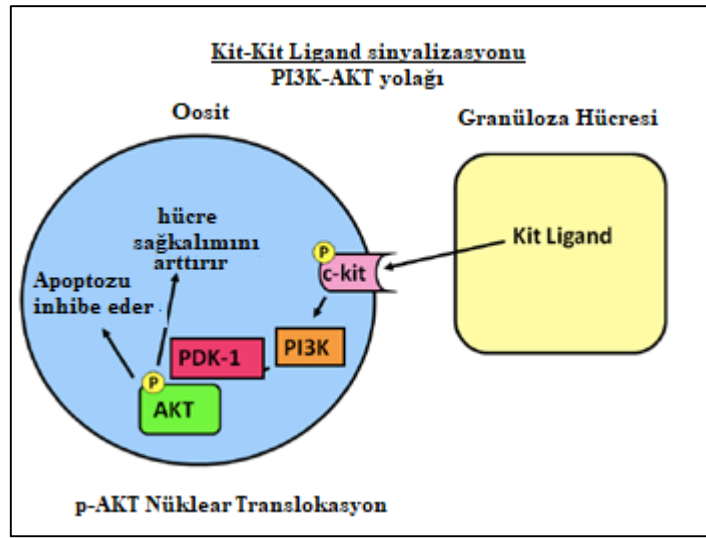
2.5. DOR Hayvan Modelleri

Over rezervinin azaltılması ve deneysel DOR hayvan modelinin oluşturulması amacıyla neonatal aşırı beslenme (Sominsky ve ark., 2016), yaşlanma (Acuña ve ark., 2009), FOXL2 knockout farelerde prematür ovaryan yetmezlik (POF) (Moumné ve ark., 2008), streptozosin ile diabetik hayvan modeli oluşturma (Erbas ve ark., 2014), maternal besin kısıtlaması (Mossa ve ark., 2013), maternal polikistik aromatik hidrokarbon maruziyeti (Jurisicova ve ark., 2007), intrauterin androgen maruziyeti (Dumesic ve ark., 2002), embriyonik 10. gün galaktosiltransferaz antikorunu enjeksiyonu (Banerjee ve ark., 2014), ozon inhalasyonu (Shi ve ark., 2016), isotretinoin (retinoik asit) kullanımı (Abali ve ark., 2013), tubal ligasyon, over torsiyonu ve histerektomi gibi cerrahi yöntemler (Chalmers, 1996; Hakverdi ve ark., 1994; Kaya ve ark., 2014) ve VCD enjeksiyonu (Hassa ve ark., 2015; Li ve ark., 2014; Kuang ve ark., 2016; Mayer ve ark., 2002; Sun ve ark., 2006) gibi farklı yöntemler kullanılmaktadır.

2.6. VCD

Endüstriyel bir kimyasal olan VCD'nin, tekrarlayan dozlarla belirli bir süre kullanımının, selektif olarak sıçan ve fare primordiyal ve primer foliküllerinin sayısını apoptoz sürecini başlatarak azalttığı gösterilmiştir (Hu ve ark., 2001a; Hu ve ark., 2001b; Springer ve ark., 1996a, Springer ve ark., 1996b). Primordiyal ve primer foliküllerde KIT / KITLG yolağı oosit canlılığı ve sağkalımında etkin rol oynar (Jin ve ark., 2005; Parrott ve Skinner, 1999). Granüloza hücreleri tarafından üretilen kit

ligandı (KITLG), oosit üzerindeki tirozin kinaz reseptörü olan KIT'e bağlanır. Bu bağlanma KIT otofosforilasyonu ve ardından fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) sinyal yolağının aktivasyonu ile sonuçlanır (Reddy ve ark., 2005). Aktive olan PI3K, nükleusta transloke olup, apoptoz inhibisyonu ve hücre sağkalımını sağlayan protein kinaz AKT'ı (pAKT) fosforile edip aktivasyonunu gerçekleştirir (Şekil 18) (Liu ve ark., 2006; Kappeler ve Hoyer, 2012; Reddy ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda primordiyal ve primer foliküllerin FSH reseptörü içermediği ve canlılıklarını KITLG / KIT sinyali üzerinden korudukları gösterilmiştir (Parrott ve Skinner, 1999; Yoshida ve ark., 1997).



Şekil 18. KIT / KITLG sinyal yolağı (Kappeler ve Hoyer, 2012)

Yapılan çalışmalarda VCD'nin KIT mRNA ekspresyonunda düşüşe ve KITLG mRNA ekspresyonunda artışa sebep olduğu ve KITLG / KIT sinyal yolunun inhibisyonunun ovaryum için toksik etkileri olduğu gösterilmiştir (Keating ve ark., 2009; Keating ve ark., 2011). İn vitro kültür çalışmasında VCD'nin pAKT ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Keating ve ark., 2009). VCD'nin selektif olarak preantral foliküller üzerine olan etkisi in vitro olarak sıçan ovaryum doku kültüründe de tespit edilmiştir (Devine ve ark., 2002). Aynı zamanda VCD enjeksiyonu ile oluşturulan deneysel hayvan modeli; kardiyovasküler hastalıklar (Mayer ve ark., 2005), diyabet ve diyabetik böbrek hasarı (Keck ve ark., 2007), kemik kaybı (Wright ve ark., 2008), insülin direnci ve metabolik sendrom (Romero-Aleshire ve ark., 2009), neoplazma gelişimi (Craig ve ark., 2010) ve fertilityle (Sahambi ve ark., 2008) ilişkili perimenopozal ve postmenopozal değişiklikleri

incelemek için de kullanılmıştır. VCD ile oluşturulacak DOR hayvan modelinin avantajları Tablo 4’te özetlenmiştir.

Tablo 4. VCD enjeksiyonu ile oluşturulan DOR hayvan modelinin avantajları

(Hoyer ve Sipes, 2007b; Keating ve ark., 2009)	Selektif olarak sıçan ve fare primordiyal ve primer foliküllerinin sayısını apoptoz sürecini başlatarak azaltması
(Mayer ve ark., 2002)	Uygun perimenapozal hormonal değişikliklere (östrojen, FSH, LH) sebep olması
(Van Kempen ve ark., 2011)	Hayvanlarda genetik değişikliklerin yapılmaması
(Van Kempen ve ark., 2011)	Cerrahi bir işlem uygulanmaması
(Mayer ve ark., 2002)	Hem in vivo hemde in vitro test edilmiş olması
(Muhammad ve ark., 2009)	Çevresel dokuları etkilememesi
(Mayer ve ark., 2004)	VCD enjeksiyonlarından sonra belirlenen zaman aralıkları hesaplanarak pre-, peri-, post- menapozal evreleri içeren uzun vadeli çalışmalar yapılabilir olması
(Van Kempen ve ark., 2011)	Transgenik, knockout ve diğer hayvan modelleriyle birlikte ileri çalışmalar yapılabilmesi

2.7. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon

Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon, yardımcı üreme tedavileri dahilinde overlerden en ideal sayı ve kalitede oosit elde etmek amacı ile aynı sıklusta çok sayıda folikülün geliştirilmesi tekniğidir. Bu foliküllerden elde edilecek oositler, embriyoloji laboratuvarında hastanın eşine ait spermiler ile fertilize edilecek ve geliştirilen embriyolar uterus içerisine yerleştirilecektir. KOH protokolleri, hipotalamus-hipofiz-over aksının tedavi siklusu öncesinde baskılanıp baskılanmamasına göre uzun ve kısa protokoller olarak ikiye ayrılır. Uzun protokolde amaç, bir önceki siklusun midluteal döneminde gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogu kullanılarak endojen LH ve FSH’nın baskılanması ve folikül gelişiminin ekzojen gonadotropinler ile hekim tarafından kontrol edilmesidir. Kısa protokollerde ise GnRH analogunun uzun süreli kullanımının getirdiği baskılamadan kaçınarak, overlerin maksimum düzeyde uyarılması hedeflenir. GnRH analogunun ve ekzojen gonadotropinlerin farklı zamanlama ve farklı sürede kullanımı ile birçok stimülasyon protokolü kullanılmaktadır. Uzun protokoller arasında standart long, ultralong ve modifiye long protokolleri sıklıkla tercih edilmektedir. Kısa protokoller arasında ise short, GnRH-agonist flare up, mikrodoz, GnRH-antagonist protokolleri sıklıkla kullanılmaktadır (Niederberger ve ark., 2018).

2.7.1. DOR Olgularında KOH Protokolleri

Yardımcı üreme teknikleri ile DOR tedavisinde ovaryan yanıtın iyileştirilmesi, çok sayıda folikülün geliştirilmesi, ideal sayı ve kalitede oosit elde edilmesi ve canlı doğum oranlarının artırılması amacıyla farklı KOH protokolleri geliştirilmiştir. Yapılan bir çalışmada IVF sikluslarında elde edilen oosit sayısı ile canlı doğum arasında anlamlı şekilde korelasyon tespit edilmiştir (Sunkara ve ark., 2011b). Aynı çalışmada 2 ya da 3 oosit elde edilebilen DOR olgularında fazladan elde edilen 1 oositin canlı doğum oranını 2 kat arttırdığı rapor edilmiştir ki bu veri DOR olgularında uygulanan tedavilerin önemini vurgulamaktadır (Lekamge ve ark., 2008). Literatürde yapılan çalışmalara bakıldığında, DOR tedavisinde uygulanan farklı tedavi protokolleri ile farklı klinik sonuçların rapor edildiği ve altın standart tedavi protokolünün bulunmadığı tespit edilmiştir.

İdeal sayı ve kalitede oosit elde edilmesi amacıyla kullanılan ekzojen gonadotropinlerin (FSH, LH ve HMG) DOR olgularının tedavisinde etkinlikleri birçok çalışmada araştırılmıştır. Farklı tip gonadotropin kullanımının klinik sonuçları etkilemediği (Van Wely ve ark., 2012) ve gonadotropin doz artışının klinik sonuçlara etkisinin olmadığı (Lekamge ve ark., 2008) tespit edilmiştir.

Retrospektif bir çalışmada DOR olgularında standart long protokol, short protokol ve GnRH antagonist protokol arasında fertilizasyon oranlarında fark olmadığı bildirilmiştir (Vollenhoven ve ark., 2008). Farklı bir çalışmada ise DOR hasta grubunda short, long, miniflare ve antagonist protokollerinin uygulanmasının implantasyon, gebelik oranları gibi klinik sonuçları iyileştirmede benzer etkinlikleri olduğu öne sürülmüştür (Madani ve ark., 2012). Bu konuda yapılan prospektif çalışmalar da aynı sonuçlara ulaşmıştır (Demirel ve Gurgan, 2009; Malmusi ve ark., 2005). Buna ek olarak 66 hastanın dahil edildiği randomize kontrollü çalışmada (RCT), zayıf ovaryan yanıtı (POR) hasta grubunda antagonist ve long protokol uygulanan gruplar arasında siklus iptal oranları, stimülasyon süresi, toplam uygulanan gonadotropin dozu, toplanan oosit sayısı, embriyo gelişimi, implantasyon ve klinik gebelik oranları yönünden anlamlı farkın bulunmadığı rapor edilmiştir (Cheung ve ark., 2005). Ayrıca birçok meta-analizde DOR olgularında hangi protokolün daha etkin olduğu konusunda kesin sonuç elde edilememiştir (Franco ve ark., 2006; Griesinger ve ark., 2006). Son olarak 2010 yılında güncellenen 10

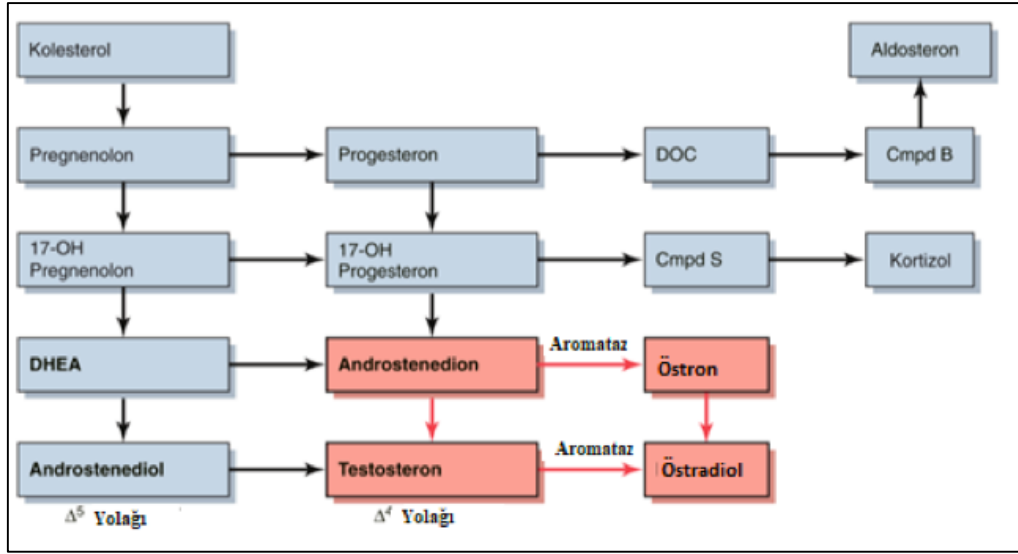
RCT'nin dahil edildiği bir meta-analizde GnRH-agonist flare up, mikrodoz, long, modifiye long ve GnRH-antagonist protokoller arasında klinik sonuçlar yönünden anlamlı fark bulunmadığı bildirilmiştir (Pandian ve ark., 2010).

2.7.2. DOR Olgularında KOH Protokollerine Eklenen Adjuvan Ajanlar

Literatür taraması yapıldığında, DOR'lu olgularda son 20 yılda yapılan çalışmalarda etkin tedavi protokolünün bulunamaması araştırmacıları alternatif yaklaşımlara yönlendirmiştir. Yapılan birçok çalışmada transdermal testosteron (Balasch ve ark., 2006; Doan ve ark., 2017; Fábregues ve ark., 2009; Mitri ve ark., 2016), dehidroepiandrosteron (DHEA) (Chen ve ark., 2000; Jayaprakasan ve ark., 2014; Qin ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2016), büyüme hormonu (Bassiouny ve ark., 2016; Dakhly ve ark., 2016; Kolibianakis ve ark., 2009; Li ve ark., 2017), koenzim Q10 (CoQ10) (Ben-Meir ve ark., 2015; Gat ve ark., 2016; Özcan ve ark., 2016), aspirin (Frattarelli ve ark., 2008; Lok ve ark., 2004) gibi birçok adjuvan ajan KOH protokollerine eklenmiştir. En sık tartışılan ve tedavi protokollerine eklenen adjuvan ajanlardan biri olan DHEA'nın 45 ülke, 196 merkez ve 124 700 IVF siklusunun dahil edildiği bir çalışmada %25 oranında klinik kullanımının olduğu rapor edilmiştir (Patrizio ve ark., 2015).

2.8. Dehidroepiandrosteron

DHEA adrenal bezlerde, ayrıca gonad dokusu ve beyinde üretilen bir androjendir. DHEA'nın, androstenedion, testosteron ve östradiolün öncülü olmakla birlikte, pubertenin başlangıcında rol oynadığı ve artan yaşla birlikte azaldığı bilinmektedir (Şekil 19) (Gleicher ve ark., 2010a).



Şekil 19. DHEA ve steroidojenik yolak

2.8.1. DOR Olgularında DHEA Kullanımı

DOR olgularında DHEA kullanımının potansiyel yararları hakkında tartışmalar devam etmesine rağmen, dünyadaki birçok IVF merkezleri tarafından giderek daha fazla kullanılmaktadır. Literatüre bakıldığında DHEA'nın ovaryan yanıtı arttırdığı kabul edilen mekanizmalar Tablo 5'de özetlenmiştir.

Tablo 5. DHEA'nın ovaryan yanıtı arttırdığı kabul edilen mekanizmalar

(Casson, 2000; Casson ve ark., 1998; Yan ve ark., 1997)	Foliküler gelişim ve oosit kalitesi üzerinde olumlu etkisi olan ve aynı zamanda gonadotropinlere duyarlılığı arttıran IGF-1 konsantrasyonunda artış sağlar.
(Walters ve ark., 2010)	İntraovaryan androjen reseptörleri üzerinden folikül gelişimini uyarır.
(Barad ve Gleicher, 2006)	LH uyarımı ile foliküler androjen ve östrojen üretimini düzenler.
(Nielsen ve ark., 2011; Prizant ve ark., 2014;)	FSH reseptörü ekspresyonunu artırarak, pre-antral ve küçük antral foliküllerin sayısını artırır.
(Zhang ve ark., 2014)	Oosit ve embriyo kalitesi üzerinde olumlu etkileri olan BMP-15'in foliküler sıvı konsantrasyonunda artış sağlar.
(Gleicher ve ark., 2010a)	Mayoz bölünmede iğ ipliklerinin yerleşimini düzenleyerek eşit kromozomal dağılımı sağlar.
(Haning ve ark., 1993)	Estradiol ve testosteron prekürsörü olarak steroidogenezini artırır.
(Ménézo ve ark., 2010)	DHEA oositlerde DNA hasar onarımını artırır.
(Pitteloud ve ark., 2005)	Foliküler hücreler ve oositlerde mitokondriyal fonksiyonu olumlu yönde etkiler.

Konu hakkında yapılan ilk çalışmalarda, DHEA'nın IVF sikluslarında ovaryan yanıtı (Casson, 2000), toplanan oosit sayısını (Barad ve Gleicher, 2006) ve klinik gebelik oranlarını (Barad ve ark., 2007) arttırdığı bildirilmiştir. Yapılan bir meta-analizde antral folikül gelişiminde rol oynadığı düşünülen DHEA'nın ovaryan stimülasyona yanıt veren folikül sayısını arttırdığı tespit edilmiştir (Sunkara ve ark.,

2011a). Ancak bu çalışmaların hasta popülasyonunun heterojen ve az sayıda olması sonuçlarının tartışılmasına yol açmıştır.

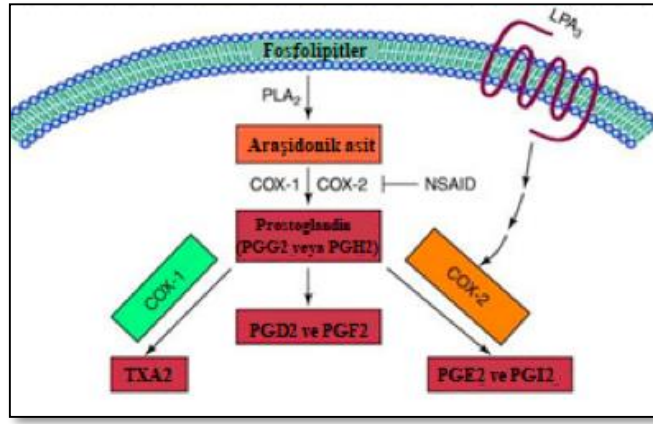
Yapılan farklı bir çalışmada, IVF tedavisi öncesi DHEA kullanan hastaların yaklaşık %50'sinin tedaviye başlamadan önce spontan gebe kaldığı bildirilmiştir. Bu çalışma sonucunda DOR olgularında DHEA'nın tek başına kullanımının spontan gebelik oranını arttırabileceği gösterilmiştir (Barad ve ark., 2007). Konu hakkında yapılan ilk RCT'de DHEA kullanımı ile embriyo kalitesinde ve canlı doğum oranında artış bildirilmiştir (Wiser ve ark., 2010). Kümülatif data kullanılmış olması, sadece ilk IVF siklusları göz önüne alındığında canlı doğum oranında artış gösterilememesi ve sınırlı sayıda hastayı dahil etmiş olması nedeniyle yapılan çalışmalar eleştirilmiştir (Yakin ve Urman, 2011). Yapılan meta-analizlerde DOR olgularında DHEA'nın rutin kullanılmasını desteklemek için iyi tasarlanmış RCT'lere ve DHEA etki mekanizmalarını gösteren ileri çalışmalara ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (Bosdou ve ark., 2012; Narkwichean ve ark., 2013). Zayıf ovaryan yanıtı sahip 82 olgunun dahil edildiği bir çalışmada, gruplar arasında FSH, E2, AFC, AMH ve inhibin B düzeyinde anlamlı farklılıklar olduğu ve bu veriler ışığında KOH'a DHEA eklentisinin DOR olguları için etkili bir seçenek olduğu bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2013). Aynı çalışmada DOR hasta grubunda oosit donasyonuna alternatif olarak IVF tedavisi öncesi DHEA kullanımı önerilmektedir. Yapılan en geniş RCT çalışmasında ise, 208 olgunun incelendiği IVF siklusu öncesi 12 haftalık DHEA kullanımının klinik sonuçları etkilememesi nedeniyle DHEA'nın adjuvan olarak kullanımı önerilmemiştir (Kara ve ark., 2014).

Çalışmaların kısıtlamaları ve yeterince güçlü RCT'nin olmamasına rağmen, önemli yan etkilerin olmaması, düşük maliyetli olması ve spontan gebelikleri arttırması göz önüne alındığında, DHEA'nın DOR olgularında, ovaryan stimülasyona yanıt ve klinik sonuçlar üzerinde olumlu etkileri olacağı öngörülmektedir.

2.9. Siklooksijenaz-2 (COX-2)

Perinükleer alanda lokalize bir enzim olan COX-2 (PTGS-2) araşidonik asiti PGH₂'ye dönüştürür. PGH₂'nin çeşitli sentetazlar tarafından biyolojik aktivitesine göre terminal formasyonu belirlenir. Oluşan son ürünler farklı dokularda

vazokonstriksiyon, vazodilatasyon, platelet agregasyonu, kemotaksis, allerjik ve inflamatuvar mekanizmalarda rol oynar. PGH₂, PGE sentaz enzimi ile PGE₂' dönüşür. PGE₂ ise folikül rüptürü ve ovaryum duvarındaki düz kas hücrelerinin kasılması sonucu ovulasyon ve fertilizasyonda etkilidir. Özetle, LH piki sonrası artan COX-2 granüloza hücrelerinde araşidonik asitten prostaglandin sentezine yol açar (Funk, 2001). Üretilen prostaglandinler vasküler permeabilite, kollojenolizis, steroidogenez, folikül rüptürü, lüteinizasyon ve sonuçta ovulasyona yol açar. Aynı zamanda gonadotropinler, COX-2 gen ekspresyonunu düzenleyerek, prostaglandinlerin granüloza hücrelerinden üretimini kontrol edebilmektedir.



Şekil 20. COX yolağı (Shah ve Catt, 2005)

Prostaglandinlerin ovulasyon sırasında proinflamatuvar rol oynayarak ovulasyonu tetiklediği gösterilmiştir (Huslig ve ark., 1987). Birçok araştırmacı COX-2 enzimini ovulasyon sürecinde prostaglandin sentezinin sınırlayıcı basamağı olarak tanımlamıştır (Barrios-Rodiles ve ark., 1999; Cipollone ve ark., 2008; Sirois ve ark., 2004). Hayvan çalışmalarında KOH protokolünde hCG enjeksiyonundan 24 saat sonra foliküler COX-2 ekspresyon artışı gösterilmiş ve ovulasyon belirteci olarak tanımlanmıştır (Hedin ve ark., 1987; Liu ve Sirois, 1998). LH piki sonrası foliküler sıvıda, granüloza hücrelerinde ve teka hücrelerinde COX-2 ekspresyon artışı gösterilmiştir (Adriaenssens ve ark., 2010; Duffy, 2011; Wong ve Richards, 1991). Ayrıca COX-2'nin oosit matürasyonunda, folikül rüptüründe ve kumulus ekspansiyonunda önemli rol oynadığı tespit edilmiştir (Duffy, 2011; Matsumoto ve ark., 2001; Ochsner ve ark., 2003; Sirois ve ark., 2004). Yapılan bir çalışmada COX-2 inhibisyonunun fertilizasyon, desidualizasyon ve implantasyonu olumsuz etkilediği gösterilmiştir (Matsumoto ve ark., 2001; Takahashi ve ark., 2006). Aynı

şekilde COX-2 sinyal yolağının genetik olarak inhibisyonu ovulasyonun baskılanması ile sonuçlanmıştır (Hizaki ve ark., 1999; Tilley ve ark., 1999). COX-2 knockout farelerden elde edilen oositlerin in vitro fertilizasyon ve blastosist gelişim oranının azaldığı tespit edilmiştir (Takahashi ve ark., 2006). Sıçanlara non-steroid anti-inflamatuar (NSAİ) preparatların etkilerinin gösterildiği bir çalışmada, folikül rüptürü bazolateral foliküler alanlarda gerçekleşmiş, oosit-kumulus kompleksi ovaryan stroma içerisine salınmıştır (Gaytán ve ark., 2006). Hayvanlarda yapılan farklı bir çalışmada COX-2 inhibitörü kullanımının mayoz bölünmeyi inhibe ederek immatür oosit eldesi ile sonuçlandığı gösterilmiştir (Duffy ve Vandevoort, 2011). Ovulasyon tetiklenmesi sonrası kısa süreli düşük doz NSAİ kullanımının ise prematür ovulasyon oranını azalttığı ve transfer edilen embriyo sayısını arttırdığı gösterilmiştir (Kawachiya ve ark., 2012). Farklı bir çalışmada artan yaş ile birlikte gonadotropinlere yanıtın azaldığı ve COX-2 gen ekspresyonunun arttığı gösterilmiş ve COX-2 gen ekspresyon seviyesinin embriyo kalite tayininde kullanılabileceği öngörülmüştür (McKenzie ve ark., 2004).

2.9.1. DHEA ile COX-2 Etkileşimi

Androjen ve COX-2 birlikteliği üzerine yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, androjen / androjen reseptör yolağının, perioovulatuvar granüloza hücrelerinde COX-2 ekspresyonu yoluyla ovulatuvar süreçte yer aldığı gösterilmiştir (Yazawa ve ark., 2013). Granüloza hücre kültürü çalışmasında ise DHEAS'nin COX-2 ve androjen reseptör (AR) ekspresyonlarını arttırdığı, östrojen reseptör beta (ER β) ekspresyonlarını azalttığı tespit edilmiştir (ELBeltagy ve ark., 2007). Farklı bir çalışmada sıçanlarda prenatal testosteron enjeksiyonu ile oluşturulmuş polikistik over sendromu modelinde over dokusunda COX-2 protein ekspresyon artışı gözlenmiştir (Amalfi ve ark., 2012). Folikülogenez indüksiyonunun tek doz DHEA ve koryonik gonadotropin ile yapıldığı bir çalışmada ise hiperandrojenik koşulda indüklenen folikülogenez sonrası over dokusu COX-2 ve protaglandin E mRNA ile protein ekspresyonlarının arttığı gösterilmiştir (Velez ve ark., 2015). Farelerde erken gebelik sürecinde uygulanan DHEA'nın uterus dokularında COX-2 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Luchetti ve ark., 2008). Androjenlerin farklı dokularda COX-2 üzerine olan etkisini değerlendiren çalışmalarda, epididimis ve testiküler

Leyding hücrelerinde COX-2 ekspresyonunun artışına sebep olduğu gösterilmiştir (Cheuk ve ark., 2000; Neeraja ve ark., 2003). Son olarak, romatoid artrit ve kortikal hasar modellerinde yapılan çalışmalar, DHEA'nın COX-2 mRNA veya PGE2 ekspresyonunu azalttığı gösterilmiştir (Malik ve ark., 2003; Sun ve ark., 2006).

2.10. Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, düşük ovaryan rezerv olgularında, kontrollü ovaryan stimülasyon protokolüne eklenen DHEA'nın ovaryan foliküllerin gelişimine etkisi ovaryan mikroçevre düzeyinde COX-2 ekspresyonu üzerinden gerçekleştirilmiştir. Hipotezinden yola çıkılarak; sıçan düşük ovaryan rezerv modeli oluşturulmuş ve kontrol deneklerde DHEA'nın tek başına ve kontrollü ovaryan stimülasyon protokolü ile birlikte kullanımının ovaryan folikül gelişimi ve COX-2 gen ekspresyon düzeyi üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmamıza Bursa Uludağ Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 11.07.2018 tarih, B.30.2.ULU.0.8Z.00.00/81 sayılı ve 2018-09/02 karar nolu onayı sonrasında başlandı. Çalışmada kullanılan 75 adet 60 günlük, 160-180 gr ağırlığında Spraque Dawley cinsi dişi sıçan Bursa Uludağ Üniversitesi Deney Hayvanları Yetiştirme Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden (DEHYUAM) temin edildi. Sıçanlar su ve besin kısıtlaması yapılmaksızın, 12 saatlik aydınlık/ karanlık döngüsünde DEHYUAM'de standart kafeslerde takip edildi. Tüm deney prosedürleri DEHYUAM ve Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki araştırma laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

3.2. Deney Grupları

Çalışmada kullanılacak her bir deneğin farklı over rezervine sahip olabileceği göz önünde bulunduruldu. Homojen dağılım gösteren over rezervine sahip deneklerin çalışmaya dahil edilebilmesi için çalışma başlangıcında deneklerin serum AMH düzeyleri enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak belirlendi. Serum AMH değerleri %25 ile %75'lik persentil arasında tespit edilenler çalışmaya dahil edildi. Bu aralık dışında kalan denekler çalışma dışında bırakıldı.

Çalışmaya dahil edilen denekler her gruptaki denek sayısı 5 olacak şekilde randomize olarak 15 gruba ayrıldı (Tablo 5):

- **Kontrol Grubu (n=5):** Deneyin 0. günü serum AMH düzeyi ölçümü sonrası sakrifiye edilen denekler
- **VCD Grubu (n=5):** VCD enjeksiyonları (15 gün) sonrası sakrifiye edilen denekler
- **VCD+DHEA Grubu (n=5):** Sırasıyla; VCD enjeksiyonları (15 gün) ve DHEA enjeksiyonları (45 gün) sonrası sakrifiye edilen denekler

- **VCD+DHEA+KOH Grubu (n=5):** Sırasıyla; VCD enjeksiyonları (15 gün), DHEA enjeksiyonları (45 gün) ve KOH protokolü (9 gün) uygulanması sonrası sakrifiye edilen denekler
- **VCD+DHEA+SF Grubu (n=5):** Sırasıyla; VCD enjeksiyonları (15 gün), DHEA enjeksiyonları (45 gün) ve SF enjeksiyonları (9 gün) sonrası sakrifiye edilen denekler
- **VCD+DMSO Grubu (n=5):** Sırasıyla; VCD enjeksiyonları (15 gün) ve DMSO enjeksiyonları (45 gün) sonrası sakrifiye edilen denekler
- **VCD+DMSO+KOH Grubu (n=5):** Sırasıyla; VCD enjeksiyonları (15 gün), DMSO enjeksiyonları (45 gün) ve KOH protokolü (9 gün) uygulanması sonrası sakrifiye edilen denekler
- **VCD+DMSO+SF Grubu (n=5):** Sırasıyla; VCD enjeksiyonları (15 gün), DMSO enjeksiyonları (45 gün) ve SF enjeksiyonları (9 gün) sonrası sakrifiye edilen denekler
- **DMSO Grubu (n=5):** DMSO enjeksiyonları (15 gün) sonrası sakrifiye edilen denekler
- **DMSO+DHEA Grubu (n=5):** Sırasıyla; DMSO enjeksiyonları (15 gün) ve DHEA enjeksiyonları (45 gün) sonrası sakrifiye edilen denekler
- **DMSO+DHEA+KOH Grubu (n=5):** Sırasıyla; DMSO enjeksiyonları (15 gün), DHEA enjeksiyonları (45 gün) ve KOH protokolü (9 gün) uygulanması sonrası sakrifiye edilen denekler
- **DMSO+DHEA+SF Grubu (n=5):** Sırasıyla; DMSO enjeksiyonları (15 gün), DHEA enjeksiyonları (45 gün) ve SF enjeksiyonları (9 gün) sonrası sakrifiye edilen denekler
- **DMSO+DMSO Grubu (n=5):** Sırasıyla; DMSO enjeksiyonları (15 gün) ve DMSO enjeksiyonları (45 gün) sonrası sakrifiye edilen denekler
- **DMSO+DMSO+KOH Grubu (n=5):** Sırasıyla; DMSO enjeksiyonları (15 gün), DMSO enjeksiyonları (45 gün) ve KOH protokolü (9 gün) uygulanması sonrası sakrifiye edilen denekler
- **DMSO+DMSO+SF Grubu (n=5):** Sırasıyla; DMSO enjeksiyonları (15 gün), DMSO enjeksiyonları (45 gün) ve SF enjeksiyonları (9 gün) sonrası sakrifiye edilen denekler

Tablo 5. Deney Grupları

Kontrol grubu	Sakrifikasyon	Sakrifikasyon	Sakrifikasyon	Sakrifikasyon
VCD grubu	VCD (15 gün)		Sakrifikasyon	
VCD+DHEA grubu	VCD (15 gün)	DHEA (45 gün)		Sakrifikasyon
VCD+DHEA+KOH grubu	VCD (15 gün)	DHEA (45 gün)		KOH (9 gün)
VCD+DHEA+SF grubu	VCD (15 gün)	DHEA (45 gün)		SF (9 gün)
VCD+DMSO grubu	VCD (15 gün)	DMSO (45 gün)		Sakrifikasyon
VCD+DMSO+KOH grubu	VCD (15 gün)	DMSO (45 gün)		KOH (9 gün)
VCD+DMSO+SF grubu	VCD (15 gün)	DMSO (45 gün)		SF (9 gün)
DMSO grubu	DMSO (15 gün)		Sakrifikasyon	
DMSO+DHEA grubu	DMSO (15 gün)	DHEA (45 gün)		Sakrifikasyon
DMSO+DHEA+KOH grubu	DMSO (15 gün)	DHEA (45 gün)		KOH (9 gün)
DMSO+DHEA+SF grubu	DMSO (15 gün)	DHEA (45 gün)		SF (9 gün)
DMSO+DMSO grubu	DMSO (15 gün)	DMSO (45 gün)		Sakrifikasyon
DMSO+DMSO+KOH grubu	DMSO (15 gün)	DMSO (45 gün)		KOH (9 gün)
DMSO+DMSO+SF grubu	DMSO (15 gün)	DMSO (45 gün)		SF (9 gün)

```

    graph LR
      0[0. gün] --- 15[15. gün]
      15 --- 60[60. gün]
      60 --- 69[69. gün]
  
```

3.3. Kimyasal Maddeler ve Uygulanması

Enjeksiyonların dozları ve uygulama yöntemleri Tablo 6'da belirtildiği şekilde, literatürler göz önünde bulundurularak, her gün aynı zaman aralığında (saat 08:00-10:00) gerçekleştirildi. İlaç dozlarını belirlemek için sıçanların vücut ağırlıkları haftalık olarak belirlendi.

Tablo 6. İlaç Enjeksiyonları

Etken madde	Çözücü madde	Doz	Süre	Uygulama yolu
4-Vinylcyclohexene Diepoxid (VCD) (Sigma, Kat.No: 94956-100ml)	DMSO (1ml/kg)	160 mg/kg/gün (Frye ve ark., 2012)	15 gün	Subkutan
Dimetil Sülfoksit (DMSO) (VCD sham) (Sigma, Kat.No: 472301-500ml)	-	1 ml/kg/gün (Frye ve ark., 2012)	15 gün	Subkutan
Dihidroepiandrostenedion (DHEA) (Sigma, Kat.No: D4000-25g)	DMSO (1ml/kg)	60 mg/kg/gün (Hassa ve ark., 2015)	45 gün	Subkutan
Dimetil Sülfoksit (DMSO) (DHEA sham) (Sigma, Kat.No: 472301-500ml)	-	1 ml/kg/gün (Hassa ve ark., 2015)	45 gün	Subkutan
Gonadotropin Salgılatıcı Hormon (GnRH) Agonisti (Lucrin, Abbott)	-	1.5 µg/100 g/gün (Gong ve ark., 2015)	7 gün	İntraperitoneal
Gebe Kısırak Serum Gonadotropini (PMSG) (Prospecbio, Kat.No: HOR-272)	-	5 IU/100 g/gün (Gong ve ark., 2015)	1 gün	İntraperitoneal
İnsan Koryonik Hormon (hCG) (Ovitrelle, Merck-Serono,)	-	10 IU/100 g/gün (Gong ve ark., 2015)	1 gün	İntraperitoneal
Serum Fizyolojik (SF) (KOH sham)	-	KOH protokolüyle eşit volüm (Gong ve ark., 2015)	7 gün	İntraperitoneal

3.4. DOR Hayvan Modeli Oluşturulması

Çalışmamızda DOR hayvan modeli 15 gün boyunca, 160 mg/kg/gün dozunda subkutan VCD enjeksiyonu ile oluşturuldu (Frye ve ark., 2012). DOR hayvan modelinin gerçekleştiğinin doğrulanması; ovaryan doku kesitlerinde gelişimin farklı evrelerindeki folikül sayılarının histolojik değerlendirmesi yapılarak gerçekleştirildi. Normal over rezervine sahip olacak deneklere VCD yerine VCD ile aynı volüm ve sürede DMSO (1ml/kg/gün) enjeksiyonu yapıldı.

3.5. Östrus Siklus Evrelerinin Saptanması

Deneklerin östrus siklus evrelerinin saptanması için vajinal smear sitolojik incelemesi yapıldı. Yayma fırçaları ile alınan vaginal sürüntü lama yayılarak metanol ile 5 dk fiksasyon işlemi gerçekleştirildi. Ardından hematoksilin-eozin (H&E) boyama protokolü ile boyanan örnekler kurumaya bırakıldı. Sonrasında lamel ile

kapatılıp, mikroskop altında incelendi ve östrus evreleri Tablo 7'deki tanımlamalara göre belirlendi.

Tablo 7. Östrus Siklus Evreleri

Proöstrus evresi	Nükleuslu epitel hücrelerinin yoğun olarak gözleendiği, lökositlerin gözlenmediği preparatlar
Östrus evresi	%75 nükleuslu süperfisiyal ve %25 keratinize süperfisiyal hücre gözlenen preparatlar
Metöstrus evresi	Nükleuslu ve kornifiye hücreler etrafında çok miktarda lökosit gözlenen preparatlar
Diöstrus evresi	Yaygın olarak lökositlerin gözleendiği preparatlar

3.6. Deneklerden Kan Örneklerinin Alınması

Deneklerden kan örnekleri sevofluran inhalasyon anestezisi altında retro-orbital olarak alındı. Anestezi altındaki deneklerin kafatası ve çenesinden tutularak başı sabitlendi, işaret parmağı ile üst göz kapağı geri çekilip, middorsal yaklaşımla orbital venöz pleksuslar mikrokapillar tüp yardımıyla yırtılarak kanın deney tüpüne dolması sağlandı. Her denekten 500 µl kan örneği ince mikrokapiller tüpün kapilleritesi sayesinde toplandı.

3.7. Kontrollü Ovaryan Hiperstimülasyon Protokolü

Birbirini takip eden 2 düzenli östrusa sahip olan deneklerin kontrollü ovaryan hiperstimülasyonunda GnRH agonist long protokol kullanıldı. Vaginal smear sonuçlarına göre östrus periyodunun 3. günü (proöstrus evresi) KOH protokolüne başlandı. Siklusun 3-9. günleri arasında 1.5 µg/100g/gün dozunda günde bir kez intraperitoneal GnRH agonist enjeksiyonu yapıldı. Siklusun 9. günü 5 IU/100g tek doz PMSG intraperitoneal olarak uygulandı. Enjeksiyonların son dozundan 28 saat sonra 10 IU/100g intraperitoneal hCG enjeksiyonu yapılarak ovulasyon tetiklendi (Gong ve ark., 2015).

KOH-Sham alt gruplarında vaginal smear sonuçlarına göre östrus periyodunun 3-9. günleri boyunca ve son dozdan 28 saat sonra sıçanlara KOH protokolünde uygulanan ajanların yerine aynı volümde SF enjeksiyonu yapıldı.

3.8. Deneklerin Sakrifikasyonu ve Doku Eldesi

Denekler enjeksiyonlar sonrasında ovaryan sikluslarının östrus evresinde sakrifiye edildi. Sevofluran inhalasyon anestezisi altında deneklerin batin boşluğu ve torakslarının açılmasının ardından Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) tekniğinde

kullanılmak üzere unilateral sağ ooferektomi uygulandı ve alınan örnek mRNA degradasyonunu engellemek için -80°C ultra derin dondurucuda muhafaza edildi. Ardından deneklerde perfüzyon fiksasyon yöntemi gerçekleştirildi. Bu yöntemde perfüzyon pompasına bağlı kateter deneklerin aortasına yerleştirildi ve uygun basınçta SF verilerek dolaşımdan kan temizlendi. Sonrasında dolaşıma %4'lük paraformaldehit solüsyonu verilerek fiksasyon işlemi tamamlandı. Perfüzyon fiksasyon işlemi ardından histokimyasal boyama tekniklerinde kullanılmak üzere sol ovaryumun diseksiyonu gerçekleştirildi. Diseksiyon sonrası ovaryum dokusunun %4'lük paraformaldehit içerisinde 3 gün boyunca immersiyon fiksasyonu gerçekleştirildi.

3.9. Doku Takibi

Fiksasyon sonrası ovaryum dokuları morfolojik olarak değerlendirilmek için doku takibine alındı. Doku takibi Tablo 8'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi ve dokular parafin bloklara gömüldü.

Tablo 8. Doku Takip Protokolü

1	%50'lik alkol	2 saat
2	%70'lik alkol	2 saat
3	%90'lik alkol	2 saat
4	%96'lik alkol-I	2 saat
5	%96'lik alkol-II	Gece boyu
6	Ksilen-I	1,5 saat
7	Ksilen-II	1,5 saat
8	Parafin-I	1,5 saat
9	Parafin-II	1,5 saat
10	Parafin-III	1 saat
11	Parafine Gömme	

3.10. Kesit Alınması

H&E boyamasında kullanılmak üzere parafin bloklardan mikrotom (Leica RM2245) yardımı ile 5 µm kalınlığında seri kesitler alındı.

3.11. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Parafin kesitler 60°C'lik etüvde gece boyunca bekletilip, ksilen ile deparafinize edildikten sonra boyama protokolüne başlandı. H&E boyaması Tablo 9'da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 9. Hematoksilen Eozin Boyama Protokolü

1	%96'lık alkol	3 dk
2	%90'lık alkol	3 dk
3	%70'lık alkol	3 dk
4	Su	3 dk
5	Harris'in Hematoksileni	10 dk
6	Su	Suyun rengi şeffaf olana kadar
7	Asit alkol	1-2 dips
8	Su	3 dk
9	Amonyaklı su	1-2 dips
10	Su	3 dk
11	Eozin-2-5 dk	2-5 dk
12	Su	Suyun rengi şeffaf olana kadar
13	%70'lık alkol	7 dips
14	%90'lık alkol	7 dips
15	%96'lık alkol	7 dips
16	Ksilen-I	20 dk
17	Ksilen-II	20 dk
18	Kapatma	

3.12. Ovaryan Folikül Sayımı

H&E ile boyanan ovaryum doku kesitlerinde ovaryan folikül sayımı, ışık mikroskobu yardımıyla gerçekleştirildi. Parafin bloklarda başlangıç kesiti en az 4 sekonder folikülün bulunduğu kesit olarak belirlendi. Folikül sayımı başlangıç kesitinden itibaren ve değerlendirilmek üzere ayrılan her kesit arasında 10'ar kesit atlanarak elde edilen 5 kesit üzerinde yapıldı.

Foliküllerin morfolojik sınıflandırılması granüloza hücre (GH) şekli ve hücre katman sayısı göz önüne alınarak Tablo 10'da belirtildiği şekilde değerlendirildi.

Tablo 10. Ovaryan Folikül Sınıflandırması

Primordiyal Folikül	Tek katlı yassı pregranüloza hücre katmanı
Unilaminer Primer Folikül	Tek katlı kübik granüloza hücre katmanı
Multilaminer Primer Folikül	≥2 sıralı kübik granüloza hücre katmanı ve antral boşluk yok
Sekonder Folikül	>5 sıralı granüloza hücre, antral boşluklu, belirgin teka tabakalı
Graaf Folikül	Kumulus-oosit kompleksi, tek antral boşluk ve belirgin teka tabakalı
Atretik Folikül	Parçalanmış oosit ve parçalanmış ya da kaybolmuş granüloza hücre katmanı

3.13. Gen Ekspresyon Analizi

Sakrifikasyon aşamasında elde edilen sağ ovaryum dokuları homojenize edildi ve sonrasında COX-2 gen ekspresyon analizleri gerçekleştirildi.

3.13.1. RNA Eldesi

Tüm deneklere ait 75 adet ovaryum doku homojenatından “Quick-RNA™ MicroPrep” (katalog no:732-6820, Aurum™ Total RNA Mini Kit, U.S.A) ticari kit yardımı ile RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Kit içeriğindeki lizis ve yıkama tamponlarına ek olarak, DNase I enzimi uygulaması üretici firmanın protokolü takip edilerek RNA izolasyonu gerçekleştirildi. İzole edilen RNA örnekleri degradasyonu engellemek amacıyla -80 °C ultra derin dondurucuda RNA saflık tayini yapılmaya kadar muhafaza edildi.

3.13.2. RNA Saflık Tayini

cDNA eldesi sırasında tüm örnekleri aynı yoğunlukta reaksiyona tabi tutmak amacıyla elde edilen RNA örneklerinin miktar ve kalite tayini yapıldı. Spektrofotometrik yöntem kullanılarak O.D. 260/ O.D. 280 oranı 1,7-1,8 olarak okunan örneklerin RNA'ları saf olarak kabul edildi.

3.13.3. cDNA Eldesi

Saflık tayini ardından uygun olan örneklerin cDNA eldesi, “SensiFAST cDNA Synthesis Kit” (katalog no: BIO-65053, BIOLINE LIFE SCIENCE COMP., U.S.A) ticari kiti yardımı ile gerçekleştirildi. Her bir örnek için, 5X TransAMP Buffer 4µl Reverse Transcriptase enzimi 1µl, 100 ng/µl olacak şekilde örnek miktarı ve toplam reaksiyon hacimi 20 µl'ye dH₂O ile tamamlandı. Enzim aktivasyon koşulları olarak; 25°C'de 10 dakika–ilk bağlanma, 42°C'de 15 dakika – revers transkripsiyon, 85°C'de 5 dakika–enzim inaktivasyonu ve 4°C'de reaksiyon sonlanması olarak kit üretici firma protokolü uygulandı. Elde edilen cDNA örnekleri çalışma zamanına kadar -20°C'de saklandı.

3.13.4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR)

Elde edilen cDNA örneklerinden, RT-PCR çalışmasında üç tekrarlı olmak üzere COX-2 geni çalışıldı. “The SensiFAST™ SYBR® Hi-ROX Kit” (Katalog no: BIO-92020, Biorline Life Science Comp., U.S.A) ticari kit yardımı ile gen ekspresyon analizi SYBR Green metodu ile gerçekleştirildi. Kit içeriğinde yer alan; 2x SensiFAST SYBER Hi-ROX Mix 10µl, 10µM konsantrasyonunda olarak şekilde

Forward ve Revers Primerler (0,4 µl), cDNA örneği ve toplam reaksiyon hacmi 10 µl' ye dH₂O ile tamamlandı. Primer dizileri Tablo 11' de verilmiştir.

Tablo 11. Genlere ait primerler dizaynları

Gen	Primer Dizi Bilgisi	Beklenen Gen Ürünü
COX-2	Forward - 5'- ATGACGAGCGACTGTTCCAA - 3'	102 BP
	Reverse - 5'- TGAAGTGGTAACCGCTCAGG -3'	
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	Forward - 5'- TGTGAACGGATTTGGCCGTA -3'	149 BP
	Reverse - 5'- TGAACCTGCCGTGGGTAGAG - 3'	

Hazırlanan reaksiyon karışımı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmek üzere, 96 örnek analizi gerçekleştirilebilen şeffaf kuyucuklar içeren plakaya yüklendi. Bio-Rad CFX connect Real-Time PCR Detection System (BIORAD, BD) kullanılarak örneklerin yüklendiği plakalarda enzimatik reaksiyon ve 465-510 nm dalga boyunda ölçümler ile prob ışına oranına bağımlı olarak ekspresyon seviye tayini gerçekleştirildi. Polimer aktivasyonu (95°C'de 2 dakika), denatürasyon (95°C'de 5 saniye), polimer bağlanma (65°C'de 20 saniye) ve uzama olarak 40 tekrarlayan döngü kit üretici firma protokolü uygulandı. Tüm örnekler ayrı olarak COX-2 geni ekspresyon seviyesi, referans gen olan “gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz (GADPH)” ekspresyonuna göre göreceli olarak 2- $\Delta\Delta$ CT yöntemine göre hesaplandı.

3.14. ELISA

Serum AMH düzeyleri “enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)” yöntemine dayanan ticari kitlerle (katalog no: ER0260 Fine Test Rat AMH ELISA Kit, CHINA) üretici önerilerine göre ölçüldü. Bu prosedürde, örnekler ve standartlar antikorları ile kaplanmış ELISA plak çukurlarına mikropipet aracılığı ile yüklendi. Üretici firmanın protokolü takip edildi, kromojen substrat solüsyonlarının eklenmesinin ardından, örnekler 450 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Örneklerdeki AMH konsantrasyonları standart eğriye göre hesaplandı.

3.15. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz SPSS v.23 (IBM) yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi. Parametrik dağılım gösteren verilere sahip 2 grup arasındaki karşılaştırmalarda Student t testi, 2'den fazla grup arasındaki karşılaştırmalarda ise One-Way ANOVA testi kullanıldı. Non-parametrik dağılım gösteren verilerde; 2 grup arasındaki karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi, 2'den fazla grup arasındaki karşılaştırmalarda ise Kruskal Wallis Testi kullanıldı.

Ekspresyon analizleri için web tabanlı Qiagen PCR-Data Analiz (RT² profiler PCR array data analysis version 3.5) programından yararlanıldı. Dozlar arasında COX-2 ekspresyon düzeyindeki değişimleri ifade eden, ekspresyon kat değişim oranı grafikleri oluşturuldu. Qiagen PCR-Data Analiz sisteminde 2^{ΔCT} değerlerinden Student t testi aracılığıyla gen ekspresyon kat değişim oranlarının p değerleri belirlendi. Sonuçlar %95'lik güven aralığında ve anlamlılık p<0.05 düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Ağırlık Ölçümleri

4.1.1. Vücut Ağırlık Ölçümleri

Çalışma kapsamında tüm gruplardaki deneklerin VCD/DHEA/KOH/DMSO enjeksiyonlarının başlangıç ve bitiş günü vücut ağırlık ölçümleri gerçekleştirildi ve karşılaştırıldı.

4.1.1.1. Kontrol, Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerin Vücut Ağırlık Ölçümleri

Kontrol grubu denekleri çalışmanın başlangıcında vücut ağırlıkları ölçülerek herhangi bir enjeksiyon yapılmaksızın sakrifiye edildi. VCD ve DMSO grubu deneklerin enjeksiyonları öncesi ve sonrası ortalama vücut ağırlıkları hesaplandı. Enjeksiyonların başlangıç günü deneklerin ortalama vücut ağırlıkları Kontrol, VCD ve DMSO grupları için sırasıyla 174,3±7,7 gr; 182,3±8,5 gr ve 177,8±8,1 gr olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi (p=0.62). Enjeksiyonların bitiş günü (çalışma başlangıcı sonrasındaki 15. gün) ise VCD ve DMSO grupları için vücut ağırlık ortalamaları sırasıyla 201,4±7,3 gr ve 199,4±6,7 gr olarak hesaplandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi (p=0.54) (Tablo 12, Grafik 1).

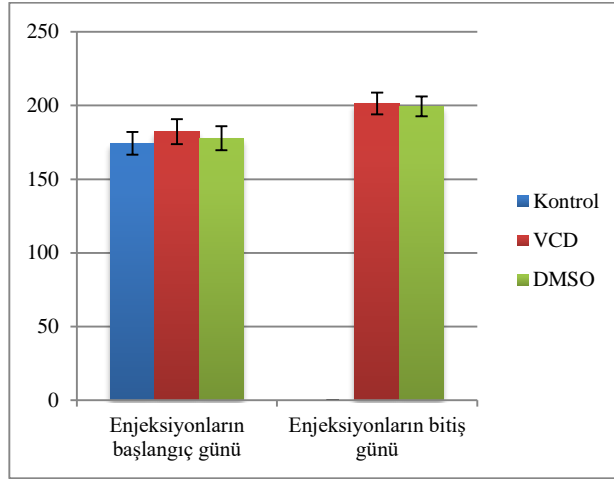
Tablo 12. Kontrol, VCD ve DMSO gruplarına ait deneklerin enjeksiyon başlangıcı ve bitiminde vücut ağırlık ortalamaları

	Kontrol Grubu	VCD Grubu	DMSO Grubu	P ^{**,***}
Enjeksiyonların başlangıç günü ağırlık (gr)*	174,3±7,7	182,3±8,5	177,8±8,1	0.62
Enjeksiyonların bitiş günü ağırlık (gr)*	-	201,4±7,3	199,4±6,7	0.54

*Veriler ortama ağırlık± Standart Deviasyon (SD) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 1. Kontrol, VCD ve DMSO gruplarına ait deneklerin enjeksiyon başlangıcı ve bitiminde vücut ağırlık ortalamaları

4.1.1.2. Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Vücut Ağırlık Ölçümleri

Deneklerin DHEA ya da DMSO enjeksiyonları öncesi ve sonrası vücut ağırlık ortalamaları hesaplandı. Enjeksiyonların başlangıç günü deneklerin ortalama vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde; VCD+DHEA, VCD+DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO grupları için sırasıyla 202,1±5,9 gr, 198,3±7,2 gr, 204,2±6,3 gr ve 201,8±4,3 gr olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi (p=0.32). 45 gün sonrasında bu gruplar için enjeksiyonların bitiş gününde aynı gruplar için vücut ağırlık ortalamaları sırasıyla 245,1±8,6 gr, 239,3±6,9 gr, 241,6±7,1 gr ve 237,9±7,6 gr olarak hesaplandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi (p=0.46) (Tablo 13, Grafik 2).

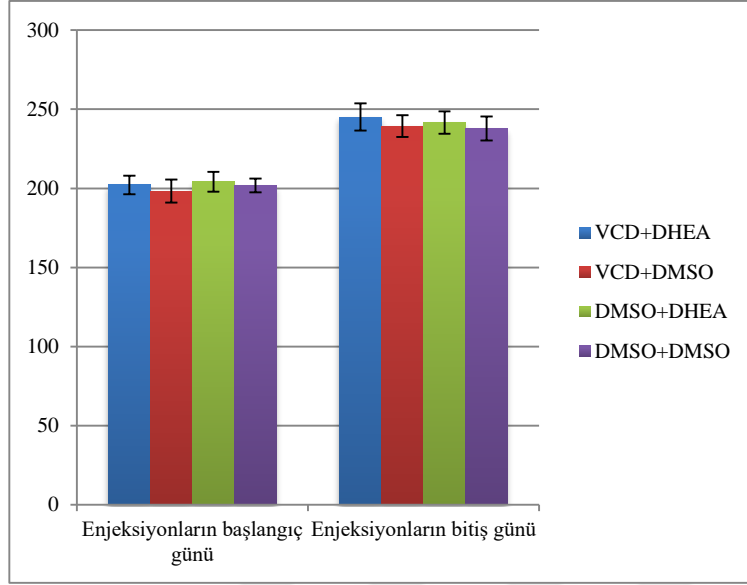
Tablo 13. VCD+DHEA, VCD+DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO gruplarına ait deneklerin DHEA ya da DMSO enjeksiyon başlangıcı ve bitiminde vücut ağırlık ortalamaları

	VCD+DHEA Grubu	VCD+DMSO Grubu	DMSO+DHEA Grubu	DMSO+DMSO Grubu	p ^{**,***}
Enjeksiyonların başlangıç günü ağırlık (gr)*	202,1±5,9	198,3±7,2	204,2±6,3	201,8±4,3	0.32
Enjeksiyonların bitiş günü ağırlık (gr)*	245,1±8,6	239,3±6,9	241,6±7,1	237,9±7,6	0.46

*Veriler ortama ağırlık± SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 2. VCD+DHEA, VCD+DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO gruplarına ait deneklerin DHEA ya da DMSO enjeksiyon başlangıcı ve bitiminde vücut ağırlık ortalamaları

4.1.1.3. Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Vücut Ağırlık Ölçümleri

Deneklerin KOH protokolü ya da SF enjeksiyonları öncesi ve sonrası vücut ağırlık ortalamaları hesaplandı. Enjeksiyonların başlangıç günü deneklerin ortalama vücut ağırlıkları değerlendirildiğinde VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH, VCD+DMSO+SF, DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF grupları için sırasıyla 244,1±7,9 gr, 246,6±4,1 gr, 240,7±7,8 gr, 239,1±5,1 gr, 243,3±6,9 gr, 238,7±5,1 gr, 240,3±8,1 gr ve 238,6±6,5 gr olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi (p=0.24). Enjeksiyonların bitiş günü ise aynı gruplar için vücut ağırlık ortalamaları sırasıyla 249,3±5,1 gr, 251,3±5,3 gr, 243,4±5,2 gr, 242,1±6,2 gr, 246,6±4,3 gr, 242,3±6,8 gr, 244,1±6,4 gr ve 245,6±4,9 gr olarak hesaplandı. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi (p=0.52) (Tablo 14, Grafik 3).

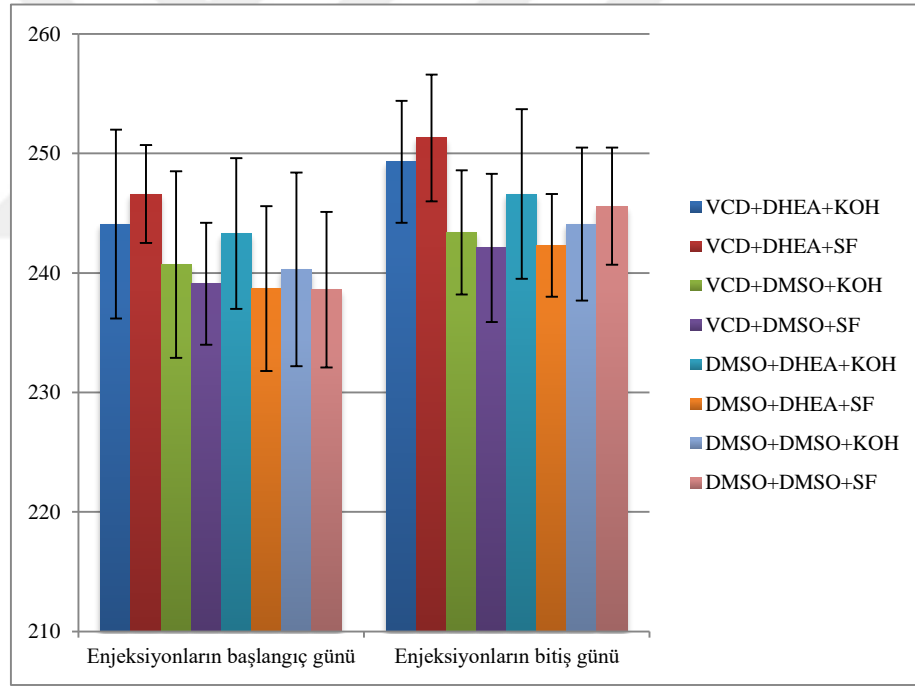
Tablo 14. VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH, VCD+DMSO+SF, DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF gruplarına ait deneklerin KOH protokolü ya da SF enjeksiyonları başlangıcı ve bitiminde vücut ağırlık ortalamaları

	VCD + DHEA + KOH Grubu	VCD + DHEA + SF Grubu	VCD + DMSO + KOH Grubu	VCD + DMSO + SF Grubu	DMSO + DHEA + KOH Grubu	DMSO + DHEA + SF Grubu	DMSO + DMSO + KOH Grubu	DMSO + DMSO + SF Grubu	p ^{**} , ***
Enjeksiyonların başlangıç günü ağırlık (gr)*	244,1±7,9	246,6±4,1	240,7±7,8	239,1±5,1	243,3±6,9	238,7±5,1	240,3±8,1	238,6±6,5	0.24
Enjeksiyonların bitiş günü ağırlık (gr)*	249,3±5,1	251,3±5,3	243,4±5,2	242,1±6,2	246,6±4,3	242,3±6,8	244,1±6,4	245,6±4,9	0.52

*Veriler ortama ağırlık± SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 3. VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH, VCD+DMSO+SF, DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF gruplarına ait deneklerin KOH protokolü ya da SF enjeksiyonları başlangıcı ve bitiminde vücut ağırlık ortalamaları

4.1.2. Ovaryum Ağırlık Ölçümleri

Çalışma kapsamında tüm gruplardaki deneklerin enjeksiyonlarının ardından sakrifikasyonları sonrası bilateral ovaryum ağırlıkları ölçülerek, gruplar arasında ovaryum ağırlıkları karşılaştırıldı.

4.1.2.1. Kontrol, Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerin Toplam Ovaryum Ağırlık Ölçümleri

Kontrol grubu denekleri çalışmanın başlangıcında herhangi bir enjeksiyon yapılmaksızın sakrifiye edildi ve toplam ovaryum ağırlıkları hesaplandı. VCD ve DMSO Grubu deneklerin enjeksiyonlarının tamamlanmasının ardından sakrifikasyonları gerçekleştirildi ve bilateral ovaryum ağırlıkları değerlendirilerek ortalama ovaryum ağırlıkları hesaplandı. Deneklerin ortalama ovaryum ağırlıkları değerlendirildiğinde Kontrol, VCD ve DMSO grupları için sırasıyla $0,139\pm 0,019$ gr; $0,131\pm 0,011$ gr ve $0,136\pm 0,014$ gr olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi ($p=0.17$) (Tablo 15, Grafik 4).

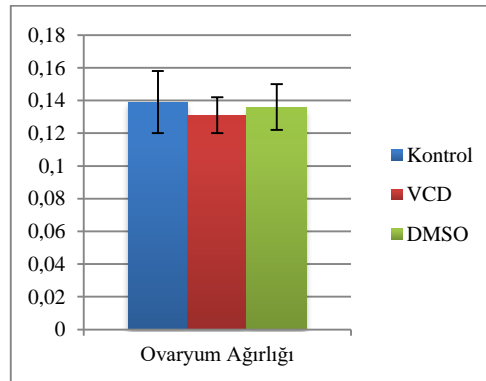
Tablo 15. Kontrol, VCD ve DMSO gruplarına ait deneklerin toplam ovaryum ağırlık ölçümleri

	Kontrol Grubu	VCD Grubu	DMSO Grubu	p^{**,***}
Toplam ovaryum ağırlığı (gr)*	0,139±0,019	0,131±0,011	0,136±0,014	0.17

*Veriler ortama ağırlık± SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 4. Kontrol, VCD ve DMSO gruplarına ait deneklerin toplam ovaryum ağırlık ölçümleri

4.1.2.2. Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Toplam Ovaryum Ağırlık Ölçümleri

Deneklerin DHEA ve DMSO enjeksiyonlarının tamamlanmasının ardından sakrifikasyonları gerçekleştirildi ve bilateral ovaryum ağırlıkları değerlendirilerek ortalama ovaryum ağırlıkları hesaplandı. Deneklerin ortalama ovaryum ağırlıkları değerlendirildiğinde VCD+DHEA, VCD+DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO grupları için sırasıyla 0,206±0,014 gr, 0,142±0,019 gr, 0,214±0,021 gr ve 0,144±0,012 gr olarak tespit edildi. DHEA enjeksiyonu yapılan düşük ve normal over rezervine sahip denekleri temsil eden VCD+DHEA grubu ve DMSO+DHEA grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi (p=0.19). Aynı şekilde DMSO enjeksiyonu yapılan düşük ve normal over rezervine sahip denekleri temsil eden VCD+DMSO grubu ve DMSO+DMSO grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi (p=0.24). Ancak VCD+DHEA grubu deneklerin ortalama ovaryum ağırlıklarının VCD+DMSO grubu deneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fazla olduğu belirlendi (p=0.01). Aynı şekilde DHEA enjeksiyonu yapılan DMSO+DHEA grubu deneklerin ortalama ovaryum ağırlıklarının, DHEA enjeksiyonu yapılmayan DMSO+DMSO grubu deneklere kıyasla istatistiksel olarak anlamlı fazla olduğu saptandı (p=0.02) (Tablo 16, Grafik 5).

Tablo 16. VCD+DHEA, VCD+DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO gruplarına ait deneklerin toplam ovaryum ağırlık ölçümleri

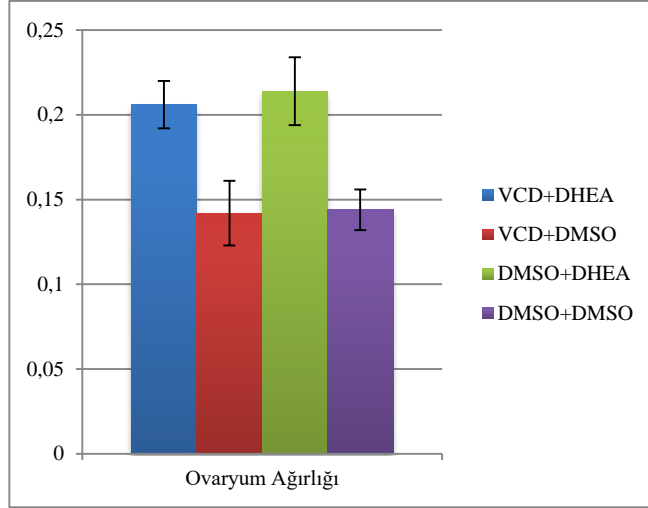
	VCD+DHEA Grubu	VCD+DMSO Grubu	DMSO+DHEA Grubu	DMSO+DMSO Grubu	P ^{**,***}
Toplam ovaryum ağırlığı (gr)*	0,206±0,014 ^a	0,142±0,019 ^b	0,214±0,021 ^a	0,144±0,012 ^b	0.02

*Veriler ortama ağırlık± SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

^{ab}Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Grafik 5. VCD+DHEA, VCD+DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO gruplarına ait deneklerin toplam ovaryum ağırlık ölçümleri

4.1.2.3. Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Toplam Ovaryum Ağırlık Ölçümleri

Deneklerin KOH protokolü ya da SF enjeksiyonlarının tamamlanmasının ardından sakrifikasyonları gerçekleştirildi ve bilateral ovaryum ağırlıkları değerlendirilerek toplam ovaryum ağırlıkları hesaplandı. Deneklerin ortalama ovaryum ağırlıkları değerlendirildiğinde VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH, VCD+DMSO+SF, DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF grupları için sırasıyla 244,1±7,9 gr, 246,6±4,1 gr, 240,7±7,8 gr, 239,1±5,1 gr, 243,3±6,9 gr, 238,7±5,1 gr, 240,3±8,1 gr ve 238,6±6,5 gr olarak tespit edildi. KOH protokolü için enjeksiyonlar yapılan VCD+DHEA+KOH, VCD+DMSO+KOH, DMSO+DHEA+KOH ve DMSO+DMSO+KOH grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi (p=0.12). Aynı şekilde SF enjeksiyonu yapılan VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+SF, DMSO+DHEA+SF ve DMSO+DMSO+SF grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi (p=0.31). Ancak KOH protokolü için enjeksiyonları yapılan gruplarda (VCD+DHEA+KOH grubu, VCD+DMSO+KOH grubu, DMSO+DHEA+KOH grubu ve DMSO+DMSO+KOH grubu) ortalama ovaryum ağırlığının DMSO enjeksiyonu yapılan gruplara (VCD+DHEA+SF grubu, VCD+DMSO+SF grubu, DMSO+DHEA+SF grubu ve

DMSO+DMSO+SF grubu) kıyasla istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi (p=0.02) (Tablo 17, Grafik 6).

Tablo 17. VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH, VCD+DMSO+SF, DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF gruplarına ait deneklerin toplam ovaryum ağırlık ölçümleri

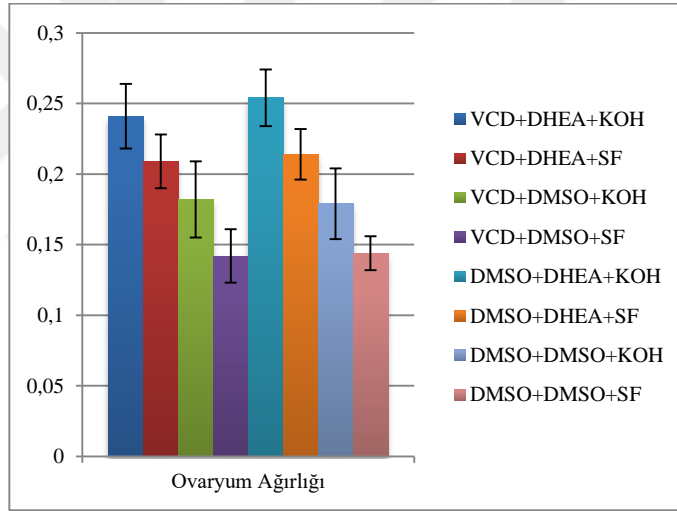
	VCD + DHEA + KOH Grubu	VCD + DHEA + SF Grubu	VCD + DMSO + KOH Grubu	VCD + DMSO + SF Grubu	DMSO + DHEA + KOH Grubu	DMSO + DHEA + SF Grubu	DMSO + DMSO + KOH Grubu	DMSO + DMSO + SF Grubu	p ^{***}
Toplam ovaryum ağırlığı (gr)*	0,241 ± 0,023 ^a	0,209 ± 0,019 ^a	0,182 ± 0,027 ^b	0,142 ± 0,019 ^b	0,254 ± 0,018 ^c	0,214 ± 0,021 ^c	0,179 ± 0,025 ^d	0,144 ± 0,012 ^d	0.03

*Veriler ortama ağırlık± SD olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

^{abcd} Aynı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Grafik 6. VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH, VCD+DMSO+SF, DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF gruplarına ait deneklerin toplam ovaryum ağırlık ölçümleri

4.2. Işık Mikroskopik Bulgular

4.2.1. Histomorfolojik Bulgular

Her gruptaki deneklerin sakrifikasyonları sırasında perfüzyon fiksasyon işlemi sonrası sol ovaryumları eksize edildi. Elde edilen ovaryum doku örneklerinden alınan 5 µm kalınlığındaki doku kesitlerinde H&E boyaması sonrası histomorfolojik değerlendirmeler gerçekleştirildi.

4.2.1.1. Kontrol, Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerin Ovaryum Dokusu Histomorfolojik Bulguları

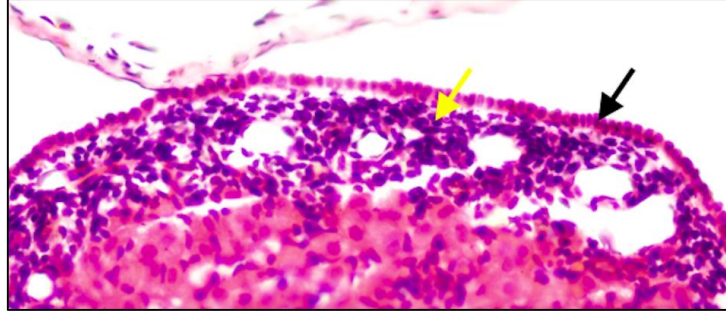
Kontrol grubu, DMSO grubu ve VCD grubu deneklerin ovaryum doku kesitleri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi.

Kontrol grubuna ait kesitlerde; ovaryum yüzeyinin tek katlı yassı epitelden tek katlı alçak kübik epitele değişkenlik gösteren germinal epitel ile çevrelendiği gözlemlendi. Germinal epitelin altında bağ dokusu lifleri ve hücrelerinden oluşan tunika albuginea tabakası bulunmaktaydı (Şekil 21). Tunika albugineanın altında sınırları net olarak ayırt edilemeyen, dışta gelişiminin farklı aşamalarındaki folikülleri içeren korteks tabakası, içte ise gevşek bağ dokusu ile hilus boyunca ovaryuma ulaşan kan damarları, lenf damarları ve sinirleri içeren medulla tabakası izlendi (Şekil 22A). Korteks stroması içerisinde az sayıda vasküler yapılar, ince kollajen yapılar, düz kas lifleri ve normal morfolojiye sahip gelişiminin farklı aşamalarındaki foliküller izlendi. Korteksin sıklıkla tunika albugineaya yakın bölümünde normal morfolojide, tek tabaka halindeki yassı folikül hücreleri ile çevrili büyük ökromatik nükleuslu oosite sahip primordiyal foliküller gözlemlendi (Şekil 23A). Primordiyal foliküller aynı zamanda korteks tabakasının daha derin bölgelerinde, gelişiminin farklı aşamalarındaki foliküllerin aralarında da bulunduğu tespit edildi. Normal morfolojiye sahip, tek tabakalı kübik granüloza hücreleri ve net olarak gözlenemeyen zona pellusida ile çevrili oosite sahip unilaminer primer foliküller gözlemlendi (Şekil 24A). Granüloza hücreleri asidofilik olarak boyanan sitoplazması ve kromatinden zengin nükleusları ile tanımlandı. Multilaminer primer foliküller ise normal morfolojide, birden çok hücre tabakalı kübik granüloza hücreleri ve belirgin zona pellusida ile çevrili oosite sahip olarak izlendi (Şekil 25A). Sıklıkla ovaryan stromanın derinleride yerleşim gösteren sekonder foliküller normal morfolojiye sahip olup, çok tabakalı granüloza hücreleri arasında düzensiz boşlukları sayesinde tanımlandı (Şekil 26A). Folikülü çevreleyen, içte fibroblastlar, küçük kas demetleri ve yüksek oranda vasküler yapılara sahip teka interna tabakası ve dışta düz kas hücreleri ve kollajen lifler içeren tunika eksterna tabakası gözlemlendi. Sekonder foliküle göre boyutları daha büyük olan, tek antruma sahip, oosit etrafında birkaç sıra granüloza hücrelerini içeren ve oositin kumulus ooforus ile birlikte granuloza hücre

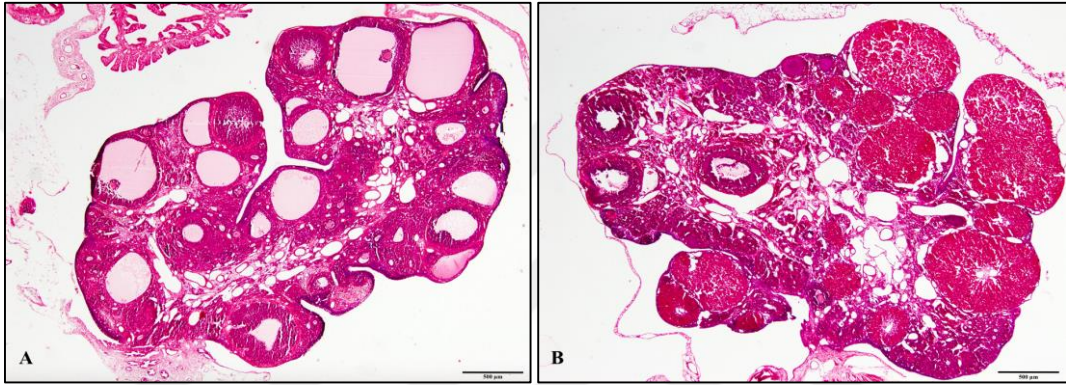
tabakasıyla ilişkide olduğu normal morfolojili graaf foliküller gözlemlendi (Şekil 27A). Az sayıda da olsa camsı membran görünümlü dalgalı hyalinize bant yapılarına sahip atretik foliküller izlendi. Farklı sıklara ait korpus luteum yapıları, teka lutein hücreleri ve daha büyük nükleus ve daha soluk boyanan sitoplazmaya sahip granuloza lutein hücreleri ile tanımlandı. Son olarak bağ dokusu lifleri, kas demetleri ve belirgin vasküler yapıları ile normal morfolojiye sahip ovaryum medulla tabakası gözlemlendi.

DMSO grubuna ait kesitlerde ise; Kontrol grubunda olduğu gibi genel morfolojinin normal olduğu, gelişiminin farklı evrelerindeki tüm foliküllerin sayılarının korunduğu tespit edildi. Primer oosit, granuloza hücreleri, teka hücreleri ve stromal hücrelerin normal morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi.

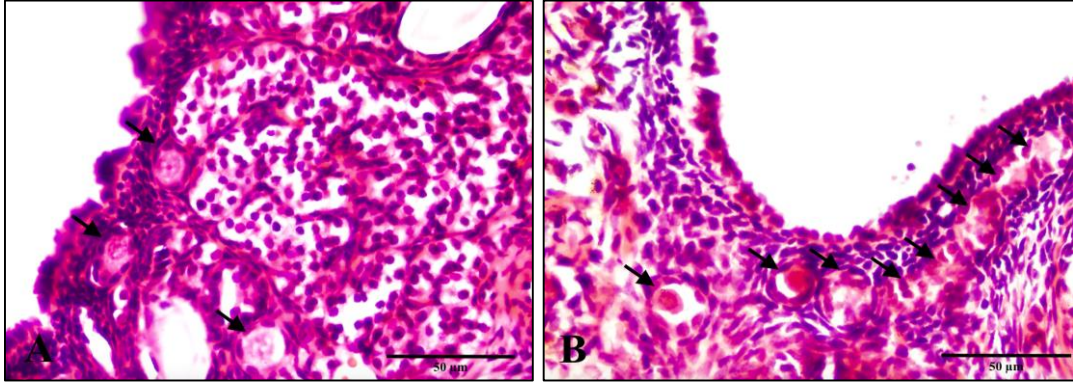
VCD grubuna ait kesitlerde; germinal epitel ve tunika albugineanın kontrol grubuna benzer özellikte normal morfolojiye sahip olduğu görüldü. Ancak VCD grubu Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gelişiminin farklı evrelerindeki tüm foliküllerin sayılarında azalma olduğu tespit edildi (Şekil 22B). Özellikle primordiyal, unilaminer primer ve multilaminer primer folikül sayılarının belirgin azalmış, atretik folikül sayılarının ise artış olduğu gözlemlendi (Şekil 28). Atretik foliküllerin oositlerinde asidofili (Şekil 29A), fragmentasyon (Şekil 29B) ve vakuolizasyon (Şekil 29C) artışı gözlenirken granuloza hücrelerinde piknotik görünümlü nükleus artışı gözlemlendi (Şekil 30). Oosit ve granuloza hücrelerinde hücre zarı bütünlüğünde ve aralarındaki bağlantılarda bozulmalar tespit edildi (Şekil 31). Sekonder ve graaf folikül sayısında azalma olduğu ancak genel olarak normal histolojik yapının korunduğu tespit edildi. Az da olsa piknotik görünümlü nükleuslara sahip granuloza ve teka hücrelerine sahip sekonder ve graaf foliküller izlendi. Korpus luteumların ise VCD grubunda Kontrol grubuna kıyasla daha az sayıda olduğu, az sayıda da olsa dejenerene hücrelere sahip olduğu tespit edildi. Hem korteks hem de medullada bulunan stromal hücreler Kontrol grubuna benzer özellikteydi.



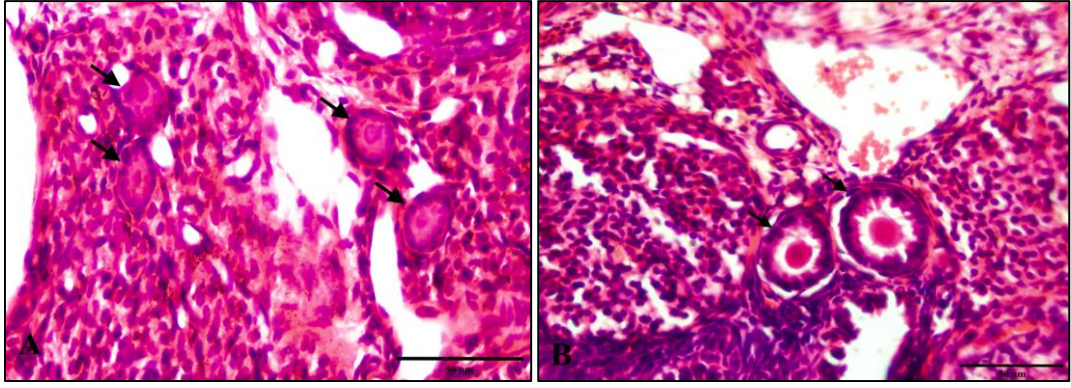
Şekil 21. Kontrol grubuna ait ovaryum doku kesitinde germinal epitel (siyah ok) ve tunika albuginea (sarı ok)



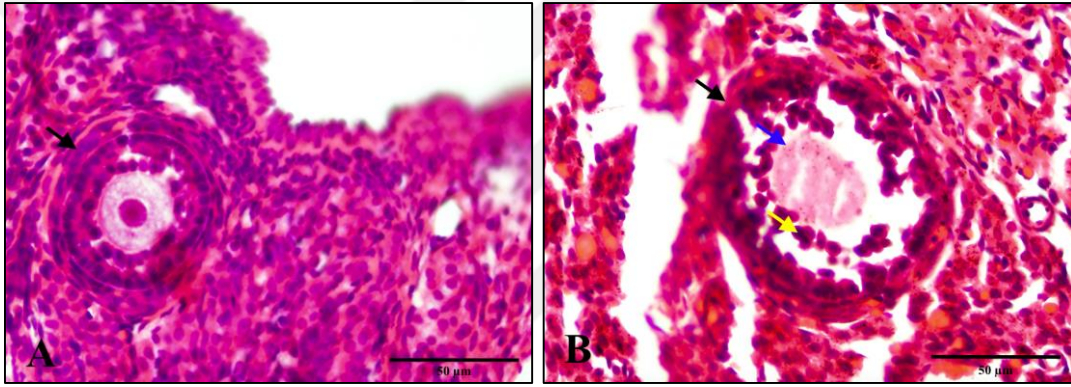
Şekil 22. (A) Kontrol grubuna ait ovaryum doku kesitinde genel görünüm. (B) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde genel görünüm.



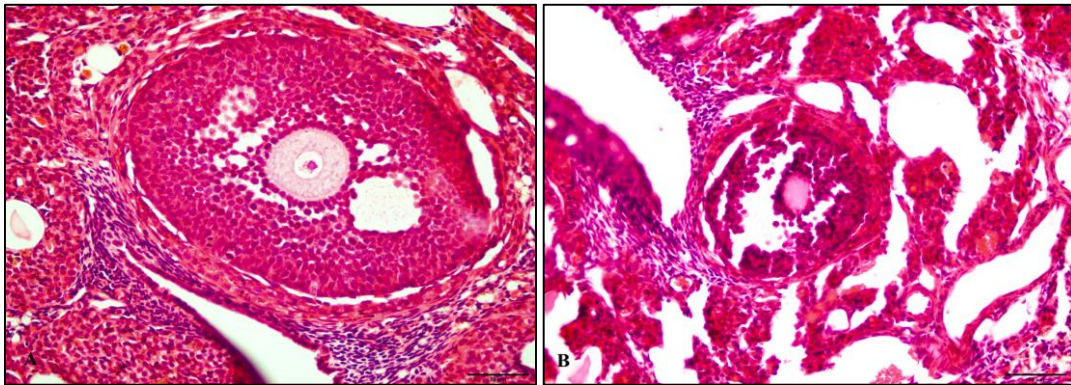
Şekil 23. (A) Kontrol grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal morfolojiye sahip primordiyal foliküller (siyah ok). (B) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde asidofilik, küçük nukleusa sahip atretik primordiyal foliküller (siyah ok).



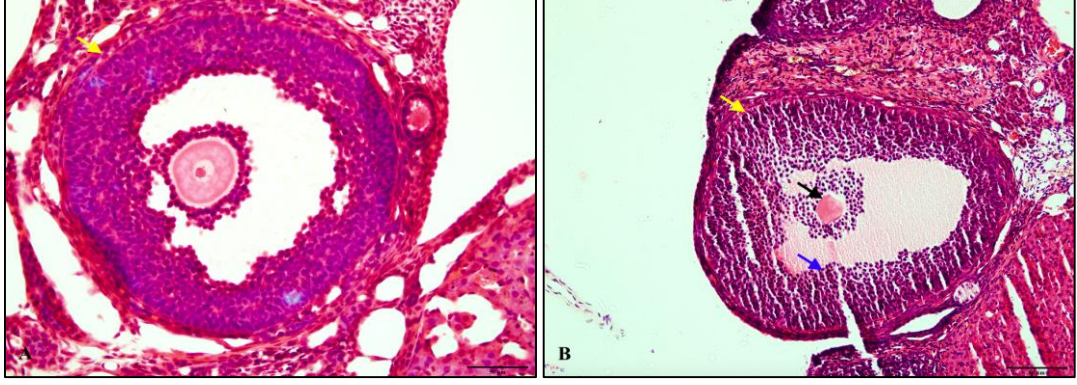
Şekil 24. (A) Kontrol grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal morfolojiye sahip unilaminer primer foliküller (siyah ok). (B) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde asidofilik, küçük nukleusa ve piknotik görünümlü granüzoza hücrelerine sahip atretik unlaminer primer foliküller (siyah ok).



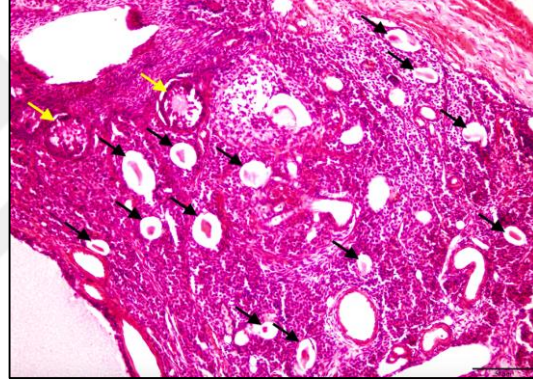
Şekil 25. (A) Kontrol grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal morfolojiye sahip multilaminer primer folikül (siyah ok). (B) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde atretik multilaminer primer folikül (siyah ok), atretik oosit (mavi ok) ve piknotik görünümlü nukleuslara sahip granuloza hücreleri (sarı ok).



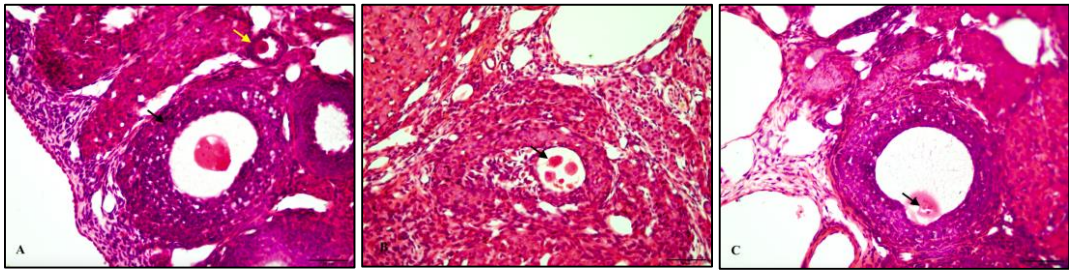
Şekil 26. (A) Kontrol grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal morfolojiye sahip sekonder folikül. (B) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde atretik sekonder folikül.



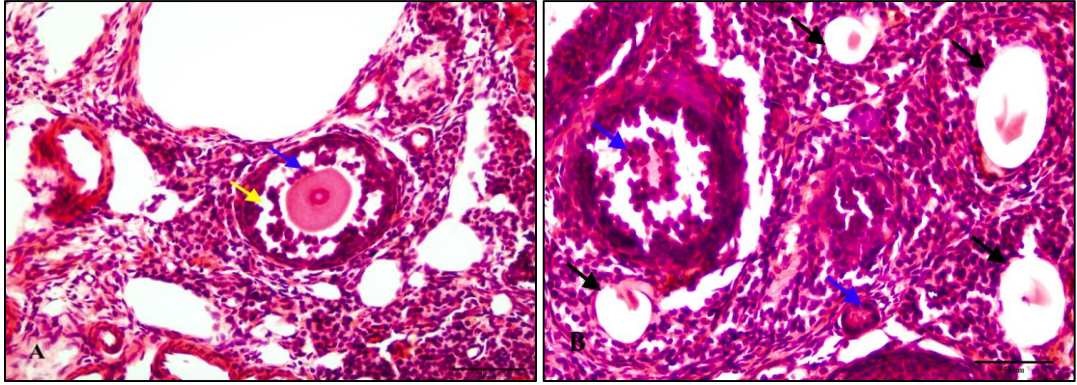
Şekil 27. (A) Kontrol grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal morfolojiye sahip graaf folikül. (B) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde atretik graaf folikül (sarı ok), atretik oosit (siyah ok) ve piknotik görünümlü nukleuslara sahip granuloza hücreleri (mavi ok).



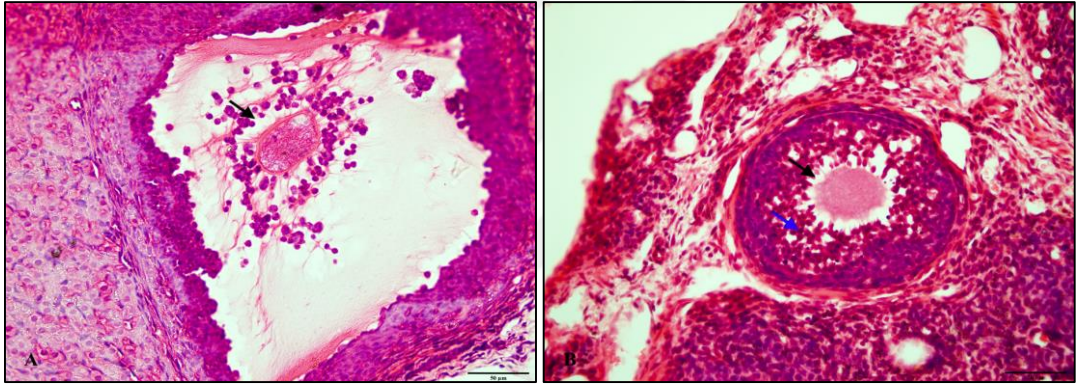
Şekil 28. VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde atretik folikül camsı membran görünümlü dalgalı hyalinize bant yapılarına sahip atretik foliküller (siyah ok) ve atretik multilaminar primer foliküller (sarı ok)



Şekil 29. (A) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde asidofilik oosite sahip atretik multilaminar (siyah ok) ve unilaminar primer folikül (sarı ok). (B) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde atretik multilaminar primer folikülün oositinde fragmentasyon artışı (siyah ok). (C) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde atretik folikülün oositinde vakuolizasyon.



Şekil 30. (A) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde piknotik nukleusa sahip granüloza hücreleri (mavi ok), granüloza hücreleri arasındaki bağlantılarda azalma (sarı ok). (B) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde piknotik nukleusa sahip granüloza hücreleri (mavi ok) ve atretik foliküller (siyah ok).



Şekil 31. (A) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde oosit-granüloza hücre bağlantılarında bozulma (siyah ok). (B) VCD grubuna ait ovaryum doku kesitinde oosit-granüloza hücre bağlantılarında bozulma (siyah ok) ve piknotik nukleusa sahip granüloza hücreleri (mavi ok).

4.2.1.2. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Ovaryum Dokusu Histomorfolojik Bulguları

VCD+DMSO grubu ve VCD+DHEA grubu deneklerin ovaryum doku kesitleri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi.

VCD+DMSO grubuna ait kesitlerde; germinal epitel ve tunika albugineanın normal morfolojiye sahip olduğu görüldü. VCD grubuna benzer histomorfolojik değişikliklere sahip olduğu ve gelişiminin farklı evrelerindeki tüm foliküllerin sayılarında azalma olduğu tespit edildi. VCD grubuna kıyasla primordial ve primer folikül sayılarının azalmış, atretik folikül sayısının artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 32).

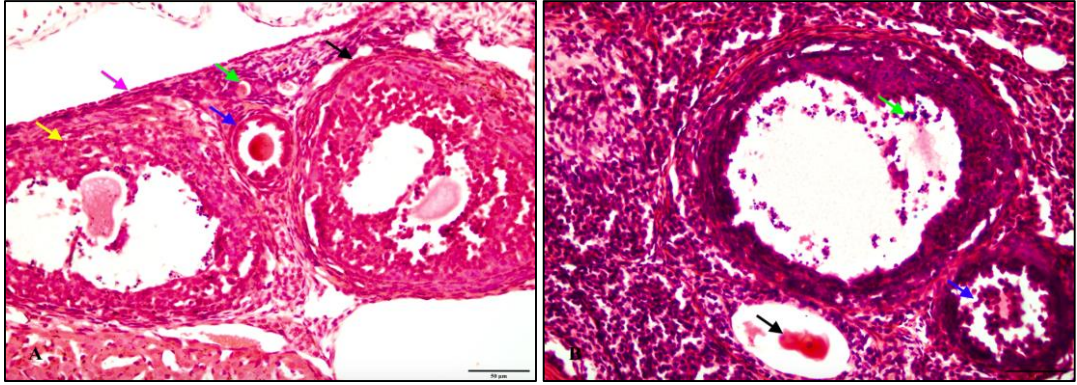
VCD+DHEA grubuna ait kesitlerde; normal morfolojiye sahip germinal epitel ve tunika albuginea izlendi (Şekil 33B). Hem VCD grubu hem de VCD+DMSO grubuna kıyasla daha az sayıda atretik folikül tespit edilirken diğer tüm folikül tiplerinin ise daha fazla sayıda olduğu belirlendi (Şekil 34). Primer oosit, granuloza hücreleri, teka hücreleri ve stromal hücrelerinde apoptotik görümlü hücre sayısının azaldığı gözlemlendi (Şekil 35).

4.2.1.3. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Ovaryum Dokusu Histomorfolojik Bulguları

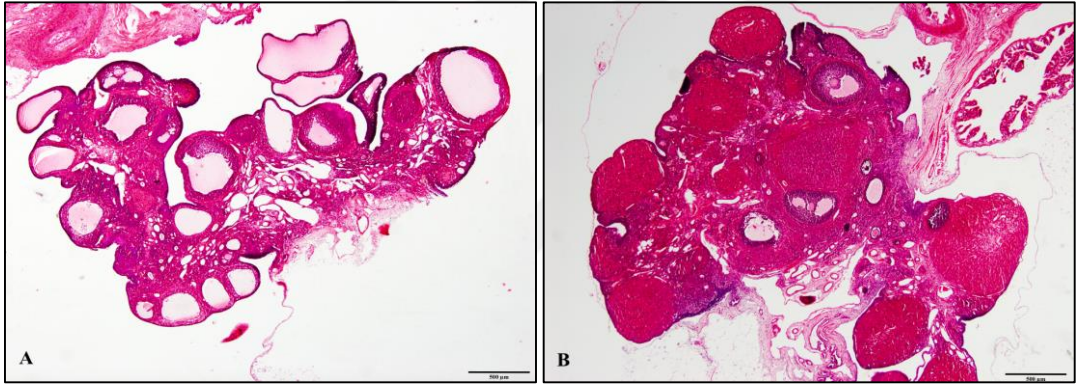
DMSO+DMSO grubu ve DMSO+DHEA grubu deneklerin ovaryum doku kesitleri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi.

DMSO+DMSO grubuna ait kesitlerde; Kontrol grubunda olduğu gibi genel morfolojinin normal olduğu, gelişiminin farklı evrelerindeki tüm foliküllerin sayılarının korunduğu tespit edildi. Primer oosit, granuloza hücreleri, teka hücreleri ve stromal hücrelerin normal morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 36).

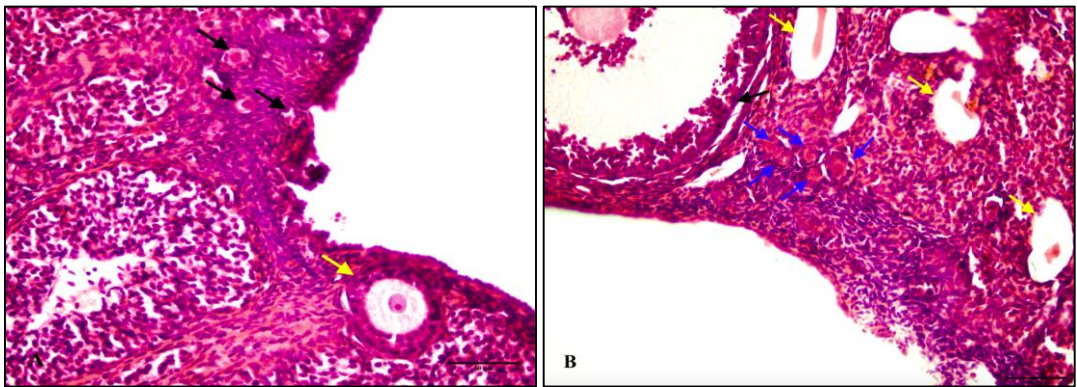
DMSO+DHEA grubuna ait kesitlerde ise, diğer gruplarda olduğu gibi normal morfolojiye sahip germinal epitel ve tunika albuginea izlendi. Kesitlerde genel morfolojinin normal olduğu, primordiyal foliküller hariç gelişiminin farklı evrelerindeki tüm foliküllerin sayılarının ve morfolojilerin korunduğu tespit edildi (Şekil 33A). Primordiyal foliküllerin normal histolojik yapı sergilediği ancak sayılarının azaldığı gözlemlendi. Primer oosit, granuloza hücreleri, teka hücreleri ve stromal hücrelerin normal morfolojiye sahip olduğu tespit edildi (Şekil 37). Korteks tabakasında oosit ve korona radiata yapılarının gözlenmediği, antrumlarının genişlediği ve granuloza hücre tabakalarının incelendiği kistik formasyona geçiş aşamasındaki foliküllerin sayılarında artış tespit edildi (Şekil 38).



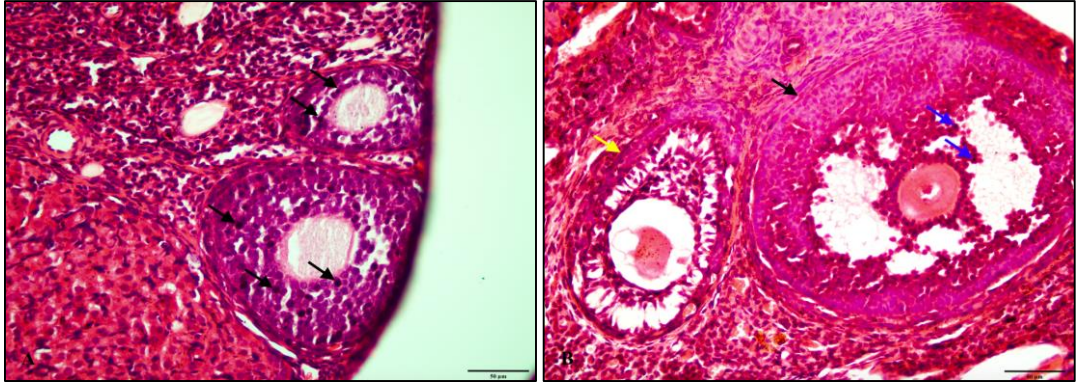
Şekil 32. (A) VCD+DMSO grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal morfolojiye sahip germinal epitel ve tunika albuginea (pembe ok), atretik primordiyal (yeşil ok), atretik unilaminer primer (mavi ok), sekonder (siyah ok) ve graaf folikül (sarı ok). (B) VCD+DMSO grubuna ait ovaryum doku kesitinde folikül kisti içerisindeki apoptotik hücreler (yeşil ok), asidofilik görünümlü oosit (siyah ok) ve oosit-granüloza hücre bağlantılarında bozulma (mavi ok).



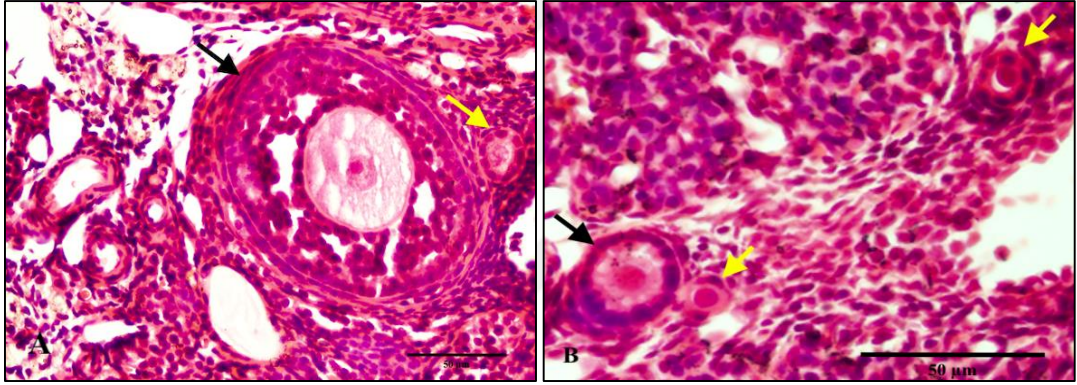
Şekil 33. (A) DMSO+DHEA grubuna ait ovaryum doku kesitinde genel görünüm. (B) VCD+DHEA grubuna ait ovaryum doku kesitinde genel görünüm.



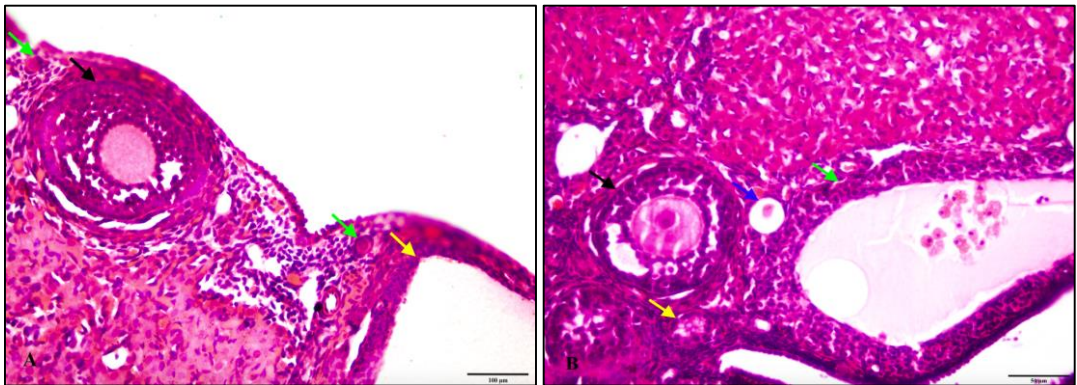
Şekil 34. (A) VCD+DHEA grubuna ait ovaryum doku kesitinde atretik primordiyal foliküller (siyah ok) ve normal görünümlü multilaminer folikül (sarı ok). (B) VCD+DHEA grubuna ait ovaryum doku kesitinde atretik foliküller (sarı ok), normal morfolojiye sahip primordiyal foliküller (mavi ok) ve oosit-granüloza hücre bağlantılarında bozulmanın gözlemlendiği graaf folikül (siyah ok).



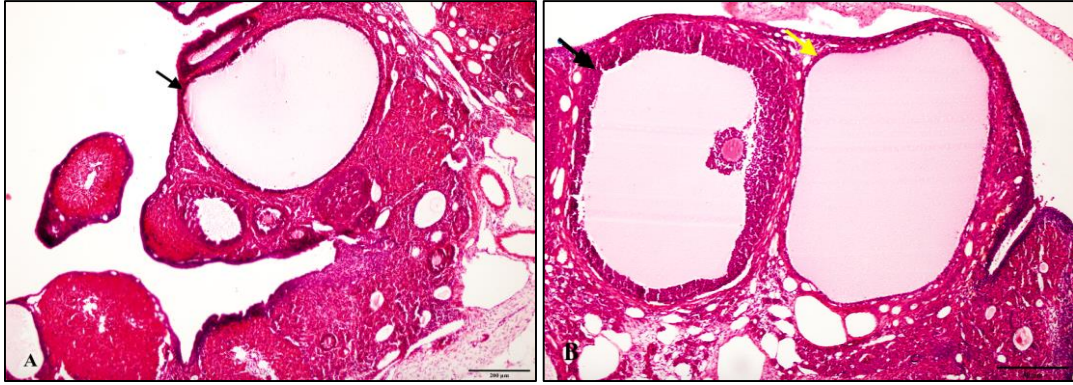
Şekil 35. (A) VCD+DHEA grubuna ait ovaryum doku kesitinde multilaminar primer foliküllerin granüloza hücrelerinde piknotik görünüm (siyah ok) (B) VCD+DHEA grubuna ait ovaryum doku kesitinde atretik multilaminar primer folikül ve normal morfolojiye sahip sekonder folikülün (siyah ok) granüloza hücrelerinde piknotik görünüm (mavi ok).



Şekil 36. (A) DMSO+DMSO grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal morfolojiye sahip multilaminar primer (siyah ok) ve unilaminar primer folikül (sarı ok). (B) DMSO+DMSO grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde normal unilaminar primer (siyah ok) ve primordiyal foliküller (sarı ok).



Şekil 37. (A) DMSO+DHEA grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal morfolojiye sahip primordiyal (yeşil ok), multilaminar primer folikül (siyah ok) ve folikül kisti (sarı ok). (B) DMSO+DHEA grubuna ait ovaryum doku kesitinde folikül kisti (yeşil ok), atretik folikül (mavi ok), normal morfolojiye sahip sekonder (siyah ok) ve unilaminar primer folikül (sarı ok).



Şekil 38. (A) DMSO+DHEA grubuna ait ovaryum doku kesitinde folikül kisti (siyah ok). (B) DMSO+DHEA grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal morfolojiye sahip graaf folikül (siyah ok) ve ince granüloza hücre tabakası ile karakterize kistik formasyona geçiş aşamasındaki folikül kisti (sarı ok).

4.2.1.4. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Ovaryum Dokusu Histomorfolojik Bulguları

VCD+DMSO+SF grubu, VCD+DMSO+KOH grubu, VCD+DHEA+SF grubu ve VCD+DHEA+KOH grubu deneklerin ovaryum doku kesitleri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi.

VCD+DMSO+SF grubuna ait kesitlerde; germinal epitel ve tunika albugineanın normal morfolojiye sahip olduğu görüldü. VCD grubuna benzer histomorfolojik değişikliklere sahip olduğu ve gelişiminin farklı evrelerindeki tüm foliküllerin sayılarında azalma olduğu tespit edildi (Şekil 39A). VCD grubuna kıyasla primordiyal ve primer folikül sayılarının azalmış, atretik folikül sayısının artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 39B).

VCD+DMSO+KOH grubuna ait kesitlerde ise; diğer gruplarda olduğu gibi ovaryumu çevreleyen normal morfolojiye sahip germinal epitel ve tunika albuginea izlendi. Kontrol grubuna kıyasla, VCD grubuna benzer şekilde histomorfolojik değişikliklere sahip olduğu ve gelişiminin farklı evrelerindeki tüm foliküllerin sayılarında azalma olduğu tespit edildi. Ancak VCD+DMSO+SF grubuna kıyasla sekonder folikül, graaf folikül ve korpus luteum sayılarının sayılarının artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 40A). Özellikle farklı sıkluslara ait korpus luteum sayılarındaki artış dikkat çekti. Medulla tabakasında stromal hücrelerde dejenerasyon bulgularının

bulunmamasına karşın vasküler yapıların daha büyük yer kapladığı gözlemlendi (Şekli 40B).

VCD+DHEA+SF grubuna ait kesitlerde; germinal epitel ve tunika albugineanın normal morfolojiye sahip olduğu görüldü. VCD+DHEA grubuna benzer histomorfolojik değişikliklere sahip olduğu ve VCD grubuna kıyasla daha az sayıda atretik folikül tespit edilirken diğer tüm folikül tiplerinin ise daha fazla sayıda olduğu belirlendi. VCD+DHEA grubunda olduğu gibi primer oosit, granuloza hücreleri, teka hücreleri ve stromal hücrelerinde apoptotik görünümlü hücre sayısının azaldığı gözlemlendi. VCD+DMSO+SF grubuna kıyasla tüm folikül tiplerinin sayısında artış olduğu tespit edildi.

VCD+DHEA+KOH grubuna ait kesitlerde ise; diğer gruplarda olduğu gibi ovaryumu çevreleyen normal morfolojiye sahip germinal epitel ve tunika albuginea izlendi. VCD+DHEA grubuna benzer şekilde histomorfolojik değişikliklere sahip olduğu tespit edildi. VCD+DHEA+SF grubuna kıyasla sekonder folikül, graaf folikül ve korpus luteum sayılarının artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 41A). Özellikle farklı sıkluslara ait korpus luteum sayılarında belirgin artış izlendi (Şekil 42B). Medulla tabakasında stromal hücrelerde dejenerasyon bulgularının bulunmamasına karşın vasküler yapıların daha büyük yer kapladığı gözlemlendi (Şekil 41B).. VCD+DMSO+KOH grubuna kıyasla tüm folikül tiplerinin sayısında artış olduğu tespit edildi.

4.2.1.5. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Ovaryum Dokusu Histomorfolojik Bulguları

DMSO+DMSO+SF grubu, DMSO+DMSO+KOH grubu, DMSO+DHEA+SF grubu ve DMSO+DHEA+KOH grubu deneklerin ovaryum doku kesitleri ışık mikroskopik olarak değerlendirildi.

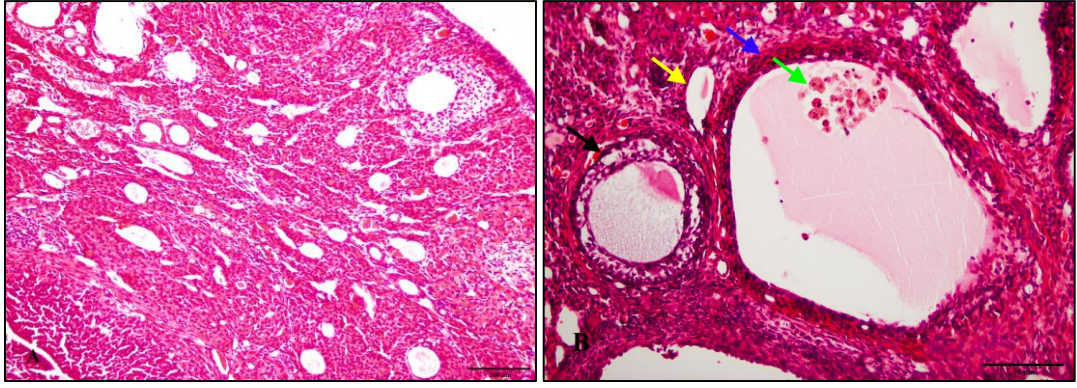
DMSO+DMSO+SF grubuna ait kesitlerde; germinal epitel ve tunika albugineanın normal morfolojiye sahip olduğu görüldü. Kontrol grubunda olduğu gibi genel morfolojinin normal olduğu, gelişiminin farklı evrelerindeki tüm foliküllerin sayılarının ve morfolojilerinin korunduğu tespit edildi. Primer oosit,

granuloza hücreleri, teka hücreleri ve stromal hücrelerin normal morfolojiye sahip olduğu gözlemlendi (Şekil 43A).

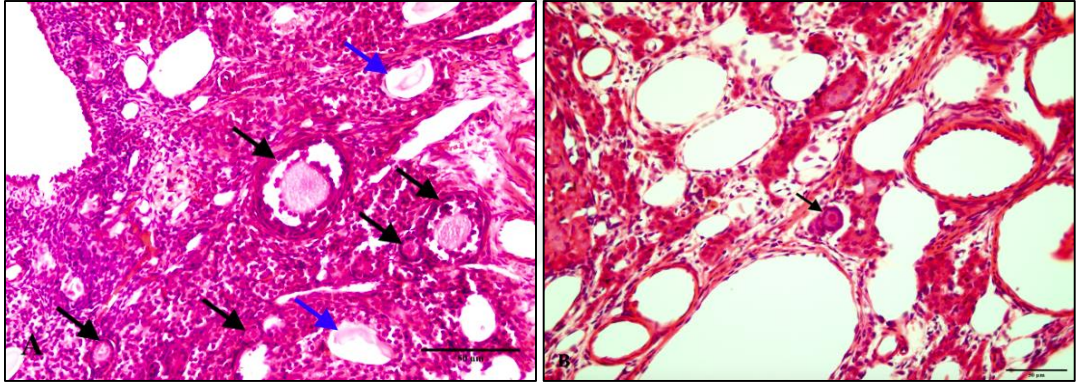
DMSO+DMSO+KOH grubuna ait kesitlerde ise; diğer gruplarda olduğu gibi ovaryumu çevreleyen normal morfolojiye sahip germinal epitel ve tunika albuginea izlendi. DMSO+DMSO+SF grubuna benzer şekilde histomorfolojik değişikliklere sahip olduğu ancak sekonder folikül, graaf folikül ve özellikle korpus luteum sayılarının belirgin artmış olduğu gözlemlendi (Şekil 43B). Medulla tabakasında stromal hücrelerde dejenerasyon bulgularının bulunmamasına karşın vasküler yapıların daha büyük yer kapladığı gözlemlendi (Şekil 44).

DMSO+DHEA+SF grubuna ait kesitlerde; germinal epitel ve tunika albugineanın normal morfolojiye sahip olduğu görüldü. DMSO+DHEA grubuna benzer histomorfolojik değişikliklere sahip olduğu ve primer oosit, granuloza hücreleri, teka hücreleri ve stromal hücrelerin normal morfolojiye sahip olduğu tespit edildi. DMSO+DHEA grubuna benzer şekilde kistik formasyona geçiş aşamasındaki foliküllerin sayılarında artış tespit edildi (Şekil 45A). DMSO+DMSO+SF grubuna kıyasla daha fazla sayıda multilaminar folikül olduğu tespit edilirken korpus luteum sayısının azaldığı, diğer folikül tipleri sayısında ise fark olmadığı tespit edildi.

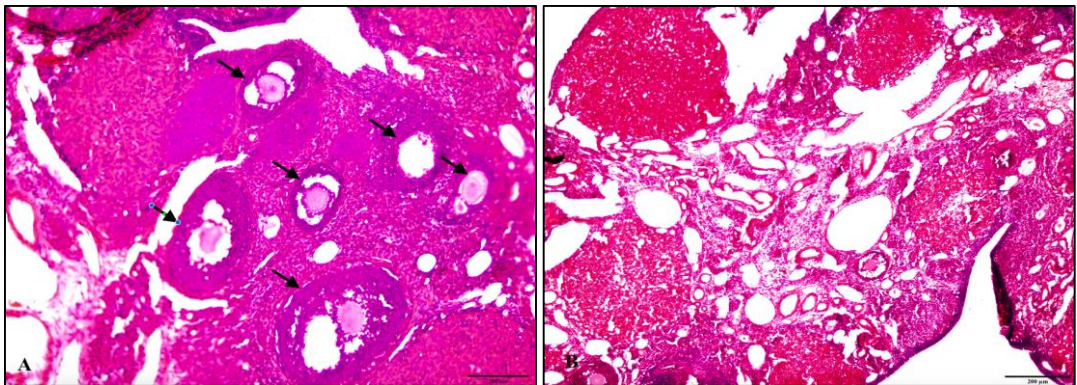
DMSO+DHEA+KOH grubuna ait kesitlerde ise; diğer gruplarda olduğu gibi ovaryumu çevreleyen normal morfolojiye sahip germinal epitel ve tunika albuginea izlendi. DMSO+DHEA grubuna benzer şekilde histomorfolojik değişikliklere sahip olduğu tespit edildi (Şekil 45B). DMSO+DHEA+SF grubuna kıyasla sekonder folikül, graaf folikül ve korpus luteum sayılarının sayılarının artmış olduğu gözlemlendi. Özellikle farklı sıkluslara ait korpus luteum sayılarında belirgin artış izlendi (Şekil 42A). Medulla tabakasında stromal hücrelerde dejenerasyon bulgularının bulunmamasına karşın vasküler yapıların daha büyük yer kapladığı gözlemlendi. DMSO+DMSO+KOH grubuna kıyasla primordiyal, unilaminar primer ve atretik folikül dışında diğer tüm folikül tiplerinin sayısında artış olduğu tespit edildi.



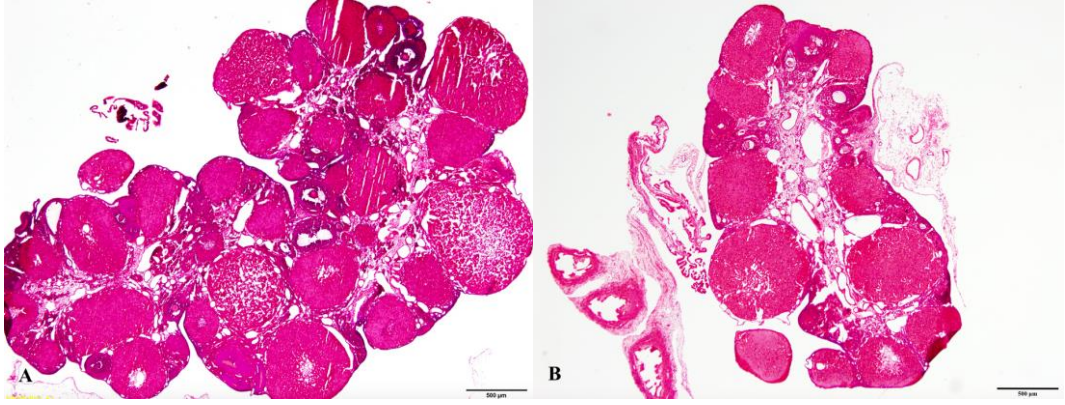
Şekil 39. (A) VCD+DMSO+SF grubuna ait ovaryum doku kesitinde gelişiminin farklı evrelerindeki tüm foliküllerde azalmanın görülebildiği genel görünüm. (B) VCD+DMSO+SF grubuna ait ovaryum doku kesitinde camsı membran görünümlü atretik folikül (sarı ok), atretik multilaminar primer (siyah ok) ve apoptotik cisimleri (yeşil ok) görülebilen folikül kisti (mavi ok).



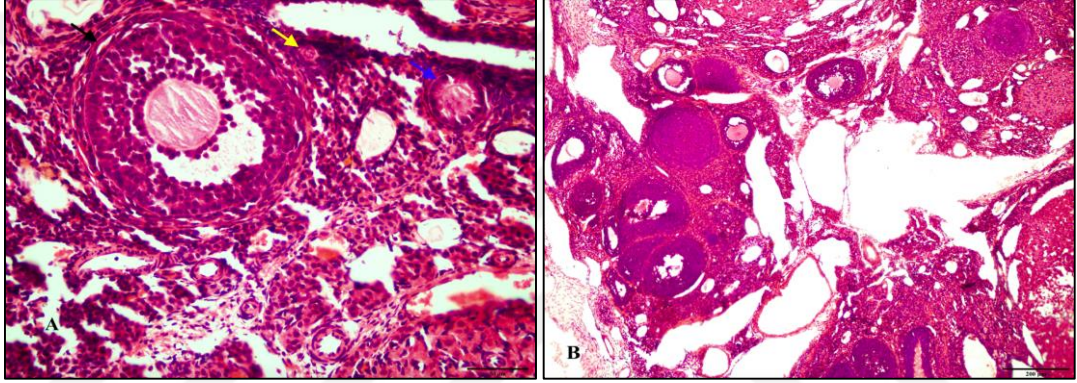
Şekil 40. (A) VCD+DMSO+KOH grubuna ait ovaryum doku kesitinde gelişmekte olan foliküller (siyah ok) ve atretik foliküller (mavi ok). (B) VCD+DMSO+KOH grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal morfolojiye sahip unilaminar primer folikül (siyah ok) ve vaskularite artışı.



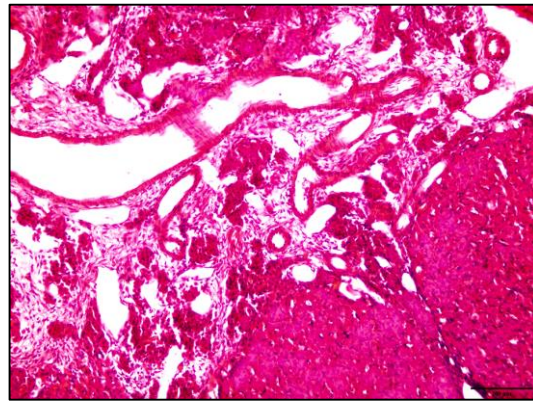
Şekil 41. (A) VCD+DHEA+KOH grubuna ait ovaryum doku kesitinde gelişmekte olan foliküller (siyah ok). (B) VCD+DHEA+KOH grubuna ait ovaryum doku kesitinde vaskularite artışı.



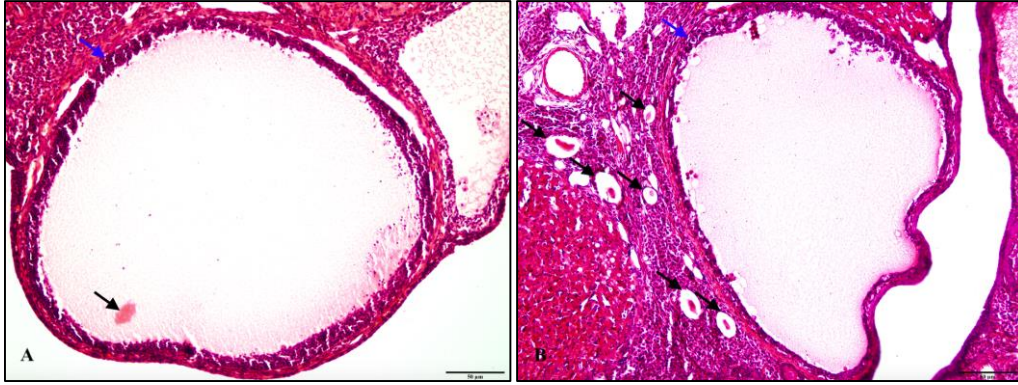
Şekil 42. (A) DMSO+DHEA+KOH grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde genel görünüm. (B) VCD+DHEA+KOH grubuna ait ovaryum doku kesitlerinde genel görünüm



Şekil 43. (A) DMSO+DMSO+SF grubuna ait ovaryum doku kesitinde normal görünümlü sekonder (siyah ok), primordiyal (sarı ok) ve unilaminer primer folikül (mavi ok). (B) DMSO+DMSO+KOH grubuna ait ovaryum doku kesitinde folikülogenez artışı.



Şekil 44. DMSO+DMSO+KOH grubuna ait ovaryum doku kesitinde vakularizasyon artışı



Şekil 45. (A) DMSO+DHEA+SF grubuna ait ovaryum doku kesitinde folikül kisti (mavi ok) ve asidofilik görünümlü dejenere oosit. (B) DMSO+DHEA+KOH grubuna ait ovaryum doku kesitinde folikül kisti (mavi ok) ve atretik foliküller (siyah ok).

4.2.2. Morfometrik Bulgular

Her gruptaki deneklerin sol ovaryumundan alınan 5 µm kalınlığındaki doku kesitlerinin H&E boyaması sonrası primordiyal, unilaminar primer, multilaminar primer, sekonder, graaf, atretik folikül ve korpus luteum sayımları yapıldı.

4.2.2.1. Kontrol, Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerin Folikül Sayıları

Kontrol, VCD ve DMSO gruplarındaki deneklerin ovaryan folikülleri, gelişim evrelerine göre sınıflandırılarak ortalama değerleri Tablo 18 ve Grafik 7’de verildi. Deneklerin ortalama folikül sayıları karşılaştırıldığında Kontrol grubu ile DMSO grubu arasında tüm foliküller gelişim basamakları evrelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı belirlendi. VCD grubu deneklerin gelişimin tüm evrelerindeki ortalama folikül değerlerinin hem Kontrol grubu hem de DMSO grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu belirlendi.

Tablo 18. Kontrol, VCD ve DMSO gruplarına ait deneklerin folikül sayıları

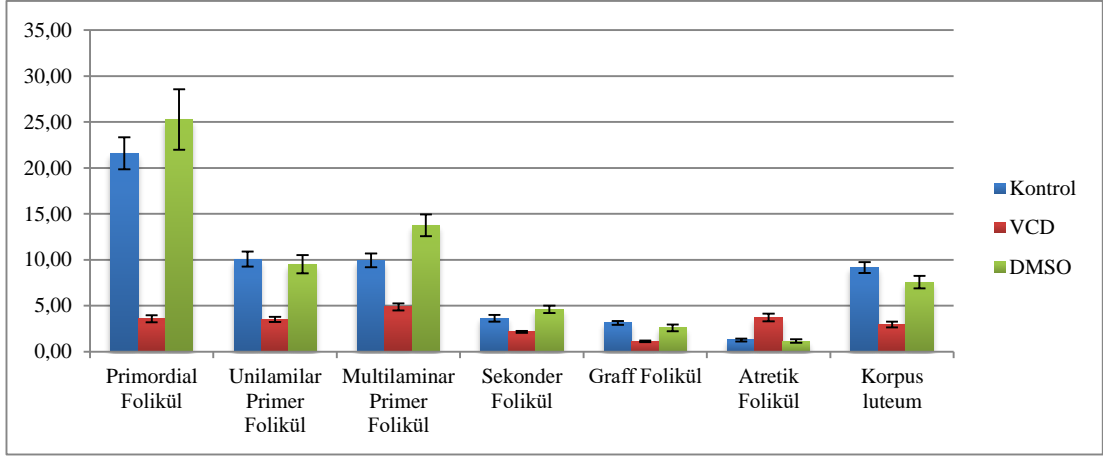
Foliküller	Kontrol Grubu*	VCD Grubu*	DMSO Grubu*	P**,***
Primordiyal	21,6±1,37 ^a	3,60±0,83 ^b	25,8±3,29 ^a	<0,001
Unilaminar primer	10,8±0,81 ^a	3,53±20,27 ^b	9,52±0,98 ^a	<0,001
Multilaminar primer	9,96±0,74 ^a	4,88±0,80 ^b	13,76±1,17 ^a	<0,001
Sekonder	3,64±0,36 ^a	2,16±0,09 ^b	4,60±0,4 ^a	<0,001
Graaf	3,12±0,21 ^a	1,12±0,08 ^b	2,60±0,31 ^a	0,001
Atretik	1,28±0,15 ^a	3,72±0,41 ^b	1,16±0,18 ^a	<0,001
Korpus luteum	9,16±0,67 ^a	2,96±0,35 ^b	7,56±0,92 ^a	<0,001

*Veriler ortama ağırlık± Standart Error (SE) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

^{ab}Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Grafik 7. Kontrol, VCD ve DMSO gruplarına ait deneklerin folikül sayıları

4.2.2.2. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Folikül Sayıları

VCD, VCD+DHEA ve VCD+DMSO gruplarındaki deneklerin ovaryan folikülleri, gelişim evrelerine göre sınıflandırılarak ortalama değerleri Tablo 19 ve Grafik 8’de verildi. Deneklerin ortalama folikül sayıları karşılaştırıldığında VCD+DHEA grubunda hem VCD grubu hem de VCD+DMSO grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı daha az sayıda ortalama atretik folikül tespit edilirken, diğer tüm folikül gelişim evrelerinde ise istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi. VCD+DMSO grubunda, VCD grubuna göre ortalama primordiyal ve primer folikül sayısının istatistiksel olarak anlamlı daha az olduğu, ortalama atretik folikül sayısının daha fazla olduğu ve iki grup arasında diğer tüm folikül tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi.

Tablo 19. VCD, VCD+DHEA ve VCD+DMSO gruplarına ait deneklerin folikül sayıları

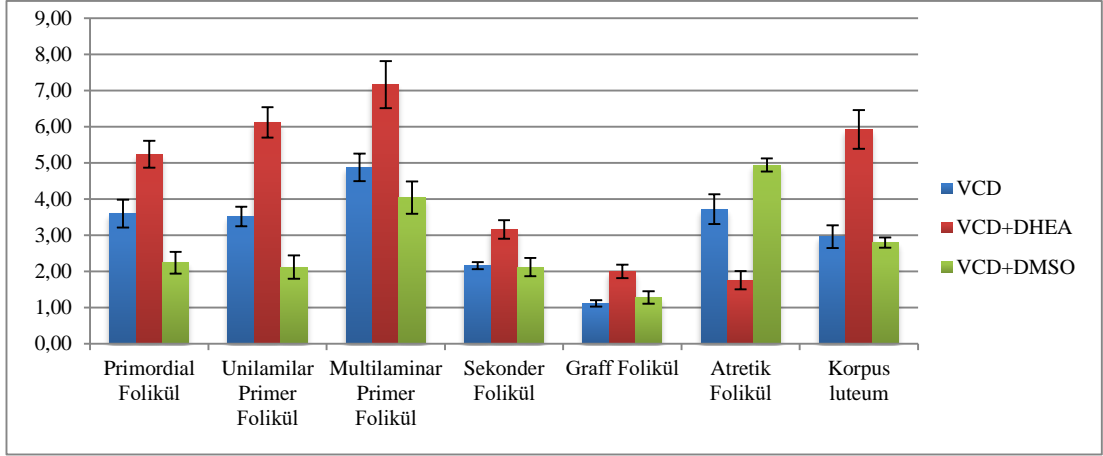
Foliküller	VCD Grubu*	VCD+DHEA Grubu*	VCD+DMSO Grubu*	p ^{**,***}
Primordiyal	3,60±0,83 ^a	5,24±0,37 ^b	2,24±0,3 ^c	<0,001
Unilaminar primer	3,53±0,27 ^a	6,12±0,4 ^b	2,12±0,33 ^c	0,006
Multilaminar primer	4,88±0,80 ^a	7,16±0,65 ^b	4,04±0,44 ^a	0,004
Sekonder	2,16±0,09 ^a	3,16±0,25 ^b	2,12±0,25 ^a	0,007
Graaf	1,12±0,08 ^a	2±0,18 ^b	1,28±0,16 ^a	0,001
Atretik	3,72±0,41 ^a	1,76±0,25 ^b	4,94±0,18 ^c	<0,001
Korpus luteum	2,96±0,35 ^a	5,92±0,54 ^b	2,80±0,14 ^a	<0,001

*Veriler ortama ağırlık± Standart Error (SE) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

^{abc}Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Grafik 8. VCD, VCD+DHEA ve VCD+DMSO gruplarına ait deneklerin folikül sayıları

4.2.2.3. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Folikül Sayıları

DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO gruplarındaki deneklerin ovaryan folikülleri, gelişim evrelerine göre sınıflandırılarak ortalama değerleri Tablo 20 ve Grafik 9’da verildi. Deneklerin ortalama folikül sayıları karşılaştırıldığında DMSO+DHEA grubunda hem DMSO grubu hem de DMSO+DMSO grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı daha az sayıda ortalama primordiyal folikül ve ortalama atretik folikül tespit edilirken, diğer tüm folikül tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi. DMSO+DMSO grubunda DMSO grubuna göre sadece ortalama atretik folikül sayısının istatistiksel olarak anlamlı daha fazla olduğu ve diğer tüm folikül tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi.

Tablo 20. DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO gruplarına ait deneklerin folikül sayıları

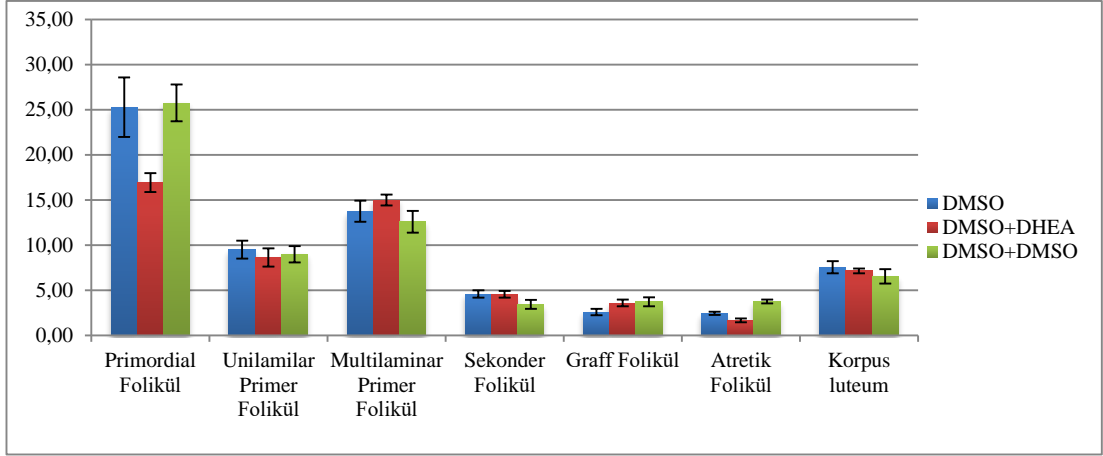
Foliküller	DMSO Grubu*	DMSO+DHEA Grubu*	DMSO+DMSO Grubu*	p ^{**,***}
Primordiyal	25,8±3,29 ^a	16,92±1,04 ^b	25,76±2,48 ^a	0,011
Unilaminar primer	9,52±0,98	8,64±0,9	9±0,91	0,870
Multilaminar primer	13,76±1,17	15±0,61	12,60±1,2	0,200
Sekonder	4,60±0,4	4,56±0,37	3,44±0,5	0,600
Graaf	2,60±0,31	3,6±0,37	3,72±0,5	0,300
Atretik	2,46±0,18 ^a	1,68±0,21 ^b	3,76±0,21 ^c	0,012
Korpus luteum	7,56±0,67	7,16±0,26	6,56±0,79	0,230

*Veriler ortama ağırlık± Standart Error (SE) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

^{abc}Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Grafik 9. DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO gruplarına ait deneklerin folikül sayıları

4.2.2.4. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Folikül Sayıları

VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH ve VCD+DMSO+SF gruplarındaki deneklerin ovaryan folikülleri, gelişim evrelerine göre sınıflandırılarak ortalama değerleri Tablo 21 ve Grafik 10'da verildi. Deneklerin ortalama folikül sayıları karşılaştırıldığında VCD+DHEA+KOH grubunda VCD+DHEA+SF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı daha fazla sayıda ortalama sekonder folikül, ortalama graaf folikül ve ortalama korpus luteum olduğu tespit edilirken, ortalama multilaminar primer folikül ve ortalama atretik folikül sayısının istatistiksel olarak anlamlı az olduğu belirlendi. İki grup arasında ortalama primordiyal folikül ve ortalama unilaminar primer folikül açısından istatistiksel anlamlı fark tespit edilmedi. VCD+DMSO+KOH grubunda ise VCD+DMSO+SF grubuna kıyasla ortalama sekonder folikül, ortalama graaf folikül ve ortalama korpus luteum sayısının istatistiksel olarak anlamlı daha fazla olduğu tespit edilirken diğer tüm folikül tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı. VCD+DHEA+KOH grubu ile VCD+DMSO+KOH grubu karşılaştırıldığında, iki grup arasında ortalama korpus luteum sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmezken, daha az sayıda ortalama atretik folikül sayısı saptandı. İki grup arasında diğer tüm foliküller gelişim evrelerinde ortalama folikül sayısının VCD+DHEA+KOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı fazla olduğu belirlendi. VCD+DHEA+SF grubu ile VCD+DMSO+SF grubu karşılaştırıldığında ise iki grup arasında ortalama atretik folikül sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark

tespit edilmezken, diğer foliküler gelişim evrelerinde ortalama folikül sayısının VCD+DHEA+SF grubunda istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 21. VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH ve VCD+DMSO+SF gruplarına ait deneklerin folikül sayıları

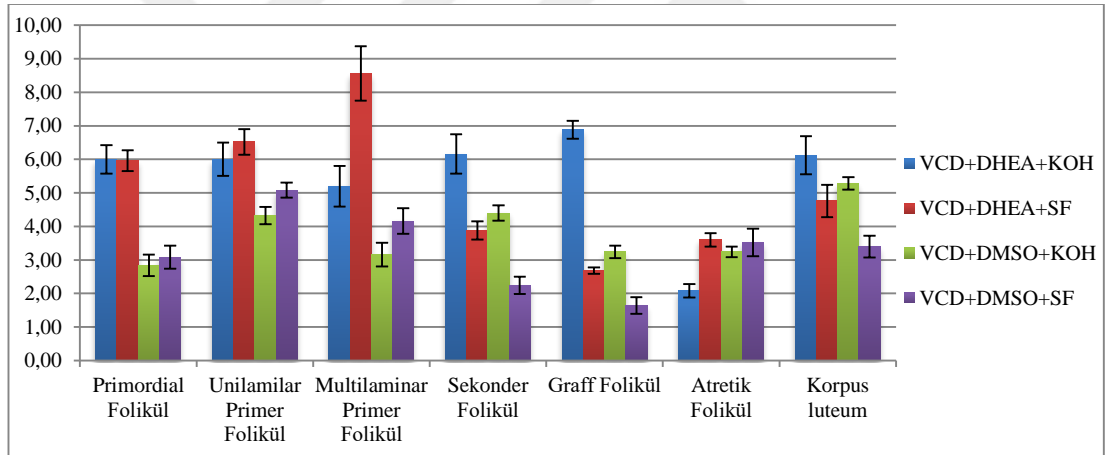
Foliküller	VCD + DHEA + KOH Grubu*	VCD + DHEA + SF Grubu*	VCD + DMSO + KOH Grubu*	VCD + DMSO + SF Grubu*	p ^{**,****}
Primordiyal	6±0,48 ^a	5,96±0,31 ^a	2,84±0,32 ^b	3,08±0,46 ^b	<0,001
Unilaminar primer	6±0,5 ^a	6,52±0,38 ^a	4,32±0,25 ^b	5,08±0,22 ^b	0,001
Multilaminar primer	5,20±0,6 ^a	8,56±0,83 ^b	3,16±0,35 ^c	4,16±0,38 ^c	<0,001
Sekonder	6,16±0,6 ^a	3,88±0,27 ^b	4,4±0,23 ^b	2,24±0,26 ^c	<0,001
Graaf	6,88±0,26 ^a	2,68±0,1 ^b	3,24±0,18 ^b	1,16±0,25 ^c	<0,001
Atretik	2,08±0,2 ^a	3,6±0,2 ^b	3,24±0,15 ^b	3,52±0,4 ^b	0,004
Korpus luteum	6,12±0,57 ^a	4,76±0,48 ^b	5,28±0,18 ^a	3,40±0,32 ^c	<0,001

*Veriler ortama ağırlık± Standart Error (SE) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

abc Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Grafik 10. VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH ve VCD+DMSO+SF gruplarına ait deneklerin folikül sayıları

4.2.2.5. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların Folikül Sayıları

DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF gruplarındaki deneklerin ovaryan folikülleri, gelişim evrelerine göre sınıflandırılarak ortalama değerleri Tablo 22 ve Grafik 11’de verildi. Deneklerin ortalama folikül sayıları karşılaştırıldığında DMSO+DHEA+KOH grubunda

DMSO+DHEA+SF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek sayıda ortalama sekonder folikül, ortalama graaf folikül ve ortalama korpus luteum olduğu tespit edilirken, ortalama multilaminer primer folikül sayısının istatistiksel olarak anlamlı az olduğu belirlendi. İki grup arasında diğer tüm folikül tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi. DMSO+DMSO+KOH grubunda ise DMSO+DMSO+SF grubuna kıyasla ortalama sekonder folikül, ortalama graaf folikül ve ortalama korpus luteum sayısının istatistiksel olarak anlamlı daha yüksek olduğu tespit edilirken, diğer tüm folikül tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı. DMSO+DHEA+KOH grubu ile DMSO+DMSO+KOH grubu karşılaştırıldığında, iki grup arasında ortalama primordiyal, ortalama unilaminer primer, ortalama multilaminer primer ve ortalama atretik folikül sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmezken, diğer foliküler gelişim evrelerinde ortalama folikül sayısının DMSO+DHEA+KOH grubunda istatistiksel olarak anlamlı fazla olduğu belirlendi. DMSO+DHEA+SF grubunda DMSO+DMSO+SF grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı daha fazla sayıda ortalama multilaminer primer folikül olduğu tespit edilirken, diğer tüm foliküler gelişim evrelerinde ortalama folikül sayısında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmedi.

Tablo 22. DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF gruplarına ait deneklerin folikül sayıları

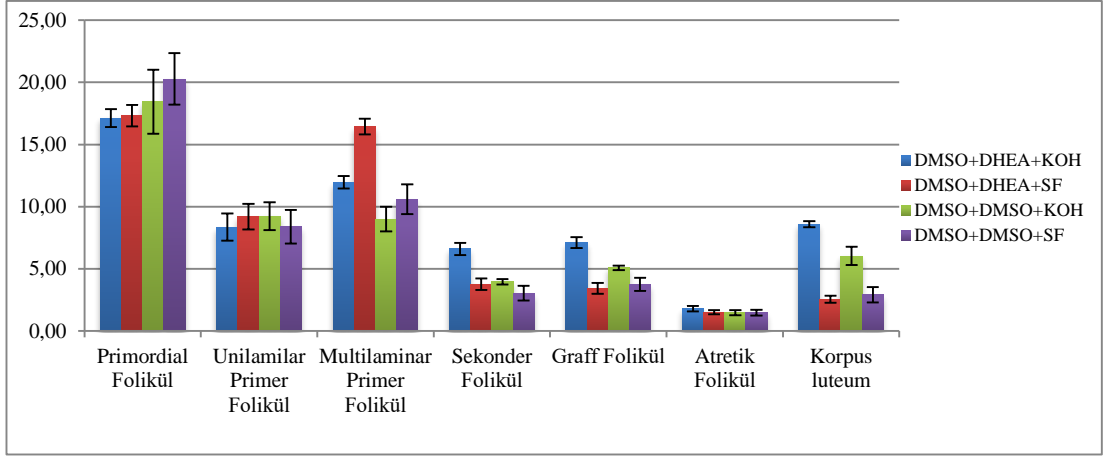
Foliküller	DMSO + DHEA + KOH Grubu*	DMSO + DHEA + SF Grubu*	DMSO + DMSO + KOH Grubu*	DMSO + DMSO + SF Grubu*	p ^{**,***}
Primordiyal	17,12±0,17	17,31±0,86	18,44±2,58	20,28±2,07	0,48
Unilaminer primer	8,36±1,1	9,2±1,05	9,24±1,1	8,40±1,3	0,8
Multilaminer primer	11,96±0,5 ^a	16,44±0,62 ^b	9±0,9 ^a	10,6±1,2 ^a	<0,001
Sekonder	6,60±0,48 ^a	3,75±0,45 ^b	3,96±0,21 ^b	3,04±0,5 ^b	<0,001
Graaf	7,12±0,43 ^a	3,44±0,44 ^b	5,08±0,19 ^b	3,76±0,53 ^b	<0,001
Atretik	1,8±0,2	1,52±0,16	1,39±0,2	1,48±0,23	0,75
Korpus luteum	8,60±0,25 ^a	2,56±0,27 ^b	6,04±0,73 ^c	2,92±0,62 ^b	<0,001

*Veriler ortama ağırlık± Standart Error (SE) olarak verildi.

**Gruplar arası karşılaştırmalarda One-Way ANOVA testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

***İkili grup karşılaştırmalarında Post Hoc Tukey testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

^{ab}Farklı harfler ikili grup karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı farkı göstermektedir.



Grafik 11. DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF gruplarına ait deneklerin folikül sayıları

4.3. Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. Gen Ekspresyon Analizi

Her gruptaki deneklerin sakrifikasyonları sırasında perfüzyon fiksasyon işlemi öncesi sağ ovaryumları eksize edildi. Elde edilen ovaryum doku örneklerinden total RNA izolasyonu sonrası elde edilen mRNA'ların ters transkriptaz enzimi ile cDNA'ya dönüşümü gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar kullanılarak COX-2 gen ekspresyon düzeyi Real Time PCR tekniği ile belirlendi. Tüm örnekler 3 tekrar olarak analiz edildi. Elde edilen verilerde GAPDH housekeeping geni kullanılarak ekspresyon düzeyleri normalize edildi. Verilerinin değerlendirilmesi ve gruplar arası istatistiksel analizler, $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemi kullanılarak internet tabanlı gen ekspresyon yazılımı (Qiagen) ile gerçekleştirildi.

4.3.1.1. Kontrol, Düşük Over Rezervine Sahip ve Normal Over Rezervine Sahip Deneklerin COX-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri

Kontrol, VCD ve DMSO gruplarındaki deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon analizi Tablo 23 ve Grafik 12'de verildi. Deneklerin COX-2 gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında Kontrol grubu ile DMSO grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi ($p=0,68$). VCD grubu deneklerin COX-2 gen ekspresyonunun hem Kontrol grubu hem de DMSO grubuna

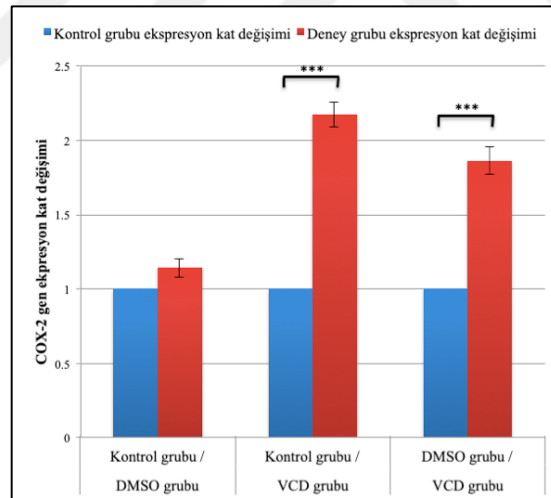
kıyasla sırasıyla 2,17 (p=0,02) ve 1,86 kat (p=0,03) istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi.

Tablo 23. Kontrol, VCD ve DMSO gruplarına ait deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri

	2 ⁻ (-Avg.(ΔCt))		Ekspresyon kat değişim oranı*	P**
	Kontrol grubu	Deney grubu		
	Kontrol grubu	DMSO grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,012275	0,014275	+1,14	0,68
	Kontrol grubu	VCD grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,012275	0,026387	+2,17	0,02
	DMSO grubu	VCD grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,014275	0,026387	+1,86	0,03

* Ekspresyon kat değişim oranı, deney grubu gen ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre + ya da - katını temsil eder.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 12. Kontrol, VCD ve DMSO gruplarına ait deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri

4.3.1.2. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların COX-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri

VCD, VCD+DHEA ve VCD+DMSO gruplarındaki deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon analizi Tablo 24 ve Grafik 13’de verildi. Deneklerin COX-2 gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, VCD+DMSO grubu deneklerin

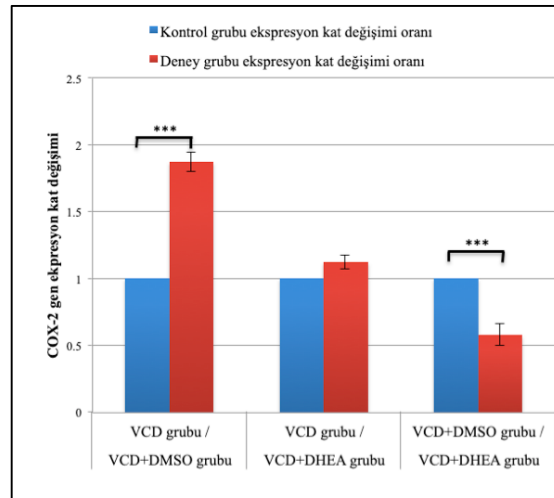
VCD Grubu deneklerine kıyasla sırasıyla 1,87 kat istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi (p=0,03). VCD+DHEA grubu deneklerin COX-2 gen ekspresyonunun, VCD+DMSO grubuna kıyasla 1,69 kat istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu tespit edildi (p=0,04).

Tablo 23. Kontrol, VCD ve DMSO gruplarına ait deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri

	2 [^] (-Avg.(ΔCt))		Ekspresyon kat değişim oranı*	P**
	Kontrol grubu	Deney grubu		
	VCD grubu	VCD+DMSO grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,026387	0,048975	+1,87	0,03
	VCD grubu	VCD+DHEA grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,026387	0,029295	+1,12	0,22
	VCD+DMSO grubu	VCD +DHEA grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,048975	0,029295	-1,69	0,04

* Ekspresyon kat değişim oranı, deney grubu gen ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre + ya da – katını temsil eder.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 13. Kontrol, VCD ve DMSO gruplarına ait deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri

4.3.1.3. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların COX-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri

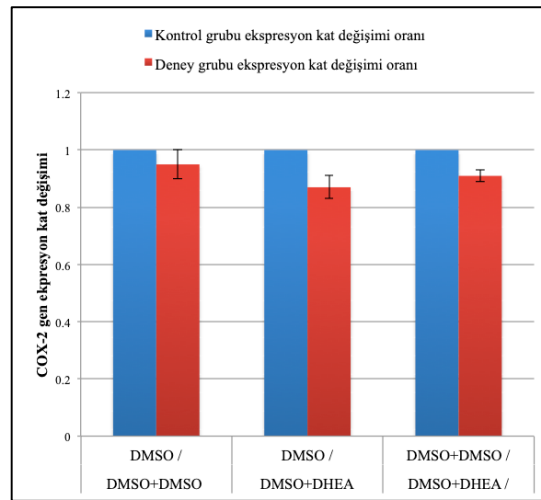
DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO gruplarındaki deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon analizi Tablo 25 ve Grafik 14’de verildi. Deneklerin COX-2 gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı tespit edildi.

Tablo 25. DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO grubuna ait deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri

	2 [^] (-Avg.(ΔCt))		Ekspresyon kat değişim oranı*	P**
	Kontrol grubu	Deney grubu		
	DMSO grubu	DMSO+DMSO grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,014275	0,013631	-1,04	0,78
	DMSO grubu	DMSO+DHEA grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,014275	0,012523	-1,13	0,59
	DMSO+DMSO grubu	DMSO+DHEA grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,013631	0,012520	-1,08	0,83

* Ekspresyon kat değişim oranı, deney grubu gen ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre + ya da - katını temsil eder.

** İkili grup karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 14. DMSO, DMSO+DHEA ve DMSO+DMSO grubuna ait deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri

4.3.1.4. Düşük Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların COX-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri

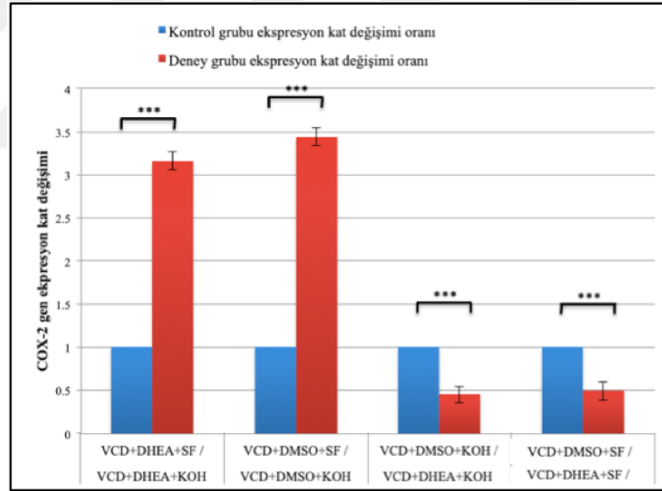
VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH ve VCD+DMSO+SF gruplarındaki deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon analizi Tablo 26 ve Grafik 15’de verildi. Deneklerin COX-2 gen ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, VCD+DHEA+KOH grubu deneklerin COX-2 gen ekspresyonunun VCD+DHEA+SF grubuna kıyasla 3,16 kat istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi ($p=0,002$). DHEA enjeksiyonu yapılmayıp aynı süre boyunca DMSO enjeksiyonu yapılan düşük over rezervine sahip gruplarda KOH protokolünün COX-2 gen ekspresyon düzeyine etkisi değerlendirildiğinde, VCD+DMSO+KOH grubu deneklerin COX-2 gen ekspresyonunun VCD+DMSO+SF grubuna kıyasla 3,44 kat istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi ($p=0,001$). Düşük over rezervine sahip deneklerde KOH protokolü öncesinde 45 gün süreyle DHEA ya da DMSO enjeksiyonlarının COX-2 gen ekspresyon düzeyine etkisi değerlendirildiğinde ise, VCD+DHEA+KOH grubu deneklerin COX-2 gen ekspresyonunun VCD+DMSO+KOH grubuna kıyasla 2,17 kat istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu tespit edildi ($p=0,006$). Düşük over rezervine sahip deneklerde DHEA enjeksiyonlarının uzun dönem etkisi değerlendirildiğinde, VCD+DHEA+SF grubu deneklerin COX-2 gen ekspresyonunun VCD+DMSO+SF grubuna kıyasla 2,01 kat istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu tespit edildi ($p=0,006$).

Tablo 26. VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH ve VCD+DMSO+SF gruplarına ait deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri

	$2^{(-Avg.(\Delta Ct))}$		Ekspresyon kat değişim oranı*	P**
	Kontrol grubu	Deney grubu		
	VCD+DHEA+SF grubu	VCD+DHEA+KOH grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,028990	0,091834	3,16	0,002
	VCD+DMSO+SF grubu	VCD+DMSO+KOH grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,058018	0,199640	3,44	0,001
	VCD+DMSO+KOH grubu	VCD+DHEA+KOH grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,199640	0,091834	-2,17	0,006
	VCD+DMSO+SF grubu	VCD+DHEA+SF grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,058018	0,02899	-2,01	0,006

* Ekspresyon kat değişim oranı, deney grubu gen ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre + ya da - katını temsil eder.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı, $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 15. VCD+DHEA+KOH, VCD+DHEA+SF, VCD+DMSO+KOH ve VCD+DMSO+SF gruplarına ait deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri

4.3.1.5. Normal Over Rezervine Sahip Deneklerde DHEA ya da DMSO Enjeksiyonları Sonrası Uygulanan KOH Protokolü Etkinliğinin Değerlendirildiği Grupların COX-2 Gen Ekspresyon Düzeyleri

DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF gruplarındaki deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon analizi Tablo 27 ve Grafik 16'de verildi. Deneklerin COX-2 gen

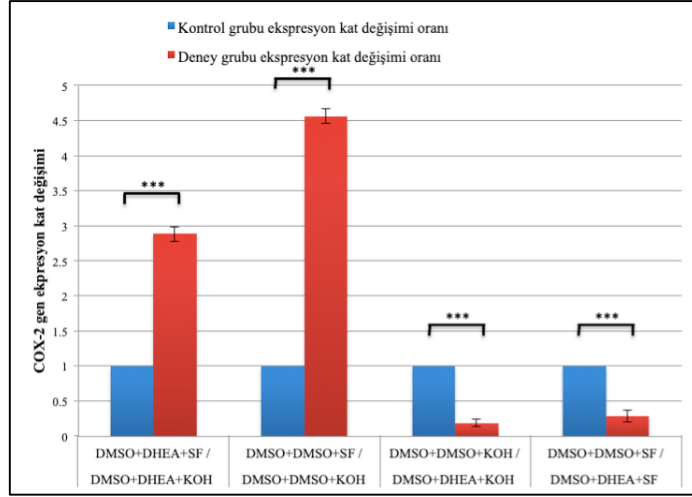
ekspresyon düzeyleri karşılaştırıldığında, DMSO+DHEA+KOH grubu deneklerin COX-2 gen ekspresyonunun DMSO+DHEA+SF grubuna kıyasla 2,88 kat istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi (p=0,002). DHEA enjeksiyonu yapılmayıp aynı süre boyunca DMSO enjeksiyonu yapılan normal over rezervine sahip gruplarda KOH protokolünün COX-2 gen ekspresyon düzeyine etkisi değerlendirildiğinde, DMSO+DMSO+KOH grubu deneklerin COX-2 gen ekspresyonunun DMSO+DMSO+SF grubuna kıyasla 4,56 kat istatistiksel olarak anlamlı yüksek olduğu belirlendi (p=0,001). Normal over rezervine sahip deneklerde KOH protokolü öncesinde 45 gün süreyle DHEA ya da DMSO enjeksiyonlarının COX-2 gen ekspresyon düzeyine etkisi değerlendirildiğinde ise, DMSO+DHEA+KOH grubu deneklerin COX-2 gen ekspresyonunun DMSO+DMSO+KOH grubuna kıyasla 5,54 kat istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu tespit edildi (p=0,001). Normal over rezervine sahip deneklerde DHEA enjeksiyonlarının uzun dönem etkisi değerlendirildiğinde, DMSO+DHEA+SF grubu deneklerin COX-2 gen ekspresyonunun DMSO+DMSO+SF grubuna kıyasla 3,51 kat istatistiksel olarak anlamlı düşük olduğu tespit edildi (p=0,006).

Tablo 27. DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF gruplarındaki deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri

	2 ⁻ (-Avg.(ΔCt))		Ekspresyon kat değişim oranı	p
	Kontrol grubu	Deney grubu		
	DMSO+DHEA+SF grubu	DMSO+DHEA+KOH grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,003681	0,010626	+2,88	0,002
	DMSO+DMSO+SF grubu	DMSO+DMSO+KOH grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,012937	0,058901	+4,56	0,001
	DMSO+DMSO+KOH grubu	DMSO+DHEA+KOH grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,058901	0,010626	-5,54	0,001
	DMSO+DMSO+SF grubu	DMSO+DHEA+SF grubu		
GAPDH	1	1	1	0
COX-2	0,012937	0,003681	-3,51	0,006

* Ekspresyon kat değişim oranı, deney grubu gen ekspresyon düzeyinin kontrol grubuna göre + ya da - katını temsil eder.

**İkili grup karşılaştırmalarında Student t testi kullanıldı, p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



Grafik 16. DMSO+DHEA+KOH, DMSO+DHEA+SF, DMSO+DMSO+KOH ve DMSO+DMSO+SF gruplarındaki deneklerin ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri

4.3.2. ELISA

Serum AMH değeri median 2.33 (1,08 - 5,42) (%25-%75 Persentil) ng/ml arasındaki 75 denek çalışmaya dahil edildi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada ‘DOR olgularında, KOH protokolüne eklenen DHEA’nın ovaryan foliküllerin gelişimine etkisi ovaryan mikroçevre düzeyinde COX-2 ekspresyonu üzerinden gerçekleşir’ hipotezinden yola çıkılarak; düşük ve normal ovaryan rezerve sahip deneklerde DHEA’nın tek başına ve KOH protokolü ile birlikte kullanımının ovaryan folikül gelişimi ve COX-2 gen ekspresyon düzeyi üzerindeki etkileri değerlendirildi.

5.1. DOR Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Vücut Ağırlığına Etkisi

Çalışmada sıçan DOR modeli oluşturmak amacıyla; primordiyal ve primer foliküllerde apoptotik süreci başlatarak sayılarını azaltması ve uygulama sürecinde herhangi bir cerrahi müdahale ve/veya genetik değişikliğe ihtiyaç duyulmaması nedeniyle, in vivo ve in vitro çalışmalarda etkinliği kanıtlanmış VCD kullanımı (subkutan, 160 mg/kg/gün, 15 gün) tercih edildi. VCD ile farklı türlerde DOR modeli oluşturulan çalışmalarda ilacın uygulama yöntemi (oral, subkutan, intraperitoneal), dozu (5 mg/kg-200 mg/kg), uygulama sürelerinin (14 gün- 49 gün) ve VCD uygulaması ile sıçan vücut ağırlığına etkisine yönelik sonuçların oldukça değişken olduğu görüldü (Berger ve Horner, 2019; Chhabra ve ark., 1990; Haas ve ark., 2007; Hoyer ve Sipes, 2007b; Keck ve ark., 2007; Mayer ve ark., 2002; Mayer ve ark., 2004; National Toxicology Program, 1989; Romero-Aleshire ve ark., 2009). Çalışmamızın sonuçları VCD’nin vücut ağırlığı üzerinde etkisi olmadığını gösteren çalışmaları destekler nitelikte bulundu (Berger ve Horner, 2019; Mayer ve ark., 2004; National Toxicology Program, 1989; Romero-Aleshire ve ark., 2009) ve 15 gün süreyle gerçekleştirilen VCD enjeksiyonlarının besin alımı ve denek metabolizması üzerine bir etkisinin olmadığını düşündürdü.

Literatüre bakıldığında VCD’nin vücut ağırlığına olumsuz etkisinin özellikle uzun periyotta (30-49 gün) ve düşük dozda (60-80 mg/kg/gün) uygulama yapılan çalışmalarda rapor edildiği gözlemlendi. Çalışmamızda VCD’nin vücut ağırlığını azalttığını gösteren çalışmalardan farklı olarak, uygulanan VCD dozu daha yüksek

uygulandı (160 mg/kg/gün) ve enjeksiyon süresi daha kısa tutuldu (15 gün). Ovaryan stimülasyon protokollerinde vücut kitle indeksinin doz ayarlaması ve foliküler gelişim sürecinde belirleyici bir parametre olması nedeniyle (Best ve ark., 2017; Cai ve ark., 2017; Christensen ve ark., 2016; Provost ve ark., 2016; Supramaniam ve ark., 2018), DOR modeli oluşturulan deneklerin vücut ağırlıklarının değişmemesi, çalışmamızda farklı tedavi protokollerinin etkinliğini (KOH, DHEA etkinliği) ve etki mekanizmasını doğru değerlendirmek açısından bir standardizasyon sağlamıştır.

Çalışmamızda KOH ve/veya DHEA uygulaması da denek ağırlıklarında bir değişime neden olmadı. Literatüre bakıldığında, Wistar cinsi dişi sıçanlarda 7 gün süreyle intraperitoneal yolla uygulanan 10 mg/kg/gün DHEA dozunun (Medina ve ark., 2006), Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlarda 27 hafta boyunca subkutan 30 mg/kg/gün DHEA dozunun (Mauriège ve ark., 2003), yine aynı tür sıçanlarda DHEA'nın 1, 5, 10 ve 20 hafta boyunca 60 mg/kg/gün dozunda intraperitoneal uygulanmasının (Parker ve Conway-Myers, 1998) denek vücut ağırlığını değiştirmedeği saptanmıştır. Bu bulguların aksine, farklı çalışmalarda farklı doz ve sürelerde DHEA maruziyetinin vücut ağırlığı üzerinde olumsuz etkileri tespit edilmiştir (Berger ve ark., 2008; Krishna ve ark., 2001; Taniguchi ve ark., 1995). Bu çalışmalarda farklı tür deneklere DHEA oral ya da intravaginal olarak farklı dozlarda uygulanmıştır. Çalışmamızda düşük ve normal over rezervine sahip deneklere subkutan olarak 60 mg/kg/gün, 45 gün süreyle DHEA uygulanmıştır. Bulgularımızın DHEA'nın vücut ağırlığını azalttığını gösteren çalışmalardan farklı olmasının sebebinin; kullanılan denek cinsinin, uygulanan DHEA'nın dozunun, süresinin ve uygulanma yollarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmüştür. Ayrıca deneklerin vücut ağırlıklarının benzer olması; DHEA'nın obeziteden bağımsız olarak etkilerinin karşılaştırılmasını ve DHEA sonrasında uygulanacak olan KOH protokolünün etkinliğinin gruplar arasında etkin değerlendirilmesini sağlamıştır.

Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde, KOH protokolünün vücut ağırlığı üzerine etkilerini değerlendiren literatüre rastlanmamıştır. Çalışmamızda gerçekleştirdiğimiz KOH protokolünün, uygulanan kümülatif dozun minimal seviyelerde olması ve süresinin kısa olması sebebiyle vücut ağırlığına etki etmediği düşünülmüştür.

5.2. DOR Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Toplam Ovaryum Ağırlığına Etkisi

Literatürde VCD uygulaması ile DOR modelinin oluşturulduğu ve ovaryum ağırlığının değerlendirildiği çalışmalara bakıldığında, VCD'nin intraperitoneal 80 mg/kg/gün olarak farklı sürelerde uygulandığı görülmüştür (Flaws ve ark., 1994; Hoyer ve Sipes, 2007a; Mayer ve ark., 2002; Nozaki ve ark., 2009). Farklı türlerde ve yaş periyodlarında VCD enjeksiyonları sonrası ovaryum ağırlığının değişmediği (Flaws ve ark., 1994; Nozaki ve ark., 2009) veya azaldığı (Hoyer ve Sipes, 2007a; Mayer ve ark., 2002) rapor edilmiştir. Ovaryum ağırlığının azaldığını bildiren çalışmalarda 30 gün VCD uygulaması ardından deneklerin uzun dönem takibi (360 gün) yapılmış olup, ovaryum ağırlığındaki azalmanın sebebinin azalan ovaryan folikül sayısı ve artan ovaryum doku atrofi kaynaklı olduğu belirtilmiştir (Hoyer ve Sipes, 2007a; Mayer ve ark., 2002).

Çalışmamızda, DOR hayvan modeli oluşturmak için 60 günlük, 160-180 g ağırlığında Spraque-Dawley cinsi dişi sıçanlara 15 gün boyunca, 160 mg/kg/gün dozunda subkutan VCD enjeksiyonları uygulandı. Sonuçlarımız VCD'nin ovaryum ağırlığı üzerinde etkisi olmadığını gösteren çalışmaları desteklemektedir. Kullanılan denek cinsinin, uygulanan VCD'nin dozunun, süresinin ve uygulanma yollarının farklılığı çalışmalar arasındaki sonuç farklılıklarını açıklayabilir. Çalışmamızın sonuçları, gerçekleştirilen VCD enjeksiyonlarının ovaryum dokusu üzerinde jeneralize etki göstermediğini, selektif olarak primordiyal ve primer foliküller üzerinde olumsuz etkisinin olduğunu ve bu foliküllerin toplam ovaryum ağırlığında etkisinin olmadığını düşündürdü.

Çalışmamızda Spraque-Dawley cinsi dişi sıçanlara 45 gün süreyle 60 mg/kg/gün subkutan DHEA enjeksiyonları uygulandı ve KOH ve/veya DHEA uygulamasında ovaryum ağırlıklarında anlamlı artış görüldü. Aynı tür deneklere daha kısa sürede (20 gün) benzer dozlarda DHEA uygulamasının ovaryum ağırlığını arttırdığı rapor edilmiştir (Wang ve ark., 2004; Ward ve ark., 1978). Bu sonuçlar DHEA enjeksiyonlarının steroidogenezi arttırdığını ve bu sayede ovaryum hacmini ve ağırlığını arttırdığını düşündürmektedir. Daha önce yapılan çalışmalar incelendiğinde KOH protokolünün ovaryum ağırlığı üzerine etkilerini değerlendiren

literatüre rastlanmamıştır. Bu çalışmada 7 gün süreyle gerçekleştirilen KOH protokolü ile birlikte steroidogenez artışının ovaryum ağırlığını arttırdığı düşünüldü.

5.3. DOR Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Ovaryan Folikül Sayılarına Etkisi

Literatürde VCD uygulamasıyla DOR modeli oluşturulan çalışmalara bakıldığında folikül rezervine ve gelişmekte olan foliküllere etkilerinin değişken olduğu görülmektedir. Çalışmaların hepsinde primordiyal folikül ve primer folikül sayılarında azalma olduğu rapor edilmiştir. Fakat sekonder, antral folikül ve korpus luteum sayılarına etkilerinin değişken olduğu görülmüştür (Devine ve ark., 2004; Flaws ve ark., 1994; Kao ve ark., 1999; Mayer ve ark., 2002; Mark-Kappeler ve ark., 2010; Nozaki ve ark., 2009; Springer ve ark., 1996). İncelenen bu çalışmalarda uygulanan dozlardan farklı olarak, bizim çalışmamızda ovaryan rezervi azaltmak amacıyla daha kısa sürede (15 gün) subkutan yüksek doz (160 mg/kg/gün) VCD uygulandı. Normal ovaryan rezerve sahip deneklere kısa periyotta (DMSO grubu- 15 gün) primordiyal folikül, gelişmekte olan foliküller ve atretik folikül sayısı açısından bakıldığında, ovaryan rezervin değişmediği, fakat VCD ile DOR modeli oluşturulan deneklerde primordiyal folikül rezervinde ve gelişmekte olan foliküllerde azalma, atretik folikül sayısında artma olduğu görüldü. Normal ovaryan rezervli deneklerde uzun periyotta da (DMSO+DMSO- 60 gün) folikül rezervinin korunduğu, fakat atretik folikül sayılarının arttığı saptandı. Dolayısıyla bu sonuçlar normal ovaryan rezervli deneklerde 60 günlük yaşlanmanın folikül rezervini olumsuz etkilemediği şeklinde, DOR modelinde ise unilaminar primer foliküller hariç gelişmekte olan foliküllerin azalması ve atretik foliküllerin artmasının hem VCD etkisinin hem de yaş almanın olumsuz etkisinin bir sonucu olarak yorumlanabilir.

Çalışmamızda normal ovaryan rezervli ve düşük ovaryan rezervli deneklere uygulanan DHEA tedavisi birbirinden farklı sonuçlar gösterdi. Normal rezerve sahip deneklerde DHEA uzun periyotta (60 gün) primordiyal folikül rezervinde azalmaya, gelişmekte olan foliküllerin korunmasına ve atretik folikül sayısının azalmasına neden oldu. Literatüre bakıldığında farklı doz ve sürelerde DHEA uygulamaları sonrası folikül rezervine etkinin çok değişken olduğu görülmektedir. Primordiyal foliküllerin arttığı ve gelişmekte olan foliküllerin azaldığı rapor edilen çalışmalarda,

DHEA'nın atretik folikül sayısını arttırdığı bildirilmiştir (Ikeda ve ark., 2014; Honnma ve ark., 2006; Krishna ve ark., 2001; Lee ve ark., 1991). Bu çalışmanın ve adı geçen çalışmaların sonuçlarındaki değişkenliklerin sebebinin; farklı denek cinsi ve uygulanan DHEA'nın dozunun, süresinin ve uygulanma yollarının farklılığından kaynaklandığı düşünüldü. Düşük over rezervine sahip deneklerde ise DHEA uygulamasının uzun periyotta (VCD+DHEA- 60 gün) ovaryan rezervi koruyucu etki göstererek primordiyal folikül ve gelişmekte olan folikül kaybını, hem de atretik folikül sayısını azalttığı saptandı. Literatürde intraperitoneal ya da oral olarak benzer doz ve sürelerde DHEA uygulanan DOR modellerinde bizim sonuçlarımızı destekler nitelikte primordiyal ve gelişmekte olan foliküllerin arttığı, atretik foliküllerin azaldığı rapor edilmiştir (Hassa ve ark., 2015; Mahmoud ve ark., 2018; Sozen ve ark., 2019). Folikül rezervine ilerleyen yaşın etkisini ekarte etmek amacıyla çalışmamıza dahil edilen VCD + DMSO enjeksiyonları sonrasında ise primordiyal ve primer folikül sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma, atretik folikül sayısında ise anlamlı artış tespit edildi. Bu bulgular, VCD'nin ve beraberinde ilerleyen yaşın primordiyal ve primer foliküller üzerindeki apoptotik süreci atırıcı etkisinin 45 gün sürecinde de devam ettiği, gerçekleştirilen DHEA enjeksiyonlarının VCD veya yaşlanma etkisiyle artan ovaryan foliküllerdeki apoptozu baskıladığı, aynı zamanda folikülogenezi arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Normal over rezervine sahip deneklerde DHEA uygulaması sonucunda atretik folikül sayısında azalma görülmekle birlikte, DOR modelinin tersine primordiyal folikül sayılarında azalmanın olması; DHEA'nın folikülogenez sürecini hızlandırmasının bir sonucu olarak primordiyal foliküllerden büyüyen foliküllere geçişte artışının bir sonucu olduğu düşünülebilir.

BALB/c cinsi fareler üzerinde yapılan bir çalışmada ovaryan stimülasyon intraperitoneal 10 IU At Koryonik Gonadotropini (eCG) ile gerçekleştirilmiş ve ovaryan stimülasyon sonrası primordiyal foliküllerde değişim olmadığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar tarafından, elde ettikleri bulgular doğrultusunda ovaryan stimülasyonun over rezervine etki etmediği bildirilmiştir (Maman ve ark., 2009). KOH uygulanan deneklerden elde ettiğimiz sonuçlar bunu destekler niteliktedir. Farklı bir çalışmada ovaryan stimülasyonu 25 IU eCG ile intraperitoneal olarak uygulanan Sprague-Dawley cinsi sıçanlara, stimülasyon ile birlikte 60 mg/kg DHEA

subkutan olarak enjekte edilen grupta sadece ovaryan stimülasyon yapılan gruba kıyasla atretik folikül yüzdeleri benzer bulunurken, daha fazla sayıda primordiyal folikül ve daha az sayıda primer folikül olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada DHEA'nın foliküler seçilim üzerinde etkili olduğu sonucuna varılmıştır (Velez ve ark., 2019).

Normal over rezervine sahip Sprague-Dawley cinsi sıçanlar üzerinde yapılan farklı bir çalışmada denekler; sadece susam yağı enjekte edilen kontrol grubu, ovaryan stimülasyonu 25IU eCG ile intraperitoneal olarak uygulanan grup (eCG) ve ovaryan stimülasyonuna subkutan olarak 60 mg/kg DHEA enjeksiyonu eklenen grup (eCG+DHEA) olmak üzere 3 gruba ayrılmıştır. Deneklerin ovaryan folikülleri, gelişim evrelerine göre değerlendirildiğinde, eCG grubunda kontrol grubuna kıyasla daha fazla sayıda primordiyal folikül tespit edilirken, diğer tüm folikül tiplerinde istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptanmıştır. eCG+DHEA grubunda ise hem eCG hem de kontrol grubuna kıyasla daha fazla sayıda primordiyal folikül tespit edilirken daha az sayıda primer folikül saptanmıştır. Araştırmacılar stimülasyona eklenen DHEA'nın foliküler seçilimi arttırdığı, ancak foliküler gelişimi azalttığı sonucuna varmıştır (Velez ve ark., 2015). Yapılan bir diğer çalışmada aynı şekilde denekler 3 gruba ayrılmış olup, eCG+DHEA grubunda hem eCG hem de kontrol grubuna kıyasla antral foliküllerinde apoptozis artışı bildirilmiştir (Faut ve ark., 2011). Paixao ve arkadaşlarının (Paixão ve ark., 2016) yapmış olduğu çalışmada daha önceki çalışmalarda olduğu gibi denekler kontrol, eCG ve eCG+DHEA gruplarına ayrılmış, gruplardaki deneklerin primordiyal folikül sayıları benzer bulunurken, eCG+DHEA grubunda daha fazla sayıda primer, sekonder ve antral folikül tespit edilmiştir. Araştırmacılar stimülasyona eklenen DHEA'nın foliküler gelişimi arttırdığı sonucuna varmıştır.

Çalışmamızda normal ve düşük over rezervine sahip deneklere uygulanan KOH protokolüne eklenen DHEA normal ovaryan rezerve sahip deneklerde primordiyal ve atretik folikül sayılarında bir değişiklik oluşturmadı. Unilaminar primer foliküller hariç diğer gelişmekte olan foliküllerde artışa neden oldu. Gelişmekte olan foliküllere gösterdiği bu olumlu etki 69 günlük yaşlanma periyodu sonrasında da (DMSO+DHEA+SF) gözlemlendi. Bu bulgular normal over rezervine sahip deneklerde KOH protokolü öncesinde uygulanan DHEA enjeksiyonlarının

folikülogenezi, primordiyal foliküllerden büyüyen foliküllere geçişi ve KOH protokolü etkinliğini arttırdığını düşündürdü.

Düşük over rezervine sahip deneklere ise KOH protokolü öncesinde DHEA tedavisi primordiyal ve tüm gelişmekte olan folikül sayılarında artışa neden oldu. Ovaryan rezerve bir diğer olumlu etkisi olarak atretik folikül oranlarında azalma görüldü. Bu bulgular düşük over rezervine sahip deneklerde KOH protokolü öncesinde uygulanan DHEA enjeksiyonlarının folikülogenezi ve KOH protokolü etkinliğini arttırdığını düşündürdü. KOH protokolü uygulanmayan, 69 günlük periyotta yaşatılan deneklerde de benzer sonuçların elde edilmesi, DHEA'nın düşük over rezervine sahip deneklerde folikülogenezi olumlu yönde etkilemeye devam ettiği şeklinde yorumlandı. Bulgularımızın yapılan çalışmalardan farklı olmasının sebebinin; farklı denek cinsinin, uygulanan KOH protokolü ve DHEA'nın dozunun, süresinin ve uygulanma yollarının farklılığından kaynaklandığı düşünülmüştür.

5.4. DOR Modelinin ve Tedavi Protokollerinin Ovaryum Dokusunda Histomorfolojik Etkileri

Çalışmamızda kontrol grubunu oluşturan kesitlerde; genel morfolojinin normal görülmesi fiksasyon, doku takibi, kesit alma ve H&E boyama protokollerinin uygun ve etkin olarak uygulandığını gösterdi. Sham grubu olarak değerlendirilen DMSO grubuna ait kesitlerin kontrol grubuyla benzer morfolojik görüntüye sahip olmaları, DMSO enjeksiyonlarının ovaryum dokusu üzerinde herhangi bir toksisiteye sebep olmadığını düşündürdü.

VCD grubunda azalmış over rezervi ile uyumlu olarak görülen atretik folikül sayılarında artış ve oositlerinde asidofili, fragmantasyon ve vakuolizasyon, granüloza hücrelerinde piknotik görünümlü nukleus artışı, daha önce yapılan çalışmalarda sıçanlarda VCD'nin apoptozun karakteristik özelliği olan morfolojik bulgularla uyumlu olarak değerlendirildi (Kao ve ark., 1999; Springer ve ark., 1996b). Yapılan birçok çalışmada da VCD'nin gelişimin farklı aşamasındaki foliküllerde apoptozu arttırdığı rapor edilmiştir (Devine ve ark., 2002; Hu ve ark., 2001a; Hu ve ark., 2002; Springer ve ark., 1996a). VCD'nin F344/N cinsi sıçanlarda 80 mg/kg/gün dozunda 30 gün süreyle intraperitoneal olarak uygulandığı bir çalışmada uzun dönem takiplerde foliküler atrezinin granüloza hücrelerinde başladığı saptanmıştır. Aynı

çalışmada sonrasında oosit ve granüloza hücre bağlantılarının bozulduğu, granüloza hücre tabakasının incelendiği, oositin dejenerasyonu sonrasında ise folikül çapının küçüldüğü bildirilmiştir (Mayer ve ark., 2002). Bizim sonuçlarımızda da bu çalışma ile uyumlu olarak oosit ve granüloza hücrelerinde hücre zarı bütünlüğünde ve aralarındaki bağlantılarda bozulmalar şeklinde atreziye giden foliküllere özgü morfolojik değişiklikler tespit edildi.

DHEA'nın ovaryum üzerinde etkisinin morfolojik değerlendirme sonuçları normal ovaryan reserve sahip deneklerde folikülogenez ve foliküler atrezi artışının birlikte gerçekleştiğini düşündürdü. Düşük over rezervi modelinde ise VCD'nin ovaryum dokusunda arttırdığı apoptoz sürecine DHEA'nın baskılayıcı yönde yanıt verdiğini düşündürdü. Ovaryum dışında, DHEA'nın testis, deri, kortikal nöron, osteoblast, keratinosit, endotel ve lenfoid hücreleri gibi farklı doku ve hücre hatlarında apoptozu inhibe ettiği bildirilmiştir (Alexaki ve ark., 2009; Leskiewicz ve ark., 2008; Liu ve ark., 2007; Nouveau ve ark., 2008; Takahashi ve ark., 2004; Wang ve ark., 2007; Yapanoglu ve ark., 2008). Steroid hormonların ovaryum dokusunda atrezi sürecinde ve özellikle granüloza hücrelerinin apoptozunda etkin olduğu tespit edilmiştir (Billig ve ark., 1993). DHEA enjeksiyonlarının ovaryum dokusunda steroidogenezi (Luchetti ve ark., 2004) ve serumda progesteron ve östradiol seviyelerini arttırdığı yapılan çalışmalarda belirlenmiştir (Sander ve ark., 2006).

Sprague-Dawley cinsi sıçanlarda DHEA'nın Fas/FasL/kaspaz-8 yolağını aktive ederek foliküler atrezide ve membran tipi matriks metalloproteinaz (MT1-MMP) artışı ile doku remodeling'inde rol oynadığı bildirilmiştir (Honma ve ark., 2006). Aynı çalışmada çalışmamızda elde edilen morfolojik bulgularla uyumlu olarak kistik formasyona sahip folikül sayısında artış tespit edilmiştir. Daha önce yapılan birçok çalışmada da sıçan ovaryumunda DHEA enjeksiyonları sonrası kistik değişiklikler bildirilmiştir (Lee ve ark., 1991; Luchetti ve ark., 2004; Ward ve ark., 1978). Çalışmamızda elde ettiğimiz morfolojik bulgular doğrultusunda DHEA'nın düşük over rezervine sahip deneklerin ovaryum dokularında apoptozu azalttığı ve normal over rezervine sahip deneklerin ovaryum dokularında ise kistik formasyona geçiş aşamasındaki foliküllerin sayısında artışa neden olduğu sonucuna varılmıştır.

Yapılan çalışmalara bakıldığında DHEA'nın doku spesifik olarak apoptoz sürecini farklı etkilediği, ovaryum dokusunda ise apoptozu arttırdığı görülmektedir.

Çalışmamız DHEA'nın kistik oluşumları arttırdığını gösteren çalışmalarını desteklemekte olup, bu oluşumların DHEA enjeksiyonları sonrası folikülogenezdeki artışa sekonder geliştiği düşünülmüştür. Elde ettiğimiz morfolojik bulgularda apoptotik görünümlü hücre sayısında artış olmamasının sebebinin ise DHEA'nın daha fazla süre uygunlamış olması ve artan süre ile birlikte farklı metabolitleri üzerinden farklı etki gösterdiği şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmamızda uzun periyotta yaşatılan, sham grubu olarak DMSO ve SF enjeksiyonları uygulanan deneklerin ovaryum dokularının normal morfolojisini koruduğu görüldü. Bu bulgular çalışma boyunca deney koşullarının uygun olduğunu ve ovaryum dokularının herhangi bir dış faktöre maruz kalmadığını düşündürdü. Uzun periyotta yaşatılan VCD gruplarında (VCD+DMSO+SF) folikül sayılarında azalma tespit edilmesi, VCD'nin uzun dönemde ovaryum dokusu üzerinde toksisitesini apoptotik süreçle devam ettirdiğini düşündürdü. Normal ve düşük rezervli, DHEA ardından KOH uygulamadan yaşatılan deneklerde (DMSO+DHEA+SF ve VCD+DHEA+SF) erken sakrifiye edilen (DMSO+DHEA ve VCD+DHEA) gruplara göre ovaryan histomorfolojide fark olmaması DHEA'nın normal ya da düşük over rezervine sahip deneklerde uzun dönem etkisinin değişmediğini gösterdi.

Normal ve düşük over rezervli deneklerde KOH uygulaması sonrası folikülogenez ve vasküler yapılardaki artış KOH protokolünün uygun ve etkin olarak uygulandığını, ovaryum morfolojisinde bir etkisinin olmadığını düşündürdü. Daha önce yapılan bir çalışmada ovaryan stimülasyonun ovaryum dokusu fizyolojisini değiştirdiği, ovaryum volümüyle birlikte kan akımını arttırdığı belirtilmiştir (Pan ve ark., 2003). Kan akımı ovaryum dokusunda hem folikülogenez hem de steroidogenez aşamalarında önemli bir rol üstlenmektedir (Abulafia ve Sherer, 2000). Primordiyal ve primer foliküller stromal vasküler yapılar ile canlılığını korumaktadır (Findlay, 1986). Yapılan bir çalışmada ovaryan stimülasyonda kullanılan eksojen gonadotropinlerin granüloza hücrelerinden vasküler büyüme faktörlerinin salınmasını sağladığı belirlenmiştir (Hazzard, 1999). Aynı çalışmada bu büyüme faktörlerinin Ang-1 (steroid bağımlı) ve VEGF (steroid bağımsız) olduğu rapor edilmiştir. Gonadotropinlere ek olarak, Bcl-2 (Wang ve ark., 2012), IGF (Hu ve ark., 2004) ve TGF- β süper ailesinin üyeleri (inhibin ve aktivin) (Hillier, 2009)

foliküler gelişimde ve gelişen foliküllerin viabilitesinde etkin rol oynamaktadır. Foliküler atrezi öncelikle granüloza hücrelerinin apoptozu ile başlar (Matsuda-Minehata ve ark., 2006). Aynı zamanda küçük foliküllerin apoptoza karşı daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Luo ve Zhu, 2000).

Çalışmamızda elde ettiğimiz morfolojik bulgular daha önce yapılmış olan çalışmaları destekler niteliktedir. KOH protokolünün vasküler yapılarda artış sağlamış olması folikülogenezi ve folikül viabilitesini açıklamaktadır. Hem normal hem de düşük over rezerve sahip deneklerde DHEA'nın KOH protokolü öncesinde kullanımının herhangi bir histopatolojik etkiye sebep olmadığı, ovaryum morfolojisini değiştirmedeği, aynı zamanda KOH protokolünün etkinliğini arttırdığı tespit edildi. DHEA'nın bu etkisini gonadotropinlerin etkinliğini arttırarak mı ya da farklı moleküler yollar üzerinden mi gerçekleştirdiği bilinmemekle birlikte, konu hakkında ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

5.5. DOR Modelinin ve Tedavi Protokollerinin COX-2 Gen Ekspresyon Düzeylerine Etkisi

Çalışmamızda over rezervi ile ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyonu arasındaki ilişkiyi belirlemek adına Kontrol, DMSO ve VCD gruplarındaki deneklerin sakrifikasyonları sonrası elde edilen ovaryum dokularında COX-2 gen ekspresyon analizleri gerçekleştirildi. Kontrol grubu ile DMSO grubu COX-2 gen ekspresyon düzeyleri benzer tespit edilirken, VCD grubu deneklerinde hem Kontrol grubu hem de DMSO grubuna kıyasla daha yüksek COX-2 gen ekspresyonu olduğu belirlendi. Bu sonuçlar ile 15 gün süreyle gerçekleştirilen DMSO enjeksiyonlarının COX-2 gen ekspresyonu üzerinde etkisi olmadığı ve VCD enjeksiyonlarıyla oluşturulan düşük over rezervi ile birlikte COX-2 gen ekspresyon düzeyinde artış olduğu belirlenmiştir.

Yapılan bir çalışmada Wistar cinsi dişi sıçanlarda VCD'nin 28 gün boyunca 100, 250 ve 500 mg/kg/gün farklı dozlarında oral yolla uygulanması sonucunda deneysel DOR hayvan modeli oluşturulmuş ve VCD'nin tüm dozlarında ovaryum dokusu COX-2 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar VCD'nin over rezervini inflamasyon ve apoptozu arttırarak düşürdüğü sonucuna varmıştır (Abolaji ve ark., 2016). Farklı bir çalışmada, IVF tedavisi alan hastaların korona radiata hücrelerinde COX-2 gen ekspresyon analizi gerçekleştirmiş; düşük over

rezervine sahip hastaların korona radiata hücrelerinde normal over rezervine sahip hastalara kıyasla daha yüksek oranda COX-2 gen ekspresyonu olduğu bildirilmiştir (May-Panloup ve ark., 2012). Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlarda tek doz radyoterapi sonrası deneysel DOR modeli oluşturulmuş ve düşük over rezervine sahip deneklerin ovaryum dokularında COX-2 ekspresyonunun arttığı tespit edilmiştir (Said ve ark., 2016).

Bu çalışmalarda rapor edilen bulguların tersine, azalan over rezervine gelişimin farklı aşamasındaki foliküllerin COX-2 ekspresyon düzeylerinde azalmanın eşlik ettiğini gösteren bir çalışmada, 60 gün boyunca yüksek kalorili diyet ile beslenen ve obezite kaynaklı DOR modeli oluşturulan Wistar cinsi dişi sıçanlar değerlendirilmiştir. Araştırmacılar yüksek kalorili diyet ile over rezervinin azaldığı ve ovulasyon sürecinin etkilendiği sonucuna varmıştır (Bazzano ve ark., 2015).

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular VCD ile oluşturulmuş deneysel DOR hayvan modelinde ovaryan COX-2 gen ekspresyon artışını bildiren çalışmalarını desteklemektedir. Daha önce yapılan çalışmalar ve çalışmamızda elde ettiğimiz veriler kapsamında VCD'nin düşük over rezervi üzerindeki etki mekanizmasının temel olarak foliküler apoptoz süreci üzerinden gerçekleştiği, ek olarak da hormonal düzensizlik, oksidatif stres ve inflamasyon artışı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamızda düşük over rezervine sahip deneklere uygulanan DHEA enjeksiyonlarının ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyonu üzerindeki etkisi değerlendirildiğinde, düşük over rezervine sahip deneklerde 45 gün sonrasında da VCD'nin uzun dönemde over rezervi üzerinde olumsuz etkisinin devam ettiği ve COX-2 gen ekspresyonunda artışa sebep olduğu belirlendi. DOR modelinde DHEA tedavisinin COX-2 gen ekspresyonunun daha düşük olduğu tespit edildi. Bu bulgular ile düşük over rezervine sahip deneklerde 45 gün süreyle gerçekleştirilen DHEA enjeksiyonlarının ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyonunu azaltıcı yönde etki ettiği belirlendi. Normal rezervli deneklerde DMSO enjeksiyonlarının uzun dönemde de COX-2 gen ekspresyonu üzerinde etkisinin olmadığı ve 45 gün süreyle gerçekleştirilen DHEA enjeksiyonlarının da ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyonuna etkisi olmadığı belirlendi.

Yapılan bir çalışmada 20 gün süreyle intraperitoneal yolla uygulanan 60 mg/kg/gün DHEA dozunun normal over rezervine sahip dişi BALB/c cinsi

farelerin ovaryum dokularında COX-2 ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (Elia ve ark., 2006). İn vitro şartlarda gerçekleştirilen granüloza hücre kültür çalışmasında, DHEA prekürsörü olan DHEAS'nin granüloza hücrelerinde COX-2 gen ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (ELBeltagy ve ark., 2007). Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlar üzerinde yapılan farklı bir çalışmada, prenatal dönemde 3 gün 5 mg/gün süreyle testesteron ile hiperandrojenize edilen deneklerin postnatal ovaryum dokularında COX-2 ekspresyon artışı saptanmıştır. Araştırmacılar prenatal androjen yüksekliğinin proinflamatuvar süreci indüklediği sonucuna varmıştır (Amalfi ve ark., 2012).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde DHEA'nın ovaryum dokusunda COX-2 ekspresyonu azaltıcı etkisini bildiren literatüre rastlanılmamıştır. Bulgularımızın yapılan çalışmalardan farklı olmasının sebebinin; denek cinsinin, uygulanan DHEA'nın dozunun, süresinin ve uygulanma yollarının farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Ovaryum dokusunda DHEA ile COX-2 etkileşimini değerlendiren çalışma sayısı az olmakla birlikte çalışmalarda değerlendirilen ovaryum dokularında herhangi bir patoloji bulunmamaktadır. Bulgularımızın DHEA'nın ovaryum dokusunda COX-2 ekspresyon artışı gösteren çalışmalardan farklı olmasının bir diğer önemli sebebi ise; çalışmamızda değerlendirilen dokuların düşük over rezervine sahip deneklere ait olması ve bu dokularda daha önceki yapılan çalışmalar göz önüne alındığında inflamasyon artışının bulunmasıdır. Farklı dokular üzerinde gerçekleştirilen birçok çalışmada DHEA'nın proinflamatuvar sitokinleri azalttığı gösterilmiştir (Ben-Nathan ve ark., 1999; Straub ve ark., 1998; Weiss ve ark., 2011). Aynı zamanda inflamasyon artışı gösteren dokularda DHEA'nın sistemik inflamatuvar yanıtın modülasyonunu sağladığı ve COX-2 ekspresyon seviyelerini azalttığı bildirilmiştir. Yapılan bir çalışmada romatoid artrit olgularında DHEA kullanımının kıkırdak dokusunda COX-2 ekspresyon seviyelerinde azalmayla sonuçlandığı bildirilmiştir (Sun ve ark., 2006). Malik ve arkadaşlarının (Malik ve ark., 2003) yapmış olduğu çalışmada, sistemik inflamatuvar yanıtın artış gösterdiği travmatik beyin hasar modeli oluşturulan Sprague-Dawley cinsi dişi sıçanlara intraperitoneal 2 gün süreyle 25 mg/kg dozunda DHEA enjeksiyonları gerçekleştirilmiş ve DHEA enjeksiyonları sonrasında kortikal doku COX-2 ekspresyonunun azaldığı rapor

edilmiştir. Deneysel kolit modeli oluşturulmuş Wistar cinsi sıçanlarda yapılan bir çalışmada, DHEA metaboliti olan 7-Hydroxy-DHEA'nın bağırsak dokularında COX-2 ekspresyonlarını azalttığı tespit edilmiştir (Hennebert ve ark., 2008). Çalışmamızda düşük over rezervine sahip deneklerde DHEA enjeksiyonları sonrası COX-2 ekspresyon düzeyi azalırken, normal over rezervine sahip deneklerde COX-2 ekspresyon düzeyinde değişim olmamıştır. Sonuç olarak DHEA'nın sistemik inflamatuvar yanıtın modülasyonunu COX-2 ekspresyon seviyelerini azaltarak gösterdiği düşünülmüştür.

Çalışmamızda düşük over rezervine sahip deneklerde KOH protokolü öncesi DHEA uygulanan deneklerde ovaryum dokusunda daha yüksek COX-2 gen ekspresyonu görüldü. Benzer artışın DHEA verilmeden uygulanan KOH grubunda da (VCD+DMSO+KOH) görülmesi ve bu artışın DHEA verilen deneklerden yüksek olması KOH protokolünün beklenildiği üzere COX-2 gen ekspresyonu artışına sebep olduğu ve bu artışın DHEA'dan bağımsız olduğu şeklinde yorumlandı. KOH protokolü uygulanmayan deneklerde DHEA'nın COX-2 ekspresyonunda azalma göstermesi DHEA'nın KOH protokolünden bağımsız olarak COX-2 gen ekspresyonunu azalttığı şeklinde yorumlandı.

Çalışmamızda normal over rezervine sahip deneklerde de KOH protokolünün DHEA'dan bağımsız olarak ovaryum dokusunda COX-2 gen ekspresyonunu arttırdığı görüldü. DOR modeliyle benzer şekilde, normal rezervli deneklerde KOH öncesi DHEA uygulamasının COX-2 gen ekspresyonunu azalttığı, fakat KOH protokolü uygulanmayan deneklerde DHEA'nın COX-2 ekspresyonunda bir değişim oluşturmaması göz önüne alındığında; DHEA'nın 45 gün enjeksiyonları sonrası COX-2 gen ekspresyonunu değiştirmediği ancak 9 gün sonrasında COX-2 gen ekspresyonunu azalttığı ve KOH protokolü birlikteliğinde COX-2 gen ekspresyonu üzerinde azaltıcı etki gösterdiği şeklinde yorumlandı.

Yapılan bir çalışmada IVF tedavisi alan hastaların kumulus hücrelerinde COX-2 gen ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. KOH protokolü uygulanan hastalarda artan yaşla birlikte kumulus hücrelerinde COX-2 gen ekspresyon artışı tespit edilmiştir (Adriaenssens ve ark., 2010). C57BL/6NCrl cinsi fareler üzerinde yapılan farklı bir çalışmada, intraperitoneal 5 IU/100g eCG ve 48 saat sonrasında 5 IU/100g intraperitoneal hCG enjeksiyonları ile ovaryan stimülasyon

gerçekleştirilmiş; hCG enjeksiyonundan 4 saat sonra granüloza hücrelerinde COX-2 ekspresyonunda artış bildirilmiştir (Siddappa ve ark., 2015). Normal over rezervine sahip Sprague-Dawley cinsi sıçanların kullanıldığı bir çalışmada; sadece susam yağı enjekte edilen kontrol grubu, ovaryan stimülasyonu 25 IU eCG ile intraperitoneal olarak uygulanan grup (eCG) ve ovaryan stimülasyonuna subkutan olarak 60 mg/kg DHEA enjeksiyonu eklenen grup (eCG+DHEA) olmak üzere 3 grup değerlendirilmiştir. Deneklerin ovaryum dokusu COX-2 ekspresyonunun eCG grubunda kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu eCG+DHEA grubunda ise hem eCG hem de kontrol grubuna kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar stimülasyona eklenen DHEA'nın ovaryum dokusunda artan prostaglandin E düzeyi sebebiyle COX-2 artışına sebep olduğu sonucuna varmışlardır (Velez ve ark., 2015). Velez ve arkadaşlarının (Velez ve ark., 2019) yapmış olduğu çalışmada ovaryan stimülasyonu 25 IU eCG ile intraperitoneal olarak uygulanan Sprague-Dawley cinsi sıçanlara, stimülasyon ile birlikte 60 mg/kg subkutan DHEA enjeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Ovaryum dokusu COX-2 gen ekspresyonları değerlendirildiğinde, DHEA enjeksiyonu yapılan grupta sadece ovaryan stimülasyon yapılan gruba kıyasla daha yüksek COX-2 düzeyi tespit edilmiştir.

Bu bulguların aksine farklı bir çalışmada yüksek androjen düzeyinin ovaryan COX-2 ekspresyonunu azalttığı ifade edilmiştir. KOH protokolü uygulanan androjen yüksekliği olduğu bilinen polikistik over sendromu tanılı hastalardan elde edilen granüloza hücrelerinde kontrol grubuna kıyasla daha düşük COX-2 gen ekspresyon düzeyi tespit edilmiştir (Lee ve ark., 2017). Aynı şekilde polikistik over sendromu tanılı hastalarda gerçekleştirilen bir diğer çalışmada ise KOH protokolü sonrası elde edilen folikül sıvısında kontrol grubuyla benzer düzeyde COX-2 gen ekspresyonu saptanmıştır (Sander ve ark., 2011). IVF tedavisi alan düşük over rezervi tanılı hastalara KOH protokolü öncesi 12 hafta boyunca oral yoldan 75 mg/gün dozunda DHEA tedavisi uygulanan bir çalışmada hastaların kumulus hücrelerinde COX-2 gen ekspresyon düzeyi DHEA tedavisi almayan grup ile benzer olarak saptanmıştır (Jayaprakasan ve ark., 2014).

Çalışmamız KOH protokolünün ovaryum dokusunda COX-2 gen ekspresyonunu arttırdığını bildiren çalışmalarını desteklemektedir. Aynı zamanda çalışmamızda KOH protokolü öncesi gerçekleştirilen DHEA enjeksiyonlarının COX-

2 gen ekspresyon düzeyini azaltmış olması, yüksek androjen düzeyinin ovaryan COX-2 ekspresyonunu azalttığını bildiren çalışmayı destekler niteliktedir. Bulgularımızın yapılan diğer çalışmalardan farklı olmasının sebebinin; farklı denek cinsi ve uygulanan KOH protokolünün dozunda ve süresinde farklılıklar olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Aynı zamanda bir diğer önemli sebep olarak; DHEA'nın tek başına inflamasyon artışı gösteren dokularda sistemik inflamatuvar yanıtın modülasyonunu sağladığı ve COX-2 ekspresyon seviyelerini azalttığı göz önüne alınarak, KOH protokolüne eklenen DHEA'nın aynı mekanizmayla etki etmiş olabileceği düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarda KOH protokolünün birçok inflamatuvar mediator üzerinden sistemik inflamatuvar yanıt oluşturduğu bildirilmiştir (262, 263). Sonuç olarak DHEA'nın, uygulanan KOH protokolü sonrası artış gösteren sistemik inflamatuvar yanıtın modülasyonunu COX-2 ekspresyon seviyelerini azaltarak gösterdiği düşünülmüştür.

5.6. Sonuç

VCD'nin apoptotik mekanizmalar üzerinden over rezervini azalttığı bilinmektedir. Proinflamatuvar mekanizmalar üzerinden etkinliğine dair çalışmalar bulunmakla birlikte halen tartışmalıdır. Bu çalışmada VCD'nin proinflamatuvar etkisini destekler nitelikte COX-2 ekspresyonunu arttırıcı etkisi gösterilmiştir. DHEA'nın DOR modelinde folikülogenezi arttırdığını, apoptotik süreci baskıladığını ve aynı zamanda COX-2 gen ekspresyonunu azaltarak sistemik inflamatuvar yanıtın modülasyonunu sağladığı gösterilmiştir.

Sonuç olarak; çalışmamızda düşük over rezervinde DHEA'nın primordiyal folikül üzerine koruyucu etkisinin olduğu ve KOH protokolünün etkinliğini arttırdığı tespit edilmiştir. DHEA'nın ovaryan mikroçevre üzerine olan etkinliği ve etki mekanizması hakkında yeni bulgular elde edilmiş olup, DOR olgularında KOH protokolüne eklenebilecek bir tedavi seçeneği olarak kabul görebileceği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Abali R, MA Yuksel, C Aktas et al (2013) Decreased ovarian reserve in female Sprague-Dawley rats induced by isotretinoin (retinoic acid) exposure. *Reproductive BioMedicine Online* c. 27 sayı (2): ss. 184-191., doi:10.1016/j.rbmo.2013.04.010.
- Abolaji AO, IA Adedara, AO Abajingin et al (2016) Evidence of oxidative damage and reproductive dysfunction accompanying 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure in female Wistar rats. *Reproductive Toxicology* c. 66 Aralık ss. 10-19., doi:10.1016/j.reprotox.2016.09.009.
- Abulafia O, DM Sherer (2000) Angiogenesis of the ovary. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* c. 182 sayı (1): ss. 240-246., doi:10.1016/S0002-9378(00)70519-9.
- Acuña E, R Fornes, D Fernandois et al (2009) Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reproductive Biology and Endocrinology* c. 7 , doi:10.1186/1477-7827-7-64.
- Adriaenssens T, S Wathlet, I Segers et al (2010) Cumulus cell gene expression is associated with oocyte developmental quality and influenced by patient and treatment characteristics. *Human Reproduction* c. 25 sayı (5): ss. 1259-1270., doi:10.1093/humrep/deq049.
- Alexaki VI, I Charalampopoulos, M Panayotopoulou et al (2009) Dehydroepiandrosterone protects human keratinocytes against apoptosis through membrane binding sites. *Experimental Cell Research* c. 315 sayı (13): ss. 2275-2283., doi:10.1016/j.yexcr.2009.04.006.
- Amalfi S, LM Velez, MF Heber et al (2012) Prenatal Hyperandrogenization induces metabolic and endocrine alterations which depend on the levels of testosterone exposure. *PLoS ONE* c. 7 sayı (5):, doi:10.1371/journal.pone.0037658.
- Balasz J, F Fábregues, J Peñarrubia et al (2006) Pretreatment with transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in poor-responder IVF patients with normal basal concentrations of FSH. *Human Reproduction* c. 21 sayı (7): ss. 1884-1893., doi:10.1093/humrep/del052.
- Banerjee S, Banerjee S, Saraswat G et al (2014) Female reproductive aging is master-planned at the level of ovary. *PLoS ONE* c. 9 sayı (5):, doi:10.1371/journal.pone.0096210.
- Barad D, H Brill, N Gleicher (2007) Update on the use of dehydroepiandrosterone supplementation among women with diminished ovarian function. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 2007, c. 24, ss. 629-634, doi:10.1007/s10815-007-9178-x.
- Barad D, N Gleicher (2006) Effect of dehydroepiandrosterone on oocyte and embryo yields, embryo grade and cell number in IVF. *Human Reproduction* c. 21 sayı (11): ss. 2845-2849., doi:10.1093/humrep/del254.
- Barrios-Rodiles M, G Tiralloche, K Chadee (1999) Lipopolysaccharide modulates cyclooxygenase-2 transcriptionally and posttranscriptionally in human macrophages independently from endogenous IL-1 β and TNF- α . *Journal of Immunology* c. 163 sayı (2): ss. 963-969.

- Bassiouny YA, DMR Dakhly, YA Bayoumi et al (2016) Does the addition of growth hormone to the in vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection antagonist protocol improve outcomes in poor responders? A randomized, controlled trial. *Fertility and Sterility* c. 105 sayı (3): ss. 697-702., doi:10.1016/j.fertnstert.2015.11.026.
- Bazzano MV, C Torelli, MC Pustovrh et al (2015) Obesity induced by cafeteria diet disrupts fertility in the rat by affecting multiple ovarian targets. *Reproductive BioMedicine Online* c. 31 sayı (5): ss. 655-667., doi:10.1016/j.rbmo.2015.08.004.
- Ben-Meir A, E Burstein, A Borrego-Alvarez et al (2015) Coenzyme Q10 restores oocyte mitochondrial function and fertility during reproductive aging. *Aging Cell* c. 14 sayı (5): ss. 887-895., doi:10.1111/accel.12368.
- Ben-Nathan D, DA Padgett, RM Loria (1999) Androstenediol and dehydroepiandrosterone protect mice against lethal bacterial infections and lipopolysaccharide toxicity. *Journal of Medical Microbiology* c. 48 sayı (5): ss. 425-431., doi:10.1099/00222615-48-5-425.
- Berger L, M El-Alfy, F Labrie (2008) Effects of intravaginal dehydroepiandrosterone on vaginal histomorphology, sex steroid receptor expression and cell proliferation in the rat. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* c. 109 sayı (1-2): ss. 67-80., doi:10.1016/j.jsbmb.2007.09.023.
- Berger T, CM Horner 2019 In vivo exposure of female rats to toxicants may affect oocyte quality. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* c. 17 sayı (3): ss. 273-281., (20.10.2019), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12759095>.
- Best D, A Avenell, S Bhattacharya (2017) How effective are weight-loss interventions for improving fertility in women and men who are overweight or obese? A systematic review and meta-analysis of the evidence. *Human Reproduction Update* c. 23 sayı (6): ss. 681-705., doi:10.1093/humupd/dmx027.
- Billig H, I Furuta, AJW Hsueh (1993) Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology* c. 133 sayı (5): ss. 2204-2212., doi:10.1210/endo.133.5.8404672.
- Bosdou JK, CA Venetis, EM Kolibianakis et al (2012) The use of androgens or androgen-modulating agents in poor responders undergoing in vitro fertilization: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update* c. 18 sayı (2): ss. 127-145., doi:10.1093/humupd/dmr051.
- Boubekri A, T Gernigon-Spychalowicz, F Khammar et al (2007) Histological and immunohistological aspects of the ovarian cycle of the algerian wild sand rat, *Psammomys obesus* Cretzschmar, 1828. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2007, c. 45, ss. 41-49, doi:10.2478/4487.
- Broekmans FJ, MR Soules, BC Fauser (2009) Ovarian aging: Mechanisms and clinical consequences. *Endocrine Reviews*, doi:10.1210/er.2009-0006.
- Buyuk E, DB Seifer, E Illions et al (2011) Elevated body mass index is associated with lower serum anti-mullerian hormone levels in infertile women with diminished ovarian reserve but not with normal ovarian reserve. *Fertility and Sterility* c. 95 sayı (7):, Elsevier Ltd ss. 2364-2368., doi:10.1016/j.fertnstert.2011.03.081.
- Cai J, L Liu, J Zhang et al (2017) Low body mass index compromises live birth rate in fresh transfer in vitro fertilization cycles: a retrospective study in a Chinese

- population. *Fertility and Sterility* c. 107 sayı (2): ss. 422-429.e2., doi:10.1016/j.fertnstert.2016.10.029.
- Cappellen G Van (1998) Ovarian follicle dynamics in the rat: regulation and flexibility.
- Casson PR (2000) Dehydroepiandrosterone supplementation augments ovarian stimulation in poor responders: a case series. *Human Reproduction* c. 15 sayı (10): ss. 2129-2132., doi:10.1093/humrep/15.10.2129.
- Casson Peter R., N Santoro, K Elkind-Hirsch et al (1998) Postmenopausal dehydroepiandrosterone administration increases free insulin-like growth factor-I and decreases high-density lipoprotein: A six-month trial. *Fertility and Sterility* c. 70 sayı (1): ss. 107-110., doi:10.1016/S0015-0282(98)00121-6.
- Centers_for_National_Disease_Control_and_Prevention (2009) Assisted reproductive technology 2009: Success rates. National Summary and Fertility Clinic Report, <http://www.cdc.gov/ART/ART2009>.
- Chalmers C (1996) Does hysterectomy in a premenopausal woman affect ovarian function?. *Medical Hypotheses* c. 46 sayı (6): ss. 573-575., doi:10.1016/S0306-9877(96)90134-6.
- Check JH, D Summers-Chase, W Yuan et al (2007) Effect of embryo quality on pregnancy outcome following single embryo transfer in women with a diminished egg reserve. *Fertility and Sterility* c. 87 sayı (4): ss. 749-756., doi:10.1016/j.fertnstert.2006.11.001.
- Chen SU, HF Chen, YR Lien et al (2000) Schedule to inject in vitro matured oocytes may increase pregnancy after intracytoplasmic sperm injection. *Archives of Andrology* c. 44 sayı (3): ss. 197-205., doi:10.1080/014850100262173.
- Cheuk BLY, PS Leung, ACT Lo et al (2000) Androgen control of cyclooxygenase expression in the rat epididymis. *Biology of Reproduction* c. 63 sayı (3): ss. 775-780., doi:10.1093/biolreprod/63.3.775.
- Cheung LP, PM Lam, IH Lok et al (2005) GnRH antagonist versus long GnRH agonist protocol in poor responders undergoing IVF: A randomized controlled trial. *Human Reproduction* c. 20 sayı (3): ss. 616-621., doi:10.1093/humrep/deh668.
- Chhabra RS, MR Elwell, A Peters (1990) Toxicity of 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide after 13 weeks of dermal or oral exposure in rats and mice. *Fundamental and applied toxicology: official journal of the Society of Toxicology* c. 14 sayı (4): ss. 745-751., doi:10.1016/0272-0590(90)90299-y.
- Christensen MW, HJ Ingerslev, B Degen et al (2016) Effect of female body mass index on oocyte quantity in fertility treatments (IVF): Treatment cycle number is a possible effect modifier. A register-based cohort study. *PLoS ONE*. Clemens Fürnsinn c. 11 sayı (9): s. e0163393., doi:10.1371/journal.pone.0163393.
- Cipollone F, G Cicolini, M Bucci (2008) Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: Recent insights and future perspectives. *Pharmacology and Therapeutics*, doi:10.1016/j.pharmthera.2008.01.002.
- Cossigny DA, JK Findlay, AE Drummond (2012) The effects of FSH and activin A on follicle development in vitro. *Reproduction* c. 143 sayı (2): ss. 221-229., doi:10.1530/REP-11-0105.
- Craig ZR, JR Davis, SL Marion et al (2010) 7,12-Dimethylbenz[A]anthracene

- induces sertoli-leydig-cell tumors in the follicle-depleted ovaries of mice treated with 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Comparative Medicine* c. 60 sayı (1): ss. 10-17.
- Dakhly DMR, YA Bayoumi, SH Gad Allah (2016) Which is the best IVF/ICSI protocol to be used in poor responders receiving growth hormone as an adjuvant treatment? A prospective randomized trial. *Gynecological Endocrinology* c. 32 sayı (2): ss. 116-119., doi:10.3109/09513590.2015.1092136.
- De Felici M (2013) Origin, migration, and proliferation of human primordial germ cells. *Oogenesis*, ss. 19-37, doi:10.1007/978-0-85729-826-3_2.
- Demiroglu A, T Gurgan (2009) Comparison of microdose flare-up and antagonist multiple-dose protocols for poor-responder patients: a randomized study. *Fertility and Sterility* c. 92 sayı (2);, Elsevier Ltd ss. 481-485., doi:10.1016/j.fertnstert.2008.07.006.
- Devine PJ, IG Sipes, PB Hoyer (2004) Initiation of delayed ovotoxicity by in vitro and in vivo exposures of rat ovaries to 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology* c. 19 sayı (1): ss. 71-77., doi:10.1016/j.reprotox.2004.06.002.
- Devine PJ, IG Sipes, MK Skinner et al (2002) Characterization of a rat in vitro ovarian culture system to study the ovarian toxicant 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology* c. 184 sayı (2): ss. 107-115., doi:10.1016/S0041-008X(02)99502-5.
- Doan HT, LH Quan, TT Nguyen (2017) The effectiveness of transdermal testosterone gel 1% (androgel) for poor responders undergoing in vitro fertilization. *Gynecological Endocrinology* c. 33 sayı (12): ss. 977-979., doi:10.1080/09513590.2017.1332586.
- Duffy DM (2011) Prostaglandin dehydrogenase (PGDH) in granulosa cells of primate periovulatory follicles is regulated by the ovulatory gonadotropin surge via multiple G proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology* c. 333 sayı (2);, Elsevier Ireland Ltd ss. 119-126., doi:10.1016/j.mce.2010.12.016.
- Duffy DM, CA Vandervoort (2011) Maturation and fertilization of nonhuman primate oocytes are compromised by oral administration of a cyclooxygenase-2 inhibitor. *Fertility and Sterility* c. 95 sayı (4): ss. 1256-1260., doi:10.1016/j.fertnstert.2010.12.048.
- Dumesic DA, RD Schramm, E Peterson et al (2002) Impaired developmental competence of oocytes in adult prenatally androgenized female rhesus monkeys undergoing gonadotropin stimulation for in vitro fertilization. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* c. 87 sayı (3): ss. 1111-1119., doi:10.1210/jcem.87.3.8287.
- ELBeltagy K, K ichi Honda, K Ozaki et al (2007) In vitro effect of dehydroepiandrosterone sulfate on steroid receptors, aromatase, cyclooxygenase-2 expression, and steroid hormone production in preovulatory human granulosa cells. *Fertility and Sterility* c. 88 sayı (4 SUPPL.): ss. 1135-1142., doi:10.1016/j.fertnstert.2007.01.008.
- Elia E, V Sander, CG Luchetti et al (2006) The mechanisms involved in the action of metformin in regulating ovarian function in hyperandrogenized mice. *Molecular Human Reproduction* c. 12 sayı (8): ss. 475-481., doi:10.1093/molehr/gal057.
- Elmore SA (2016) Book Review: Atlas of Histology of the Juvenile Rat Parker G.

- A. Picut C. A. , eds. (2016). Atlas of Histology of the Juvenile Rat (1st ed.). Cambridge, MA: Academic Press . 462 pp. US\$170.00 . ISBN-100128026820 ; ISBN-13: 978-0128026823 . Toxicologic pathology c. 44 sayı (8): s. 1170., doi:10.1177/0192623316677069.
- Erbas O, HG Pala, EE Pala et al (2014) Ovarian failure in diabetic rat model: Nuclear factor-kappaB, oxidative stress, and pentraxin-3. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology* c. 53 sayı (4): ss. 498-503., doi:10.1016/j.tjog.2013.11.008.
- Fábregues F, J Peñarrubia, M Creus et al (2009) Transdermal testosterone may improve ovarian response to gonadotrophins in low-responder IVF patients: A randomized, clinical trial. *Human Reproduction* c. 24 sayı (2): ss. 349-359., doi:10.1093/humrep/den428.
- Faut M, EM Elia, F Parborell et al (2011) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and early folliculogenesis during an acute hyperandrogenism condition. *Fertility and Sterility* c. 95 sayı (1): ss. 333-337., doi:10.1016/j.fertnstert.2010.07.1083.
- Findlay JK (1986) Angiogenesis in reproductive tissues. *Journal of Endocrinology*, doi:10.1677/joe.0.1110357.
- Flaws JA., KL Salyers, IG Sipes et al (1994) Reduced ability of rat preantral ovarian follicles to metabolize 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology* c. 126 sayı (2): ss. 286-294., doi:10.1006/taap.1994.1118.
- Flaws Jodi A., JK Doerr, IG Sipes et al (1994) Destruction of preantral follicles in adult rats by 4-vinyl-1-cyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology* c. 8 sayı (6): ss. 509-514., doi:10.1016/0890-6238(94)90033-7.
- Franco JG, RLR Baruffi, AL Mauri et al (2006) GnRH agonist versus GnRH antagonist in poor ovarian responders: A meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online* c. 13 sayı (5):, Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK ss. 618-627., doi:10.1016/S1472-6483(10)60651-7.
- Frattarelli JL, GDE McWilliams, MJ Hill et al (2008) Low-dose aspirin use does not improve in vitro fertilization outcomes in poor responders. *Fertility and Sterility* c. 89 sayı (5): ss. 1113-1117., doi:10.1016/j.fertnstert.2007.05.007.
- Frye JB, AL Lukefahr, LE Wright et al (2012) Modeling perimenopause in sprague-dawley rats by chemical manipulation of the transition to ovarian failure. *Comparative Medicine* c. 62 sayı (3): ss. 193-202.
- Funk CD (2001) Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science*, doi:10.1126/science.294.5548.1871.
- Gat I, S Blanco Mejia, H Balakier et al (2016) The use of coenzyme Q10 and DHEA during IUI and IVF cycles in patients with decreased ovarian reserve. *Gynecological Endocrinology* c. 32 sayı (7): ss. 534-537., doi:10.3109/09513590.2015.1137095.
- Gaytán M, C Bellido, C Morales et al (2006) Effects of selective inhibition of cyclooxygenase and lipoxygenase pathways in follicle rupture and ovulation in the rat. *Reproduction* c. 132 sayı (4): ss. 571-577., doi:10.1530/rep.1.01236.
- Gleicher N, D Barad (2006) "Ovarian age-based" stimulation of young women with diminished ovarian reserve results in excellent pregnancy rates with in vitro fertilization. *Fertility and Sterility* c. 86 sayı (6): ss. 1621-1625.,

doi:10.1016/j.fertnstert.2006.04.046.

- Gleicher N, E Ryan, A Weghofer et al (2009) Miscarriage rates after dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation in women with diminished ovarian reserve: A case control study. *Reproductive Biology and Endocrinology* c. 7 s. 108., doi:10.1186/1477-7827-7-108.
- Gleicher N, A Weghofer, DH Barad (2010a) Dehydroepiandrosterone (DHEA) reduces embryo aneuploidy: Direct evidence from preimplantation genetic screening (PGS). *Reproductive Biology and Endocrinology* c. 8 , doi:10.1186/1477-7827-8-140.
- Gleicher N, A Weghofer, DH Barad (2010b) Improvement in diminished ovarian reserve after dehydroepiandrosterone supplementation. *Reproductive BioMedicine Online*, doi:10.1016/j.rbmo.2010.04.006.
- Gong X, Q Tong, Z Chen et al (2015) Microvascular density and vascular endothelial growth factor and osteopontin expression during the implantation window in a controlled ovarian hyperstimulation rat model. *Experimental and Therapeutic Medicine* c. 9 sayı (3): ss. 773-779., doi:10.3892/etm.2015.2181.
- Griesinger G, K Diedrich, BC Tarlatzis et al (2006) GnRH-antagonists in ovarian stimulation for IVF in patients with poor response to gonadotrophins, polycystic ovary syndrome, and risk of ovarian hyperstimulation: A meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online* c. 13 sayı (5):, Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK ss. 628-638., doi:10.1016/S1472-6483(10)60652-9.
- Guigon CJ, S Magre (2006) Contribution of Germ Cells to the Differentiation and Maturation of the Ovary: Insights from Models of Germ Cell Depletion. *Biology of Reproduction* c. 74 sayı (3): ss. 450-458., doi:10.1095/biolreprod.105.047134.
- Haas JR, PJ Christian, PB Hoyer (2007) Effects of impending ovarian failure induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide on fertility in C57BL/6 female mice. *Comparative medicine* c. 57 sayı (5): ss. 443-449., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17974126>.
- Hakverdi AU, CE Taner, AC Erden et al (1994) Changes in ovarian function after tubal sterilization. *Advances in Contraception* c. 10 sayı (1): ss. 51-56., doi:10.1007/BF01986530.
- Haning R V., RJ Hackett, CA Flood et al (1993) Plasma dehydroepiandrosterone sulfate serves as a prehormone for 48% of follicular fluid testosterone during treatment with menotropins. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* c. 76 sayı (5): ss. 1301-1307., doi:10.1210/jcem.76.5.8496321.
- Hassa H, Y Aydin, O Ozatik et al (2015) Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on follicular dynamics in a diminished ovarian reserve in vivo model. *Systems Biology in Reproductive Medicine* c. 61 sayı (3): ss. 117-121., doi:10.3109/19396368.2015.1011353.
- Hazzard TM (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and angiopoietin regulation by gonadotrophin and steroids in macaque granulosa cells during the peri-ovulatory interval. *Molecular Human Reproduction* c. 5 sayı (12): ss. 1115-1121., doi:10.1093/molehr/5.12.1115.
- Hedin L, D Gaddy-Kurten, R Kurten et al (1987) Prostaglandin endoperoxide synthase in rat ovarian follicles: Content, cellular distribution, and evidence for hormonal induction preceding ovulation. *Endocrinology* c. 121 sayı (2): ss. 722-

- 731., doi:10.1210/endo-121-2-722.
- Helke KL (2018) Book Review: Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas. *Veterinary Pathology* c. 55 sayı (6): ss. 918-918., doi:10.1177/0300985818795862.
- Hennebert O, MA Pelissier, S Le Mee et al (2008) Anti-inflammatory effects and changes in prostaglandin patterns induced by 7 β -hydroxy-epiandrosterone in rats with colitis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* c. 110 sayı (3-5): ss. 255-262., doi:10.1016/j.jsbmb.2007.12.014.
- Hillier SG (2009) Paracrine support of ovarian stimulation. *Molecular Human Reproduction* c. 15 sayı (12): ss. 843-850., doi:10.1093/molehr/gap086.
- Hizaki H, E Segi, Y Sugimoto et al (1999) Abortive expansion of the cumulus and impaired fertility in mice lacking the prostaglandin E receptor subtype EP2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* c. 96 sayı (18): ss. 10501-10506., doi:10.1073/pnas.96.18.10501.
- Honnma H, T Endo, H Henmi et al (2006) Altered expression of Fas/Fas ligand/caspase 8 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in atretic follicles within dehydroepiandrosterone-induced polycystic ovaries in rats. *Apoptosis* c. 11 sayı (9): ss. 1525-1533., doi:10.1007/s10495-006-9148-2.
- Hoyer PB, IG Sipes (2007a) Development of an animal model for ototoxicity using 4-vinylcyclohexene: A case study. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, doi:10.1002/bdrb.20103.
- Hoyer PB, IG Sipes (2007b) Development of an animal model for ototoxicity using 4-vinylcyclohexene: A case study. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, doi:10.1002/bdrb.20103.
- Hu CL, RG Cowan, RM Harman et al (2004) Cell Cycle Progression and Activation of Akt Kinase Are Required for Insulin-Like Growth Factor I-Mediated Suppression of Apoptosis in Granulosa Cells. *Molecular Endocrinology* c. 18 sayı (2): ss. 326-338., doi:10.1210/me.2003-0178.
- Hu X, P Christian, IG Sipes et al (2001a) Expression and Redistribution of Cellular Bad, Bax, and Bcl-xL Protein Is Associated with VCD-Induced Ovotoxicity in Rats1. *Biology of Reproduction* c. 65 sayı (5): ss. 1489-1495., doi:10.1095/biolreprod65.5.1489.
- Hu X, PJ Christian, KE Thompson et al (2001b) Apoptosis Induced in Rats by 4-Vinylcyclohexene Diepoxide Is Associated with Activation of the Caspase Cascades1. *Biology of Reproduction* c. 65 sayı (1): ss. 87-93., doi:10.1095/biolreprod65.1.87.
- Hu X, JA Flaws, IG Sipes et al (2002) Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases and AP-1 Transcription Factor in Ovotoxicity Induced by 4-Vinylcyclohexene Diepoxide in Rats1. *Biology of Reproduction* c. 67 sayı (3): ss. 718-724., doi:10.1095/biolreprod.102.004259.
- Huslig RL, A Malik, MR Clark (1987) Human chorionic gonadotropin stimulation of immunoreactive prostaglandin synthase in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology* c. 50 sayı (3): ss. 237-246., doi:10.1016/0303-7207(87)90022-0.
- Jayaprakasan K, A Narkwichean, WE Maalouf et al (2014) Efficacy of dehydroepiandrosterone to overcome the effect of ovarian ageing (DITTO): A proof of principle randomised controlled trial protocol. *BMJ Open* c. 4 sayı (10):, doi:10.1136/bmjopen-2014-005767.

- Jin X, CS Han, FQ Yu et al (2005) Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Molecular Reproduction and Development* c. 70 sayı (1): ss. 82-90., doi:10.1002/mrd.20142.
- Juriscicova A, A Taniuchi, H Li et al (2007) Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri. *Journal of Clinical Investigation* c. 117 sayı (12): ss. 3971-3978., doi:10.1172/JCI28493.
- Ikeda K, Baba T, Morishita M et al (2014). Long-term treatment with dehydroepiandrosterone may lead to follicular atresia through interaction with anti-Mullerian hormone. *Journal of ovarian research*, 7, 46. doi:10.1186/1757-2215-7-46
- Kao SW, IG Sipes, PB Hoyer (1999) Early effects of ovotoxicity induced by 4-vinylcyclohexene diepoxide in rats and mice. *Reproductive Toxicology* c. 13 sayı (1): ss. 67-75., doi:10.1016/S0890-6238(98)00061-6.
- Kappeler CJ, PB Hoyer (2012) 4-vinylcyclohexene diepoxide: A model chemical for ovotoxicity. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 12.02.2012, c. 58, ss. 57-62, doi:10.3109/19396368.2011.648820.
- Kara M, T Aydin, T Aran et al (2014) Does dehydroepiandrosterone supplementation really affect IVF-ICSI outcome in women with poor ovarian reserve?. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* c. 173 sayı (1): ss. 63-65., doi:10.1016/j.ejogrb.2013.11.008.
- Kawachiya S, T Matsumoto, D Bodri et al (2012) Short-term, low-dose, non-steroidal anti-inflammatory drug application diminishes premature ovulation in natural-cycle IVF. *Reproductive BioMedicine Online* c. 24 sayı (3): ss. 308-313., doi:10.1016/j.rbmo.2011.12.002.
- Kaya C, H Turgut, H Cengiz et al (2014) Effect of detorsion alone and in combination with enoxaparin therapy on ovarian reserve and serum antimüllerian hormone levels in a rat ovarian torsion model. *Fertility and Sterility* c. 102 sayı (3):, doi:10.1016/j.fertnstert.2014.06.007.
- Keating AF, SM Fernandez, CJ Mark-Kappeler et al (2011) Inhibition of PIK3 Signaling Pathway Members by the Ovotoxicant 4-Vinylcyclohexene Diepoxide in Rats. *Biology of Reproduction* c. 84 sayı (4): ss. 743-751., doi:10.1095/biolreprod.110.087650.
- Keating AF, C J. Mark, N Sen et al (2009) Effect of phosphatidylinositol-3 kinase inhibition on ovotoxicity caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide and 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene in neonatal rat ovaries. *Toxicology and Applied Pharmacology* c. 241 sayı (2): ss. 127-134., doi:10.1016/j.taap.2009.08.012.
- Keck M, MJ Romero-Aleshire, Q Cai et al (2007) Hormonal status affects the progression of STZ-induced diabetes and diabetic renal damage in the VCD mouse model of menopause. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* c. 293 sayı (1):, doi:10.1152/ajprenal.00022.2007.
- Kolibianakis EM, CA Venetis, K Diedrich et al (2009) Addition of growth hormone to gonadotrophins in ovarian stimulation of poor responders treated by in-vitro fertilization: A systematic review and meta-analysis. *Human Reproduction Update*, doi:10.1093/humupd/dmp026.
- Krishna A, A Al Rifai, B Hubner et al (2001) Increase in calcitonin gene related peptide (CGRP) and decrease in mast cells in dihydroepiandrosterone (DHEA)-

- induced polycystic rat ovaries. *Anatomy and Embryology* c. 203 sayı (5): ss. 375-382., doi:10.1007/s004290100165.
- Kuang H, D Han, J Xie et al (2016) Profiling of differentially expressed microRNAs in premature ovarian failure in an animal model. *c. 3590 sayı (July):*, doi:10.3109/09513590.2013.850659.
- Kumbak B, E Oral, S Kahraman et al (2005) Young patients with diminished ovarian reserve undergoing assisted reproductive treatments: A preliminary report. *Reproductive BioMedicine Online* c. 11 sayı (3): ss. 294-299., doi:10.1016/S1472-6483(10)60836-X.
- Lass A (2001) Assessment of ovarian reserve - is there a role for ovarian biopsy?. *Human Reproduction* c. 16 sayı (6): ss. 1055-1057., doi:10.1093/humrep/16.6.1055.
- Lazar T (2002) *Histology and Cell Biology—An Introduction to Pathology. Tissue and Cell* c. 34 sayı (6): s. 460., doi:10.1016/s0040816602000733.
- Lee JY, JC Tae, CH Kim et al (2017) Expression of the genes for peroxisome proliferatoractivated receptor- γ , cyclooxygenase-2, and proinflammatory cytokines in granulosa cells from women with polycystic ovary syndrome. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine* c. 44 sayı (3):, Korean Society for Reproductive Medicine ss. 146-151., doi:10.5653/cerm.2017.44.3.146.
- Lee MT, E Anderson, GY Lee (1991) Changes in ovarian morphology and serum hormones in the rat after treatment with dehydroepiandrosterone. *The Anatomical Record* c. 231 sayı (2): ss. 185-192., doi:10.1002/ar.1092310206.
- Lekamge DN, M Lane, RB Gilchrist et al (2008) Increased gonadotrophin stimulation does not improve IVF outcomes in patients with predicted poor ovarian reserve. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* c. 25 sayı (11-12): ss. 515-521., doi:10.1007/s10815-008-9266-6.
- Leskiewicz M, D Jantas, B Budziszewska et al (2008) Excitatory neurosteroids attenuate apoptotic and excitotoxic cell death in primary cortical neurons. *Journal of Physiology and Pharmacology* c. 59 sayı (3): ss. 457-475.
- Li J, S Fan, D Han et al (2014) Microarray gene expression profiling and bioinformatics analysis of premature ovarian failure in a rat model. *Experimental and Molecular Pathology* c. 97 sayı (3): ss. 535-541., doi:10.1016/j.yexmp.2014.10.015.
- Li XL, L Wang, F Lv et al (2017) The influence of different growth hormone addition protocols to poor ovarian responders on clinical outcomes in controlled ovary stimulation cycles: A systematic review and meta-analysis. *Medicine (United States)*, doi:10.1097/MD.0000000000006443.
- Liu D, H Si, KA Reynolds et al (2007) Dehydroepiandrosterone protects vascular endothelial cells against apoptosis through a G α i protein-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and regulation of antiapoptotic Bcl-2 expression. *Endocrinology* c. 148 sayı (7): ss. 3068-3076., doi:10.1210/en.2006-1378.
- Liu J, J Sirois (1998) Follicle Size-Dependent Induction of Prostaglandin G/H Synthase-2 during Superovulation in Cattle1. *Biology of Reproduction* c. 58 sayı (6): ss. 1527-1532., doi:10.1095/biolreprod58.6.1527.
- Liu K, S Rajareddy, L Liu et al (2006) Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: New roles for

- an old timer. *Developmental Biology*, doi:10.1016/j.ydbio.2006.07.038.
- Lok IH, SK Yip, LP Cheung et al (2004) Adjuvant low-dose aspirin therapy in poor responders undergoing in vitro fertilization: A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Fertility and Sterility* c. 81 sayı (3): ss. 556-561., doi:10.1016/j.fertnstert.2003.07.033.
- Löw P, K Molnár, G Kriska (2016) *Atlas of Animal Anatomy and Histology. Anticancer research* c. 36 sayı (8);, Cham: Springer International Publishing s. 4371., doi:10.1007/978-3-319-25172-1.
- Lu Q, H Shen, Y Li et al (2014) Low testosterone levels in women with diminished ovarian reserve impair embryo implantation rate: A retrospective case-control study. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* c. 31 sayı (4): ss. 485-491., doi:10.1007/s10815-014-0186-3.
- Luchetti C. G., E Mikó, J Szekeres-Bartho et al (2008) Dehydroepiandrosterone and metformin modulate progesterone-induced blocking factor (PIBF), cyclooxygenase 2 (COX2) and cytokines in early pregnant mice. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* c. 111 sayı (3-5): ss. 200-207., doi:10.1016/j.jsbmb.2008.06.007.
- Luchetti Carolina Griselda, ME Solano, V Sander et al (2004) Effects of dehydroepiandrosterone on ovarian cystogenesis and immune function. *Journal of Reproductive Immunology* c. 64 sayı (1-2): ss. 59-74., doi:10.1016/j.jri.2004.04.002.
- Luo W, C Zhu (2000) Expression and regulation of mRNAs for insulin-like growth factor-I receptor and LH receptor in corpora lutea. *Science in China, Series C: Life Sciences* c. 43 sayı (2): ss. 188-190., doi:10.1007/bf02879127.
- Madani T, M Ashrafi, LM Yeganeh (2012) Comparison of different stimulation protocols efficacy in poor responders undergoing IVF: A retrospective study. *Gynecological Endocrinology* c. 28 sayı (2): ss. 102-105., doi:10.3109/09513590.2011.579206.
- Mahmoud YI, AA Mahmoud, FS Abo-Zeid et al (2018) Effects of dehydroepiandrosterone on the ovarian reserve and pregnancy outcomes in perimenopausal rats (DHEA and fertility in perimenopausal rats). *Life Sciences* c. 199 Nisan ss. 131-138., doi:10.1016/j.lfs.2018.03.021.
- Malik AS, RK Narayan, WW Wendling et al (2003) A novel dehydroepiandrosterone analog improves functional recovery in a rat traumatic brain injury model. *Journal of Neurotrauma* c. 20 sayı (5): ss. 463-476., doi:10.1089/089771503765355531.
- Malmusi S, A La Marca, S Giulini et al (2005) Comparison of a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist and GnRH agonist flare-up regimen in poor responders undergoing ovarian stimulation. *Fertility and Sterility* c. 84 sayı (2): ss. 402-406., doi:10.1016/j.fertnstert.2005.01.139.
- Maman E, K Prokopsis, J Levron et al (2009) Does controlled ovarian stimulation prior to chemotherapy increase primordial follicle loss and diminish ovarian reserve? An animal study. *Human Reproduction* c. 24 sayı (1): ss. 206-210., doi:10.1093/humrep/den337.
- Marcondes FK, FJ Bianchi, AP Tanno (2002) Determination of the estrous cycle phases of rats: Some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* c. 62 sayı (4 A): ss. 609-614., doi:10.1590/S1519-69842002000400008.
- Mark-Kappeler CJ, N Sen, AF Keating et al (2010) Distribution and responsiveness

- of rat anti-Müllerian hormone during ovarian development and VCD-induced ovotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* c. 249 sayı (1): ss. 1-7., doi:10.1016/j.taap.2010.08.024.
- Matsuda-Minehata F, N Inoue, Y Goto et al (2006) The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. *Journal of Reproduction and Development*, doi:10.1262/jrd.18069.
- Matsumoto H, W Ma, W Smalley et al (2001) Diversification of Cyclooxygenase-2-Derived Prostaglandins in Ovulation and Implantation1. *Biology of Reproduction* c. 64 sayı (5): ss. 1557-1565., doi:10.1095/biolreprod64.5.1557.
- Mauriège P, C Martel, D Langin et al (2003) Chronic effects of dehydroepiandrosterone on rat adipose tissue metabolism. *Metabolism: Clinical and Experimental* c. 52 sayı (3): ss. 264-272., doi:10.1053/meta.2003.50043.
- May-Panloup P, V Ferr-Lhtellier, C Morinire et al (2012) Molecular characterization of corona radiata cells from patients with diminished ovarian reserve using microarray and microfluidic-based gene expression profiling. *Human Reproduction* c. 27 sayı (3): ss. 829-843., doi:10.1093/humrep/der431.
- Mayer LP, PJ Devine, CA Dyer et al (2004) The Follicle-Deplete Mouse Ovary Produces Androgen1. *Biology of Reproduction* c. 71 sayı (1): ss. 130-138., doi:10.1095/biolreprod.103.016113.
- Mayer LP, CA Dyer, RL Eastgard et al (2005) Atherosclerotic lesion development in a novel ovary-intact mouse model of perimenopause. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* c. 25 sayı (9): ss. 1910-1916., doi:10.1161/01.ATV.0000175767.46520.6a.
- Mayer LP, NA Pearsall, PJ Christian et al (2002) Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reproductive Toxicology* c. 16 sayı (6): ss. 775-781., doi:10.1016/S0890-6238(02)00048-5.
- McGee EA, AJW Hsueh (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews*, doi:10.1210/er.21.2.200.
- McKenzie LJ, SA Pangas, SA Carson et al (2004) Human cumulus granulosa cell gene expression: A predictor of fertilization and embryo selection in women undergoing IVF. *Human Reproduction* c. 19 sayı (12): ss. 2869-2874., doi:10.1093/humrep/deh535.
- McLean AC, N Valenzuela, S Fai et al (2012) Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments*, sayı 67, doi:10.3791/4389.
- Medina MC, LC Souza, LC Caperuto et al (2006) Dehydroepiandrosterone increases β -cell mass and improves the glucose-induced insulin secretion by pancreatic islets from aged rats. *FEBS Letters* c. 580 sayı (1): ss. 285-290., doi:10.1016/j.febslet.2005.12.014.
- Ménézo Y, B Dale, M Cohen (2010) DNA damage and repair in human oocytes and embryos: A review. *Zygote* c. 18 sayı (4): ss. 357-365., doi:10.1017/S0967199410000286.
- Merhi Z, A Zapantis, DS Berger et al (2013) Determining an anti-mullerian hormone cutoff level to predict clinical pregnancy following in vitro fertilization in women with severely diminished ovarian reserve. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* c. 30 sayı (10): ss. 1361-1365., doi:10.1007/s10815-013-0077-z.

- Mitri F, LA Behan, CA Murphy et al (2016) Microdose flare protocol with interrupted follicle stimulating hormone and added androgen for poor responders - An observational pilot study. *Fertility and Sterility* c. 105 sayı (1): ss. 100-105.e6., doi:10.1016/j.fertnstert.2015.09.038.
- Moore KL, TVN Persaud, MG Torchia (2008) Klinik yönleriyle insan embriyolojisi.
- Mossa F, F Carter, SW Walsh et al (2013) Maternal Undernutrition in Cows Impairs Ovarian and Cardiovascular Systems in Their Offspring1. *Biology of Reproduction* c. 88 sayı (4): ss. 1-9., doi:10.1095/biolreprod.112.107235.
- Moumné L, F Batista, BA Benayoun et al (2008) The mutations and potential targets of the forkhead transcription factor FOXL2. *Molecular and Cellular Endocrinology* c. 282 sayı (1-2): ss. 2-11., doi:10.1016/j.mce.2007.11.006.
- Muhammad FS, AK Goode, ND Kock et al (2009) Effects of 4-vinylcyclohexene diepoxide on peripubertal and adult sprague-dawley Rats: Ovarian, clinical, and pathologic outcomes. *Comparative Medicine* c. 59 sayı (1): ss. 46-59.
- Narkwichean A, W Maalouf, BK Campbell et al (2013) Efficacy of dehydroepiandrosterone to improve ovarian response in women with diminished ovarian reserve: a meta-analysis. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, doi:10.1186/1477-7827-11-44.
- National Toxicology Program (1989) Toxicology and Carcinogenesis Studies of 4-Vinyl-1-cyclohexene Diepoxide (CAS No. 106-87-6) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Dermal Studies). National Toxicology Program technical report series c. 362 Kasım ss. 1-249., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12695779>.
- Neeraja S, AS Sreenath, PRK Reddy et al (2003) Expression of cyclooxygenase-2 in rat testis. *Reproductive BioMedicine Online* c. 6 sayı (3): ss. 302-309., doi:10.1016/S1472-6483(10)61849-4.
- Niederberger C, A Pellicer, J Cohen et al (2018) Forty years of IVF. *Fertility and Sterility*, doi:10.1016/j.fertnstert.2018.06.005.
- Nielsen ME, IA Rasmussen, SG Kristensen et al (2011) In human granulosa cells from small antral follicles, androgen receptor mRNA and androgen levels in follicular fluid correlate with FSH receptor mRNA. *Molecular Human Reproduction* c. 17 sayı (1): ss. 63-70., doi:10.1093/molehr/gaq073.
- Nouveau S, P Bastien, F Baldo et al (2008) Effects of topical DHEA on aging skin: A pilot study. *Maturitas* c. 59 sayı (2): ss. 174-181., doi:10.1016/j.maturitas.2007.12.004.
- Nozaki Y, E Furubo, T Matsuno et al (2009) Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity 6) Two- or four-week repeated-dose studies and fertility study of cisplatin in female rats. *Journal of Toxicological Sciences* c. 34 sayı (1 SPEC. ISS.): ss. SP91-9., doi:10.2131/jts.34.s91.
- Ochsner SA, DL Russell, AJ Day et al (2003) Decreased expression of tumor necrosis factor- α -stimulated gene 6 in cumulus cells of the cyclooxygenase-2 and EP2 null mice. *Endocrinology* c. 144 sayı (3): ss. 1008-1019., doi:10.1210/en.2002-220435.
- Özcan P, C Fıçıcıoğlu, O Kizilkale et al (2016) Can Coenzyme Q10 supplementation protect the ovarian reserve against oxidative damage?. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* c. 33 sayı (9): ss. 1223-1230., doi:10.1007/s10815-016-0751-z.
- Paixão L, LM Velez, BR Santos et al (2016) Early ovarian follicular development in prepubertal Wistar rats acutely exposed to androgens. *Journal of Developmental*

- Origins of Health and Disease c. 7 sayı (4): ss. 384-390., doi:10.1017/S2040174416000222.
- Pan HA, MH Wu, YC Cheng et al (2003) Quantification of ovarian Doppler signal in hyperresponders during in vitro fertilization treatment using three-dimensional power Doppler ultrasonography. *Ultrasound in Medicine and Biology* c. 29 sayı (7): ss. 921-927., doi:10.1016/S0301-5629(03)00901-3.
- Pandian Z, AR McTavish, L Aucott et al (2010) Interventions for “poor responders” to controlled ovarian hyper stimulation (COH) in in-vitro fertilisation (IVF). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, sayı 1 (Ocak) s. CD004379., doi:10.1002/14651858.cd004379.pub3.
- Parker CR, BA Conway-Myers (1998) The effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on the thymus, spleen, and adrenals of prepubertal and adult female rats. *Endocrine Research* c. 24 sayı (2): ss. 113-126., doi:10.1080/07435809809135522.
- Parrott JA, MK Skinner (1999) Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology* c. 140 sayı (9): ss. 4262-4271., doi:10.1210/endo.140.9.6994.
- Patrizio P, A Vaiarelli, PE Levi Setti et al (2015) How to define, diagnose and treat poor responders? Responses from a worldwide survey of IVF clinics. *Reproductive BioMedicine Online* c. 30 sayı (6): ss. 581-592., doi:10.1016/j.rbmo.2015.03.002.
- Pitteloud N, VK Mootha, AA Dwyer et al (2005) Relationship between testosterone levels, insulin sensitivity, and mitochondrial function in men. *Diabetes Care* c. 28 sayı (7): ss. 1636-1642., doi:10.2337/diacare.28.7.1636.
- Prizant H, N Gleicher, A Sen (2014) Androgen actions in the ovary: Balance is key. *Journal of Endocrinology*, doi:10.1530/JOE-14-0296.
- Provost MP, KS Acharya, CR Acharya et al (2016) Pregnancy outcomes decline with increasing body mass index: Analysis of 239,127 fresh autologous in vitro fertilization cycles from the 2008-2010 Society for Assisted Reproductive Technology registry. *Fertility and Sterility* c. 105 sayı (3): ss. 663-669., doi:10.1016/j.fertnstert.2015.11.008.
- Qin JC, L Fan, AP Qin (2017) The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on women with diminished ovarian reserve (DOR) in IVF cycle: Evidence from a meta-analysis. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, doi:10.1016/j.jgyn.2016.01.002.
- Reddy P, L Shen, C Ren et al (2005) Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. *Developmental Biology* c. 281 sayı (2): ss. 160-170., doi:10.1016/j.ydbio.2005.02.013.
- Reed BG, SN Babayev, O Bukulmez (2015) Shifting paradigms in diminished ovarian reserve and advanced reproductive age in assisted reproduction: Customization instead of conformity. *Seminars in Reproductive Medicine* c. 33 sayı (3): ss. 169-178., doi:10.1055/s-0035-1552585.
- Romero-Aleshire MJ, MK Diamond-Stanic, AH Hasty et al (2009) Loss of ovarian function in the VCD mouse-model of menopause leads to insulin resistance and a rapid progression into the metabolic syndrome. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* c. 297 sayı (3):, doi:10.1152/ajpregu.90762.2008.

- Ross MH, Pawlina W (2014) *Histology a Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology Psychological Science*.
- Sadler T (1993) *Langman's medikal embriyoloji. Langman's medikal embriyoloji c. 6 sayı (Williams&Wilkin/Palme): ss. 198-218.*
- Sahambi SK, JA Visser, APN Themmen et al (2008) Correlation of serum anti-Müllerian hormone with accelerated follicle loss following 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced follicle loss in mice. *Reproductive Toxicology c. 26 sayı (2): ss. 116-122., doi:10.1016/j.reprotox.2008.07.005.*
- Said RS, E El-Demerdash, AS Nada et al (2016) Resveratrol inhibits inflammatory signaling implicated in ionizing radiation-induced premature ovarian failure through antagonistic crosstalk between silencing information regulator 1 (SIRT1) and poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1). *Biochemical Pharmacology c. 103 ss. 140-150., doi:10.1016/j.bcp.2016.01.019.*
- Saksouk FA, SC Johnson (2004) Recognition of the ovaries and ovarian origin of pelvic masses with CT. *Radiographics c. 24 sayı (SPEC. ISS.):*
- Sander V, CG Luchetti, ME Solano et al (2006) Role of the N, N'-dimethylbiguanide metformin in the treatment of female prepuberal BALB/c mice hyperandrogenized with dehydroepiandrosterone. *Reproduction c. 131 sayı (3): ss. 591-602., doi:10.1530/rep.1.00941.*
- Sander VA, MB Hapon, L Sícaro et al (2011) Alterations of folliculogenesis in women with polycystic ovary syndrome. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology c. 124 sayı (1-2): ss. 58-64., doi:10.1016/j.jsbmb.2011.01.008.*
- Şeftalioğlu A (1998) *Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, Tıp ve teknik.*
- Seifer DB, G Lambert-Messerlian, JW Hogan et al (1997) Day 3 serum inhibin-B is predictive of assisted reproductive technologies outcome. *Fertility and Sterility c. 67 sayı (1): ss. 110-114., doi:10.1016/S0015-0282(97)81865-1.*
- Shah BH, KJ Catt (2005) Roles of LPA3 and COX-2 in implantation. *Trends in Endocrinology and Metabolism, doi:10.1016/j.tem.2005.09.009.*
- Shi L, J Zhang, Z Lai et al (2016) Long-term moderate oxidative stress decreased ovarian reproductive function by reducing follicle quality and progesterone production. *PLoS ONE c. 11 sayı (9):, doi:10.1371/journal.pone.0162194.*
- Siddappa D, É Beaulieu, N Gévry et al (2015) Effect of the transient pharmacological inhibition of Mapk3/1 pathway on ovulation in mice. *PLoS ONE Ed. Jean-Marc A Lobaccaro c. 10 sayı (3): s. e0119387., doi:10.1371/journal.pone.0119387.*
- Singletary SJ, AJ Kirsch, J Watson et al (2005) Lack of correlation of vaginal impedance measurements with hormone levels in the rat. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science c. 44 sayı (6): ss. 37-42.*
- Sirois J, K Sayasith, KA Brown et al (2004) Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: A 2004 account. *Human Reproduction Update, doi:10.1093/humupd/dmh032.*
- Sominsky L, I Ziko, A Soch et al (2016) Neonatal overfeeding induces early decline of the ovarian reserve: Implications for the role of leptin. *Molecular and Cellular Endocrinology c. 431 , Elsevier Ltd ss. 24-35., doi:10.1016/j.mce.2016.05.001.*
- Sozen B, M Ozekinci, M Erman et al (2019) Dehydroepiandrosterone supplementation attenuates ovarian ageing in a galactose-induced primary

- ovarian insufficiency rat model. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, doi:10.1007/s10815-019-01560-4.
- Springer LN, ME McAsey, JA Flaws et al (1996b) Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology* c. 139 sayı (2): ss. 394-401., doi:10.1006/taap.1996.0180.
- Springer LN, JL Tilly, IG Sipes et al (1996a) Enhanced expression of bar in small preantral follicles during 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovotoxicity in the rat. *Toxicology and Applied Pharmacology* c. 139 sayı (2): ss. 402-410., doi:10.1006/taap.1996.0181.
- Straub RH, L Konecna, S Hrach et al (1998) Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: Possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* c. 83 sayı (6): ss. 2012-2017., doi:10.1210/jcem.83.6.4876.
- Sun JS, CX Wu, YH Tsuang et al (2006) The in vitro effects of dehydroepiandrosterone on chondrocyte metabolism. *Osteoarthritis and Cartilage* c. 14 sayı (3): ss. 238-249., doi:10.1016/j.joca.2005.09.012.
- Sunkara SK, J Pundir, Y Khalaf (2011a) Effect of androgen supplementation or modulation on ovarian stimulation outcome in poor responders: A meta-analysis. *Reproductive BioMedicine Online*, Reproductive Healthcare Ltd., doi:10.1016/j.rbmo.2011.01.015.
- Sunkara SK, V Rittenberg, N Raine-Fenning et al (2011b) Association between the number of eggs and live birth in IVF treatment: An analysis of 400 135 treatment cycles. *Human Reproduction* c. 26 sayı (7): ss. 1768-1774., doi:10.1093/humrep/der106.
- Supramaniam PR, M Mittal, E McVeigh et al (2018) The correlation between raised body mass index and assisted reproductive treatment outcomes: A systematic review and meta-analysis of the evidence. *Reproductive Health* c. 15 sayı (1): s. 34., doi:10.1186/s12978-018-0481-z.
- Suttie AE, JR Leininger, AE Bradley et al (2017) Boorman's pathology of the rat : reference and atlas.
- Takahashi H, A Nakajima, H Sekihara (2004) Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfate (DHEAS) inhibit the apoptosis in human peripheral blood lymphocytes. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* c. 88 sayı (3): ss. 261-264., doi:10.1016/j.jsbmb.2003.12.006.
- Takahashi T, JD Morrow, H Wang et al (2006) Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin E2 directs oocyte maturation by differentially influencing multiple signaling pathways. *Journal of Biological Chemistry* c. 281 sayı (48): ss. 37117-37129., doi:10.1074/jbc.M608202200.
- Taniguchi S, T Yanase, M Haji et al (1995) The Antiobesity Effect of Dehydroepiandrosterone in Castrated or Noncastrated Obese Zucker Male Rats. *Obesity Research* c. 3 sayı (5 S): ss. 639S-643S., doi:10.1002/j.1550-8528.1995.tb00480.x.
- Te Velde ER, PL Pearson (2002) The variability of female reproductive ageing. *Human Reproduction Update*, doi:10.1093/humupd/8.2.141.
- Thoma ME, AC McLain, JF Louis et al (2013) Prevalence of infertility in the United

- States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. *Fertility and Sterility* c. 99 sayı (5):, Elsevier Inc. ss. 1324-1331.e1., doi:10.1016/j.fertnstert.2012.11.037.
- Tilley SL, LP Audoly, EH Hicks et al (1999) Reproductive failure and reduced blood pressure in mice lacking the EP2 prostaglandin E2 receptor. *Journal of Clinical Investigation* c. 103 sayı (11): ss. 1539-1545., doi:10.1172/JCI6579.
- Ubaldi F, A Vaiarelli, R D'Anna et al (2014) Management of poor responders in IVF: Is there anything new?. *BioMed Research International*, Hindawi Publishing Corporation, doi:10.1155/2014/352098.
- Van Kempen TA, TA Milner, EM Waters (2011) Accelerated ovarian failure: A novel, chemically induced animal model of menopause. *Brain Research*, Elsevier B.V., doi:10.1016/j.brainres.2010.12.064.
- Van Wely M, I Kwan, AL Burt et al (2012) Recombinant versus urinary gonadotrophin for ovarian stimulation in assisted reproductive technology cycles. A cochrane review. *Human Reproduction Update* c. 18 sayı (2): s. 111., doi:10.1093/humupd/dmr048.
- Velez LM, GA Abruzzese, MF Heber et al (2019) Treatment with the synthetic PPAR γ ligand pioglitazone ameliorates early ovarian alterations induced by dehydroepiandrosterone in prepubertal rats. *Pharmacological Reports* c. 71 sayı (1): ss. 96-104., doi:10.1016/j.pharep.2018.09.009.
- Velez LM, MF Heber, SR Ferreira et al (2015) Effect of hyperandrogenism on ovarian function. *Reproduction* c. 149 sayı (6): ss. 577-585., doi:10.1530/REP-15-0041.
- Vollenhoven B, T Osianlis, J Catt (2008) Is there an ideal stimulation regimen for IVF for poor responders and does it change with age?. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* c. 25 sayı (11-12): ss. 523-529., doi:10.1007/s10815-008-9274-6.
- Walters KA, U Simanainen, DJ Handelsman (2010) Molecular insights into androgen actions in male and female reproductive function from androgen receptor knockout models. *Human Reproduction Update*, doi:10.1093/humupd/dmq003.
- Wang L, YD Wang, WJ Wang et al (2007) Dehydroepiandrosterone improves murine osteoblast growth and bone tissue morphometry via mitogen-activated protein kinase signaling pathway independent of either androgen receptor or estrogen receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* c. 38 sayı (3-4): ss. 467-479., doi:10.1677/jme.1.02173.
- Wang XL, Y Wu, L Bin Tan et al (2012) Follicle-stimulating hormone regulates pro-apoptotic protein Bcl-2-interacting mediator of cell death-extra long (Bim EL)-induced porcine granulosa cell apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* c. 287 sayı (13): ss. 10166-10177., doi:10.1074/jbc.M111.293274.
- Wang Y, Y Sun, H Qiu (2004) Expression of resistin mRNA in adipose tissue of rat model with polycystic ovarian syndrome and its implication. *Journal of Huazhong University of Science and Technology - Medical Science* c. 24 sayı (6): ss. 621-624., doi:10.1007/bf02911374.
- Ward RC, A Costoff, VB Mahesh (1978) The Induction of Polycystic Ovaries in Mature Cycling Rats by the Administration of Dehydroepiandrosterone (DHA)1. *Biology of Reproduction* c. 18 sayı (4): ss. 614-623., doi:10.1095/biolreprod18.4.614.

- Weiss EP, DT Villareal, L Fontana et al (2011) Dehydroepiandrosterone (DHEA) replacement decreases insulin resistance and lowers inflammatory cytokines in aging humans. *Aging c. 3 sayı (5): ss. 533-542.*, doi:10.18632/aging.100327.
- Wiser A, O Gonen, Y Ghetler et al (2010) Addition of dehydroepiandrosterone (DHEA) for poor-responder patients before and during IVF treatment improves the pregnancy rate: A randomized prospective study. *Human Reproduction c. 25 sayı (10): ss. 2496-2500.*, doi:10.1093/humrep/deq220.
- Wong WYL, JAS Richards (1991) Evidence for two antigenically distinct molecular weight variants of prostaglandin synthase in the rat ovary. *Molecular Endocrinology c. 5 sayı (9): ss. 1269-1279.*, doi:10.1210/mend-5-9-1269.
- Wright LE, PJ Christian, Z Rivera et al (2008) Comparison of skeletal effects of ovariectomy versus chemically induced ovarian failure in mice. *Journal of Bone and Mineral Research c. 23 sayı (8): ss. 1296-1303.*, doi:10.1359/jbmr.080309.
- Yakin K, B Urman (2011) DHEA as a miracle drug in the treatment of poor responders; Hype or hope?. *Human Reproduction*, doi:10.1093/humrep/der150.
- Yan Z, GY Lee, E Anderson (1997) Influence of Dehydroepiandrosterone on the Expression of Insulin-Like Growth Factor-1 during Cystogenesis in Polycystic Rat Ovaries and in Cultured Rat Granulosa Cells1. *Biology of Reproduction c. 57 sayı (6): ss. 1509-1516.*, doi:10.1095/biolreprod57.6.1509.
- Yapanoglu T, Y Aksoy, N Gursan et al (2008) Antiapoptotic effects of dehydroepiandrosterone on testicular torsion/detorsion in rats. *Andrologia c. 40 sayı (1): ss. 38-43.*, doi:10.1111/j.1439-0272.2008.00806.x.
- Yazawa T, S Kawabe, M Kanno et al (2013) Androgen/androgen receptor pathway regulates expression of the genes for cyclooxygenase-2 and amphiregulin in periovulatory granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology c. 369 sayı (1-2): ss. 42-51.*, doi:10.1016/j.mce.2013.02.004.
- Yilmaz N, D Uygur, H Inal et al (2013) Dehydroepiandrosterone supplementation improves predictive markers for diminished ovarian reserve: Serum AMH, inhibin B and antral follicle count. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology c. 169 sayı (2): ss. 257-260.*, doi:10.1016/j.ejogrb.2013.04.003.
- Yoshida H, N Takakura, H Kataoka et al (1997) Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Developmental Biology c. 184 sayı (1): ss. 122-137.*, doi:10.1006/dbio.1997.8503.
- Young RC, E De Ferrero, C Carr et al (1967) Pneumoconio-tuberculosis in soft coal miners: comparison of course, prognosis and physiologic impairment in non-miners with tuberculosis. *Journal of the National Medical Association.*
- Zhang HH, PY Xu, J Wu et al (2014) Dehydroepiandrosterone improves follicular fluid bone morphogenetic protein-15 and accumulated embryo score of infertility patients with diminished ovarian reserve undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial. *Journal of ovarian research c. 7 s. 93.*, doi:10.1186/s13048-014-0093-3.
- Zhang M, W Niu, Y Wang et al (2016) Dehydroepiandrosterone treatment in women with poor ovarian response undergoing IVF or ICSI: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics, Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, doi:10.1007/s10815-016-0713.

7. SİMGELER VE KISALTMALAR

AFC: Antral folikül sayısı
AMH: Antimüllerian hormon
AR: Androjen reseptör
CoQ10: Koenzim Q10
COX-2: Siklooksijenaz-2
DEHYUAM: Denev hayvanları yetiştirme uygulama ve araştırma merkezi
DHEA: Dehidroepiandrosteron
DMSO: Dimetil sülfoksit
DOR: Düşük over rezervi
eCG: At koryonik gonadotropini
ELISA: Enzyme linked immunosorbent assay
ER β : Östrojen reseptör beta
FSH: Folikül stimulan hormon
GADPH: Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz
GH: Granüloza hücre
GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon
H&E: Hematoksilen-eozin
IVF: İn vitro fertilizasyon
KOH: Kontrollü ovaryan hiperstimülasyon
LH: Luteinizan hormon
MT1-MMP: Membran tipi matriks metalloproteinaz
NSAİ: Non-steroid anti-inflamatuar
pAKT: Protein kinaz AKT
PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu
PGE2: Prostaglandin E2
PGH: Primordiyal germ hücreleri
PGH2: Prostaglandin H2
PI3K: Fosfatidilinositol 3-kinaz
PMSG: Gebe kısrak serum gonadotropini
RCT: Randomize kontrollü çalışma
SF: Serum fizyolojik
TBF: Testis belirleyici faktör
VCD: 4-Vinylcyclohexene diepoxide
WHO: Dünya sağlık örgütü

8. TEŞEKKÜR

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda doktora eğitimi aldığım süre boyunca bilgisi, tecrübesi ve desteğiyle her zaman yanımda olan, bana yol gösteren değerli danışmanım Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Berrin AVCI'ya teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Desteğini hep hissettiğim, bilgi, görgü ve tecrübesine başvurduğum değerli hocam Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Semiha ERSOY'a; eğitimim sürecinde büyük emekleri olan bilgilerini cömertçe paylaşan Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Zeynep KAHVECİ, Prof. Dr. Zehra MİNBAŞ, Prof. Dr. Özhan EYİĞÖR'e; emekli Öğretim Üyesi Prof. Dr. İlkin ÇAVUŞOĞLU'na ve SANKO Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Şahin A. SIRMALI'ya teşekkür ederim.

İhtiyacım olduğunda yardımlarını esirgemeyerek her zaman destek olan Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndaki tüm asistan arkadaşlarıma, çalışanlarına ve laboratuvar çalışmalarındaki desteklerinden dolayı Biyo. Ayşe AKTAŞ'a ve özellikle tezimde büyük emekleri olan, ihtiyacım olduğunda her zaman destek olan Arş. Gör. Gökten KUŞPINAR'a teşekkür ederim.

Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkez Sorumlusu Prof. Dr. Gürkan UNCU ve Dr. Öğr. Üyesi Işıl KASAPOĞLU başta olmak üzere tüm çalışanlarına eğitimim boyunca verdikleri emeklerden ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvar imkanlarını esirgemeyen ve tecrübeleriyle yol gösteren Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Melehat DİRİCAN ve asistanı Arş. Gör. Dr. Cengiz BOZYİĞİT'e; Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet CANSEV'e teşekkür ederim. Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı asistanlarından Arş. Gör. Adem ALEMDAR'a ve Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı asistanlarından Arş. Gör. Işıl Ezgi KUTLU'ya desteklerinden ve emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Son olarak, beni bugünlere getiren aileme; hayatımı anlamlı kılan sabrı ve sevgisiyle her zaman yanımda olan, beni destekleyen, motive eden eşim Öğr. Gör. Dr. Ayşen ÇAKIR'a ve sevgili oğlum M. Kerem ÇAKIR'a; bu süreçte bana destek veren herkese teşekkür ederim.

9. ÖZGEÇMİŞ

02 Ocak 1985 tarihinde Pforzheim/Almanya’da doğdu. Orta öğrenimini Balıkesir Sırrı Yırcalı Anadolu Lisesi’nde, lise öğrenimini T.C. Ziraat Bankası Balıkesir Fen Lisesi’nde tamamladı. 2003 yılında İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi’ni kazandı. 2009 yılında mezun olduktan sonra 2015 yılına kadar Sağlık Bakanlığı Bursa İl Sağlık Müdürlüğü’ne bağlı 2 No’lu Acil Sağlık Hizmetleri İstasyonunda hekim olarak mecburi hizmetini tamamladı. 2013 yılında doktora eğitimine başladığı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı’na 2015 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı kapsamında Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2017 yılından itibaren Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Üremeye Yardımcı Tedavi Merkez’ine görevlendirilmiş olup halen bu görevine devam etmektedir. Evli, bir erkek çocuk babasıdır.