

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**ERKEN OVARIAN YETMEZLİK (EOY) MODELİ
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA BİLATERAL İNTRAOVARIAN
PLATELETEN ZENGİN PLAZMA (PRP) ENJEKSİYONU İLE
ENJEKSİYON SIRASINDA VERİLAN OVARIAN MEKANİK
HASARIN FONKSİYONEL OVER REZERVİ ÜZERİNDEKİ
ROLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

ONUR ADA

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

İZMİR

ARALIK 2023

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM
ANABİLİM DALI

**ERKEN OVARIAN YETMEZLİK (EOY) MODELİ
OLUŞTURULMUŞ RATLARDA BİLATERAL İNTRAOVARIAN
PLATELET ZENGİN PLAZMA (PRP) ENJEKSİYONU İLE
ENJEKSİYON SIRASINDA VERİLEN OVARIAN MEKANİK
HASARIN FONKSİYONEL OVER REZERVİ ÜZERİNDEKİ
ROLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

ONUR ADA

KADIN HASTALIKLARI VE DOĞUM ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ: DOÇ. DR. RECEP EMRE OKYAY

**Bu araştırma DEU Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü tarafından TTU-
2023-3115 proje numarası ile desteklenmiştir.**

İZMİR

ARALIK 2023

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	i
TABLO LİSTESİ	ii
ŞEKİL LİSTESİ.....	iii
KISALTMALAR	iv
ÖZET.....	1
SUMMARY	6
1. GİRİŞ	11
2. GENEL BİLGİLER.....	13
2.1. Tanım.....	13
2.2. Erken Ovarian Yetmezlik	14
2.2.1. Erken Ovarian Yetmezlikte Klinik Değerlendirme ve Tanı	15
2.2.2. Erken Ovarian Yetmezlikte Etiyoloji	18
2.2.3. Erken Ovarian Yetmezlik Tedavisi.....	23
2.2.4. Erken Ovarian Yetmezlikte Fertilite Seçenekleri	29
2.3. In Vitro Aktivasyon.....	32
2.3.1. Overi Parçalara Ayırmak, Hippo Sinyal Yolağı ve Akt Sinyal Yolağı	32
2.3.2. Hayvan Modelleri	34
2.3.3. İnsanlarda <i>In Vitro</i> Aktivasyonun Uygulanması	35
2.3.4. İlaçsız (<i>drug-free</i>) In Vitro Aktivasyon	36
2.4. Plateletten Zengin Plazma	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	42
3.1. Erken Ovarian Yetmezlik Modelinin Oluşturulması.....	43
3.2. Plateletten Zengin Plazma Elde Edilmesi	44
3.3. Işık Mikroskopik İncelemeler.....	44
3.4. Histokimyasal Boyama.....	44
3.4.1. Hematoksilen & Eozin (H&E).....	45
3.4.2. Masson's Trikrom.....	46
3.5. İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü	47
3.5.1. İmmunohistokimyasal Skorlama	47
3.6. Biyokimyasal Analizler	48
3.7. İstatistiksel Analizler	48

4. BULGULAR	49
4.1. Biyokimyasal Bulgular	50
4.2. Histolojik İnceleme Bulguları	52
4.3. Histokimyasal Bulgular	55
4.3.1. Over Dokusuna Ait Hematoksilen & Eozin Boyama Değerlendirilmesi .	55
4.3.2. Over Dokusuna Ait Masson's Trikrom Boyası Değerlendirmesi.....	59
4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular	66
4.4.1. Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Boyaması Bulguları	66
4.4.2. Ki-67 İmmünohistokimyasal Boyaması Bulguları	69
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	73
6. KAYNAKÇA	79

ÖNSÖZ

Kadın Hastalıkları ve Doğum alanındaki uzmanlık eğitimim süresince, değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, bu uzmanlık alanını sevmemde ve yetişmemde büyük katkıları olan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı öğretim üyeleri, sayın hocalarım: Prof. Dr. Bülent Gülekli, Prof. Dr. Murat Celiloğlu, Prof. Dr. Cemal Posacı, Prof. Dr. Uğur Saygılı, Prof. Dr. Mehmet Güney, Prof. Dr. Sabahattin Altunyurt, Prof. Dr. Ömer Erbil Doğan, Doç. Dr. Hasan Bahadır Saatlı, Doç. Dr. Recep Emre Okyay, Doç. Dr. Sefa Kurt, Doç. Dr. Erkan Çağlıyan, Öğr. Gör. Uzm. Dr. Aslı Akdöner, Dr. Öğr. Üyesi Tunç Timur'a; proje yazım aşamasında bana gönüllü destek olan Arş. Gör. Uzm. Dr. Ezgi Bilicen'e ve birlikte çalıştığım, uzmanlık eğitim sürecinin zorluklarını paylaştığım başta Dr. Egehan Bilen, Dr. Derya Öztürk, Dr. Nimet Günce Babacan olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma, hemşirelerimize ve personellerimize derinden teşekkür ederim.

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı başta sayın hocam Prof. Dr. Bülent Gülekli ve Doç. Dr. Recep Emre Okyay olmak üzere, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Ülker Cankurt'a, Uzm. Dr. Sıla Soy'a, Uzm. Selma Aydemir'e, Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hülya Ellidokuz'a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Özlem Gürsoy'a ve Dr. Hazar Gözgöz'e teşekkür ederim.

Hiçbir zaman bana olan desteğini esirgemeyen ve beni bugünlere getiren çok değerli anneme ve babama, ayrıca bu süreçte bana çok destek olan nişanlım Dr. Melis Tekoğlu'na sonsuz teşekkürler...

Dr. Onur Ada

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Erken ovarian yetmezliğe yol açan ana patojenik mekanizmalar

Tablo 2. Kılavuzların erken ovarian yetmezlik tanılı hastalarda HRT tedavisi ile ilgili önerileri

Tablo 3. Plateletten zengin plazmanın ana bileşenleri

Tablo 4. Doku takibi protokolü

Tablo 5. Ratların serumlarında bakılan biyokimyasal parametrelerin tüm gruplar arasında karşılaştırılması

Tablo 6. Ratların serumlarında bakılan biyokimyasal parametrelerin ortalamalarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması

Tablo 7. Ratların over dokularının histolojik inceleme parametrelerinin tüm gruplar arasında karşılaştırılması

Tablo 8. Ratların over dokularının histolojik inceleme parametrelerinin ortalamalarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması

Tablo 9. Masson Trikrom, Ki67 ve kaspaz 3 skorlamaları

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Mekanik hasar ile Hippo sinyal yolağı baskılanması ve folikül uyarımı

Şekil 2. Hippo ve Akt Sinyal Yolağının Hücredeki Etkileri

Şekil 3. SF grubuna ait kesitin Hematoksilen&Eozin boyaması

Şekil 4. EOY grubuna ait kesitin Hematoksilen&Eozin boyaması

Şekil 5. EOY+PRP+MOH grubuna ait kesitin Hematoksilen&Eozin boyaması

Şekil 6. EOY+MOH grubuna ait kesitin Hematoksilen&Eozin boyaması

Şekil 7. SF grubu over kesitine ait Masson Trikrom boyamaları

Şekil 8. EOY grubu over kesitine ait Masson Trikrom boyamaları

Şekil 9. EOY+PRP+MOH grubu over kesitine ait Masson Trikrom boyamaları

Şekil 10. EOY+MOH grubu over kesitine ait Masson Trikrom boyamaları

Şekil 11. Masson Trikrom skorlamalarının gruplar arasında karşılaştırılması

Şekil 12. Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal boyaması

Şekil 13. Kaspaz-3 skorlamalarının gruplar arasında karşılaştırılması

Şekil 14. Ki-67 İmmünohistokimyasal boyaması

Şekil 15. Ki-67 skorlamalarının gruplar arasında karşılaştırılması

KISALTMALAR

EOY: Erken ovarian yetmezlik

PRP: Plateletten zengin plazma

FSH: Folikül stimüle edici hormon

AMH: Anti müllerian hormon

ELISA: *Enzyme linked ImmunoSorbent Assay*

NaCl: Sodyum klorür

MOH: Mekanik ovarian hasar

Bcl-2: B-hücreli lenfoma geni-2

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

TGF- β : Transforme edici büyüme faktörü-beta

HGF: Hepatosit büyüme faktörü

IGF-1: İnsülin benzeri büyüme faktörü-1

GDF-9: Büyüme farklılaşma faktörü-9

BMP 15: Kemik morfojenik protein 15

EGF: Epidermal büyüme faktörü

HHA: Hipotalamo-hipofizer aks

CTX: Siklofosfamid

SWAN: *The Study of Women's Health Across the Nation*

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ESHRE: Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyoloji Derneği

ENDO: Endokrinoloji Topluluğu

ACOG: Amerikan Jinekoloji ve Obstetri Derneği

NAMS: Kuzey Amerika Menopoz Topluluğu

EMAS: Avrupa Menopoz ve Andropoz Topluluğu

NICE: İngiltere Ulusal Sağlık ve Klinik Mükemmellik Enstitüsü

IMS: Uluslararası Menopoz Topluluğu

IVA: *In vitro* aktivasyon

HRT: Hormon yerine koyma tedavisi

APS: Otoimmün poliglandüler sendrom

GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon

KOK: Kombine oral kontraseptifler

L-RİA: Levonorgestrelli rahim içi araç

DHEA: Dihidroepiandrostenedion

DHEAS: Dihidroepiandrostenedion sülfat

YÜT: Yardımcı üreme teknikleri

IVF: *In vitro* fertilizasyon

IVM: *In vitro* maturasyon

ASRM: Amerikan Üreme Tıbbı Derneği

MSCs: Mezenkimal kök hücreler

YAP: Yes-bağımlı protein

TAZ: Transkripsiyonel koaktivatör PDZ bağlayan motif

CTGF: Bağ doku büyüme faktörü

NOV: Nefroblastoma *overexpressed*

CCN: CYR61, CTGF ve NOV birlikte isimlendirilmesi

PTEN: Protein tirozin fosfataz ve tensin homologu

PI3: Fosfatidilinozitol-3

PIP2: Fosfatidilinozitol-4,5-bifosfat

PIP3: Fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfat

PDK1: Fosfatidilinozitol bağımlı kinaz-1

BIRC: Baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing

FOXO3: *Forkhead box 3*

BpV: Bisperoksovanadyum

ICSI: İntrastoplazmik sperm enjeksiyonu

IL-1 β : İnterlökın-1 beta

IL-8: İnterlökın-8

PF4: Platelet faktör 4

MIP-1 α : Makrofaj inflamatuvar protein-1 alfa

CCL2: C-C motif kemokin ligandı 2

CCL5: C-C motif kemokin ligandı 5

SDF-1 α : Stromal hücre kaynaklı faktör-1 alfa

bFGF: Basit fibroblast büyüme faktörü

FGF: Fibroblast büyüme faktörü 2

GCSF: Granülosit makrofaj-koloni-uyaran faktör

vWF: Von willebrand faktör

IgG: İmmunoglobulin G

GAM: Göbek altı median

H&E: Hematoksilen&Eozin

DAB: Diaminobenzidin

ADSCs: Adipoz-kaynaklı kök hücreler

CoQ: Koenzim Q

OPU: Ovum *pick-up*

PCOS: Polikistik over sendromu

ÖZET

ERKEN OVARIAN YETMEZLİK (EOY) MODELİ OLUŞTURULMUŞ RATLARDA BİLATERAL İNTRAOVARIAN PLATELETEN ZENGİN PLAZMA (PRP) ENJEKSİYONU İLE ENJEKSİYON SIRASINDA VERİLAN OVARIAN MEKANİK HASARIN FONKSİYONEL OVER REZERVİ ÜZERİNDEKİ ROLLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

AMAÇ: Erken ovarian yetmezlik (EOY); 40 yaşın altında izlenen amenore, hipergonadotropizm - hipoöstrojenizm ile beraber giden ovarian fonksiyonların ve rezidüel foliküllerin kaybı ile karakterize bir jinekolojik patolojidir. Pek çok sağlık problemlerine neden olan erken ovarian yetmezlikte ovarian rezervi artırmada çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Doku yenilenmesi, yara iyileşmesi ve deri rejenerasyonu gibi etkilerinin olduğu bilinen plateletten zengin plazmanın (PRP) intraovarian enjeksiyonunun da ovarian rezervi artırdığı iddia edilen yöntemlerden biridir. Öte yandan over rezervini artırdığı iddia edilen yöntemlerden bir diğeri de over dokusunda iyatrojenik olarak gerçekleştirilen mekanik hasardır. Bu yöntemde sonucun primordial foliküllerin mekanik sinyaller ve bu sinyallerin yol açtığı biyokimyasal faktörler aracılığı ile olduğu iddia edilmektedir. Folikül gelişimin iki ana düzenleyici hormonları olan folikül stimüle edici hormon (FSH) ve anti-müllerian hormon (AMH) klinikte ovarian folikül hakkında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu iki hormon seviyeleri düzensiz olduğunda istenmeyen üreme bozukları ile sonuçlanmaktadır. Bu çalışmada ratlarda oluşturulan EOY modeli ile; bir gruba ovarian rezervi artırdığı iddia edilen intraovarian PRP enjeksiyonunun ve bu enjeksiyonun yapılış sırasında overe verilen mekanik hasar ile diğer gruba da iyatrojenik olarak yapılacak olan PRP enjeksiyonu için kullanılan enjektör aracılığıyla yapılan ovarian mekanik hasarın; fonksiyonel ovarian rezervi artırma oranlarının, ratların kanlarında enzime bağlı immünosorban yöntem (*Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay*) (ELISA) ile ölçülen FSH ve AMH seviyelerinin ve histolojik inceleme ile oosit, folikül sayılarının ve over dokusundaki fibrozis derecelendirilmesinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

YÖNTEM: Çalışmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında Temmuz 2023- Ekim 2023 tarihleri arasında gerçekleştirilmiştir. Dokuz Eylül Üniversitesi Multidisiplin Laboratuvarı Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu onayı alınmıştır. Çalışmamıza, Whistar Albino cinsi 180-220 g (8-10 haftalık) dişi ratlar dahil edilmiştir. Denekler rastgele dört gruba ayrılmıştır. A grubu kontrol grubu [1 mL/kg intraperitoneal tek doz %0,9 sodyum klorür (NaCl) içeren serum fizyolojik], B grubu erken ovarian yetmezlik (EOY) grubu, EOY modeli yaratılanlar (150 mg/kg intraperitoneal tek doz siklofosfamid); C grubu EOY+PRP+MOH grubu, EOY modeli yaratılıp intraovarian PRP enjeksiyonu ve enjeksiyon sırasındaki mekanik ovarian hasar (MOH) (550.000 platelet/ 200 µl serum fizyolojik), D grubu EOY+MOH grubu, EOY modeli yaratılıp MOH (15.gün insülin enjektörü ile) oluşturulmuştur. Erken ovarian yetmezlik modeli oluşturulmuş olan ratlarda maksimum etki açısından intraperitoneal siklofosfamid enjeksiyonu sonrası 15 gün beklenmiştir. C grubundaki ratlara PRP enjeksiyonu ve bu esnada gerçekleşen MOH yapıldıktan, D grubundaki ratlara sadece MOH gerçekleştirildikten sekiz hafta sonra; tüm gruplardaki ratlardan FSH ve AMH düzeyleri bakılıp karşılaştırılmıştır. Plateletten zengin plazma oluşturabilmek için 3 adet rattan intrakardiyak olarak enjektör yardımı ile kan alınmıştır. Plateletten zengin plazma elde edilmesinin ardından bilateral intraovarian enjeksiyon yapılacak olan ratlara insülin enjektörü yardımı ile 550.000 platelet/ 200 µl serum fizyolojik dozunda dört kez yapılan penetrasyon ile PRP enjekte edilmiştir. İnsülin enjektörü ile yapılacak olan penetrasyon sayısı ile aynı sayıda penetrasyon, D grubu ratlara uygulanmıştır. Ratların anestezisi eter ile sağlanmıştır. Analjezi için sadece C ve D grubundaki ratlara intraperitoneal parol kullanılmıştır. Deney bittikten sonra serum hormon değeri çalışılması amacı ile intrakardiyak olarak enjektör yardımı ile kan alınmıştır ve hayvanların ölümü gerçekleştirilmiş ve histolojik inceleme yapılmıştır. Doku kesitleri histokimyasal ve immunohistokimyasal boyama yapılarak Olympus BX 51 ışık mikroskobu ile değerlendirilmiştir. Over dokusunda oluşan fibrozisin derecelendirilmesi, Masson's Trichrome boyası ile yapılmıştır. İmmunohistokimyasal incelemeler için Avidinbiotin-peroksidaz yöntemi (ABC metodu) ile uygulanmıştır.

BULGULAR: Toplam 20 adet Whistar albino cinsi rata ait sonuçlar incelendi. Serum FSH değeri sadece SF grubu ile EOY grubu arasında anlamlı olarak farklı görülmüştür; SF grubu ile EOY+PRP+MOH, EOY+MOH grubu arasında anlamlı fark görülmemiştir. Yine EOY+PRP+MOH ile EOY+MOH grubu arasında da anlamlı fark saptanmamıştır. Son olarak serum FSH/AMH düzeyi oranları hiçbir grup arasında anlamlı farklılık göstermemiştir. Hematoksilen&Eozin ile boyama yapılan preparatların incelenmesinde primordial folikül sayıları ve sekonder folikül sayıları gruplar arasında anlamlı fark göstermemektedir. Primer folikül sayısı, EOY grubu ve EOY+MOH grubu arasında anlamlı olarak farklı hesaplanmışken, diğer gruplar arasında anlamlı fark göstermemektedir. Graaf folikül sayısı, SF grubu ve EOY+PRP+MOH grubu arasında anlamlı olarak farklı hesaplanmışken, diğer gruplar arasında anlamlı fark göstermemektedir. Atretik folikül sayıları; SF grubu ve EOY grubu, SF grubu ve EOY+PRP+MOH grubu, SF grubu ve EOY+MOH grubu, EOY grubu ve EOY+PRP+MOH grubu, EOY grubu ve EOY+MOH grubu arasında anlamlı olarak farklı hesaplanmışken EOY+PRP+MOH grubu ve EOY+MOH grubu arasında anlamlı fark hesaplanmamıştır. EOY grubuna ait over kesitlerinde SF grubuna kıyasla normal histolojik görüntünün kaybı gözlemlendi. EOY+PRP+MOH grubuna ait kesitler incelendiğinde; EOY grubuna kıyasla primordial ve primer folikül sayısında artış olduğu gözlemlendi. EOY grubu ile kıyaslandığında normal görünen farklı sayı ve boyuttaki folikül sayılarında artış olsa da SF grubuna kıyasla normal histolojik görüntünün tam olarak korunmadığı; korpus luteum ve atretik foliküller görünümde SF grubuna kıyasla artış olduğu gözlemlendi. Atretik folikül sayısında EOY grubuna kıyasla azalma gözlemlendi. EOY+MOH grubunun over kesitlerinde, EOY+PRP+MOH grubuna benzer şekilde sağlıklı ve farklı aşamalardaki foliküllerin artışı gözlemlendi. Atretik folikül sayısında EOY grubuna oranla azalma olduğu gözlemlendi. Gruplara göre Masson Trikrom boyamanın H skor dağılımına bakıldığında; EOY grubundaki fibrozis varlığının EOY+PRP+MOH ve SF gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,04$; $p=0,00$). SF grubuna kıyasla EOY+MOH grubundaki kollajen artışı belirgin ($p=0,06$) ve EOY grubuna kıyasla EOY+MOH grubundaki fibrozis azalmış olsa da bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=1$). SF grubunda Kaspaz-3 immün reaktivitesi incelendi. Granüloza hücrelerinde ve daha belirgin olarak teka internada, Kaspaz 3 pozitifliği bazal düzeyde gözlemlendi. Gelişimin

farklı aşamalarında olan foliküllerde yer alan primer oositlerde de yer yer Kaspaz-3 için zayıf bir immün pozitiflik gözlemlendi. Korpus luteum hücrelerinde ise granüloza hücrelerine göre daha kuvvetli bir boyanma görüldü. EOY grubu over kesitlerinde Kaspaz-3 immün reaktivitesi incelendiğinde pozitif hücre sayısının tüm alanlarda arttığı; farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerin granüloza hücrelerinde ve teka internada, oositlerde ve korpus luteumda immün pozitifliğin belirgin olduğu görüldü. Ancak istatistiksel olarak bu artış anlamlı değildi ($p=0,15$). EOY+PRP+MOH grubuna ait over kesitlerinde Kaspaz-3 immün reaktivitesi incelendiğinde, granüloza ve korpus luteum hücrelerinde ve oositte EOY grubuna göre daha zayıf bir boyanma gözlemlendi ve immün pozitiflikteki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,00$). SF grubuyla kıyaslandığında ise immün pozitif hücre sayısı foliküllerde benzer şekildeyken, diğer alanlarda daha az belirgindi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=1$). EOY+MOH grubunda ise EOY grubu ile kıyaslandığında immün pozitif hücre sayısının azaldığı, SF ve EOY+PRP+MOH grupları ile kıyaslandığında ise immün pozitifliğin arttığı görüldü. Ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,44$; $p=1$; $p=0,57$). SF grubunda Ki-67 immün reaktivitesi incelendi. Granüloza hücrelerinde daha belirgin olmakla birlikte korteksteki diğer hücrelerde de immün pozitiflik gözlemlendi. Korpus luteum hücrelerinde ise granüloza hücrelerine göre daha zayıf bir boyanma görüldü. EOY grubunda immün pozitif hücre sayısının bazı örneklerde azaldığı, bazı örneklerde ise SF grubu ile benzer olduğu görüldü. Yine farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerin granüloza hücrelerinde immün pozitiflik diğer hücrelere kıyasla daha belirgindi. Ancak istatistiksel olarak bu azalma anlamlı değildi ($p=1$). EOY+PRP+MOH grubundaki tüm kortikal alandaki hücrelerde SF ve EOY grubuna göre daha kuvvetli bir boyanma gözlemlendi ve immün pozitiflikteki bu artış her iki gruba göre de istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,02$; $p=0,02$). EOY+MOH grubunda EOY grubu ile kıyaslandığında immünpozitif hücre sayısında artış eğilimi olsa da immünhistokimyasal bulguları benzerdi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=1$). EOY+MOH grubu ve EOY+PRP+MOH grubu ile kıyaslandığında immünpozitif hücre sayısı belirgin olarak azalmış olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,17$).

TARTIŞMA: İntraovarian PRP veriliş sırasındaki mekanik ovarian hasarın izole etkisi için ratlar kıyaslandığında EOY+PRP+MOH grubuna göre EOY+MOH grubunda; primordial sayısında azalma, primer folikül sayısında artma, sekonder folikül sayısında azalma, graaf folikül sayısında artma, atretik folikül sayısında azalma izlenmiş olsa da bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (tüm sonuçlarda $p=1$). Serum FSH ve AMH düzeyi artmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,99$, $p=1$). Masson trikrom ile yapılan fibrozis skorlamasında H skoru artmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,58$). İmmunohistokimyasal olarak Ki-67 ile yapılan boyamada proliferasyonun daha az olduğu görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,17$). İmmunohistokimyasal olarak Kaspaz-3 ile yapılan boyamada apoptozun daha fazla olduğu görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,57$).

ANAHTAR KELİMELEER: plateletten zengin plazma, ovarian mekanik hasar, erken ovarian yetmezlik

SUMMARY

COMPARISON OF THE ROLES OF BILATERAL INTRAOVARIAN PLATELET RICH PLASMA (PRP) INJECTION AND OVARIAN MECHANICAL DAMAGE DURING INJECTION ON THE FUNCTIONAL OVARIAN RESERVE IN RATS FOR WHICH A PREMATURE OVARIAN INSUFFICIENCY (POI) MODEL WAS CREATED

OBJECTIVE: Premature ovarian insufficiency (POI); amenorrhea observed under the age of 40 is a gynecological pathology characterized by loss of ovarian functions and residual follicles accompanied by hypergonadotropism – hypoestrogenism. Various methods are used to increase ovarian reserve in premature ovarian failure, which causes many health problems. Intraovarian injection of platelet-rich plasma (PRP), which is known to have effects such as tissue regeneration, wound healing and skin regeneration, is one of the methods claimed to increase ovarian reserve. On the other hand, another method claimed to increase ovarian reserve is iatrogenic mechanical damage to the ovarian tissue. In this method, it is claimed that the result is mediated by the mechanical signals of the primordial follicles and the biochemical factors caused by these signals. Follicle-stimulating hormone (FSH) and anti-mullerian hormone (AMH), the two main regulatory hormones of follicle development, are used clinically as biomarkers about the ovarian follicle. When the levels of these two hormones are irregular, it results in unwanted reproductive disorders. With the POI model created in rats in this study; In one group, intraovarian PRP injection, which is claimed to increase ovarian reserve, and mechanical damage to the ovary during this injection, and in the other group, ovarian mechanical damage caused by the injector used for iatrogenic PRP injection; It was aimed to compare the rates of increasing functional ovarian reserve, FSH and AMH levels measured by the enzyme-linked immunosorbent method (ELISA) in the blood of rats, and the number of oocytes and follicles and the degree of fibrosis in the ovarian tissue by histological examination.

METHOD: Our study was carried out at Dokuz Eylül University Experimental Animal Laboratory between July 2023 and October 2023. Approval was received from the Dokuz Eylül University Multidisciplinary Laboratory Animal Experiments Local Ethics Committee. Whistar Albino female rats weighing 180-220 g (8-10 weeks old) were included in our study. Subjects were randomly divided into four groups. Group A control group [1 mL/kg intraperitoneal single dose of physiological saline containing 0.9% sodium chloride (NaCl)], group B premature ovarian failure (POF) group, POF model creation (150 mg/kg intraperitoneal single dose cyclophosphamide); Group C POI+PRP+MOD group, POI model created and intraovarian PRP injection and mechanical ovarian damage (MOD) during injection (550,000 platelets / 200 µl physiological saline), D group POI+MOD group, POI model created and MOD (15th day with insulin injector).) was created. In rats in which a POI model was created, 15 days were waited after intraperitoneal cyclophosphamide injection for maximum effect. Eight weeks after PRP injection was applied to the rats in group C and MOD was performed on the rats in group D; FSH and AMH levels of rats in all groups were measured and compared. In order to create platelet-rich plasma, blood was taken intracardiac from 3 rats with the help of a syringe. After obtaination, PRP was injected into the rats that would receive bilateral intraovarian injection, with the help of an insulin injector, at a dose of 550,000 platelets/200 µl physiological saline, by four penetrations. The same number of penetrations as the number of penetrations with the insulin syringe were applied to group D rats. Anesthesia of the rats was provided with ether. For analgesia, intraperitoneal parol was used only in rats in groups C and D. After the experiment was completed, blood was taken intracardiacly with the help of a syringe to study serum hormone levels, the animals were sacrificed and histological examination was performed. Tissue sections were evaluated with an Olympus BX 51 light microscope by histochemical and immunohistochemical staining. Grading of fibrosis in the ovarian tissue was made with Masson's Trichrome stain. Avidinbiotin-peroxidase method (ABC method) was used for immunohistochemical examinations.

RESULTS: The results of a total of 20 Whistar albino rats were examined. Serum FSH value was found to be significantly different only between the SF group and the EOY group; There was no significant difference between the SF group and the EOY+PRP+MOH, EOY+MOH groups. Again, no significant difference was detected between the EOY+PRP+MOH and EOY+MOH groups. Finally, serum FSH/AMH level ratios did not differ significantly between any groups. When examining the preparations stained with Hematoxylin & Eosin, the number of primordial follicles and secondary follicles do not show a significant difference between the groups. While the number of primary follicles was calculated significantly differently between the EOY group and the EOY+MOH group, it did not show a significant difference between the other groups. While the number of Graafian follicles was calculated to be significantly different between the SF group and the EOY+PRP+MOH group, it did not show a significant difference between the other groups. Atretic follicle numbers; while EOY+PRP+ was calculated significantly different between SF group and EOY group, SF group and EOY+PRP+MOH group, SF group and EOY+MOH group, EOY group and EOY+PRP+MOH group, EOY group and EOY+MOH group, no significant difference was calculated between the MOH group and the EOY+MOH group. A loss of normal histological appearance was observed in the ovarian sections of the EOY group compared to the SF group. When the sections belonging to the EOY+PRP+MOH group are examined; an increase in the number of primordial and primary follicles was observed compared to the EOY group. Although there was an increase in the number of normal-appearing follicles of different numbers and sizes compared to the EOY group, the normal histological appearance was not fully preserved compared to the SF group; an increase in the appearance of corpus luteum and atretic follicles was observed compared to the SF group. A decrease in the number of atretic follicles was observed compared to the EOY group. An increase in healthy follicles at different stages was observed in the ovarian sections of the EOY+MOH group, similar to the EOY+PRP+MOH group. It was observed that there was a decrease in the number of atretic follicles compared to the EOY group. When looking at the H score distribution of Masson Trichrome staining according to groups; the presence of fibrosis in the EOY group was found to be statistically significant compared to the EOY+PRP+MOH and SF groups ($p=0.04$; $p=0.00$). Although the

collagen increase in the EOY+MOH group was significant compared to the SF group ($p=0.06$) and fibrosis decreased in the EOY+MOH group compared to the EOY group, this difference was not statistically significant ($p=1$). Caspase-3 immune reactivity was examined in the SF group. Caspase 3 positivity was observed at basal level in granulosa cells and more specifically in the theca interna. A weak immunopositivity for Caspase-3 was also occasionally observed in primary oocytes located in follicles at different stages of development. A stronger staining was observed in corpus luteum cells than in granulosa cells. When Caspase-3 immune reactivity was examined in the ovarian sections of the EOY group, the number of positive cells increased in all areas; it was observed that immune positivity was evident in the granulosa cells and theca interna, oocytes and corpus luteum of follicles at different developmental stages. However, this increase was not statistically significant ($p = 0.15$). When Caspase-3 immune reactivity was examined in the ovarian sections of the EOY+PRP+MOH group, a weaker staining was observed in the granulosa and corpus luteum cells and oocytes compared to the EOY group, and this decrease in immune positivity was statistically significant ($p=0.00$). Compared to the SF group, the number of immune positive cells was similar in the follicles, but was less evident in other areas, but this decrease was not statistically significant ($p = 1$). In the EOY+MOH group, it was observed that the number of immune positive cells decreased when compared to the EOY group, and immune positivity increased when compared to the SF and EOY+PRP+MOH groups. However, these changes were not statistically significant ($p=0.44$; $p=1$; $p=0.57$). Ki-67 immune reactivity was examined in the SF group. Although more prominent in granulosa cells, immune positivity was also observed in other cells in the cortex. A weaker staining was observed in corpus luteum cells compared to granulosa cells. It was observed that the number of immune positive cells in the EOY group decreased in some samples, and was similar to the SF group in some samples. Again, immune positivity was more evident in the granulosa cells of follicles at different developmental stages compared to other cells. However, this decrease was not statistically significant ($p = 1$). A stronger staining was observed in the cells in the entire cortical area in the EOY+PRP+MOH group compared to the SF and EOY groups, and this increase in immune positivity was statistically significant compared to both groups ($p=0.02$; $p=0.02$). Although there was a tendency for an increase in the

number of immunopositive cells in the EOY+MOH group compared to the EOY group, the immunohistochemical findings were similar and there was no statistically significant difference between the two groups ($p = 1$). Although the number of immunopositive cells decreased significantly compared to the EOY+MOH group and the EOY+PRP+MOH group, this decrease was not statistically significant ($p=0.17$).

DISCUSSION: When rats were compared for the isolated effect of mechanical ovarian damage during intraovarian PRP administration, in the EOY+MOH group compared to the EOY+PRP+MOH group; Although a decrease in the number of primordial follicles, an increase in the number of primary follicles, a decrease in the number of secondary follicles, an increase in the number of graafian follicles, and a decrease in the number of atretic follicles were observed, these differences were not found to be statistically significant ($p = 1$ in all results). Serum FSH and AMH levels increased but were not found to be statistically significant ($p=0.99$, $p=1$). The H score increased in fibrosis scoring with Masson Trichrome, but it was not statistically significant ($p = 0.58$). Immunohistochemically, proliferation was observed to be less in Ki-67 staining, but it was not found to be statistically significant ($p = 0.17$). Immunohistochemically, staining with Caspase-3 showed that apoptosis was higher, but it was not statistically significant ($p = 0.57$).

KEYWORDS: Platelet-rich plasma, mechanic ovarian damage, premature ovarian insufficiency

1. GİRİŞ

Erken ovarian yetmezlik (EOY); 40 yaşın altındaki hastalarda en az 4 ay boyunca süren amenoreyle beraber yükselmiş olan FSH seviyeleri ile birlikte ovarian fonksiyonların ve rezidüel foliküllerin kaybı ile karakterize; %1 oranında 40 yaşın altında, %0,1 oranında da 30 yaşın altındaki kadınlarda görülen jinekolojik bir hastalıktır (1). Pek çok sebebi olmasıyla beraber (genetik, otoimmün, mitokondrial disfonksiyon, inflamatuvar, kemoterapötikler, endokrin, psikolojik, parakrin, metabolik gibi) genellikle sebep idiyopatiktir. Hızlı foliküler atrezi nedeni ile primordial folikül sayılarında ciddi bir azalma gerçekleşir. Ovarian fonksiyonların erken kaybı ile ilişkili osteoporoz, kardiyovasküler hastalıklar ve infertilite gözlenir. Kaybolan ovarian fonksiyonları tedavi etmekte, EOY vakalarında gebelik şansı elde etmek için immünmodülatör tedaviler, apoptotik inhibitörler, antioksidan terapiler gibi teknikler denenmektedir (2,3).

Foliküler atrezi, ovarian granüloza hücrelerinin ve oositlerin apoptozudur. Foliküler atrezinin gereksiz bir süreç olmadığı, aslında dişi üreme sisteminin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesi için gerekli olduğu yaygın olarak kabul edilmektedir (4). Kişinin yaşamı boyunca meydana gelir. Hormonal olarak düzenlenen bu apoptotik süreçte, granüloza hücrelerinin apoptozu foliküler atrezinin ana nedeni olabilir. Huang ve arkadaşları, otofagozomların birikimi, B-hücreli lenfoma geni-2'nin (Bcl-2) azalan ekspresyonu ve artan kaspaz aktivasyonu granüloza hücrelerin apoptotik hücre ölümünün indüklediğini yaptıkları çalışmada ortaya koymuşlardır (4). Apoptoz ve ilgili genler ile proteinler, foliküler gelişimde kritik ve önemli rol oynamaktadır. İleri kısımlarda daha detaylı inceleneceği üzere hücre proliferasyonu ve farklılaşması, apoptozu, hücre kaderinin tayini ve bunun fertilite üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur (4–6).

Plateletten zengin plazma (PRP); periferik kandan elde edilmektedir ve platelet ve vasküler-endotelyal büyüme faktörü (VEGF), transforme edici büyüme faktörü-beta (TGF-B), hepatosit büyüme faktörü (HGF), insülin benzeri büyüme faktörü-1

(IGF-1), büyüme farklılaşma faktörü-9 (GDF-9), kemik morfojenik protein 15 (BMP 15), epidermal büyüme faktörü (EGF) gibi büyüme faktörlerinden zengindir. Doku yenilenmesi, yara iyileşmesi ve deri rejenerasyonu gibi etkilerinin olduğu bilinmektedir (7). Hem insanlar hem de hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalar göstermiştir ki; intraovarian (insanlarda ve ratlarda) ve intraperitoneal (ratlarda) PRP tedavisi, tedavi sonrası serum AMH seviyesini artırmakta, ovarian folikül gelişimini stimüle etmekte ve insanlarda gebelik şansını (hem spontane hem de yardımcı üreme tekniği ile) artırmaktadır (7–11)

Gelişen foliküllerin granüloza hücrelerinden sentezlenen AMH'nın kandaki ölçümü, yaygın olarak over rezervini değerlendirmek için kullanılmaktadır. Potansiyel olarak EOY'nin tanısı ve takibinde önem taşımaktadır (12). Hipofiz bezinden salgılanan FSH hormonu folikül gelişimini uyarmaktadır ve kanda ölçülen seviyesi EOY tanısı koyulmasında tanı kriteridir (13).

Son yıllarda, ilaçsız olarak ovarian primordial folikülleri aktive etmek üzerine umut vadeden çalışmalar yapılmıştır (14–16). Overe iyatrojenik olarak verilen mekanik hasarın, primordial foliküllerin mekanik sinyaller ve bu sinyallerin yol açtığı biyokimyasal faktörler aracılığı ile aktive etmesi yoluyla primordial folikül havuzu yeterli olan hastalarda başarıya ulaşmakta olduğunu iddia eden çalışmalar mevcuttur (14–16). Ovarian kortekse verilen mekanik hasarın hipotalamo-hipofizer aks (HHA) aktivasyonu ile folikül gelişimini uyardığı iddia edilmektedir. Bu yol ile EOY nedeni ile fonksiyonel over rezervi düşük olan hastalarda fonksiyonel over rezervinin tekrar artırılabilceği ileri sürülmektedir (2).

Siklofosfamid (CTX) ile oluşturulan EOY modelinde, PRP enjeksiyonu ve intraovarian mekanik hasar sonrası iyileşmenin PRP kaynaklı mı yoksa mekanik etki kaynaklı mı gerçekleştiği hakkında bilgi sağlayacaktır. Literatürde bu kıyaslamayı yapan iyi kurgulanmış bir çalışma mevcut değildir. Çalışmamızın amacı; erken ovarian yetmezlikte PRP enjeksiyonu sırasında enjektör aracılığıyla yapılan mekanik ovarian hasarın; PRP enjeksiyonu ile bağımlı ve bağımsız olarak ovarian rezervi

artırmasındaki katkısını incelemektir. Başka bir söylemle; ilaçsız *in vitro* aktivasyon yöntemiyle gerçekleştirilen foliküler aktivasyon ile PRP enjeksiyonunun ve ilaçsız *in vitro* aktivasyonun birlikte olan etkisi karşılaştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Tanım

Erken ovarian yetmezlik; 40 yaşın altındaki kadınlarda en az dört ay süren amenore ve postmenopozal seviyelere yükselmiş FSH seviyeleri ile karakterizedir. Görülme sıklığı 40 yaşın altındaki popülasyonda %1'dir. Nedeni en sık idiyopatikdir (%90). Diğer sebepleri arasında otoimmün etiyolojiler, kemoterapi, radyasyon toksisitesi, genetik ve daha az sıklıkta galaktozemidir(17).

Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) kılavuzuna göre; EOY tanısı koyabilmek için en az dört ay boyunca oligomenore ya da amenore ve en az dört hafta ara ile iki kez bakılan FSH seviyesinin 25 IU/l'den yüksek olması gerekmektedir(18). Gelişen foliküllerin granüloza hücrelerinde sentezlenen AMH da FSH ile EOY tanı, takibi ve over rezervi gibi hastalığın kliniğini belirlemede yardımcı olmaktadır(13).

Gebelik beklentisi olan EOY tanılı hastaların birçoğunda tedavi imkânı oldukça kısıtlıdır. Tedavisi mümkün olmayan hastalar genellikle oosit donasyonu ile gebe kalma ya da evlat edinme seçeneklerine başvurmaktadır. Ancak genetik ebeveynlik istemi olan hastalarda bu ihtimal, hastalığın kliniği ile sınırlandırılmakta olup, çoğu zaman mümkün olmamaktadır. Uykudaki foliküllerin aktivasyonunda aktive edici (Akt stimüle edici yol) ve inhibe edici (Hippo sinyal yolağı) yollarının bir denge içerisinde olduğu iddia edilmektedir(17). Over dokusunun parçalanması ile EOY tanılı hastalarda Akt stimüle edici yolun uyarılmasının sağlandığı, folikül büyümesinin gerçekleştiği ve olgun oositlerin korunduğu gösterilmiştir ve bu tekniğe

in vitro aktivasyon (IVA) tekniği adı verilmiştir (19). *In vitro* aktivasyon yönteminin uygulanmaya başlanması ile kendi oositleri ile gebelik isteyen EOY tanılı hastalarda bir tedavi potansiyeli oluşmuştur(17). Ancak Akt stimüle edici yolun uyarılmasının birtakım kimyasal yöntem yardımı ile gerçekleştirilebilmesi nedeni ile bu yol zamanla terkedilmeye başlanmış, Hippo sinyal yolağı inhibisyonu aracılığı ile gerçekleştirilme yoluna gidilmiştir. Bu yola ilaçsız IVA yöntemi adı verilmektedir. Hippo sinyal yolağının inhibisyonu da overe verilen mekanik hasar ile mümkündür(19).

Plateletten zengin plazma, tam kanın santrifüjü ile elde edilir ve sitokin ve büyüme faktörlerinden zengindir. Bu sitokin ve büyüme faktörleri, doku yenilenmesi ve yara iyileşmesini hücre göçü ve diferansiyasyonu yolu ile sağlamaktadır. Aynı zamanda folikül gelişimini de sağladığı gösterilmiştir (20). Bu açıdan PRP'nin intraovarian enjeksiyonunun, EOY tanılı hastaların tedavisindeki rolü son yıllarda araştırılmaya başlanmıştır(10).

Sıçanlar üzerinde EOY modeli gerçekleştirilip, PRP'nin ya da PRP ile bazı sitokin ve büyüme faktörlerinin intraovarian enjeksiyonuyla sıçanların FSH ve AMH düzeylerini inceleyen, deney sonrasında overleri histolojik olarak inceleyen çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda PRP'nin PRP uygulanmayan gruptaki sıçanlara göre hem kortikal hem medüller over hacmini artırdığı, uykudaki folikülleri aktive ettiği, pre-antral ve antral foliküllerdeki foliküler hücre ve oosit çapını artırdığı, serum FSH ve AMH seviyelerini artırdığı gösterilmiştir(3,7,11,21,22).

2.2. Erken Ovarian Yetmezlik

Erken ovarian yetmezlik, 40 yaşından önce görülen amenoreyle birlikte yükselmiş serum FSH seviyeleri ile karakterizedir. Normal karyotipe sahip hastalarda 30 yaşından önce 1:1000 kadında, 20 yaşından önce 1:10000 kadında, direkt olarak primer amenore ile 1:100000 kadında görülmektedir. Prevalansı etnik kökene göre farklılık göstermekle birlikte Afro-Amerikanlarda, Kafkas-Amerikan ve Asyalılara

göre daha sık görülmektedir(23). *The Study of Women's Health Across the Nation* 'da (SWAN), EOY tanısının prevalansı %1.1 olarak gösterilmiş olup etnik kökenlerine göre dağılıma bakıldığında Kafkaslarda %1, Afro-Amerikanlarda %1.4, İspanyollarda %1.4, Çinlilerde %0.5, Japonlarda %0.1 olarak gösterilmiştir(24). Yapılan 2017 yılındaki bir çalışmada dokuz kohort çalışmasının toplam 51,450 adet postmenopozal hasta havuzundaki EOY oranlarına bakılmış ve bu oran %2 olarak bulunmuştur(25). 2019 yılında yapılan bir meta-analiz çalışmasında; 1987 ve 2018 yılları arasında EOY prevalansı ile ilgili yapılmış olan tüm İngilizce dilindeki, güvenilir verilere sahip, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) kriterlerine uygun, tam metin halindeki ve katılımcı sayısı 130'dan 25.499'a kadar değişen katılımcısı olan toplam 31 adet çalışma değerlendirilmiştir(26). Yapılan bu çalışmada EOY prevalansı %3.7 olarak iddia edilmiştir.

2.2.1. Erken Ovarian Yetmezlikte Klinik Değerlendirme ve Tanı

Erken ovarian yetmezliğin semptomları kendini göstermeye başladığı yaşa bağlı olarak değişkenlik gösterir(27,28). Adolesan dönemde ergenliğin gecikmesi ve primer amenore; menarş sonrası dönemde düzensiz adet döngüsü ve infertilite ile sonuçlanan yetersiz östrojen üretimi ve sekonder amenore ile kendini gösterir. Turner sendromu gibi genetik hastalıklara bağlı olarak ya da otoimmün endokrinopatilerle beraber de ortaya çıkabilmektedir.

Avrupa İnsan Üremesi ve Embriyoloji Derneği (ESHRE) kılavuzuna göre; EOY tanısı koyabilmek için en az dört ay boyunca oligomenore ya da amenore ve en az dört hafta ara ile iki kez bakılan FSH seviyesinin 25 IU/l'den yüksek olması gerekmektedir(18,29).Kandaki FSH düzeyinin iki kez bakılmasının nedeni ise ovarian fonksiyonların periyottan periyoda değişkenlik gösterebilmesi ve ölçüm hatalarının önüne geçebilmektir. Tanı sonrası hastalığın seyrinin kesintisiz ve kalıcı olması beklenirken, bazı vakalarda özellikle ilk yıl içerisinde hafifleme ve alevlenmelerle seyretmektedir(30).

Tanı konulduğu sırada hastalara detaylı ileri inceleme önerilmektedir. Tiroit fonksiyon testi, vitamin B12 seviyeleri, serum ferritin seviyeleri EOY ile otoimmün hastalıkların da birlikte seyredebilmesi nedeni ile değerlendirilmelidir. Otoantikör bakılması otoimmün ooforitinin hassas belirtecinin olmaması nedeni ile önerilmemektedir. Küçük yaşlarda kendini gösteren EOY’de karyotip inceleme önerilmektedir. Ultrasonografi ile görüntüleme normalden küçük görülen over ve foliküllerin görülmesinin tanıyı desteklemesi nedeni ile önerilmektedir ancak klinik seyir ve infertilite tedavisi açısından net bir bilgi verememektedir. Over biyopsisinin EOY tanı ve takibinde yeri yoktur(29).

Anti-müllerian hormon; gelişmekte olan foliküllerin (<8 mm çapındaki predominant foliküller) granüloza hücrelerinden üretilen, primordial folikül havuzunu, başka bir deyişle fonksiyonel over rezervi gösteren bir biyokimyasal biyobelirteçtir(31–33). Normal menopoza öncesi dönemden menopozal sürecin başlamasına kadar over rezervinin giderek azaldığı, serum AMH seviyesinin kademeli olarak gerilediği, serum FSH seviyesinin de arttığı bilinmektedir(34). Her ne kadar bu biyokimyasal biyobelirteçler fonksiyonel over rezervini ve menopozal dönemi göstermek için kullanılabilirse de menopozun ve erken ovarian yetmezliğin ne zaman başlayacağını önceden tahmin etmek için kullanımları önerilmemektedir(29,35). Yine bu konuda 2023 yılında yapılmış olan, 28,858 hastayı içeren ve 41 adet çalışmayı dahil eden bir sistematik derlemede serum AMH değerinin menopoz ya da EOY başlangıç zamanlarını tahmin etmekte kullanılmasının önerilmediği, ancak hasta yaşı küçüldükçe bir miktar yol gösterici olabileceği ve çok düşük seviyelerdeki serum AMH seviyesinin EOY tanısının düşünülmesinde yardımcı olabileceği belirtilmiştir(36).

Koenzim Q10 (CoQ10), *in vivo* oksidatif stresin olası biyobelirteçlerinden biridir. Serum kolesterolü ve CoQ10 aynı üretim yolundadır ve kolesterol, CoQ10’un ana taşıyıcısıdır(37). Kolesterol seviyesi de serum CoQ10 seviyesinin en önemli belirleyicisidir(38). Erken ovarian yetmezlik tanılı hastalarda, kontrol grubundaki hastalara göre serumda bakılan CoQ10/total kolesterol seviyesinin anlamlı derecede

düşük bulunmuştur(39). Bu sonuç da CoQ10'un sağladığı antioksidan etkinin CoQ10 eksikliğinde azalması ve EOY oluşumunda etkin olduğunu akla getirmektedir.

Detaylı aile öyküsü anamnezi ile %30 vakada diğer aile üyelerine de tanı konabilmekle beraber bu duruma genetik danışmanlık alınmalı ve tarama yapılmalıdır(40). Aile öyküsü olan vakalarda küçük kromozom silinmelerinin nesilden nesile aktarılabilmesi nedeniyle karyotip analizi önerilmektedir. Frajil X taraması EOY hastalarının hepsinde Frajil X sendrom soyunun önlenmesi açısından yapılmalıdır(40,41).

Östrojen eksikliğine bağlı sıcak basmaları, uyku düzensizlikleri ve vajinal kuruluk gibi kendini gösteren belirtilerin yanında; ani duygudurum değişiklikleri ve kas ağrıları gibi sessiz semptomları fark edebilmek de tanıda önem taşımaktadır. Erken ovarian yetmezlik tanılı hastalarda yaşam kalitesini artırmada ve kemik sağlığını korumada hormon yerine koyma tedavisinin (HRT) yeri büyüktür. Östrojen eksikliğine bağlı olarak kemik yoğunluğunda azalma ve osteoporoz riski oluşmaktadır. Bu nedenle kemik mineral yoğunluğu ölçümü EOY tanısı anında yapılmalıdır. Eğer yeterli kemik mineral yoğunluğu ölçümü normal ve sistemik östrojen tedavisi başlanmış ise tekrarlayan ölçümlerin klinik olarak çok anlamı olmamaktadır. Hormon replasman tedavisi başlanmış ve osteoporoz tanısı konmuş ise her beş yılda bir kemik mineral yoğunluğu ölçümü önerilmektedir(42).

Yeni bir teknoloji olan yapay zekâ ChatGPT kullanımı ile EOY tanısı koyma ve medikal danışmanlığı konusunda önemli 25 adet sorunun ChatGPT'ye sorulduğu bir çalışma yapılmıştır(43). Risk faktörü, görüntüleme, semptom, tedavi ve tedavi yan etkilerini içeren bu sorular sonucunda cevaplar iki tecrübeli jinekoloji uzmanı tarafından değerlendirilmiştir. ChatGPT bu soruların 19'una yeterli cevap verebilmiştir (%76); geriye kalan altı sorudan beşine yetersiz (%20), bir soruya ise yanlış cevap vermiştir (%4). Şu aşamada yapay zekâ ile hasta desteği ve hastalık tanısı için yeterlilik olmasa da yapılacak olan çalışmalar ile ilerleyen yıllarda mümkün olabilme ihtimali göz önünde bulundurulmalıdır.

2.2.2. Erken Ovarian Yetmezlikte Etiyoloji

Primer amenore etiyolojisinin %10-28'inde, sekonder amenore etiyolojisinin ise %10'unda EOY rol oynamaktadır(44). Tanı koyma ve genetik bağlantıları aydınlatmada gelişme sağlanmasına rağmen, EOY tanısı alan hastaların çoğunda neden belirlenememektedir(28). Tablo 1.'de EOY'ye yol açan ana patojenik mekanizmalardan bahsedilmiştir(45–49).

Tablo 1. Erken ovarian yetmezliğe yol açan ana patojenik mekanizmalar

EOY sendromları	Kromozom anomalileri ya da gen mutasyonları
Turner sendromu ve varyantları	Karyotip 45, XY/XX mozaizmi, <i>ring</i> X kromozomları, izokromozomlar ve diğerleri
Otoimmün poliendokrinopati sendromu tip 1	AIRE
Woodhouse-Sakati Sendromu	DCAF17
Perrault Sendromu	HSD17B4, HARS2, LARS2 CLPP C10orf2, CLDN14p SGO2, KIAA0391, ERAL1
Blefarofimozis, pitozis, epikantus inversus sendromu	FOXL2
Galaktozemi	GALT
Psödohipoparatiroidizm tip 1a	PHP1a
Ovariölökodistrofi	EIF2B
Ataksi-telenjiektazi	ATM
Demirhan Sendromu	BMPR1B

Erken Yaşlanma Sendromu	WRN, ANTXR1
Progresif eksternal oftalmopleji	POLG
Fanconi anemisi	FANCA, FANCM, FANCL, FANCD1/BRCA2, FANCU/XRCC2
Sendromik olmayan EOY	Gen mutasyonları
Ovarian fonksiyon kaybı	FSHR, GDF9, BMP15, FIGLA
Ovarian gelişim bozukluğu	NR5A1, FOXL2, SOX8, POLR3H
Miyoz bozukluğu	MSH4, MSH5, HFM1, BRCA2, REC8, SMC1B, SYCE1, CPEB1, STAG3, PSMC3IP, DMC1, MCM8, MCM9, NUP107, CSB-PGBD3, SPIDR, TUBB8, MEIOB, ZSWIM7
Primer kök hücre bakım bozukluğu	NOBOX, SOHLH1

a) Genetik Nedenler

Hastalar üzerinde 2023 yılında yapılan EOY, polikistik over sendromu (PCOS) ve hipogonadotropik hipogonadizm ve gen ilişkilerini 55 adet çalışma üzerinde inceleyen bir sistematik derlemede; EOY ile ilişkili olan toplam 209 adet gen bulunmuş olup en sık genler arasında FOXL2 (12 çalışma), FMR1 (10 çalışma), NOBOX (10 çalışma), GDF9 (10 çalışma) ve FIGLA (9 çalışma) gösterilmiştir(50). Her üç patolojiyle de ilişkili olan genler arasında da FSHR, LH β , LEPR ve SF1 gösterilmiştir.

Vakaların %2'sinde kromozom anomalileri görülmekte ve büyük çoğunluğu X kromozomu kaynaklı anomalilerdir(51). Erken ovarian yetmezlikle ilişkili olan X kromozom defektleri arasında X kromozomlarından birinin parsiyel ya da tam delesyonu (Turner Sendromu), trizomi X, X otozom translokasyonu gibi defektler

bulunmaktadır. Turner sendromlu hastaların %80-90'ı primer amenore ve geciken ergenlik ile EOY tanısı almaktadır. Kliniğin şiddeti, X kromozomunun defekt derecesine göre ve kaybedilen gen bölgesi ve miktarında göre değişebilmektedir(52). Over histolojileri tamamen fibrotik bir yapıdan, tamamen korunmuş bir over dokusuna kadar değişebilmektedir. Monozomi X (45X), en ciddi etkilenen kesimi oluşturmaktadır. X kromozomunun parsiyel olarak delesyona uğradığı ya da mozaik 45X/46XX karyotipli tipleri sıklıkla tipik Turner sendromu fenotipinden yoksun olup, sekonder amenore nedeni ile başvuran EOY tanılı hastalardır. Turner sendromu tanılı hastaların büyük çoğunluğunda ovarian yetmezlik prevalansı %80-90 arasında olup en çok primer amenore ve pubertenin başlamaması durumları mevcuttur.

X kromozom defektlerinin iki spesifik bölgede olduğu düşünülmektedir. Bunlardan biri Xq26-qter (POI1), diğeri Xq13.3-Xq21.1'dir (POI2)(53). Kök hücre gelişiminden sorumlu bölgelerin de dahil olduğu çok sayıda mekanizma EOY tanısı için neden olarak düşünülse de bu kritik bölgeleri oluşturan genler tam olarak aydınlatılamamıştır. Genel olarak X kromozomundaki yapısal tekrar düzenlemelerin tek bir geni etkilemesinden çok miyozda normal bölünmeyi engelleyerek miyoz hapsine ya da oositin atrezisine neden olarak etki ettiği iddia edilmektedir.

Yeni nesil dizileme (*next-generation sequencing*) yaklaşımı ile ilgili son gelişmeler miyoz sırasındaki çeşitli genlerdeki patojenik varyantların, EOY ile ilişkili olduğunu düşündürmektedir. Örnek olarak; sinaptonemal kompleks açısından anahtar rolündeki SYCE1 ve SYCE3 genlerindeki, kohezin kompleks düzenlenmesi için önemli olan STAG3, REC8 ve SMC1B genlerinin EOY ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir(54–57). DNA onarım genlerinden MEIOB, BRCA2, PSMC3IP, MCM8, MCM9, MSH4, MSH5, HFM1, FANCM, SPIDR, BLM, MLH3 gibi pek çok mutasyonun yine EOY ile ilişkisi olduğu gösterilmiştir(48,58–66). Miyotik bozukluk ve DNA onarım gen defektleri ile ilgili olan patolojiler genel olarak sendromik olmayan EOY ile ilişkili olup, nadir de olsa Fanconi anemisi gibi over dışı bulgularla da gidebilmektedir(67).

b) Otoimmün Nedenler

Erken ovarian yetmezlik tanılı hastaların yaklaşık %30'unda sebep otoimmün nedenlerdir (68). Endokrin (tiroidit, adrenal, hipoparatiroidizm, diabetes mellitus, hipofizit) ve endokrin olmayan (kronik kandidiyazis, idiyopatik trombositopenik purpura, vitiligo, alopesi, otoimmün hemolitik anemi, pernisiyöz anemi, sistemik lupus eritematosus, romatoid artrit, Crohn hastalığı, Sjörger sendromu, myastenia gravis, primer biliyer siroz, kronik aktif hepatit) pek çok otoimmün hastalıkla EOY ilişkisi gösterilmiştir. Erken ovarian yetmezlik, otoimmün poliglandüler sendromun (APS) bir parçası olarak diğer otoimmün endokrinopatilerin eşlik ettiği bir durum olarak da ortaya çıkabilmektedir. Tek başına en sık birlikte görüldüğü otoimmün birliktelik, hastaların %10'unda görülen hipotiroidizmdir (69).

Over hasarında neden olan çeşitli otoimmün yolakların gösterilmesine rağmen, overe özgü bir otoimmün belirteç kanıtlanmamış olmasıyla birlikte, bazı patojenik otoantikorların keşfedildiği iddia edilmektedir(70). Az sayıda çalışma EOY tanılı hastalarda yapılan rutin immünofloresan incelemelerde anti-ovarian antikor görüldüğü iddia edilmiş olmakla beraber, özgüllük ve patojenik rolleri güvenilir değildir. Anti-ovarian antikorların gösterildiği az sayıda çalışmada insidans %4-69 gibi oldukça geniş bir aralığa sahiptir(71). Diğer aday gösterilen antikorlar arasında direkt steroid üreten enzimleri, gonadotropinleri ve reseptörlerini, korpus luteumu, zona pellucidayı ve oositi hedef alan antikorlar bulunmaktadır. Ancak yine de tüm bu antikorlar EOY tanısız biyobelirteci olarak kullanılamamaktadır. Bu nedenle EOY hastalarına otoimmün etiyolojiye yönelik yapılan incelemeler sadece EOY ile görülen otoimmün hastalıkları belirlemede önem taşımaktadır.

Erken ovarian yetmezlik tanılı hastalarda yapılan bir çalışma kan dolaşımında interlökin-1 α (IL-1 α) seviyesinin sağlıklı kadınlara göre attığı saptanmıştır(72). Başka bir çalışmada farelerde EOY modellerinde serum seviyelerinde IL-6, IL-8, IL-17, TNF- α ve IFN- γ gibi proinflamatuvar sitokin seviyelerinin artmış olduğu görülmüştür(73,74). Antiinflamatuvar sitokinlerden TGF- β seviyesinin azaldığı ve

IFN- γ seviyesinin arttığını gösteren bir çalışma da mevcuttur(75). Wang J. ve arkadaşlarının yapmış olduğu 2023 tarihli bir mendelyan randomize bir çalışmada EOY tanılı hastaların serum VEGF ve IL-10 seviyelerinde anlamlı derecede düşüş olduğu görülmüştür(76).

İdiyopatik EOY hastalarında periferik kanda T hücreleri hareketinin arttığı görülmüştür. Benzer bulgular Graves' hastalığı, tip 1 diabetes mellitus ve Addison hastalığı gibi otoimmün endokrinopatilerde de gösterilmiştir. Postmenopozal kadınlarda da periferik kanda artmış T hücresi hareketi görülmektedir ancak EOY tanılı hastalarda, östrojen seviyesinin değişmesi ile hareketli T hücre sayısının azaldığı da görülmektedir. Bu nedenle hareketli T hücresi sayısının artmasına EOY'nin neden olduğu ya da EOY'nin bir sonucu olduğu konusu tartışmaya açıktır (69).

c) Kanser Tedavisine Bağlı Gelişen Erken Ovarian Yetmezlik

Son yıllarda çocukluk çağı kanserlerinden ölümün azalmasıyla kanser tedavisine bağlı EOY gelişen hastaların sıklığı da artış göstermiştir. Kanser tedavisine bağlı olarak EOY gelişme riski seviyeleri değişkenlik göstermektedir(77,78). Hematolojik kanserlerin tedavisi alkileyici ajanların da dahil olduğu kombine kemoterapi gerektirmekte olup, %80 infertilite ile sonuçlanmaktadır. Erken evre meme kanseri adjuvan kemoterapi tedavisi orta riskli gruba dahil olup, %20-80 ihtimalle infertilite ile sonuçlanmaktadır. Lenfoma ve bazı lösemi çeşitlerinin tedavisi düşük riskli gruba dahil olmakta olup, %20'den az bir ihtimalle infertiliteye neden olmaktadır(79).

Over, ilerleyen yaşla radyoterapiye daha hassas hale gelmektedir(77). Pelvik radyoterapi gerektiren tümörlerde overlerin batin içerisinde yerinin değiştirilmesi ile over hasarı önlenabilmektedir. Bir diğer faydalı olduğu iddia edilen yol ise gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) analogu ile over fonksiyonlarının baskılanmasıdır. Birkaç küçük çaplı çalışma bu yöntemin faydasını savunmuş olmakla

beraber, genel olarak over fonksiyonlarının korunması için bu yöntemin yerini oositlerin dondurulması almıştır(79).

Genel olarak bakıldığında kanser tedavisi primordial foliküllerin apoptozunu hızlandırarak, DNA'ya hasar vererek, overi besleyen damarların harabı ile overe hasar vermektedir.

d) Erken Ovarian Yetmezliği Diğer Sebepleri

Viral ooforitinin idiyopatik EOY'nin sebeplerinden biri olduğu düşünülmektedir. Kabakulağa bağlı ooforitinin de bu sebeplerden biri olduğu iddia edilmiştir. Ancak direkt kanıt niteliğinde bunu destekleyen çok az sayıda olgu bildirimi mevcuttur(80). Sigaranın erken menopoza sebebi olabildiği gibi EOY sebeplerinden biri de olduğu iddia edilmektedir. Ağır metaller, solventler, tarım ilaçları, plastikler ve endüstriyel kimyasallarla ilgili veriler de mevcuttur(81). Galaktozemi hastalığında ortaya çıkan anormal metabolitlerin EOY'ye sebep olan over hasarı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir(82).

2.2.3. Erken Ovarian Yetmezlik Tedavisi

Östrojen ve progesteron yerine koyma tedavisi, EOY hastalarına 50 yaşına kadar klinik rutinde uygulanmaktadır. Bu kesim için HRT'nin uzun dönem kar-zarar oranı için veriler yetersizdir. Tedavinin hedefi, 50 yaş üzerindeki normal menopoza sürecindeki kadınlardan farklıdır. Buna örnek olarak genç hastalarda seksüel fonksiyon beklentisi daha yüksek olması nedeni ile normal dozun üzerinde bir östrojen yerine koyma tedavisi gerektirmektedir. Ek olarak topikal vajinal östrojen ve testosteron desteği de düşünülmelidir. Hormon yerine koyma tedavisi, hastanın yaşam beklentisine göre deneme-yanılma yolu ile mevcut süreçte ilaçların dozlarının düzenlenmesi şeklinde hasta açısından en uygun tedaviye ulaşabilir(83).

Genel hatları ile bakıldığında ESHRE kılavuzuna göre; (29)

- Düşük östrojen semptomlarını gidermek(84), kardiyovasküler hastalıkları ve kemik dansitesini korumak adına hastalara HRT önerilmelidir(42).
- Hastalara HRT'nin doğal menopoza yaşına kadar meme kanseri riskini artırmadığı anlatılmalıdır(85).
- Uterus mevcut ise, östrojen tedavisinin yanında progesteron desteği de endometrium kanserini önlemek adına önemlidir(86).
- Turner sendromu nedeni ile EOY gelişen hastalara reproduktif çağ boyunca HRT önerilmelidir(87).
- Meme kanseri tanılı hastalarda HRT kullanılmamalıdır(88). Meme kanseri hikayesi olmayan BRCA1/2 mutasyonu taşıyıcılarında profilaktik iki taraflı salpingo-ooforektomi sonrası HRT planlanabilir(89).
- Hipertansiyonu olan hastalar HRT açısından kontrendikasyon oluşturmamaktadır. Transdermal östradiol daha güvenilir bir tedavi olarak tercih edilebilir(90).
- Venöz tromboembolizm öyküsü olan ve artmış risk bulunan hastalara HRT başlamadan önce hematoloji danışmanlığı istenmeli, başlanma kararı alındığında transdermal östradiol daha güvenilir bir tedavi olarak tercih edilebilir(91).
- Obez hastalarda tercihin yine transdermal östradiol yönünde olması önerilmektedir (92).

a) Östrojen Yerine Koyma Tedavisi: Oral östrojenler arasında östradiol esterleri ve 17-beta östradiol, günlük 0.5-4 mg doz ile tedavinin temelini oluşturmaktadır(93). Konjuge at östrojenleri, östradiole kıyasla daha yüksek hipertansiyon ve tromboz riski yarattığından tercih edilmemektedir(94,95). Kombine oral kontraseptifler (KOK), EOY hastalarında düşük de olsa gebe kalma ihtimalinden dolayı kontrasepsiyon isteyen hastalarda yaygın bir seçenektir. Ancak KOK kullanımı, beraberinde iki sorun yaratmaktadır. Bunlardan biri, hap kullanılmayan haftalarda olan östrojen eksikliğinin yıllar içerisinde östrojen eksikliği semptomlarını artması ve

kemik kaybını da hızlandırması; diğeri ise 20 mcg etinil östradiol dozu ile minimize edilmiş olmasına rağmen östradiole kıyasla yüksek olan tromboz riskidir(96).

Transdermal östrojen tedavisi karaciğerde ilk geçişe uğramaz, kullanımı kolaydır ve tromboz riski çok düşüktür(83). Dozu günlük 25-100 mcg'dir. Subkutan olarak östrojen tedavisi, 25-50 mcg östradiol tabletlerinin kalça ya da alt abdomene yerleştirilmesi ile uygulanır. Topikal vajinal östrojen, sistemik östrojen ile kullanılır. Jel, tablet, pesser ya da vajinal halka şeklinde uygulanır (97).

b) Progesteron Yerine Koyma Tedavisi: Östrojen seçiminden sonra normal bir uterusu olan EOY hastalarında progestin seçimi yapılır. Norethisteron daha potent bir progestin iken didrogesteron ve mikronize progesteron gibi daha az potent progestinlere kadar pek çok çeşit mevcuttur. Daha potent progestinler çekilme kanamalarını daha iyi dengelerken, daha çok yan etkiye sahiptir ve bu durumun dengeli olası gerekmektedir. Deneme-yanılma yolu ile en uygun progestin seçeneği bulunmalıdır. Oral ve transdermal kullanımda sürekli ya da aralıklı (her ay 10-14 gün boyunca) kullanıma arasında bir tercih yapılmalıdır. Aralıklı kullanım aylık menstrüel siklus kanamaları sağlarken, sürekli kullanımda gerçekleşmemektedir. Ancak sürekli kullanımda özellikle genç hastalarda ara kanama riski yüksektir. Daha ileri yaştaki hastalarda levonorgestrelli rahim içi araç (L-RIA) sistemik etkilerden kaçınmak için uygun bir tercih olmaktadır(98).

c) Androjen Yerine Koyma Tedavisi: Kadınlarda testosteron ve pre-androjen, androstenedion, dihidroepiandrostenedion (DHEA), ve DHEA sülfat (DHEAS) seviyeleri 30-40 yaşlarında zirve yapar ve ilerleyen yaş ile beraber özellikle premenopozal dönemde en düşük seviyelerine ulaşır. Düşük testosteronun sebepleri arasında bilateral oofektomi, hipopituitarizm, iyatrojenik olarak overin baskılanması ve EOY bulunmaktadır(99,100). Total testosteron, serbest testosteron, DHEAS ve androstenedion seviyelerinin 19-65 yaş arası kadınlarda libido ve seksüel fonksiyon ile yakından ilgisi vardır(101). Testosteron yerine koyma tedavisinin en önemli endikasyonu, azalmış libidonun ciddi problem yarattığı (HSDD; hipoaktif cinsel arzu

bozukluğu, *hypoactive sexual desire disorder*) hastalardır(102–104). Ayrıca testosteronun kemik sağlığını da etkilediği, yüksek testosteron seviyelerinin kemik kırılma ihtimalini azalttığı gösterilmiştir(105). Genel olarak testosteron yerine koyma tedavisi, klinik olarak deneme amaçlı yapılabilir ancak altı aydır fayda görmeyen hastalarda tedavi kesilmelidir.

Tablo 2. Kılavuzların erken ovarian yetmezlik tanılı hastalarda HRT tedavisi ile ilgili önerileri

Topluluk	HRT	Tercih edilen HRT dozu	Tercih edilen kontrasepsiyon	Tedavi süresi
Amerika				
ENDO(106) (Endokrinoloji Topluluğu) (2015)	Öneriliyor	Normal postmenopoz dozundan yüksek doz (örnek olarak günlük 100 µg transdermal östradiol) Yan etkilere ve ilerleyen yaş ile doz düzenlenir	Ele alınmamış	Dozun ve ilacın kullanılabilirliği nin güvenli olduğu zamana ve doğal menopoz yaşına kadar
ACOG(107) (Amerikan Jinekoloji ve Obstetri Derneği) (2021 güncel)	Öneriliyor	Östrojen: 17-β-östradiol, günde 1-2 mg oral; transdermal östrojen günde 100 µg; konjuge at östrojeni günde 0,625-1,25 mg oral Progesteron: Medroksiprogesteron asetat günde 2,5-5 mg oral ya da ayda 12 gün günde 10 mg oral; mikronize progesteron günde 100 mg veya ayda 12 gün günde 200 mg oral KOK: Ele alınmamış	KOK, östrojen replasman tedavisi ile L-RİA, bariyer yöntemleri	Doğal menopoz yaşına kadar ancak tedavi hasta bazında kişiselleştirilmelidir

NAMS(108) (Kuzey Amerika Menopoz Topluluğu) (2022)	Öneriliyor	HRT'de yüksek dozların KOK'lara göre daha iyi kemik koruması sağladığı iddia edilmektedir	Kontrasepsiyon amacı olan genç hastalarda KOK, HRT'ye göre daha uygun bir seçim olabilir	Doğal menopoz yaşına kadar
Uluslararası				
EMAS(109) (Avrupa Menopoz ve Andropoz Topluluğu) (2015)	Öneriliyor	Belirtilmemiş	Belirtilmemiş	Doğal menopoz yaşına kadar
NICE(110) (İngiltere Ulusal Sağlık ve Klinik Mükemmellik Enstitüsü) (2019 güncel)	Öneriliyor	HRT (Belirtilmemiş)	KOK	En az doğal menopoz yaşına kadar
IMS(105) (Uluslararası Menopoz Topluluğu) (2016)	Öneriliyor	Östrojen: 17-β-östradiol, günde 2 mg oral; transdermal östrojen günde 75-100 μg; konjuge at östrojeni günde 1,25 mg oral; etinil östradiol günde 10 μg oral Progesteron: Medroksiprogesteron asetat günde 2,5-5 mg oral ya da ayda 12 gün günde 10 mg oral; mikronize progesteron günde 100 mg veya ayda 12 gün günde 200 mg oral KOK: Ele alınmamış	Devamlı KOK, östrojen replasman tedavisi ile L-RİA	En az doğal menopoz yaşına kadar

ESHRE(29) (2016)	Öneriliyor	Östrojen: 17- β -östradiol, konjuge at östrojenlerine ve etinil östrojene göre tercih edilmelidir Progesteron: Mikronize progesteron günde 100 mg veya ayda 12-14 gün günde 200 mg oral; didrogesteron ayda 12-14 gün günde 5-10 mg oral	Ele alınmamış	En az doğal menopoza yaşına kadar
---------------------	------------	---	---------------	-----------------------------------

Kılavuzlar, bu HRT kullanımlarında kontrendikasyonun olmadığını varsaymıştır. Genel hatları ile kontrendikasyonlara bakılacak olursa(111);

- Tanı konmamış anormal uterin kanama
- Meme kanseri veya öyküsü
- Östrojen bağımlı kanserler
- Akut derin ven trombozu
- Pulmoner emboli
- Aktif arteriyel tromboembolik hastalıklar (inme, miyokard iskemisi) ya da öyküsü
- Bilinen anafilaktik reaksiyon öyküsü, östrojen preparatlarına karşı aşırı hassasiyet
- Anjioödem öyküsü
- Protein C, protein S, antitrombin eksikliği, faktör V leiden mutasyonu, faktör 2 mutasyonu, antifosfolipid sendromu
- Artmış safra kesesi hastalıkları riski olan hastalarda östrojen dikkatli kullanılmalıdır. Hiperkalsemi, görme kaybı, ciddi hipertrigliseridemi, kolestaza bağlı sarılık durumlarında östrojen kesilmelidir.

2.2.4. Erken Ovarian Yetmezlikte Fertilite Seçenekleri

a) Spontane Fertilite

Sınırlı sayıdaki vakada, tanıdan hemen sonraki dönemde seyreden ve normal ile anormal değerler arasında dalgalanma gösteren hormon seviyeleri nedeni ile %5-10 oranında spontane gebelik izlenmiştir. Bu vakalarda gebelik sonrası kayıp %20 oranında bildirilmiştir ve bu sonuç normal popülasyondaki oranı ile aynıdır. Sistematik bir derlemede ovulasyonu sağlama amacıyla EOY tanılı hastalarda birçok medikal tedavi denenmiştir ancak hepsi başarısız bulunmuştur(112).

b) Oosit Bağışı

Son 20 yıldır EOY tanısı alan hastaların büyük çoğunluğunda en çok çözüm sağlayan yaklaşım oosit bağışı ile gerçekleştirilen yardımcı üreme teknikleridir (YÜT). Ancak oosit donasyonu her ülkede mümkün olmamaktadır. Bağışlanan oosit, partnerin spermi ile fertilize edilir ve oluşan embriyolar arasından en iyisi implantasyon için seçilir(113).

c) Embriyonun Dondurulup Saklanması

Bu yöntem daha çok kanser tedavisi planı olan ve kontrollü ovulasyon indüksiyonu için yeterli vakit olan hastalar gibi EOY gerçekleşmesi beklenen ancak gebeliği ertelemek isteyen çok kısıtlı bir kesim hastalara uygulanmaktadır(114).

d) Oositin ve Over Dokusunun Dondurulup Saklanması

Kanser tedavisi alacak ve EOY gelişimi için risk oluşturacak durumu olan hastalarda tercih edilen yöntemlerden biri olan oositlerin dondurulup saklanması, kontrollü ovulasyon indüksiyonu gerektirmektedir ancak embriyo dondurulmasından farkı sperm gereksinimi olmamasıdır. Gebelik ihtimali embriyo dondurulması yöntemine göre daha azdır(115). Ergenlik sonrası iyatrojenik EOY tehlikesi ile karşı karşıya olan hastalarda yapılan bir çalışmada, *in vitro* maturasyon (IVM) ile oositin dondurulup saklanması yöntemi denenmiştir(116). IVM ile birlikte mayoz II fazında elde edilen ve dondurulan oosit sayısı, IVM kullanılmadan elde edilenlere göre daha fazla olmuştur. IVM, IVF merkezlerinde genel olarak sık kullanılan bir yöntem değildir ve olgunlaşmamış oositler genelde dışlanmaktadır. Ancak genç erişkinlerde yapılan bu çalışmada IVM yönteminin eklenmesiyle, eklenmeden yapılan oosit dondurulup saklanmasına kıyasla %40 daha fazla olgun oosit elde edilmiştir(117).

Yine kanser tedavisi alacak ve EOY için risk yaratacak durumları olan genç hastalarda over dokusunun ilerleyen yıllarda fertilizasyon amaçlı dondurulup saklanması mümkündür. 2015 yılında yapılmış olan bir derlemede, overin ya da over korteksinin dondurulup saklanması sonrasında tekrar kullanılmasının ardından hastalarda toplam 40'tan fazla canlı doğum ile sonuçlandığı gösterilmiştir. Avantajları arasında ergenlik öncesi hastalarda uygun olması, sperm gerektirmemesi gösterilmektedir. Bu doku pelvise tekrar ekilebilir, spontane ya da *in vitro* fertilizasyon (IVF) ile fertilizasyon için hastalar takip edilebilmektedir. Ancak ortalama başarı oranını belirlemek için bu işlem daha sürecin çok başındadır(118,119).

Hasta seçimi konusunda Edinburgh kriterleri baz alınır;

- <35 yaş olması.
- >15 yaşında tanı anında daha önce kemoterapi ya da radyoterapi almamış olması; <15 yaşında tanı anında hafif ya da üreme organlarına zarar vermeyen kemoterapi kabul edilebilmektedir.
- En az 5 yıl yaşam süresi olması.

- EOY riskinin yüksek olması (>%50).
- Bilgilendirilmiş onam alınması.
- Hepatit B, insan immün yetmezlik virüsü ve sifiliz serolojilerinin negatif olması.
- Gebe olmaması ve çocuğunun olmaması.

Amerikan Üreme Tıbbı Derneği (ASRM); her ne kadar oosit dondurulup saklanması işlemini ergenlik sonrası hastalar için öneriyor olsa da(120), bu kesimde fertilite korunmasında daha sık olarak over dokusunun dondurulup saklanması işlemi uygulanmaktadır(121). Bu nedenle literatürdeki veriler ovulasyon indüksiyonu ve oosit dondurulup saklanması 18 yaşından küçük(122), ergenlik sonrası hastalar ile az sayıda hastaların olduğu çalışmalarla sınırlıdır(123–125). ASRM tarafından yapılan bu önerinin nedenleri arasında ergenlik çağındaki hastalarda overin gonadotropinlere cevabı, olgunlaşmamış HHA nedeni ile yetersiz olması hipotezidir. Başka bir nedenle Turner sendromlu ergenlik çağındaki hastalarda olgunlaşmış oosit elde edilebilme şansının daha az olmasıdır(123,126). Bu çalışmalarla beraber görüldüğü üzere IVM gibi oosit olgunlaştırmaya katkıda bulunan yöntemleri ergenlik çağındaki hastalarda deneyen çalışmalar yapılmaya başlanmıştır(116).

e) Mezenkimal Kök Hücre Tedavisi

Çok çeşitli dokulara farklılaşabilme kapasiteleri olan ve kandan, plasentadan, umbilikal korddan, yağ dokudan, kemik iliğinden ve adet kanından elde edilebilen mezenkimal kök hücreler (MSCs) EOY tedavisinde büyük bir potansiyel oluşturmaktadır(127). Yapılmış olan küçük çaptaki hayvan çalışmalarında insan umbilikal kordundan, insan kanından, insan kemik iliğinden elde edilen MSCs'nin EOY modeli oluşturulmuş ratlara ekilmesinin ardından ovarian fonksiyonların arttığı gösterilmiştir(128–133). 2023 yılında yapılmış olan bir meta-analizde EOY modeli oluşturulmuş ratlarda MSCs ekimi sonrası folikül ve hormon seviyeleri incelenmiştir(134). Primordial, primer ve sekonder foliküllerin ve serum östrojen ile

AMH seviyesinin anlamlı derecede arttığı; FSH seviyesinin anlamlı bir farklılık göstermediği saptanmıştır.

2.3. In Vitro Aktivasyon

Primordial foliküllerin preantral döneme aktivasyonu iki önemli sinyal yolağı olan Hippo yolağı ve Akt yolağı tarafından kontrol edilmektedir. In vitro aktivasyonun EOY tanımlı hastalarda folikül gelişimini nasıl sağladığını anlayabilmek için bu iki yolağın işleyişini anlamak gerekmektedir(17).

2.3.1. Overi Parçalara Ayırmak, Hippo Sinyal Yolağı ve Akt Sinyal Yolağı

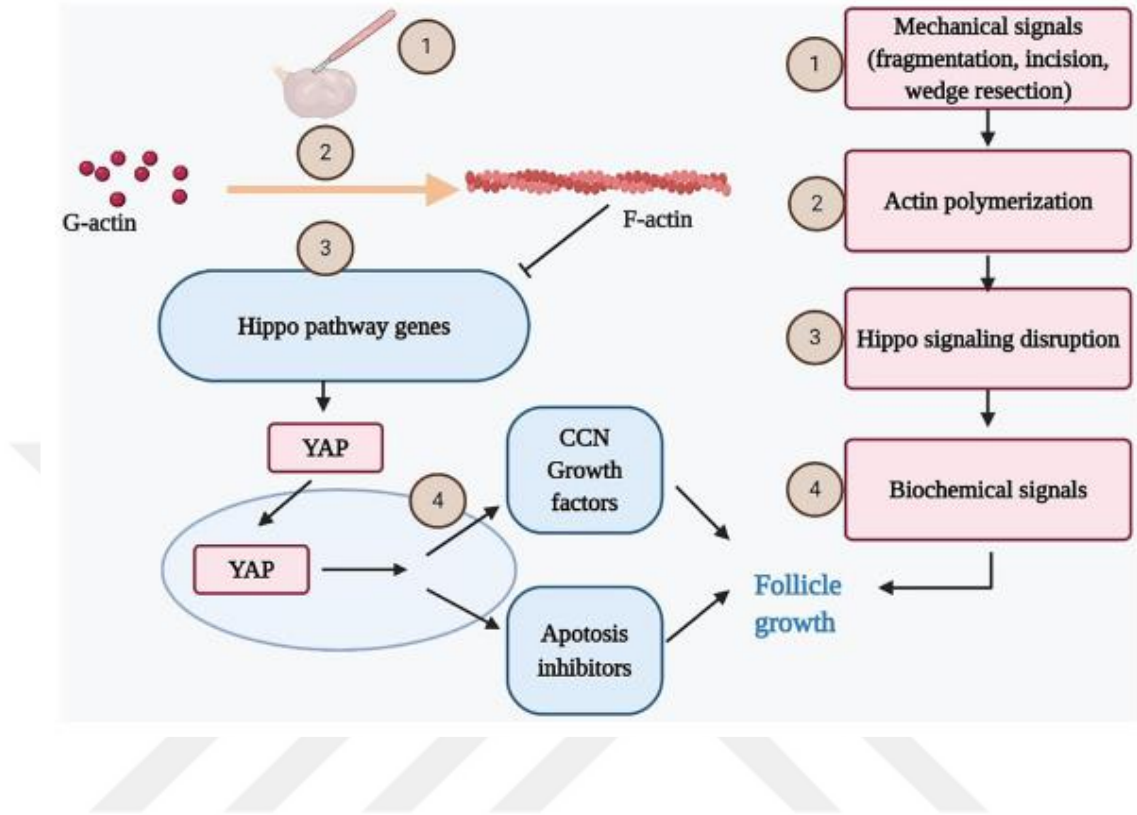
Hippo sinyal yolağı, tüm hayvan hücrelerinde ideal organ büyüklüğü ve gelişimini sağlamada önemlidir(135). Bu yolak; bir kinaz kaskatında rol oynayan Hippo sinyal yolağı tarafından fosforile edilip etkisiz hale getirilen, çeşitli negatif büyüme ve gelişme düzenleyicilerine (Yes-bağımlı protein [YAP]/PDZ bağımlı motif ile transkripsiyonel koaktivatörü [TAZ]) sahiptir. Hippo sinyali bozulduğunda YAP fosforilasyonu azalır ve hücre çekirdeğindeki miktarı artar. Sonrasında YAP/TAZ sinyali, bazı hücre içi sinyal proteinlerinin artmasını (CYR61, bağ doku büyüme faktörü [CTGF] ve *nefroblastoma overexpressed* [NOV]; hepsinin tek bir söylemi ile CCN), matriks – hücresel büyüme faktörleri artmasını ve hücre gelişimini uyarır. Hippo sinyal yolağının rolü bu zinciri önlemektir ve bunu YAP, TAZ ve diğer transkripsiyon faktörlerini fosforile edip etkisizleştirerek, bunu sonucunda da organ gelişimini durdurarak gerçekleştirir(136).

Overde Hippo sinyal yolağı, primordial foliküllerin uyarılmasını önlemektedir (Şekil 2). Bu yolak, over dokusunun mekanik olarak hasarı ile baskılanabilmektedir. Aktin polimerizasyonunun artması, fosforile YAP miktarını azaltır ve hücre çekirdeğinde olan YAP miktarını artırır(137). Bunun sonucunda da CCN büyüme faktörlerinin ve *baculoviral inhibitors of apoptosis repeat containing* (BIRC) apoptoz

inhibitörlerinin üretimi artar ve ovarian foliküllerin gelişimi için gereken moleküler basamak gerçekleşmiş olur(137).

Eğer IVA ilaçlı olarak yapılacaksa, primordial folikül uyarımında ikinci en önemli yolak Akt (protein kinaz B) sinyal yolağıdır. In vitro aktivasyonda Akt sinyal yolağıının iki üyesi, fosfatidilinozitol-3-kinaz (PI3 kinaz) ve 10.kromozom üzerinde yer alan bir tümör baskılayıcı gen olan protein tirozin fosfataz ve tensin homoloğu (PTEN), hedeflenir. Bir tirozin kinaz reseptörünü kodlayan gen olan C-kit, Akt sinyal yolağını, fosfatidilinozitol-4,5-bifosfatı (PIP2) fosfatidilinozitol-3,4,5-trifosfata (PIP3) çeviren PI3 kinaz aktivitesini artırarak uyarır. Daha sonra PIP3, fosfatidilinozitol bağımlı kinaz-1'i (PDK1) aktive eder ve bu Akt aktivasyonu ile sonuçlanır. Hücre çekirdeğinde Akt aktivasyonu, *forkhead box O3 (FOXO3)* transkripsiyonel aktivitesini baskılar ve bu da primordial folikül uyarımını sağlar (şekil 2). Akt sinyal yolağıının bir diğeri üyesi PTEN, PIP3'ü defosforile ederek PIP2'ye çevirir ve PI3 kinaz sinyalini dolayısıyla Akt sinyal yolağını baskılar(138,139). Sekonder foliküllerde bulunan granüloza hücrelerinin PTEN gen delesyonları sonucunda folikülün büyümesinin sağlandığı gösterilmiştir(140).

Şekil 1. Mekanik hasar ile Hippo sinyal yolağı baskılanması ve folikül uyarımı(141)



2.3.2. Hayvan Modelleri

Hayvan modellerinde yapılan çok sayıda çalışma göstermiştir ki PI3 kinaz aktivitesinin artırılmasıyla veya PTEN baskılanması ile gerçekleştirilen Akt sinyal yolağı aktivasyonunun primordial folikül uyarımını sağlamaktadır⁶¹. Adhikari ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, bisperoksovanadyum (bpV; PTEN baskılayıcı) ile işlem yapılmış ve böbrek kapsülü altında olgunlaşmaya bırakılmış sıçan overinden yapılan IVF ile canlı yavru elde edilmiştir(142). Li ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada, 3 gün boyunca bpV ve 740YP (PI3 kinaz uyarıcısı) ile in vitro olarak enkübe edilmiş fare overleri daha sonra yetişkin böbrek kapsüllerine ekilmiştir. 48 saat sonra primordial foliküllerin yarısından fazlasında FOXO3 üretimi izlenmiştir. Bu hayvanlardan bakılan serum AMH seviyelerinin de arttığı izlenmiştir(143).

Hippo sinyal yolağının baskılanmasının araştırıldığı bir çalışmada 10 adet kemirgen over dokusunun parçalandığı gün incelenmiştir ve YAP fosforilasyonunun azaldığı, CCN büyüme faktörü transkripsiyonunun arttığı gösterilmiştir. Bu, Hippo sinyal yolağının baskılandığının bir kanıtıdır. Bu nedenle güncel IVA protokollerinde ilk adım over verilen mekanik hasardır(137,144). Başka çalışmalar göstermiştir ki PTEN, tuberin/tuberoskleroz kompleksi (TSC1/2), ya da FOXO3 üzerindeki delesyonlar primordial foliküller üzerinde oldukça uyarıcı bir etkiye sahiptir(145–147).

Üç boyutlu biyoyazıcı ile elde edilen yağ dokudan kaynaklı kök hücreler ve ilaçsız IVA yönteminin beraber denendiği EOY modeli oluşturulmuş ratlarda denenen bir çalışmada, kontrol grubuna göre bu ratlarda folikül sayılarının arttığı, granüloza hücrelerinin gelişiminin sağlandığı, PI3K/Akt yolağı ile neoanjiogenezin arttığı ve serum AMH düzeyinin anlamlı derecede arttığı gösterilmiştir(148).

Bu çalışmalar ile görülmektedir ki, over dokularına hasar vererek Hippo sinyal yolağının baskılanmasının ardından PTEN baskılayıcılarla Akt sinyal yolağı uyarımının, PI3K uyarıcıları olsun ya da olmasın, sıçanlarda primordial folikül gelişimini sağlamaktadır.

2.3.3. İnsanlarda *In Vitro* Aktivasyonun Uygulanması

Güncel bilgilerin PI3K/Akt/FOXO3 ve Hippo yolağının folikül gelişiminde olan faydalarını göstermesinin ardından IVA yöntemi EOY tanılı hastaları tedavi etmek için kullanılmaya başlanmıştır. Bu yaklaşımda, over korteksi yaklaşık 1-2 mm'lik küçük küpler halinde dilimlenir ve *in vitro* kültüre PI3K uyarıcıları ve PTEN baskılayıcıları ile birlikte iki gün boyunca bırakılır. Ardından fallop tüplerinin serozasının altına ekilir(141). Çeşitli çalışmalar bu yöntemin güvenliğini ve etkililiğini araştırmıştır; bu yöntem ile bildirilen ilk gebelik, 27 adet EOY tanılı 37,3±5,8 yaş aralığında ve uzun süredir (6,8±2,1 yıl) amenoresi olan hastaların

incelendiği Kawamura ve arkadaşlarının 2013 yılında gerçekleştirdiği bir çalışmadır(137). Laparoskopik cerrahide overler çıkarılmış ve 1x1 cm en ve boy, 1-2 mm kalınlığında parçalara bölünmüştür. Histolojik incelemede bu 27 hastadan 13'ünde rezidüel foliküller izlenmiştir. Ardından dondurulmuş olan bu parçalar yaklaşık 100 adet (1x1x1 mm) eşit kübik parçalara ayrılmıştır ve Akt uyarıcılarıyla beraber 2 gün inkübasyona bırakılmıştır. Ardından bu parçalar fallop tüpü serozasının altına ekilmiştir. Ovarian uyarıcıların başlanması ile haftalık vajinal ultrasonografi takibine alınmışlardır. Sekiz hastada folikül gelişimi izlenmiş, beş hastada başarılı bir şekilde olgun oositler intrastoplazmik sperm enjeksiyonu (ICSI) için elde edilebilmiştir. Bu yol ile sağlıklı ve zamanında doğan bir bebek elde edilmiştir. Bu yöntemi kullanan diğer çalışmalarda da IVF yöntemi ile sağlıklı ve canlı doğumlar elde edilebilmiştir(149,150).

2.3.4. İlaçsız (*drug-free*) In Vitro Aktivasyon

In vitro aktivasyonun, PTEN baskılayıcı ya da PI3 kinaz uyarıcıları gibi ilaçlarla sağlanmasının üç temel problemi bulunmaktadır.

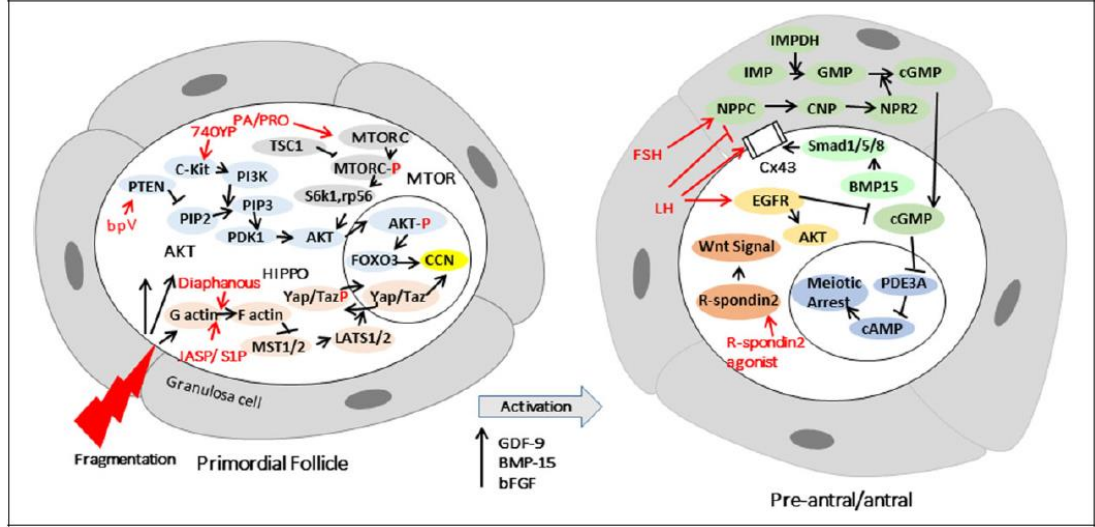
a) Cerrahi girişim sayısı: İki kez laparoskopik girişimin gereklidir. İlk girişim over korteksi elde edebilmek için, ikinci girişim de elde edilen korteksin in vitro aktivasyonu sonrası ototransplantasyonu için gerekmektedir.

b) Karsinojenik etki: Kullanılan PTEN baskılayıcılar, PI3 kinaz uyarıcıları, Akt sinyal yolu uyarıcıları gibi ilaçlar; hücre büyümesi, gelişmesi ve farklılaşmasında görev alan hücre içi yolaklar ile ilişkili olduğundan karsinojenez riski taşımaktadır. Over ve tuba kanseri de dahil olmak üzere pek çok kanser çeşidinin ortaya çıkmasında PTEN-PI3K-Akt yolağı rol oynamaktadır(151). Bu nedenle güvenilirlik açısından insanlar üzerinde yapılması gerek geniş kapsamda çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

c) Doku hasarı ve nekroz riski: İki gün süren in vitro over dokusu kültürü zamanla doku hasarı, nekroz ve programlı hücre ölümü ile sonuçlanabilmektedir.

İlaçsız IVA'nın ilaç yardımıyla yapılan IVA'dan farkı, aynı seansta hem over korteks hasarı hem de ototransplantasyonun gerçekleştirilmesi ve ilaç ile 2 gün süren kültür aşamasının olmamasıdır. Bu yeni yaklaşım gerekli operasyon sayısını azaltmakta ve ovarian dokunun dondurulup saklanması ile buna bağlı folikül kaybı riskini de azaltmaktadır. Klinik pratikte de uygulanması daha kolay olan bu yöntemde hem potansiyel karsinojenik etkileri olan PTEN baskılayıcılarının etkisinden(152) hem de Akt yolağı uyarımına bağlı olarak primordial foliküllerde ortaya çıkabilecek DNA hasarından kaçınılmış olunur(153,154). Fabregues F. Ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış olduğu bir çalışmada ilaçsız IVA yöntemi ile hücre kültürü kullanılmadan, sadece Hippo sinyal yolağı aktivasyonu aracılığıyla ve ovulasyon uyarıcılar ile iki adet olgun oositin elde edildiği, IVF yöntemi ile EOY tanılı bir hastada gebelik gerçekleştiği bildirilmiştir. Bu çalışma ilaçsız IVA yöntemi ile gebelik sağlanan ilk çalışmadır(155). İlaçsız IVA hakkında yapılan en geniş çalışma 2020 yılında Ferreri J. ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Toplam 14 adet EOY tanılı hastanın beşinden oosit elde edilebilmiştir ve bu beş hastadan dördünde gebelik sağlanabilmiştir(156). Karşıt görüşteki başka bir çalışmada EOY tanılı hastalarda ilaçsız IVA'nın etkinliği araştırılmıştır(157). Prosedürün uygulanmasından sonra 10 hafta boyunca takip edilen 20 adet EOY tanılı hastada süreç sonunda antral folikül sayılarında ve serum AMH seviyelerinde anlamlı bir artış olmamıştır. Ancak buna rağmen, 12 adet hastada gebelik gerçekleşmiştir. Bu durum da akla geliştirilmiş doğru takip prosedürü ve uzun süreçteki foliküler gelişimi öngörmeye yetersiz güncel bilgiyi getirmektedir.

Şekil 2. Hippo ve Akt Sinyal Yolağının Hücredeki Etkileri(17)



2.4. Plateletten Zengin Plazma

Plateletten zengin plazma, tam kandan iki kez yapılan santrifüj yolu ile elde edilmektedir. Santrifüj sonrası ayırma işlemi ile eritrositler ayrılır ve büyüme faktörlerinden zengin plazma kısmı alınır(158). Plateletten zengin plazma içerisinde bulunan plateletlerde; aktive olduklarında hücre büyümesini, hücre farklılaşmasını ve anjiyogenezi uyaran alfa granüller bulunmaktadır(159). Yine içeriğinde kollajen sentezi, fibroblast kemotaksisi, makrofaj aktivasyonu, immün hücre kemotaksisi, endotelial hücre çoğalması ve migrasyonu, epitelyal ve mezenkimal hücrelerden sitokin salınımında rol oynayan büyüme faktörleri bulunmaktadır. Tablo 3'te PRP bileşiminden ve bileşenlerin görevlerinden detaylıca bahsedilmektedir(159,160).

Tablo 3. Plateletten zengin plazmanın ana bileşenleri(159,160)

Kemokinler ve sitokinler	• İnterlökin-1 β (IL-1 β) • İnterlökin-8 (IL-8) • Platelet faktör 4 (PF4) • CD40 ligandı • Makrofaj inflamatuvar protein-1α (MIP-1α) • C-C motif kemokin ligandı 2 ve 5 (CCL2 ve CCL5) • Stromal hücre kaynaklı faktör-1α (SDF-1α)	• Hücre gelişimi, farklılaşması, apoptoz • Anjiogenez • Doku perfüzyonu • Hücre göçü • Hücre migrasyonu • İnflamasyon
Pıhtılaşma faktörleri ve inhibitörleri	• Faktör V • Faktör IX • Antitrombin • Faktör S • Proteaz neksin-1 ve -2 • Doku faktörü yolağı inhibitörü (TFPI)	• Pıhtılaşmanın düzenlenmesi

Büyüme faktörleri	• Transforme edici büyüme faktörü-β (TGF-β) • Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) • İnsülin-benzeri büyüme faktörleri (IGFs) • Platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) • Epidermal büyüme faktörü (EGF) • Basit fibroblast büyüme faktörü (bFGF) • Fibroblast büyüme faktörü 2 (FGF2) • Hepatosit büyüme faktörü (HGF) • Granülosit makrofaj-koloni-uyaran faktör (GCSF)	• Hücre gelişimi, farklılaşması ve kemotaksisi için gerekli gen transkripsiyonu • Direkt etki ile hücre gelişimi, çoğalması ve kemotaksisi • İmmun sistem hücrelerinin uyarılması • Damar gelişimi • Mezenkimal hücre çoğalması ve gelişimi • Doku onarımı
Adezyon proteinleri	• Von Willebrand Faktörü (VWF) • Fibrinojen • Trombospondin-1 ve -2 • Laminin-8	• Yaşlı nötrofillerin dolaşımdan uzaklaştırılması • Doku hasarında inflamasyonun başlatılması
İntegral membran proteinleri	• αIIb3 • GPIIb-IX-V • GPVI • TLT-1 • P-selektin	• Platelet aktivasyonu • Damar yaralanmalarında platelet adezyonu ve tıkaç oluşumu

İmmun medyatörler	• Kompleman C3 öncüsü • Kompleman C4 öncüsü • Faktör D, faktör H, faktör I • C1 baskılayıcı • İmmunoglobulin G (IgG)	• İnflamasyonun düzenlenmesi
-------------------	--	--

Tedavi amacı ile yapılan PRP enjeksiyonunun teorisinde; vücudun doku yaralanmasına yanıt olarak oluşturduğu aktif plateletlerin göçü ve büyüme faktörlerinin salınımı gibi doğal fizyolojik yanıt yatmaktadır(161). Son yıllarda PRP enjeksiyonu, kas-iskelet yaralanmaları(162,163), artritler(164,165), göz çevresi doku onarımı (166), diş hekimliği(167), yara iyileşmesi(168), alopesi(169) gibi çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Düşük over rezervi ve EOY tanılı hastalarda IVF öncesinde intraovarian PRP enjeksiyonu da kullanım alanları arasındadır (159,170,171). Tablo 3'te bahsedilen bileşenlerin ovarian kök hücreleri uyarması ile ovarian kök hücrelerinin oosite farklılaşmasını sağladığı iddia edilmektedir(159).

İntraovarian PRP enjeksiyonunun EOY tanılı hastalara etkisini araştıran bir pilot çalışmada 311 hasta takip edilmiştir(171). Aralarından 23 hastada (%11,6) doğal yollarla gebelik, 13 hastada IVF ile gebelik (transfer başına %22,8 gebelik oranı, toplam %4) elde edilmiştir. Bütünüyle %8 canlı doğum, %8 embriyoların dondurulup saklanması ile sonuçlanmıştır. Aralarından 201 adet hastada (%64,6) yardımcı üreme tekniği kullanılabilinecek düzeyde folikül gelişimi sağlanabilinmiştir. Bunu destekleyen olgu bildirimleri de literatürde mevcuttur(172,173).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada toplam 31 adet (28 adet rastgele dört farklı gruba, 3 adet rat PRP elde edilmesi için intrakardiyak kan temini amacıyla) dişi Whistar Albino rat kullanılmıştır. Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Multidisiplin Laboratuvarı Deney Hayvanları Biriminden temin edilen ratların çalışmaya dahil edilmiştir. Deney süresi boyunca ratlar laboratuvar koşullarında takip edilmiştir ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ oda sıcaklığı, $\%50 \pm 10$ bağıl nem, 12:12 saat gece-gündüz döngüsü, standart yem ve su).

Kontrol grubu (n=7); 0. gün 1 mL/kg intraperitoneal tek doz $\%0,9$ NaCl içeren serum fizyolojik uygulanmıştır.

Erken ovarian yetmezlik grubu (n=7); 0. gün 150 mg/kg intraperitoneal tek doz siklofosfamid enjeksiyonu uygulanmıştır.

Erken ovarian yetmezlik + PRP enjeksiyonu +MOH grubu (n=7); 0. gün 150 mg/kg intraperitoneal tek doz siklofosfamid enjeksiyonu, 15. gün intraovarian PRP enjeksiyonu (550.000 platelet/ 200 μl serum fizyolojik) uygulanmıştır.

Erken ovarian yetmezlik + PRP + MOH grubu (n=7); 0. gün 150 mg/kg intraperitoneal tek doz siklofosfamid enjeksiyonu, 15. gün insülin enjektörü ile mekanik ovarian hasar gerçekleştirilmiştir.

Erken ovarian yetmezlik + PRP +MOH grubu ve EOY + MOH grubunda yer alan deneklere eter ile genel anestezi altında uygulanmıştır. Batın cildinin tıraşlanması ve $\%10$ 'luk povidin iyot çözeltisi ile cilt antisepsisinin sağlanmasının ardından, sağ ve sol overe ulaşabilmek amacıyla göbek altı median (GAM) üç santimetre vertikal kesi yapılmıştır. Ardından EOY+PRP+MOH grubundaki ratların her iki overine de insülin enjektörü ile 200 μl PRP enjeksiyonu, dört kez uygulanan penetrasyon ile sağ - üst,

sağ - alt, sol - üst ve sol - alt şeklinde kadranlara ayrılmış olan overlerin her bir kadranına bir adet penetrasyon yapılmış şekilde enjekte edilmiştir. Erken ovarian yetmezlik+MOH grubundaki ratların overine sadece mekanik hasar oluşturmak amacıyla insülin enjektörü, EOY + PRP + MOH grubundaki ratlara yapılan penetrasyon sayısı ile aynı sayıda (dört kez) penetre edilmiştir.

Tüm hayvanlar deneyin 15. gününden itibaren sekiz hafta sonra, eter anestezi altında genel anesteziye alınarak ratların abdominal ve torakal bölgesi insizyon ile açılmış ve FSH, AMH düzeylerine bakılması için intrakardiyak yaklaşık 2,5 mL kan örneği alınmıştır ve sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir. Ardından overler histolojik çalışmalar kullanılmak üzere %10'luk formalin içerisine alınmıştır.

3.1. Erken Ovarian Yetmezlik Modelinin Oluşturulması

Erken ovarian yetmezlik modelinin oluşturulabilmesi için yapılan pilot çalışmada üç farklı doz (100, 125 ve 150 mg/kg intraperitoneal siklofosfamid) denendi. Histolojik veriler sonucunda 150mg/kg intraperitoneal siklofosfamid dozundan EOY modeli oluşturulmuştur. Erken ovarian yetmezlik modeli oluşturulacak olan ratlarda maksimum etki açısından intraperitoneal siklofosfamid enjeksiyonu sonrası 15 gün beklenmiştir(14).

Modelin oluşup oluşmadığının kontrolü için östrüs siklusuna bakılmıştır. Siklofosfamid enjeksiyonundan bir hafta önce ve bir hafta sonra yedi gün boyunca vajinal smear yapılmıştır. Numuneler, hematoxilen & eozin (H&E) boyama ile boyanarak sitolojik olarak incelenmiştir. Östrüs siklusunun sitolojik değerlendirmesi; epitelyal hücreler, keratinize epitelyal hücreler ve lökositlerin varlığına göre yapılmıştır. Epitelyal hücreler fazla ise proöstrus (bir gün), çoğunlukla kornifiye hücreler bulunursa östrus (1-2 gün), epitelyal hücreler, lökosit ve kornifiye hücrelerin varlığında metöstrus (bir gün) ve yoğun olarak lökositlerin varlığında ise diöstrus (bir gün) olarak sınıflandırılmıştır. Uzamış diöstrus ve normal/uzamış östrus (3-4 gün

östrus ya da 4-5 gün diöstrus) ile düzensiz döngü (>4 gün östrus ya da >4 gün diöstrus ve hiç siklusun olmaması) olması durumunda EOY modeli oluşmuş kabul edilmiştir(174).

3.2. Plateletten Zengin Plazma Elde Edilmesi

Üç adet rattan PRP oluşturulması kan, için eter anestezi altında enjektör yardımı ile direkt olarak kalpten alınmıştır. Kan, %3,2 sodyum sitrat içeren tüpe kan/sitrat oranı 9/1 olacak şekilde aktarılmıştır. Kan örneği; Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan santrifüj cihazında 22°C sıcaklıkta, 2100 RPM hızda 10 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra ikinci santrifüj; 22°C sıcaklıkta, 4000 RPM hızda altı dakika boyunca uygulanmıştır. Ardından, süpernatant uzaklaştırılması sonrasında PRP elde edilmiştir (3.3×10^5 adet partikül/ μl)(174).

3.3. Işık Mikroskopik İncelemeler

Deney bitiminde deneklerden elde edilen dokulara rutin doku takibi prosedürü uygulandı, lamlara 5 mikronluk kesitler alındı. Histokimyasal ve immünohistokimyasal boyalar yapıldı. Deneyde yapılan histokimyasal boyamalar; Hematoksilen & Eozin ve Masson Trikrom olup; immünohistokimyasal değişiklikler için de Kaspaz-3 ve Ki67 primer antikorları ile deney grupları değerlendirildi.

3.4. Histokimyasal Boyama

Sakrifikasyondan sonra deneklerin ovaryumu histolojik incelemeler için %10'luk formolde 4-5 gün bekletilerek fikse edildi. Ardından bir gece akarsu altında bekletilerek fiksatif uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonraki tüm işlemler 60°C'lik etüvde gerçekleştirildi. Dokular sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika dehidratasyon amacıyla bekletildi. Daha sonra 20'şer dakika 4 farklı aseton

serilerinde tutuldu. İki farklı ksilende de otuzar dakika şeffaflaştırma amacıyla tutuldu. Yumuşak parafin ile birer saat 2 kez olmak üzere immersiyonu sağlandı. Son olarak dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı (Tablo 4).

Tablo 4. Doku takibi protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
Fiksasyon	%10'luk formol	24-48 saat
Fiksatiften uzaklaştırma	Akarsu	1 gece
Dehidratasyon	%70-80-96'lık alkol serileri	20'şer dakika
Post Fiksasyon	Aseton 1-2-3-4	20'şer dakika
Şeffaflandırma	Xylol 1-2	30'ar dakika
Parafin emdirme	Yumuşak parafin 1-2	1'er saat
Bloklama	Sert parafin	

3.4.1. Hematoksilen & Eozin (H&E)

Parafin bloktan lamlara alınan doku kesitleri boyama yapılmadan bir gece önce deparafinizasyon işlemi için 60°C'lik etüvde bekletildi. Ardından ilk ksilol içinde etüvde 20 dakika diğer iki ksilolde ise oda sıcaklığında yirmişer dakika tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden (absolü - %70) geçirilip hidratasyon işlemi yapıldı. Kesitler distile su ile çalkalandı ve 10 dakika boyunca hematoksilen (05- 06002L, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile nukleusların boyanması sağlandı. Hematoksilenin fazlasını dokudan uzaklaştırmak için 5 dakika akarsuda yıkama yapıldı ve hücre sitoplazmasının boyanması için 30 saniye eozin (05-10003L, Bio-Optica, Milano, İtalya) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra dehidratasyon işlemi için artan alkol

serisinden (%70, %80, %96 ve absölü) geçirilen kesitler yirmişer dakika üç farklı ksilolde tutulup şeffaşlaştırma yapıldı. Son olarak lam üzerindeki dokular entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

Dokuların morfolojik değerlendirmesi ve folikül sayımları yapıldı.

3.4.2. Masson's Trikrom

Over dokusunda oluşan fibrozisin derecelendirilmesi, Masson's Trikrom boyası ile yapılmıştır. İstatiksel analizi semikantitatif olarak, fibrozis yok = 0, düşük fibrozis = 1, orta fibrozis = 2, şiddetli fibrozisiz = 3 şeklinde değerlendirilmiştir(175). Deparafinizasyon için bir gece 60°C'lik etüvde bekletilen kesitler biri etüvde olmak üzere üç farklı ksilolde tutuldu. Daha sonra azalan alkol serilerinden geçirildi. Distile suda çalkalandıktan sonra Masson Trikrom boyama seti (BioOptica; BO 04-010802) içerisinden dokular üzerine A solüsyonu ile B solüsyonu damlatılarak nukleusların boyanabilmesi için 10 dakika bekletildi. Yıkama işleminin yapılmadan preparatlar beş dakika kurutulduktan sonra Pikrik asit alkolik çözeltisi C solüsyonundan damlatılarak dört dakika bekletildi. Distile su ile hemen (3-4 saniye) yıkandıktan sonra kesitlere uygulanan D solüsyonu dört dakika bekletilerek hücre sitoplazmalarının boyanması sağlandı. Sonra preparatlar distile su ile yıkandıktan sonra Fosfomolibdik asit çözeltisi E solüsyonundan damlatılarak 10 dakika bekletildi. Yıkama yapılmadan preparatlar beş dakika kurutuldu. Daha sonra Masson anilin mavisi çözeltisi F solüsyonu damlatılarak 10 dakika bekletildi. Distile suda yıkanan kesitler artan alkol serilerinden geçirildi. Ksilol ile şeffaşlaştırma yapıldıktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

3.5. İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü

İmmünohistokimyasal olarak Kaspaz-3 ve Kİ67 primer antikorları kullanılmıştır. Alınan kesitler öncelikle 60 °C'lik etüvde bir gece bekletildi sonrasında şeffaflaştırma amacıyla ilki etüvde diğer ikisi oda ısısında olmak üzere 30'ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Daha sonra dokular %10'luk Sitrat tamponunda beş dakika mikrodalgada kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Soğuyan dokuların etrafı Pappen (Z672548-1EA Sigma Tokyo, Japonya) ile çizildi ve üzerlerine dokuların kurumaması amacı ile PBS koyuldu. Ardından üç kez PBS ile yıkanan kesitler, 10 dakika oda ısısında H₂O₂ ile bekletilerek dokuda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı. Sonraki aşamalar kullanılan ürünün föyünde yazdığı şekilde yapıldı (Santa Cruz; sc-2018). 30 dakika bloklama solüsyonunda (PBS ile hazırlanan stok bloklama solüsyonu ile hazırlanan) bekletildi. Yıkama yapılmadan primer antikor rat spesifik Kaspaz-3 (Bioss, BS-0081R) ve Kİ-67 (Bioss, BS-23105R) ile preparatlar + 4 °C' de bir gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yıkama yapıldı ve sonra biyotinlenmiş mouse anti-rabbit IgG sekonder antikor solüsyonu ile 90 dakika bekletildi. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra AB karışım solüsyonunda (avidin-biyotin HRP) 30 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB içeren peroksidaz solüsyonu ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Biooptica'nın hematoksileni ile ardalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.5.1. İmmunohistokimyasal Skorlama

İmmünohistokimyasal analizlerde, pozitif hücre boyanma yoğunluğu (i değeri), 0 (boyanma yok), 1 (zayıf, ancak saptanabilir boyanma), 2 (orta düzeydeki boyanma) ve 3 (yoğun boyanma) şeklinde kategorize edildi. H-skor değerini saptayabilmek için her bir kesitte 40x büyütmede rastgele beş alan tarandı, mikroskopik olarak değerlendirildi.

3.6. Biyokimyasal Analizler

Folikül uyarıcı hormon ve AMH folikül gelişimin iki ana düzenleyici hormonlarıdır. Klinikte hem FSH hem AMH ovarian folikül hakkında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Bu iki hormon seviyeleri düzensiz olduğunda istenmeyen üreme bozukları ile sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda kombine bir FSH/AMH oranı, ovarian sağlığı hakkında yararlı bir ölçü oluşturacaktır. Bu nedenle biyokimyasal olarak serum FSH ve AMH seviyeleri (ng/mL) ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. Tedavilerin kantitatif olarak dokuda değerlendirmesi için sırasıyla proliferasyon ve apoptotik belirteçleri olan Ki67 ve aktif kaspaz-3 protein düzeyleri ELISA yöntemi kullanılmıştır(176).

3.7. İstatistiksel Analizler

Tüm veriler SPSS 22,0 istatistik programına ile değerlendirilmiştir. Veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Histolojik sonuçlar için gruplar arasındaki farklar Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi ile değerlendirilmiştir(177).

Biyokimyasal değerlendirmede ise tüm veriler ortalama $\pm$ standart hata olarak gösterilmiştir. Grupların ortalamaları arasındaki farklar one-way ANOVA ve post hoc Bonferoni testi kullanılarak değerlendirilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir(176).

Shapiro-Wilk ile normalite testi yapılmış olup, veriler normal dağılıma uygun olarak hesaplanmıştır.

4. BULGULAR

Temmuz 2023 – Ekim 2023 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Multidisiplin Laboratuvarı Deney Hayvanları Birimi'nde 20 adet Whistar albino cinsi 180-220 gram aralığındaki ratlara ait sonuçlar incelendi. Toplam 28 adet olan rat sayısı, takip süreci boyunca her gruptan ikişer ratın cerrahi sonrası komplikasyon, anestezi komplikasyonu, siklofosamid yan etkileri ve idiyopatik nedenler ile kaybedilmesi sonucu yirmiye gerilemiştir.

Elde edilen sonuçlar ilk olarak gruplar içerisinde minimum, maksimum ve ortalama değerler olarak incelendi. Anti-müllerian hormon değeri SF grubunda ortalama 2,92 (2,15-4,74), EOY grubunda ortalama 1,71 (0,85-2,28), EOY+PRP+MOH grubunda ortalama 2,04 (1,89-2,31), EOY+MOH grubu ortalama 2,64 (2,25-3,38); FSH değeri EOY grubunda ortalama 113,78 (92,7-139,1), SF grubunda ortalama 77,34 (40,60-98,70), EOY+PRP+MOH grubunda ortalama 87,76 (82,10-96,60), EOY+MOH grubunda ortalama 102,60 (90,20-117,10); FSH/AMH oranı SF grubunda ortalama 29,15 (14,15-43,48), EOY grubunda ortalama 73,47 (44,78-115,41), EOY+PRP+MOH grubunda ortalama 43,17 (37,35-47,58), EOY+MOH grubunda ortalama 39,11 (34,64-42,96) şeklinde hesaplanmıştır. Gruplar arasında FSH, AMH ve FSH/AMH değerleri homojenite açısından anlamlı olarak gösterilmiştir (Tablo 5).

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Tablo 5. Ratların serumlarında bakılan biyokimyasal parametrelerin tüm gruplar arasında karşılaştırılması

	Gruplar	Min.	Maks.	Ort.	±SD	n	p
AMH	• SF grubu	2,15	4,74	2,92	1,08	5	,03
	• EOY grubu	0,85	2,28	1,71	0,55	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	1,89	2,31	2,04	0,16	5	
	• EOY+MOH grubu	2,25	3,38	2,64	0,45	5	
FSH	• SF grubu	40,6	98,7	77,34	23,65	5	,03
	• EOY grubu	92,7	139,1	113,78	19	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	82,10	96,60	87,76	5,42	5	
	• EOY+MOH grubu	90,20	117,10	102,60	10,77	5	
FSH/ AMH oranı	• SF grubu	14,15	43,48	29,15	13,52	5	,00
	• EOY grubu	44,78	115,41	73,47	29,05	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	37,35	47,58	43,17	4,52	5	
	• EOY+MOH grubu	34,64	42,96	39,11	2,99	5	

Hesaplanmış olan bu ortalama değerler, ikili gruplar arasında birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre serum AMH değeri gruplar arasında anlamlı fark göstermemiştir. Serum FSH değeri sadece SF grubu ile EOY grubu arasında anlamlı olarak farklı görülmüştür; SF grubu ile EOY+PRP+MOH, EOY+MOH grubu arasında anlamlı fark görülmemiştir. Yine EOY+PRP+MOH ile EOY+MOH grubu arasında da anlamlı fark saptanmamıştır. Son olarak serum FSH/AMH düzeyi oranları EOY ve SF, EOY ve EOY+MOH grubu arasında anlamlı olarak farklı izlenmiştir. Erken ovarian yetmezlik ve EOY+PRP+MOH grubu arasında da p değeri 0,057 olarak hesaplanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6. Ratların serumlarında bakılan biyokimyasal parametrelerin ortalamalarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması

P değeri	AMH	FSH	FSH/AMH
SF EOY	,06	,01	,00
SF EOY+PRP+MOH	,29	1	1
SF EOY+MOH	1	0,15	1
EOY EOY+PRP+MOH	1	0,13	0,057
EOY EOY+MOH	,23	1	0,02
EOY+PRP+MOH EOY+MOH	,99	1	1

4.2. Histolojik İnceleme Bulguları

Tüm gruplara ait ovaryumlardan dokunun görüldüğü ilk kesitten itibaren art arda tüm ovaryum boyunca 5µm'lik 10 adet kesit alındı ve 40 kesit atlandı ve tekrar 10 kesit alındı. Tüm ovaryum bu şekilde tarandı ve her 10 kesitin ilk preparatı Hematoksilen &Eozin ile boyandı. Tüm ovaryumda bulunan folikül sayımı için önceden oluşturulan tabloya primordial, primer, sekonder, graaf ve atretik folikül sayımları yazıldı. Daha sonra bu tablonun istatistiksel analizi yapıldı. Tablo 7.'de ratların over dokularının histolojik incelemesinde bakılan folikül çeşitleri ve sayıları karşılaştırılmıştır. Primordial folikül sayısı SF grubunda ortalama 34,8 (20-52), EOY grubunda ortalama 23,8 (15-32), EOY+PRP+MOH grubunda ortalama 37,2 (27-54), EOY+MOH grubunda ortalama 34,8 (28-44); primer folikül sayısı SF grubunda ortalama 22,2 (18-30), EOY grubunda 12,8 (10-15), EOY+PRP+MOH grubunda 22,8 (13-30), EOY+MOH grubunda 24,6 (14-33); sekonder folikül sayısı SF grubunda ortalama 11 (8-16), EOY grubunda ortalama 7,4 (4-10), EOY+PRP+MOH grubunda ortalama 13 (7-24), EOY+MOH grubunda ortalama 24,6 (14-33); graaf folikül sayısı SF grubunda ortalama 5,2 (3-7), EOY grubunda ortalama 3 (2-4), EOY+PRP+MOH grubunda 2,4 ortalama (2-3), EOY+MOH grubunda ortalama 3 (1-5); atretik folikül sayısı SF grubunda ortalama 5,4 (4-7), EOY grubunda ortalama 25,8 (14-32), EOY+PRP+MOH ortalama 18 (15-23), EOY+MOH grubunda ortalama 16,2 (12-22) şeklinde hesaplanmıştır.

Tablo 7. Ratların over dokularının histolojik inceleme parametrelerinin tüm gruplar arasında karşılaştırılması

	Gruplar	Min.	Maks.	Ortalama	±SD	n	p
Primordial folikül	• SF grubu	20	52	34,8	12,15	5	,14
	• EOY grubu	15	32	23,8	23,8	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	27	54	37,2	10,68	5	
	• EOY+MOH grubu	28	44	34,8	6,76	5	
Primer folikül	• SF grubu	18	30	22,2	4,76	5	,01
	• EOY grubu	10	15	12,8	2,58	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	13	30	22,8	6,49	5	
	• EOY+MOH grubu	14	33	24,6	7,02	5	
Sekonder folikül	• SF grubu	8	16	11	3,31	5	,32
	• EOY grubu	4	10	7,4	2,4	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	7	24	13	6,67	5	
	• EOY+MOH grubu	5	17	9,8	5,06	5	
Graaf folikül	• SF grubu	3	7	5,2	1,78	5	,02
	• EOY grubu	2	4	3	1	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	2	3	2,4	0,54	5	
	• EOY+MOH grubu	1	5	3	1,58	5	

Atretik folikül	• SF grubu	4	7	5,4	1,51	5	,00
	• EOY grubu	19	32	25,8	4,96	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	15	23	18	3,16	5	
	• EOY+MOH grubu	12	22	16,2	4,60	5	

Hesaplanmış olan bu ortalama değerler, ikili gruplar arasında birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Buna göre primordial folikül sayıları ve sekonder folikül sayıları gruplar arasında anlamlı fark göstermemektedir. Primer folikül sayısı, EOY grubu ve EOY+MOH grubu arasında anlamlı olarak farklı hesaplanmışken, diğer gruplar arasında anlamlı fark göstermemektedir. Graaf folikül sayısı, SF grubu ve EOY+PRP+MOH grubu arasında anlamlı olarak farklı hesaplanmışken, diğer gruplar arasında anlamlı fark göstermemektedir.

Atretik folikül sayıları; SF grubu ve EOY grubu, SF grubu ve EOY+PRP+MOH grubu, SF grubu ve EOY+MOH grubu, EOY grubu ve EOY+PRP+MOH grubu, EOY grubu ve EOY+MOH grubu arasında anlamlı olarak farklı hesaplanmışken EOY+PRP+MOH grubu ve EOY+MOH grubu arasında anlamlı fark hesaplanmamıştır (Tablo 8).

Tablo 8. Ratların over dokularının histolojik inceleme parametrelerinin ortalamalarının ikili gruplar arasında karşılaştırılması

P değeri	Primordial folikül	Primer folikül	Sekonder folikül	Graaf folikül	Atretik folikül
SF EOY	,49	,09	1	,10	,00
SF EOY+PRP+MOH	1	1	1	,02	,00
SF EOY+MOH	1	1	1	,10	,00
EOY EOY+PRP+MOH	,22	,06	,45	1	,03
EOY EOY+MOH	,49	,02	1	1	,00
EOY+PRP+MOH EOY+MOH	1	1	1	1	1

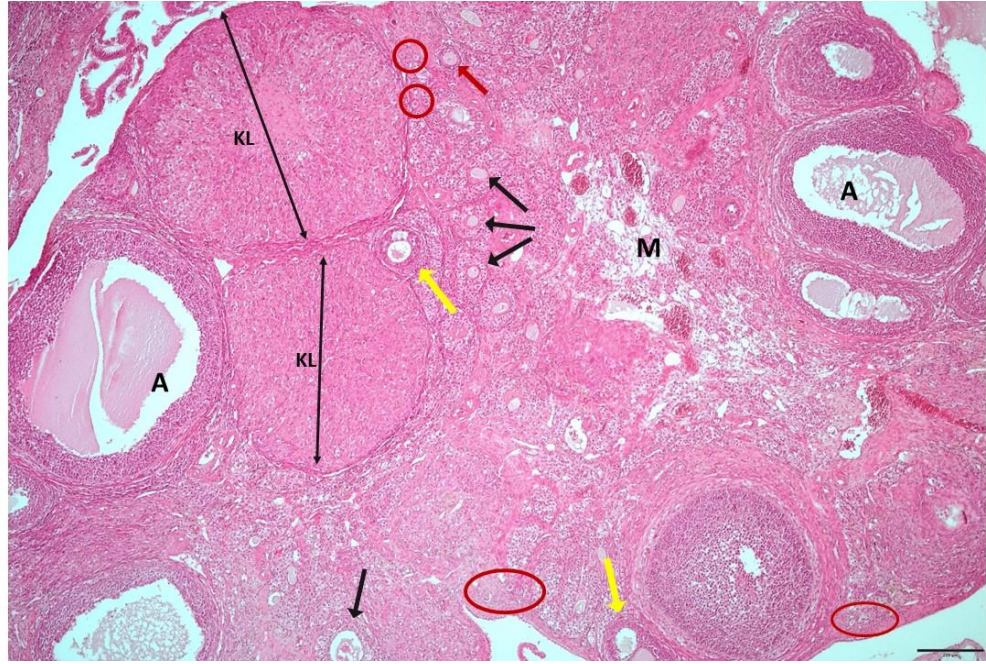
4.3. Histokimyasal Bulgular

4.3.1. Over Dokusuna Ait Hematoksilen & Eozin Boyama Değerlendirilmesi

Serum fizyolojik grubuna ait ovaryum kesitlerinde, ovaryum yüzeyinde tek katlı kübik epitel ile döşeli bir germinal epitel gözlendi. Epitelin hemen altında sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albuginea fibröz bağ dokusu lifleri ve hücreleri ile birlikte yer alıyordu. Ovarian medulla; gevşek bağ dokusu yapısında ve bol stromal hücreli olarak gözlendi. Kortekste farklı boyut ve aşamalarda, değişken sayıda foliküller (primordial, primer, sekonder, graaf ve atretik foliküller) ve korpus luteum

bulunmaktaydı. Oosit ve çevresinde bulunan zona pellusida normal görünümdeydi. Korteks stromasında yer alan ve foliküllerin arasını dolduran bağ dokusu hücreleri ve vasküler yapılar normal görünümdeydi (Şekil 3).

Şekil 3. SF grubuna ait kesitin Hematoksilen&Eozin boyaması



Kırmızı halkalar: Primordial foliküller, Kırmızı ok: Primer folikül, Sarı ok: Sekonder folikül, Siyah oklar: Atretik folikül, KL: Korpus luteum, A: Antrum, M: Medulla (x4, Bar 200 μ m)

Erken ovarian yetmezlik grubuna ait over kesitlerinde SF grubuna kıyasla normal histolojik görüntünün kaybı gözlemlendi. Öncelikle, kortekse dağılmış olan farklı aşamalarındaki foliküller incelendiğinde primordial ve primer foliküllerde azalma, korpus luteum sayısında bir miktar artış ve korpus luteum etrafında hemorajik alanların varlığı gözlemlendi. Kortekste yer alan atretik foliküllerde artış gözlemlendi. Çoğu folikül granüler hücrelerinin azalmasıyla dejenere olmuştu. Ayrıca over stromasında dilate kan damarları da görüldü (Şekil 4).

Şekil 4. EOY grubuna ait kesitin Hematoksilen&Eozin boyaması



Kırmızı halkalar: Primordial foliküller, Sarı ok: Sekonder folikül, Siyah ok: Atretik folikül, KL: Korpus luteum, M: Medulla (x4, Bar 200 µm)

Erken ovarian yetmezlik+PRP+MOH grubuna ait kesitler incelendiğinde; EOY grubuna kıyasla primordial ve primer folikül sayısında artış olduğu gözlemlendi. Erken ovarian yetmezlik grubu ile kıyaslandığında normal görünen farklı sayı ve boyuttaki folikül sayılarında artış olsa da SF grubuna kıyasla normal histolojik görüntünün tam olarak korunmadığı; korpus luteum ve atretik foliküller görünümde SF grubuna kıyasla artış olduğu gözlemlendi. Atretik folikül sayısında EOY grubuna kıyasla azalma gözlemlendi (Şekil 5).

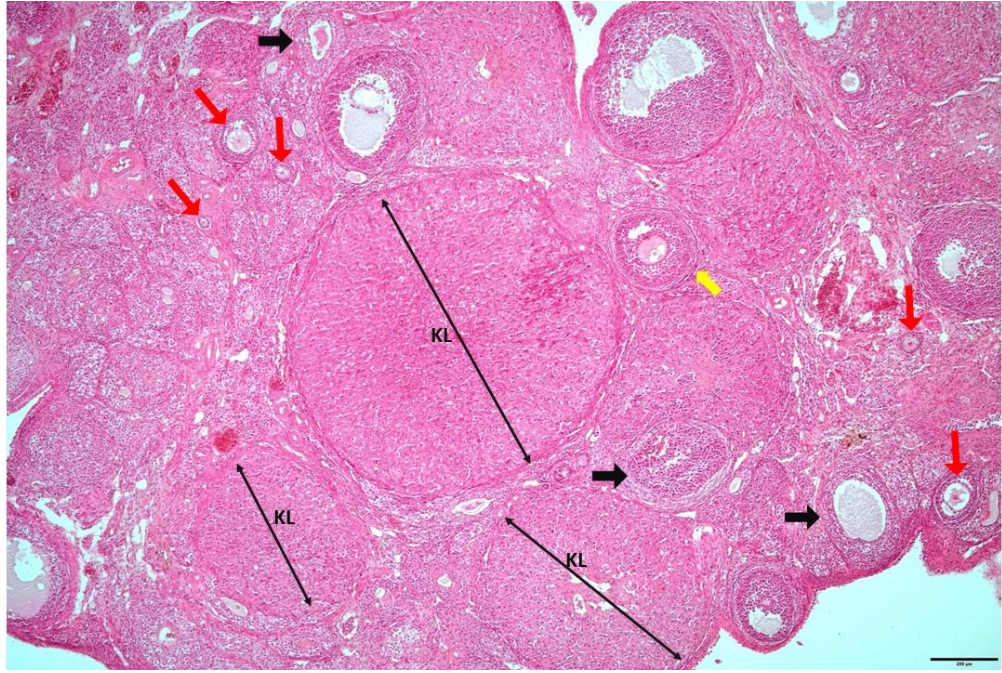
Şekil 5. EOY+PRP+MOH grubuna ait kesitin Hematoksilen&Eozin boyaması



Kırmızı halkalar: Primordial foliküller, Kırmızı ok: Primer foliküller, Sarı ok: Sekonder folikül, Siyah ok: Atretik foliküller (x4, Bar 200 µm)

Erken ovarian yetmezlik+MOH grubunun over kesitlerinde, EOY+PRP+MOH grubuna benzer şekilde sağlıklı ve farklı aşamalardaki foliküllerin artışı gözlemlendi. Atretik folikül sayısında EOY grubuna oranla azalma olduğu gözlemlendi (Şekil 6).

Şekil 6. EOY+MOH grubuna ait kesitin Hematoksilen&Eozin boyaması

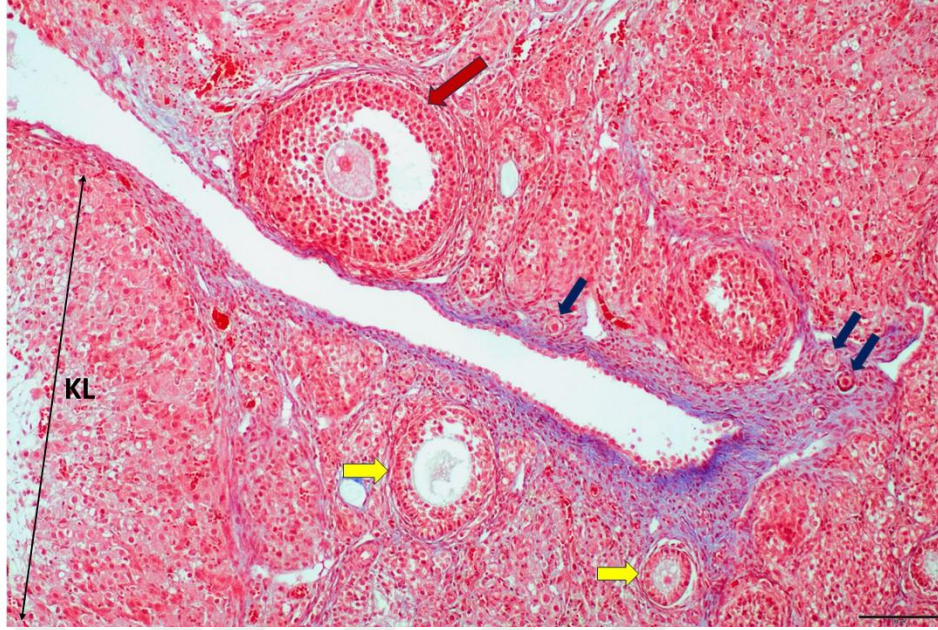


Kırmızı ok: Primer folikül, Sarı ok: Sekonder folikül, Siyah ok: Atretik foliküller, KL: Korpus luteum (x4, Bar 200 µm)

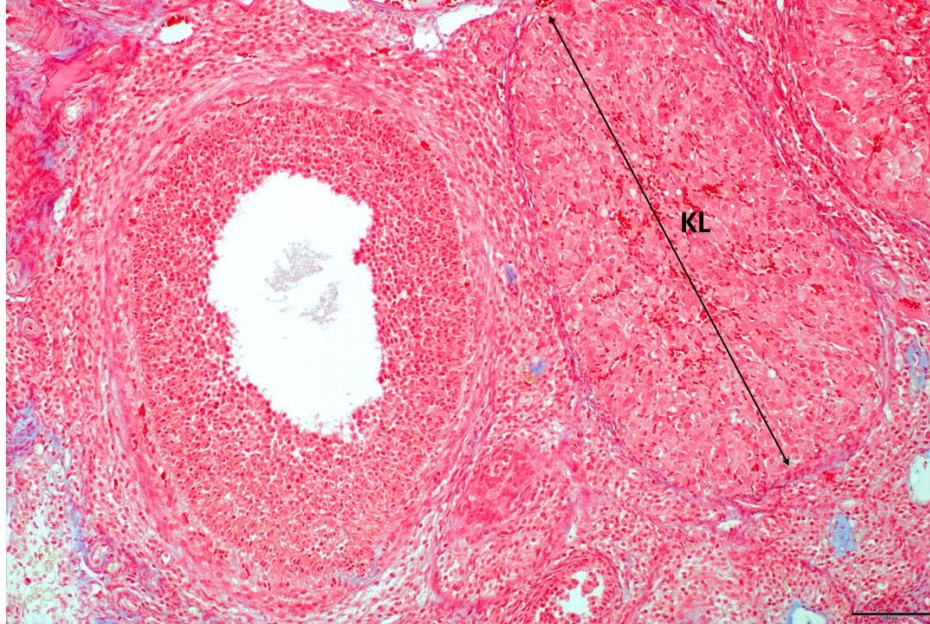
4.3.2. Over Dokusuna Ait Masson's Trikrom Boyası Değerlendirmesi

Serum fizyolojik grubunda Masson Trikrom ile boyanan kesitler normal görünümdeydi. Tunica albuginea kalınlığı, kortikal stroma ve medullar alandaki kollajen varlığı olağan görünümdeydi (Şekil 7). Erken ovarian yetmezlik grubuna ait kesitlere bakıldığında ise şiddetli kortikal fibrozis gözlemlendi. Özellikle atreziye uğrayan foliküllerin ve korpus luteum çevresinde stromada kollajen artışı oldukça belirgindi. Yine medullar alanda kollajen artışı belirgindi (Şekil 8).

Şekil 7. SF grubu over kesitine ait Masson Trikrom boyamaları

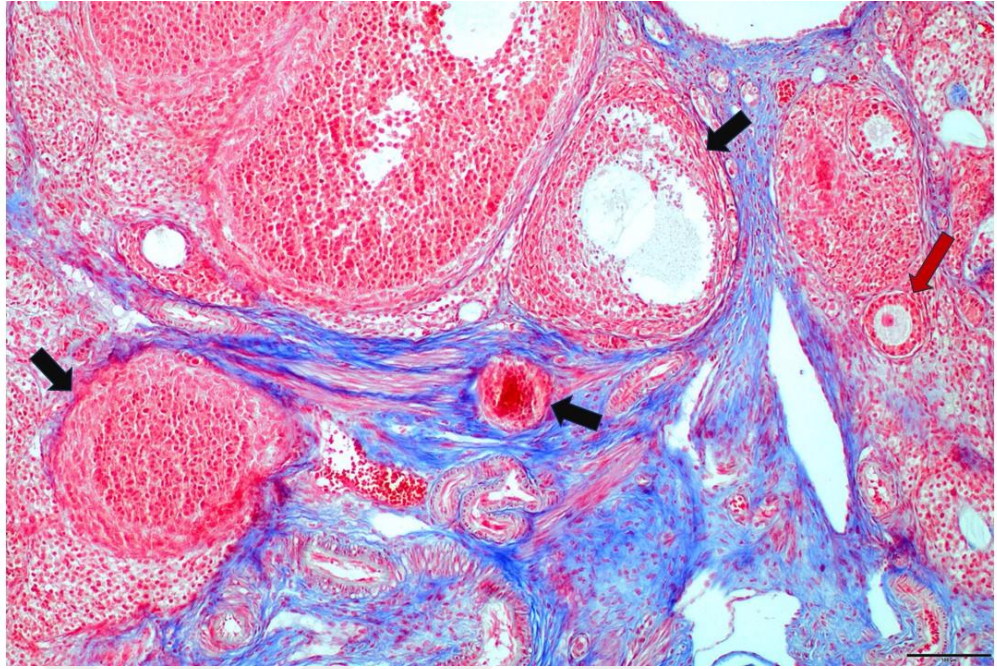


Tunica albuginea ve kortekste gelişen foliküller etrafındaki stromadaki normal histolojik görünüm. Kırmızı ok: Sekonder folikül, Mavi oklar: Primordial foliküller, Sarı oklar: Primer foliküller, KL: Korpus luteum (x10, Bar 100 μ m)

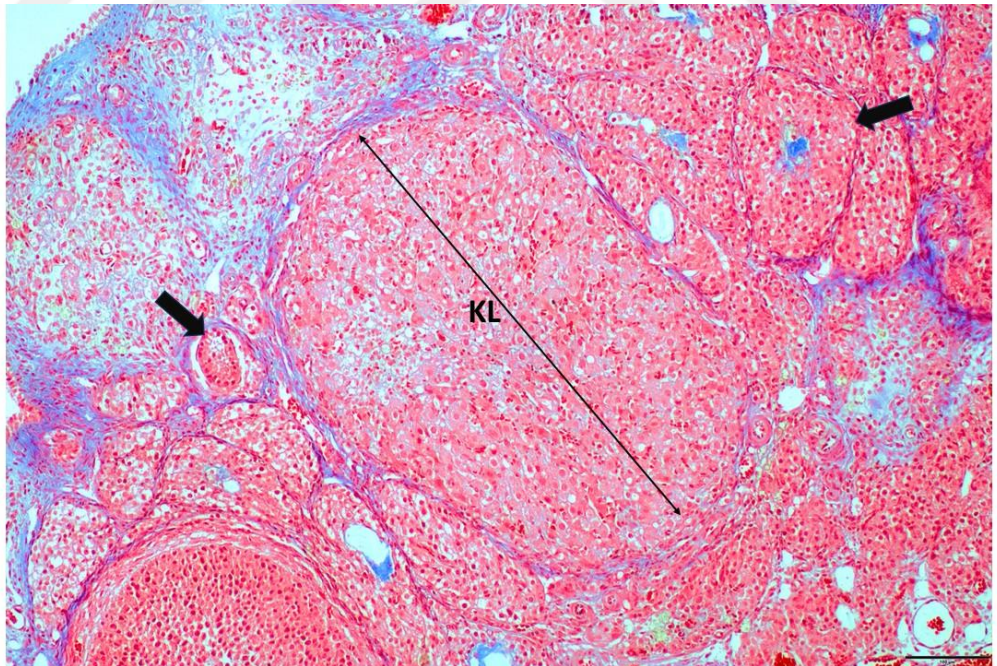


Kontrol grubu over kesitine ait Masson Trikrom boyaması. Korpus luteum ve gelişen folikül etrafındaki stromanın normal histolojik görüntüsü (x10, Bar 100 μ m)

Şekil 8. EOY grubu over kesitine ait Masson Trikrom boyamaları



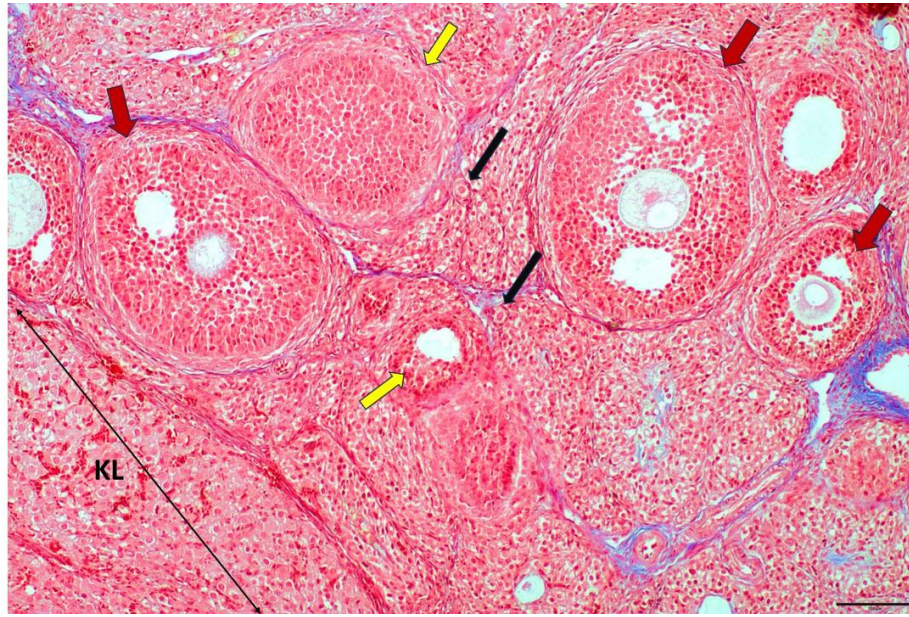
Gelişen foliküller ve atretik foliküller etrafındaki stromada şiddetli fibrozis.
Kırmızı ok: Primer folikül, Siyah oklar: Atretik foliküller (x10, Bar 100 µm)



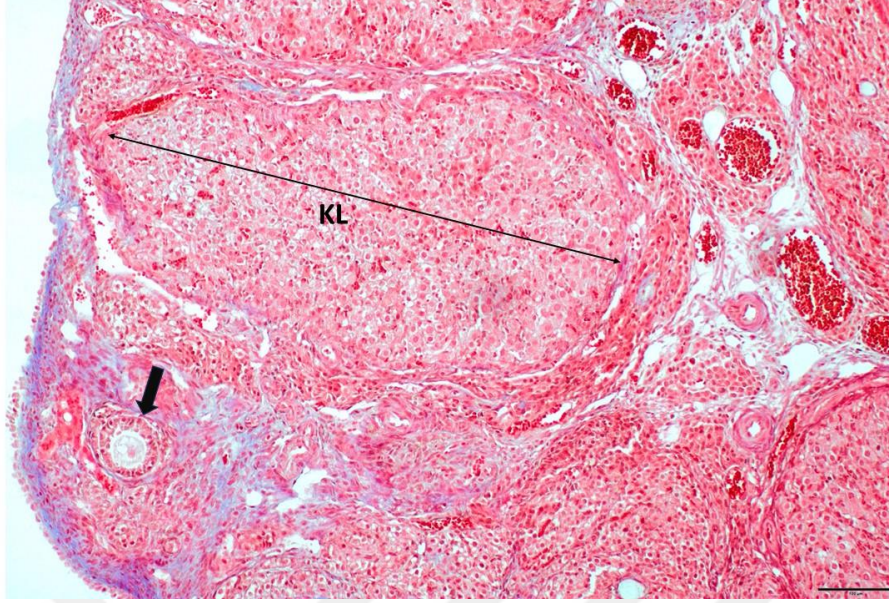
Korpus luteum ve atretik foliküller etrafındaki stromada belirgin fibrozis.
Siyah oklar: Atretik foliküller, KL: Korpus luteum (x10, Bar 100 µm)

Erken ovarian yetmezlik+PRP+MOH grubunun over kesitleri incelendiğinde fibrozisin EOY grubuna kıyasla oldukça azaldığı gözlemlendi (Şekil 9). Erken ovarian yetmezlik+MOH grubunun kesitlerinin Masson Trikrom boyaması incelendiğinde EOY grubuna kıyasla şiddetli fibroziste azalma gözlemlense de yine de SF grubu ile karşılaştırıldığında kortikal stromadaki ve medulladaki kollajen artışı belirgindi (Şekil 10).

Şekil 9. EOY+PRP+MOH grubu over kesitine ait Masson Trikrom boyamaları

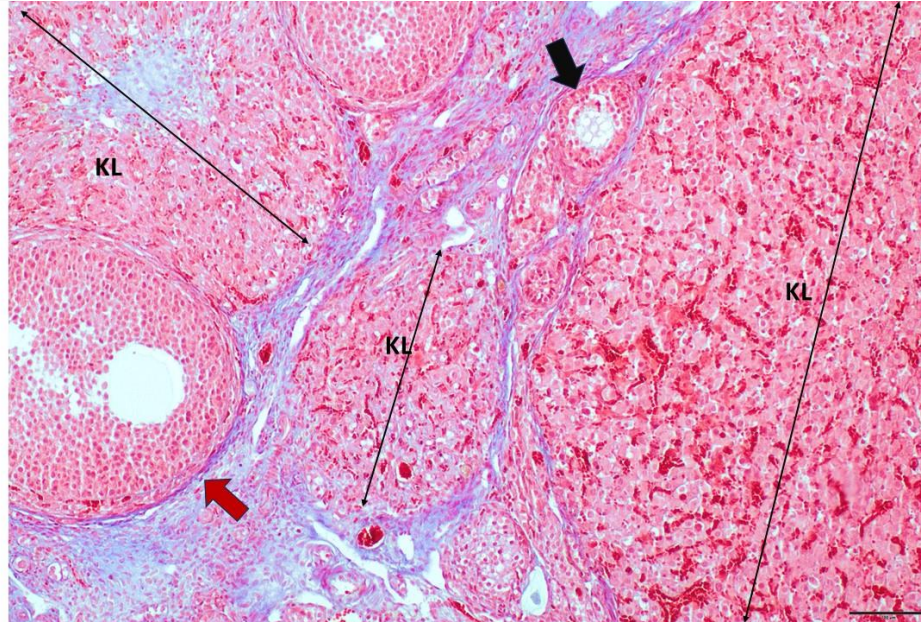


Kortekste gelişen foliküller etrafındaki kollajen görünümü. Kırmızı oklar: Sekonder foliküller, Siyah oklar: Primordial foliküller, Sarı oklar: Atretik foliküller, KL: Korpus luteum (x10, Bar 100 µm)

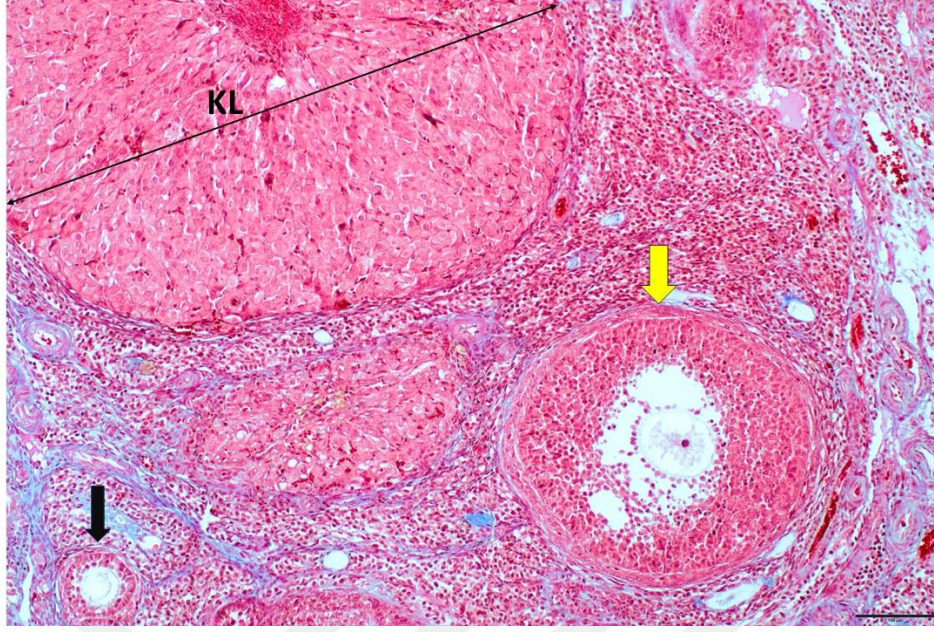


Over korteks görünümü. Siyah ok: Primer folikül, KL: Korpus luteum (x10, Bar 100 μ m)

Şekil 10. EOY+MOH grubu over kesitine ait Masson Trikrom boyamaları



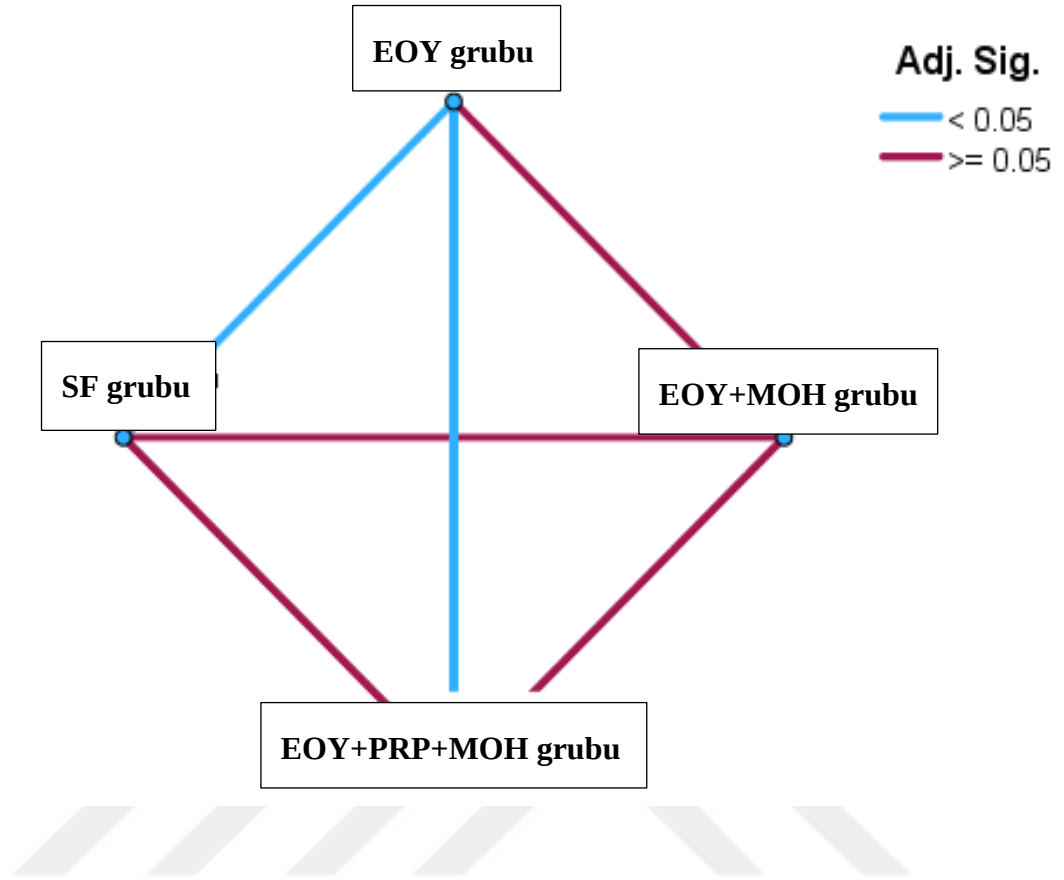
Kortekste gelişen foliküller ve korpus luteum etrafındaki stromada kontrol grubuna kıyasla belirgin kollajen artışı. Kırmızı ok: Sekonder folikül, Siyah oklar: Primer folikül, KL: Korpus luteum (x10, Bar 100 μ m)



Korteks ve medulladaki belirgin kollajen görünümü. Sarı ok: Sekonder folikül, Siyah ok: Primer folikül, KL: Korpus luteum (x10, Bar 100 μ m)

Gruplara göre Masson Trikrom boyamanın H skor dağılımına bakıldığında; EOY grubundaki fibrozis varlığının EOY+PRP+MOH ve SF gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($p=0,04$; $p=0,00$). Serum fizyolojik grubuna kıyasla EOY+MOH grubundaki kollajen artışı belirgin ($p=0,06$) ve EOY grubuna kıyasla EOY+MOH grubundaki fibrozis azalmış olsa da bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p=1$) (Şekil 11).

Şekil 11. Masson Trikrom skorlamalarının gruplar arasında karşılaştırılması



Tablo 9. Masson Trikrom, Ki67 ve kaspaz 3 skorlamaları

	Gruplar	Min.	Maks.	Ortalama	±SD	n	p
Masson trikrom	• SF grubu	0	1	0,2	0,44	5	,00
	• EOY grubu	2	3	2,8	0,44	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	0	1	0,8	0,44	5	
	• EOY+MOH grubu	1	3	2	0,70	5	
Ki67	• SF grubu	1	1	1	0	5	,01
	• EOY grubu	1	1	1	0	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	1	3	2	0,70	5	
	• EOY+MOH grubu	1	2	1,2	0,44	5	
Kaspaz 3	• SF grubu	1	2	1,4	0,54	5	,00
	• EOY grubu	2	3	2,6	0,54	5	
	• EOY+PRP+MOH grubu	0	1	0,8	0,44	5	
	• EOY+MOH grubu	1	2	1,6	0,54	5	

4.4. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.4.1. Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal Boyaması Bulguları

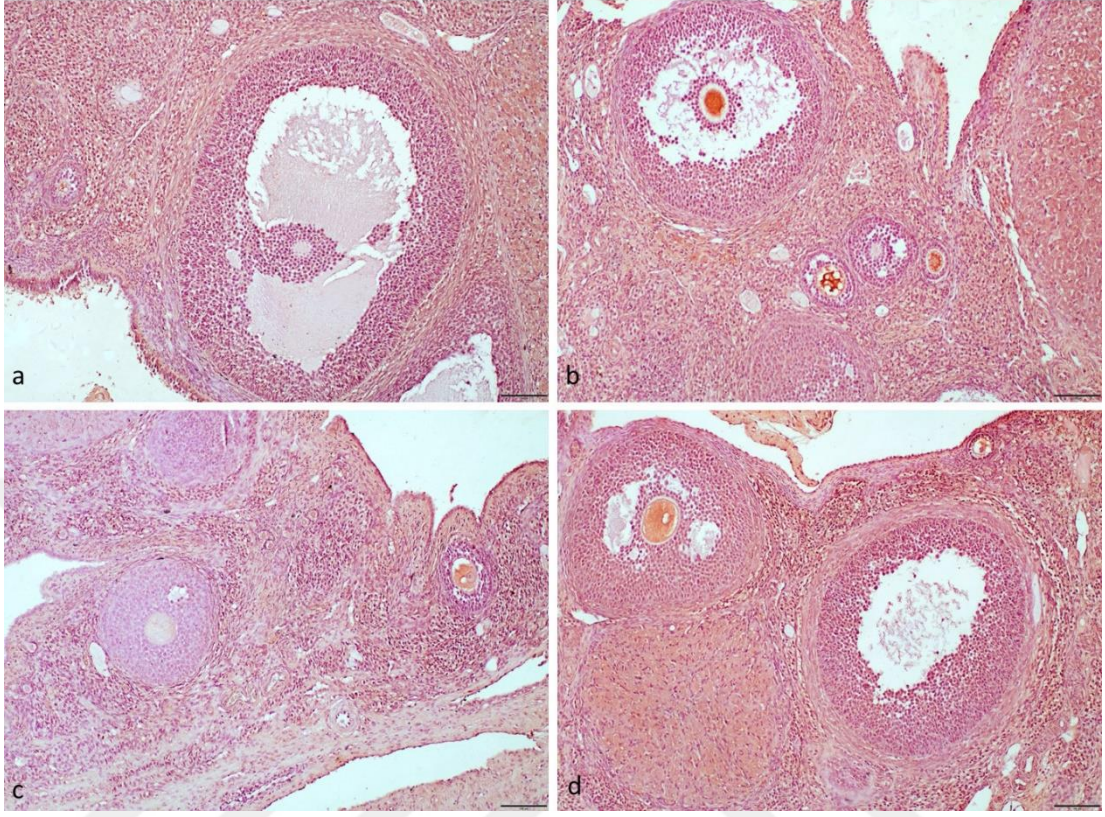
Apoptotik hücreleri tüm gruplarda gösterebilmek için alınan over kesitleri immünohistokimyasal olarak Kaspaz-3 poliklonal antikor ile işaretlendi. Apoptotik hücrelerin, gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerde, korpus luteum yapısında, stromal hücrelerde yer aldığı görüldü.

Serum fizyolojik grubunda Kaspaz-3 immün reaktivitesi incelendi. Granüloza hücrelerinde ve daha belirgin olarak teka internada, Kaspaz 3 pozitifliği bazal düzeyde gözlemlendi. Gelişimin farklı aşamalarında olan foliküllerde yer alan primer oositlerde de yer yer Kaspaz-3 için zayıf bir immün pozitiflik gözlemlendi. Korpus luteum hücrelerinde ise granüloza hücrelerine göre daha kuvvetli bir boyanma görüldü. (Şekil 12/a)

Erken ovarian yetmezlik grubu over kesitlerinde Kaspaz-3 immün reaktivitesi incelendiğinde pozitif hücre sayısının tüm alanlarda arttığı; farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerin granüloza hücrelerinde ve teka internada, oositlerde ve korpus luteumda immün pozitifliğin belirgin olduğu görüldü (Şekil 12/b). Ancak istatistiksel olarak bu artış anlamlı değildi ($p=0,15$) (Şekil 13).

Erken ovarian yetmezlik+PRP+MOH grubuna ait over kesitlerinde Kaspaz-3 immün reaktivitesi incelendiğinde, granüloza ve korpus luteum hücrelerinde ve oositte EOY grubuna göre daha zayıf bir boyanma gözlemlendi ve immün pozitiflikteki bu azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,00$) (Şekil 12/c; Şekil 13).

Şekil 12. Kaspaz-3 İmmünohistokimyasal boyaması

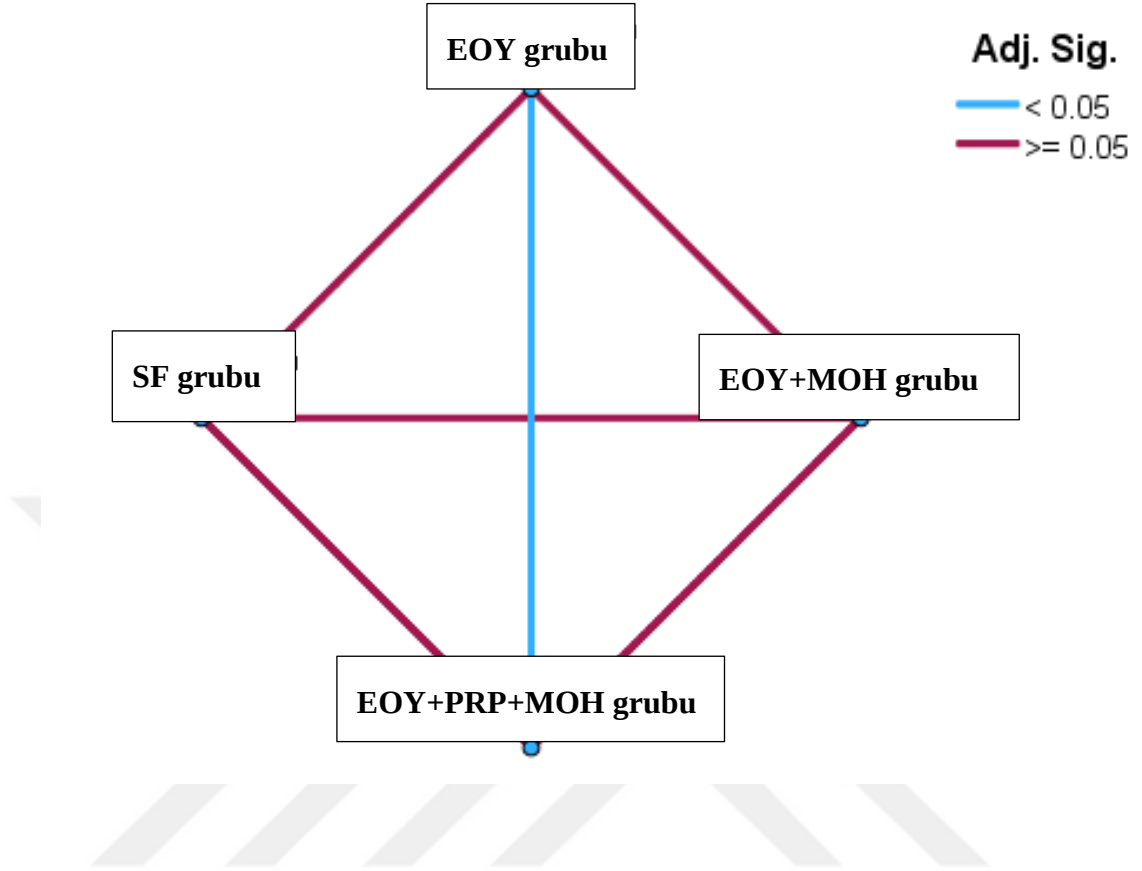


a) SF grubu, b) EOY grubu, c) EOY+PRP+MOH grubu, d) EOY+MOH grubu (x10, Bar:100 μ m)

Serum fizyolojik grubuyla kıyaslandığında ise immün pozitif hücre sayısı foliküllerde benzer şekildeyken, diğer alanlarda daha az belirgindi ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=1$) (Şekil 13).

Erken ovarian yetmezlik+MOH grubuna ait over kesitlerinde Kaspaz-3 immün reaktivitesi incelendiğinde ise EOY grubu ile kıyaslandığında immün pozitif hücre sayısının azaldığı, SF ve EOY+PRP+MOH grupları ile kıyaslandığında ise immün pozitifliğin arttığı görüldü (Şekil 12/d). Ancak bu değişiklikler istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,44$; $p=1$; $p=0,57$) (Şekil 13).

Şekil 13. Kaspaz-3 skorlamalarının gruplar arasında karşılaştırılması



4.4.2. Ki-67 İmmünohistokimyasal Boyaması Bulguları

Tüm gruplardaki over kesitleri immünohistokimyasal olarak Ki-67 poliklonal antikor ile işaretlendi. Ki-67 immünpozitif hücrelerin gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerde, korpus luteum yapısında, stromal hücrelerde yer aldığı görüldü.

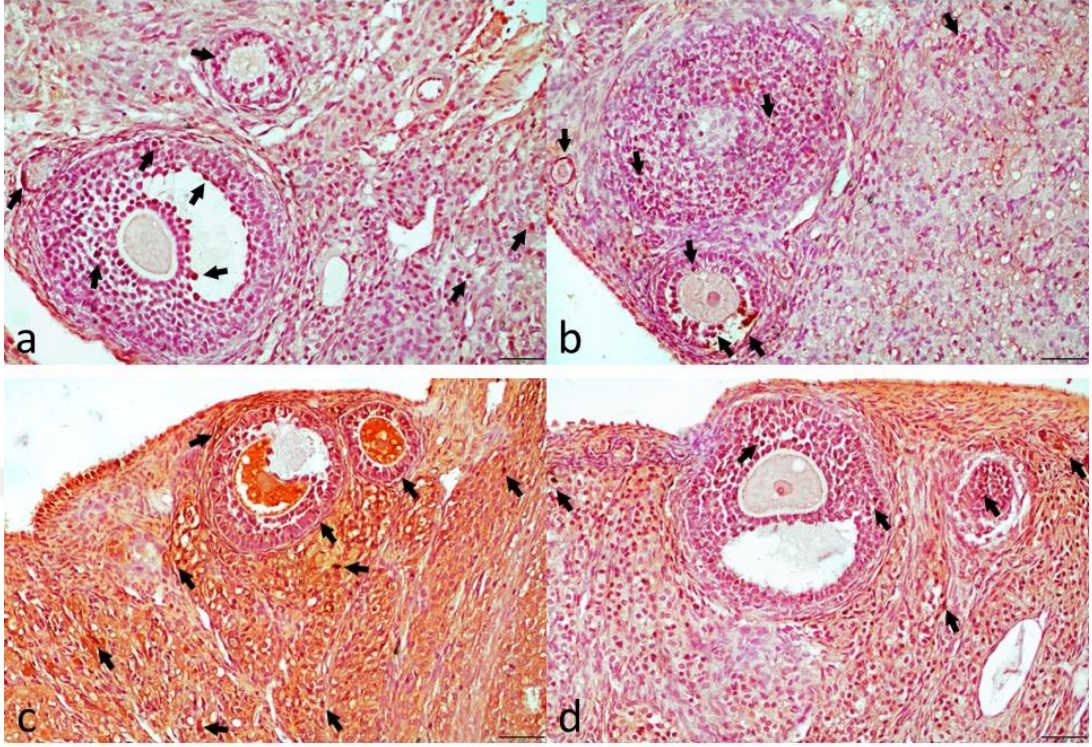
Serum fizyolojik grubunda Ki-67 immün reaktivitesi incelendi. Granüloza hücrelerinde daha belirgin olmakla birlikte korteksteki diğer hücrelerde de immün pozitiflik gözlemlendi. Korpus luteum hücrelerinde ise granüloza hücrelerine göre daha zayıf bir boyanma görüldü. (Şekil 14/a)

Erken ovarian yetmezlik grubu over kesitlerindeki Ki-67 immün reaktivitesi incelendiğinde immün pozitif hücre sayısının bazı örneklerde azaldığı, bazı örneklerde ise SF grubu ile benzer olduğu görüldü. Yine farklı gelişim aşamalarındaki foliküllerin granüloza hücrelerinde immün pozitiflik diğer hücrelere kıyasla daha belirgindi (Şekil 14/b). Ancak istatistiksel olarak bu azalma anlamlı değildi ($p=1$) (Şekil 15).

Erken ovarian yetmezlik+PRP+MOH grubundaki Ki-67 immün reaktivitesi incelendiğinde, tüm kortikal alandaki hücrelerde SF ve EOY grubuna göre daha kuvvetli bir boyanma gözlemlendi ve immün pozitiflikteki bu artış her iki gruba göre de istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,02$; $p=0,02$) (Şekil 14/c; Şekil 15).

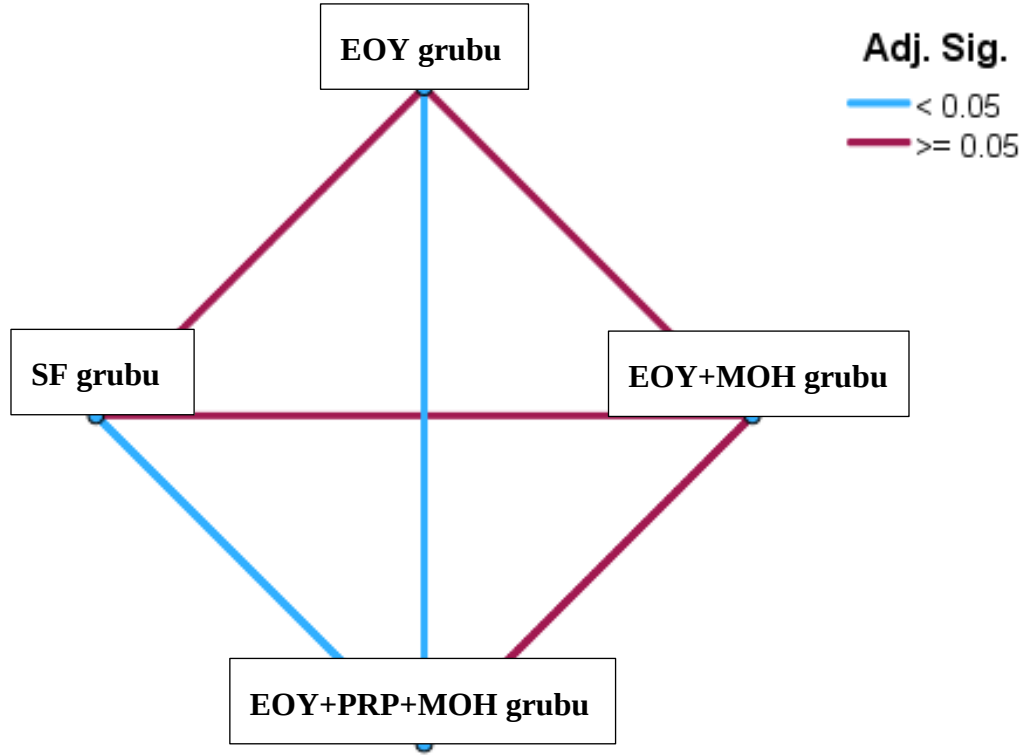
Erken ovarian yetmezlik+MOH grubuna kesitlerindeki Ki-67 immün reaktivitesi incelendiğinde ise bu grup EOY grubu ile kıyaslandığında immünpozitif hücre sayısında artış eğilimi olsa da immünhistokimyasal bulguları benzerdi ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p=1$) (Şekil 14/d ve Şekil 15). Erken ovarian yetmezlik+MOH grubu ve EOY+PRP+MOH grubu ile kıyaslandığında immünpozitif hücre sayısı belirgin olarak azalmış olsa da bu azalma istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p=0,17$) (Şekil 15).

Şekil 14. Ki-67 İmmünohistokimyasal boyaması



a) Kontrol grubu: Primordial, primer ve sekonder foliküldeki granüloza hücrelerindeki immün pozitif hücelere dikkat ediniz. b) EOY grubu, c) EOY+PRP+MOH grubu: Her alanda kuvvetli immün pozitiflik. d) EOY+MOH grubu. Siyah oklar: immün pozitif hücre örnekleri (x20, Bar:50 µm)

Şekil 15. Ki-67 skorlamalarının gruplar arasında karşılaştırılması



5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Erken ovarian yetmezlik tanılı hastalarda FSH değeri normalden yüksektir (>25 IU/L) ve ovarian rezervin azalmasına bağlı olarak serum AMH değeri ve antral folikül sayısı azalmıştır(29,178). Ahmadian S. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada EOY modeli oluşturulmuş ratlarda intraovarian PRP enjeksiyonunun ovulasyon ve FSH değeri üzerindeki etkisi araştırılmıştır(11). Her grupta 15 adet rat olacak şekilde ratlar 5 gruba ayrılmıştır. Grup 1, EOY+düşük konsantrasyonlu PRP; grup 2, EOY+yüksek konsantrasyonlu PRP; grup 3, EOY+intraovarian normal salin enjeksiyonu; grup 4, sadece EOY modeli uygulanmış grup; grup 5, hiçbir uygulama gerçekleştirilmemiş olan grup olarak tanımlanmıştır. Sekiz haftalık izlem sonucunda, PRP enjeksiyonu sonrası normal morfolojide olan folikül sayısının anlamlı olarak artmış görüldüğü (kontrol grubu [grup 5]: $94,33 \pm 44,46$; grup 4: 0 ± 0 ; grup 3: 0 ± 0 ; grup 1: $26,67 \pm 2,517$; grup 2: $37,67 \pm 5,132$) iddia edilmiştir ($p < 0,05$). Grup 3 ve grup 4'teki atretik folikül sayılarının da diğer gruplara göre anlamlı olarak artmış olduğu (kontrol grubu: $33,00 \pm 19,00$; grup 4: $88,00 \pm 34,77$; grup 3: $81,33 \pm 27,02$; grup 1: $30,33 \pm 14,26$; grup 2: $23,00 \pm 7,00$) iddia edilmiştir ($p < 0,05$). Serum FSH değerinin gruplar arasında farklı olduğu gösterilmiş olsa da istatistiksel olarak anlamlı bir fark gösterilememiştir. Diğer pek çok çalışmada da serum FSH düzeyinin gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark etmediği hesaplanmıştır(179–181).

Çalışmamızda serum FSH değeri yalnızca SF ve EOY grubu arasında anlamlı fark göstermekte olup, diğer gruplar içinde ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır. Atretik folikül sayıları ise EOY+PRP+MOH ve EOY+MOH grupları arasında istatistiksel olarak anlamsız bulunmuş olup; diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında EOY grubunda anlamlı olarak en çok, SF grubunda anlamlı olarak en az sayıda olarak saptanmıştır. Graaf folikül sayısı SF grubunda, EOY+PRP+MOH grubuna göre anlamlı sayıda yüksek; primer folikül sayısı EOY+MOH grubunda EOY grubunda göre anlamlı olarak yüksek bulunmuştur.

Literatürde EOY modeli oluşturulmuş ratlarda intraovarian ya da intraperitoneal yol ile verilen PRP'nin serum AMH değerlerini direkt olarak kıyaslayan bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak Özcan P. ve arkadaşlarının yapmış olduğu intraperitoneal siklofosfamid ile beraber verilen intraperitoneal PRP enjeksiyonunun, siklofosfamid üzerine koruyucu etkisini araştıran bir çalışmada serum AMH değerleri toplam 32 ratın bulunduğu dört rat grubu arasında (Kontrol grubu [grup 1]: intraperitoneal 1mL/kg SF enjeksiyonu; grup 2: İntraperitoneal 75 mg/kg tek doz siklofosfamid ve 1 mL/kg SF enjeksiyonu; grup 3: İntraperitoneal 75 mg/kg tek doz siklofosfamid ve intraperitoneal tek doz 200 µg PRP enjeksiyonu; grup 4: İntraperitoneal tek doz 200 µg PRP enjeksiyonu) karşılaştırılmıştır(3). Serum AMH düzeyleri grup 2'de; grup 1, grup 3 ve grup 4'e göre anlamlı olarak azalmış olduğu iddia edilmiştir (sırasıyla $p<0,01$, $p<0,01$, $p=0,04$).

Çalışmamızda hematoksilin&eoizin boyama ile yapılan histolojik incelemelerde EOY grubunda diğer gruplara göre azalmış primordial, primer, graaf folikül sayısı ve artmış atretik folikül sayısına rağmen; serum AMH değeri ikili gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemiş olup, en küçük p değeri SF ve EOY grupları arasında saptanmıştır ($p=0,06$). Erken ovarian yetmezliğin otoimmünite nedeniyle durumlarında da tanı anında folikül havuzunun korunmuş olabilmesi nedeni ile AMH normal aralıkta saptanabilmektedir(182). Bu havuzun zamanla atreziye gitmesi ile zaman içerisinde de AMH seviyeleri düşmektedir(183). Bu açıdan bakılacak olursa histolojik bulguların biyokimyasal bulguların önüne geçtiği ve oosit elde etme ihtimali açısından daha anlamlı tahminler sunabildiği göz önünde bulundurulmalıdır.

Literatürde EOY modeli oluşturulmuş ratlarda intraovarian ya da intraperitoneal yol ile verilen PRP'nin over dokuları üzerinde Masson's Trikrom ile fibrozis incelemesi ve immunohistokimyasal olarak bir proliferasyon göstergesi olan Ki67 ve apoptozis göstergesi olan Kaspaz 3 skorlamalarını direkt olarak kıyaslayan bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak Kaplan S. ve arkadaşlarının yapmış olduğu adalimumabın ratlarda ovarian rezervi ve folikül gelişimini artırdığını iddia ettiği ve

sonuçlarını serum AMH, folikül sayısı ve ovarian fibrozis skorlamalarını karşılaştırdıkları bir çalışmada toplam 21 adet rat üç eşit gruba (Grup 1: Kontrol; grup 2: 2 mg/kg intraperitoneal adalimumab; grup 3: 5 mg/kg intraperitoneal adalimumab; 4 hafta boyunca her gün intraperitoneal) bölünmüştür(175). Grup 3'teki ratların serum AMH değerleri, diğer iki gruba göre anlamlı derecede yüksek ve fibrozis skorlaması hesaplamalarında anlamlı derecede düşük izlenmiştir.

Çalışmamızda ise EOY grubunun SF ve EOY+PRP+MOH ile anlamlı derecede fibrozis skorlaması farkı izlenmiştir ancak bu durum serum AMH değerleri ile ters orantılı olsa bile (fibrozis skoru artarken serum AMH seviyesinin düşmüş olması) bu istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Erken ovarian yetmezlik tanılı hastalarda intraovarian PRP enjeksiyonunun etkilerini inceleyen çalışmalara bakıldığında Sills ES. ve arkadaşları, EOY tanılı ve intraovarian PRP enjeksiyonu sonrası iki haftada bir bakılacak şekilde IVF planı olan 4 hastanın serum AMH ve FSH değerlerini takip etmişlerdir(184). Tüm hastaların serum AMH değerlerinin arttığını ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığını ($p=0,17$), FSH değerlerinin anlamlı şekilde azaldığını ($p=0,01$) iddia etmişlerdir. Yapılan işlemlerden sonra her hastadan yaklaşık 4-7 adet oosit ve en az bir adet blastokist elde edilebilmiştir. Esas olarak PRP tedavisinin ardından elde edilen bu oosit sayısındaki artışın mekanizması halen tam olarak açıklanamamaktadır. Ovarian fonksiyonlardaki değişikliği başlatan bu sinyallerin iki nedenden dolayı olduğu düşünülmektedir. Bunlardan birisi elde edilen bu oositlerin en başından beri overde ancak uykuda olduğu, standart gonadotropinlerle ve PRP sayesinde çok sayıda büyüme faktörünün yardımıyla uyandırıldığıdır. Diğer neden ise PRP ile ilişkili büyüme sinyalleri sayesinde overde bulunan kök hücrelerin aktive olarak yeni oosit gelişimini etkilemesidir. Bu son bahsedilen neden, overde postnatal oogenezi iddia etmektedir. Bu iddiayı da literatürde hem destekleyen(185–189) hem de bu iddiaya karşı çıkan(190,191) çalışmalar mevcuttur.

‘Genel bilgiler’ kısmında IVA ve ilaçsız IVA konusunun da daha detaylı bahsedildiği üzere, bu yöntemlerin EOY tanılı hastalarda folikül gelişimini uyarabildiği iddia edilmiştir. Tanaka Y. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada laparoskopi sırasında *in situ* olarak ovarian kortekse uygulanan soğuk makas ile insizyonun, folikül gelişimine katkıda bulunabileceği, IVF için gerekli olan olgun oositleri elde etmek için faydalı olabileceği kanıtlanmaya çalışılmıştır(15).

Bu durumdan da yola çıkılarak, PRP uygulanması sırasında da overe verilen mekanik hasarın, aynı ovum toplama (ovum pick-up, OPU) sırasında olduğu gibi, folikül gelişimde etkili olduğu iddia edilebilir. Muhtemel faydanın PRP aracılığı ile mi, yoksa ovarian hasardan mı kaynaklı olduğu net olmamakla birlikte; OPU sırasında ovarian korteks ve stromanın kanatıldığı, hormonal ve foliküler aktivasyonla büyüme hormonlarının devreye girdiği düşünülerek OPU sonrası 1-2 ay içerisinde daha çok gebelik görme nedenimiz bununla ilgili olabilir(192).

Polikistik over sendromunda (PCOS) sklerotik over kapsüllerine uygulanan *ovarian drilling* yöntemi ya da over kapsülünün kama şeklinde kısmi rezeksiyonu sonrası gonadotropin tedavisinin de yardımıyla canlı doğum oranının artırıldığı sonucunu gösteren çalışmalar mevcuttur(193,194). Bu durumun da mekanik hasarın Hippo sinyal yolağını baskılaması, hapsolmuş foliküllerin gelişimini uyarması ve ovulasyonun sağlanması gibi etkilerle olduğu iddia edilmiştir.

Çalışmamızda EOY modeli oluşturulmuş ratlarda mekanik ovarian hasar ile SF ve EOY grubunun kıyaslanmasına bakıldığında sonuç olarak;

- Primordial folikül sayılarının SF ve EOY grubuna göre arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=1$, $p=0,49$),
- Primer folikül sayılarının EOY grubuna göre anlamlı yükseldiği ($p=0,02$),

- Sekonder folikül ve graaf sayılarında diğer gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı ($p=1$),
- Atretik folikül sayılarında SF grubuna göre anlamlı şekilde bir artış olduğu ($p=0,00$) ve EOY grubuna göre anlamlı bir şekilde azalma olduğu ($p=0,00$),
- Serum AMH düzeylerinin SF grubuna göre bir miktar azalma gösterdiği ve serum FSH düzeyinin SF grubuna göre artmış olduğu (sırasıyla $p=1$, $p=0,15$), EOY grubuna göre serum AMH değerinin yükselmiş ve serum FSH değerinin bir miktar düşmüş olduğu ancak bunların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı (sırasıyla $p=0,23$, $p=1$),
- Masson trikrom ile yapılan fibrozis skorlamasında her ne kadar SF grubuna kollajen artışının belirgin olduğu histolojik olarak görülse de H skorunun attığı ve EOY grubuna göre azaldığı, ancak bunların istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p=0,06$, $p=1$)
- İmmunohistokimyasal olarak Ki-67 ile yapılan boyamada proliferasyonun SF ve EOY grubuna göre arttığı ancak bu artışın anlamlı olmadığı ($p=1$, $p=1$)
- İmmunohistokimyasal olarak Kaspaz-3 ile yapılan boyamada apoptozun EOY grubuna göre azaldığı ancak bu azalmanın anlamı olmadığı ($p=0,44$) gösterilmiştir.

Sadece EOY+PRP+MOH grubunda bulunan ratlarla ile EOY+MOH grubunda bulunan ratlar kıyaslandığında EOY+PRP+MOH grubuna göre EOY+MOH grubunda;

- Primordial sayısında azalma, primer folikül sayısında artma, sekonder folikül sayısında azalma, graaf folikül sayısında artma, atretik folikül sayısında azalma izlenmiş olsa da bu farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır (tüm sonuçlarda $p=1$).

- Serum FSH ve AMH düzeyi artmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,99$, $p=1$).
- Masson trikrom ile yapılan fibrozis skorlamasında H skoru artmıştır ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,58$).
- İmmunohistokimyasal olarak Ki-67 ile yapılan boyamada proliferasyonun daha az olduğu görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,17$).
- İmmunohistokimyasal olarak Kaspaz-3 ile yapılan boyamada apoptozun daha fazla olduğu görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p=0,57$).

Başka bir açıdan bakılacak olunursa; EOY+PRP+MOH grubu ile EOY+MOH grubu arasındaki farkı etkileyecek olan unsurlardan birinin de PRP'nin verildiği sırada gerçekleşen ovarian hasarı, PRP'nin kendisinin de ne kadar iyileşmesine katkıda bulunduğu da belirli değildir. Mekanik hasarın folikül aktivasyon etkisini sınırlayıp elde edebileceğimiz maksimum folikül sayısını azalttığı ya da anlamlı bir engel teşkil edip etmediği konusu net değildir.

Literatürde intraovarian PRP enjeksiyonunun mu yoksa bu enjeksiyon sırasında verilen mekanik hasarın mı folikül gelişiminde etkili olduğunu gösteren yeterli veri bulunmamaktadır. Hem insanlarda hem de hayvanlarda yapılan çalışmalar arasında bu çalışma bu konuyu ortaya koymaya çalışan bilinen ilk çalışmadır. Yapılacak olan prospektif randomize çalışmalara yol gösterebilmek adına daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

6. KAYNAKÇA

1. Rudnicka E, Kruszewska J, Klicka K, Kowalczyk J, Grymowicz M, Skórska J, et al. Premature ovarian insufficiency - aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Przegląd Menopauzalny*. 2018 Sep;17(3):105–8.
2. Zhang X, Han T, Yan L, Jiao X, Qin Y, Chen ZJ. Resumption of Ovarian Function After Ovarian Biopsy/Scratch in Patients With Premature Ovarian Insufficiency. *Reproductive Sciences*. 2019 Feb;26(2):207–13.
3. Ozcan P, Takmaz T, Tok OE, Islek S, Yigit EN, Ficicioglu C. The protective effect of platelet-rich plasma administrated on ovarian function in female rats with Cy-induced ovarian damage. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics [Internet]*. 2020 Apr;37(4):865–73.
4. Huang J, Zeng F, Xu Q, Ma J. Cryptotanshinone decreases granulosa cell apoptosis and restores ovarian function in mice with premature ovarian failure. *General Physiology and Biophysics*. 2020 May;39(3):277–83.
5. Sales CF, Melo RMC, Pinheiro APB, Luz RK, Bazzoli N, Rizzo E. Autophagy and Cathepsin D mediated apoptosis contributing to ovarian follicular atresia in the Nile tilapia. *Molecular Reproduction and Development*. 2019 Nov 1;86(11):1592–602.
6. Matsuda F, Inoue N, Manabe N, Ohkura S. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. *Journal of Reproduction and Development*. 2012;58(1):44–50.
7. Dehghani F, Aboutalebi H, Esmaeilpour T, Panjehshahin MR, Bordbar H. Effect of platelet-rich plasma (PRP) on ovarian structures in cyclophosphamide-induced ovarian failure in female rats: a stereological study. *Toxicology Mechanisms and Methods [Internet]*. 2018 Nov;28(9):653–9.
8. Panda SR, Sachan S, Hota S. A Systematic Review Evaluating the Efficacy of Intra-Ovarian Infusion of Autologous Platelet-Rich Plasma in Patients With Poor Ovarian Reserve or Ovarian Insufficiency. *Cureus*. 2020 Dec 12;12;12(12).
9. Sfakianoudis K, Simopoulou M, Grigoriadis S, Pantou A, Tsioulou P, Maziotis E, et al. Reactivating Ovarian Function through Autologous Platelet-Rich Plasma Intraovarian Infusion: Pilot Data on Premature Ovarian Insufficiency, Perimenopausal, Menopausal, and Poor Responder Women. *Journal of Clinical Medicine*. 2020 Jun 10;9(6):1809.
10. Petryk N, Petryk M. Ovarian Rejuvenation Through Platelet-Rich Autologous Plasma (PRP)—a Chance to Have a Baby Without Donor Eggs, Improving the Life Quality of Women Suffering from Early Menopause Without Synthetic Hormonal Treatment. *Reproductive Sciences*. 2020 Nov;27(11):1975–82.
11. Ahmadian S, Sheshpari S, Pazhang M, Bedate AM, Beheshti R, Abbasi MM, et al. Intra-ovarian injection of platelet-rich plasma into ovarian tissue promoted rejuvenation in the rat model of premature ovarian insufficiency and restored

- ovulation rate via angiogenesis modulation. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2020 Aug 5;18(1):1–13.
12. Anderson RA, Cameron D, Clatot F, Demeestere I, Lambertini M, Nelson SM, et al. Anti-Müllerian hormone as a marker of ovarian reserve and premature ovarian insufficiency in children and women with cancer: A systematic review. *Human Reproduction Update*. Oxford University Press; 2022 May 2;28(3):417–34.
 13. Jiao X, Meng T, Zhai Y, Zhao L, Luo W, Liu P, et al. Ovarian Reserve Markers in Premature Ovarian Insufficiency: Within Different Clinical Stages and Different Etiologies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Mar 18;12:601752.
 14. Lee HN, Chang EM. Primordial follicle activation as new treatment for primary ovarian insufficiency. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*. Korean Society for Reproductive Medicine; 2019 Jun;46(2):43–9.
 15. Tanaka Y, Hsueh AJ, Kawamura K. Surgical approaches of drug-free in vitro activation and laparoscopic ovarian incision to treat patients with ovarian infertility. *Fertil Steril*. 2020 Dec 1;114(6):1355–7.
 16. Devenutto L, Quintana R, Quintana T. In vitro activation of ovarian cortex and autologous transplantation: A novel approach to primary ovarian insufficiency and diminished ovarian reserve. *Human Reproduction Open*. 2020 Oct 3;2020(4).
 17. Cordeiro CN, Christianson MS, Selter JH, Segars JH. In Vitro Activation: A Possible New Frontier for Treatment of Primary Ovarian Insufficiency. *Reproductive Sciences*. 2016;23(4):429–38.
 18. Mashayekhi M, Mirzadeh E, Chekini Z, Ahmadi F, Eftekhari-Yazdi P, Vesali S, et al. Evaluation of safety, feasibility and efficacy of intra-ovarian transplantation of autologous adipose derived mesenchymal stromal cells in idiopathic premature ovarian failure patients: non-randomized clinical trial, phase I, first in human. *Journal of Ovarian Research*. 2021 Dec 1;14(1):5.
 19. Fabregues F, Ferreri J, Mendes M, Calafell JM, Otero J, Farre R. In Vitro Follicular Activation and Stem Cell Therapy as a Novel Treatment Strategies in Diminished Ovarian Reserve and Primary Ovarian Insufficiency. *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2021 Feb 24;11:617704.
 20. Cakiroglu Y, Yuceturk A, Karaosmanoglu O, Yildirim Kopuk S, Utkan Korun ZE, Herlihy N, et al. Ovarian reserve parameters and IVF outcomes in 510 women with poor ovarian response (POR) treated with intraovarian injection of autologous platelet rich plasma (PRP). *Aging*. 2022;14:2513–23.
 21. Vural B, Duruksu G, Vural F, Gorguc M, Karaoz E. Effects of VEGF + Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Inbred Rat Ovarian Functions in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Insufficiency Model. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2019;15(4):558–73.
 22. Huang Q, Liu B, Jiang R, Liao S, Wei Z, Bi Y, et al. G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells combined with platelet-rich plasma

- accelerate restoration of ovarian function in cyclophosphamide-induced POI rats. *Biology of Reproduction*. 2019;101(1):91–101.
23. Luborsky JL, Meyer P, Sowers MF, Gold EB, Santoro N. Premature menopause in a multi-ethnic population study of the menopause transition. *Human Reproduction*. 2003 Jan 1;18(1):199–206.
 24. El Khoudary SR, Greendale G, Crawford SL, Avis NE, Brooks MM, Thurston RC, et al. The menopause transition and women's health at midlife: A progress report from the Study of Women's Health across the Nation (SWAN). *Menopause*. Lippincott Williams and Wilkins; 2019 Oct;26(10):1213–27.
 25. Mishra GD, Pandeya N, Dobson AJ, Chung HF, Anderson D, Kuh D, et al. Early menarche, nulliparity and the risk for premature and early natural menopause. *Human Reproduction*. 2017 Mar 1;32(3):679–86.
 26. Golezar S, Ramezani Tehrani F, Khazaei S, Ebadi A, Keshavarz Z. The global prevalence of primary ovarian insufficiency and early menopause: a meta-analysis. *Climacteric*. 2019 Jul 4;22(4):403–11.
 27. Conway GS, Kaltsas G, Patel MBA, Melanie DMU, Davies C, Howard MRCOG, et al. Characterization of idiopathic premature ovarian failure. *American Society for Reproductive Medicine*. 1996 Feb;65(2):337-41.
 28. Nelson LM. Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *The New England Journal of Medicine* [Internet]. 2009 Feb 5;360(6):606–14.
 29. Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, Cartwright B, et al. ESHRE Guideline: Management of women with premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction*. Oxford University Press; 2016 May;31(5):926–37.
 30. Bachelot A, Nicolas C, Bidet M, Dulon J, Leban M, Golmard JL, et al. Long-term outcome of ovarian function in women with intermittent premature ovarian insufficiency. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 2017 Feb 1;86(2):223–8.
 31. Jeppesen J V., Anderson RA, Kelsey TW, Christiansen SL, Kristensen SG, Jayaprakasan K, et al. Which follicles make the most anti-Müllerian hormone in humans? Evidence for an abrupt decline in AMH production at the time of follicle selection. *Molecular Human Reproduction*. 2013 Aug;19(8):519–27.
 32. Weenen C, Laven JSE, von Bergh ARM, Cranfield M, Groome NP, Visser JA, et al. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: Potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. *Molecular Human Reproduction*. 2004 Feb;10(2):77–83.
 33. Hansen KR, Hodnett GM, Knowlton N, Craig LB. Correlation of ovarian reserve tests with histologically determined primordial follicle number. *Fertil Steril*. 2011 Jan;95(1):170–5.
 34. De Vet A, Laven JSE, De Jong FH, Themmen APN, Fauser BCJM. Antimüllerian hormone serum levels: a putative marker for ovarian aging. *Fertil Steril*. 2019 Oct;112(4Suppl1):e183-e188.
 35. Lumsden MA. The NICE Guideline – Menopause: diagnosis and management. *Climacteric*. Taylor and Francis Ltd; 2016 Oct;19(5):426–9.

36. Nelson SM, Davis SR, Kalantaridou S, Lumsden MA, Panay N, Anderson RA. Anti-Müllerian hormone for the diagnosis and prediction of menopause: a systematic review. *Human Reproduction Update*. Oxford University Press; 2023 May 2;29(3):327–46.
37. Fischer A, Onur S, Niklowitz P, Menke T, Laudes M, Rimbach G, et al. Coenzyme Q10 status as a determinant of muscular strength in two independent cohorts. *PLoS One*. 2016 Dec 1;11(12).
38. Kaikkonen J, Nyysönen K, Tuomainen TP, Ristonmaa U, Salonen JT. Determinants of plasma coenzyme Q10 in humans. *FEBS Letters* 1999 Jan 29;443(2):163–6.
39. Ma L, Li X, Li C, Chen P, Lan Y, Huang Y, et al. Association of Coenzyme Q10 with Premature Ovarian Insufficiency. *Reproductive Sciences*. 2023 May 1;30(5):1548–54.
40. van Kasteren YM, Hundscheid RDL, Smits APT, Cremers FPM, van Zonneveld P, Braat DDM. Familial idiopathic premature ovarian failure: an overrated and underestimated genetic disease? *Human Reproduction*. 1999 Oct;14(10):2455–9.
41. Conway GS. Insuffisance ovarienne prématurée et mutations du gène FMR1: Avancées récentes. *Annales d'Endocrinologie (Paris)*. 2010 May;71(3):215–7.
42. Kanis JA, McCloskey E V., Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster JY. European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis International*. 2013 Jan;24(1):23–57.
43. Sütçüoğlu BM, Güler M. Appropriateness of premature ovarian insufficiency recommendations provided by ChatGPT. *Menopause*. 2023 Oct 1;30(10):1033–7.
44. Master-Hunter T, Heiman DL. Amenorrhea: Evaluation and Treatment [Internet]. *American Family Physician*. 2006 Apr 15;73(8):1374–82.
45. Huhtaniemi I, Hovatta O, La Marca A, Livera G, Monniaux D, Persani L, et al. Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and Treatment of Primary Ovarian Insufficiency. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. Elsevier Inc.; 2018 Jun;29(6):400–19.
46. Rossetti R, Ferrari I, Bonomi M, Persani L. Genetics of primary ovarian insufficiency. *Clinical Genetics*. Blackwell Publishing Ltd; 2017 Feb;91(2):183–98.
47. McGlacken-Byrne SM, Le Quesne Stabej P, Del Valle I, Ocaka L, Gagunashvili A, Crespo B, et al. ZSWIM7 Is Associated with Human Female Meiosis and Familial Primary Ovarian Insufficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2022 Jan 1;107(1):E254–63.
48. Caburet S, Todeschini AL, Petrillo C, Martini E, Farran ND, Legois B, et al. A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. *EBioMedicine*. 2019 Apr 1;42:524–31.

49. Veitia RA. Primary ovarian insufficiency, meiosis and DNA repair. *Biomedical Journal. Elsevier B.V.*; 2020 Apr;43(2):115–23.
50. Doulgeraki T, Papageorgopoulou M, Iliodromiti S. The genetic background of female reproductive disorders: a systematic review. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*. 2023 Oct 1;35(5):426–33.
51. Desai S, Rajkovic A. Genetics of Reproductive Aging from Gonadal Dysgenesis through Menopause. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2017 Mar 1;35(2):147–59.
52. Cameron- Pimblett A, la Rosa C, King TFJ, Davies MC, Conway GS. The Turner syndrome life course project: Karyotype-phenotype analyses across the lifespan. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 2017 Nov 1;87(5):532–8.
53. Baronchelli S, Villa N, Redaelli S, Lissoni S, Saccheri F, Panzeri E, et al. Investigating the role of X chromosome breakpoints in premature ovarian failure. *Molecular Cytogenetics*. 2012 Jun 16;5(1):32.
54. Bouilly J, Beau I, Barraud S, Bernard V, Azibi K, Fagart J, et al. Identification of multiple gene mutations accounts for a new genetic architecture of primary ovarian insufficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2016 Dec 1;101(12):4541–50.
55. Caburet S, Arboleda VA, Llano E, Overbeek PA, Barbero JL, Oka K, et al. Mutant Cohesin in Premature Ovarian Failure. *New England Journal of Medicine*. 2014 Mar 6;370(10):943–9.
56. De Vries L, Behar DM, Smirin-Yosef P, Lagovsky I, Tzur S, Basel-Vanagaite L. Exome sequencing reveals SYCE1 mutation associated with autosomal recessive primary ovarian insufficiency. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2014 Oct 1;99(10):E2129–32.
57. Geisinger A, Benavente R. Mutations in Genes Coding for Synaptonemal Complex Proteins and Their Impact on Human Fertility. *Cytogenetic and Genome Research*. S. Karger AG; 2016;150(2):77–85.
58. Caburet S, Heddar A, Dardillac E, Creux H, Lambert M, Messiaen S, et al. Homozygous hypomorphic BRCA2 variant in primary ovarian insufficiency without cancer or Fanconi anaemia trait. *Journal of Medical Genetics*. 2021 Feb 1;58(2):125–34.
59. Wood-Trageser MA, Gurbuz F, Yatsenko SA, Jeffries EP, Kotan LD, Surti U, et al. MCM9 mutations are associated with ovarian failure, short stature, and chromosomal instability. *The American Journal of Human Genetics*. 2014 Dec 4;95(6):754–62.
60. Saleh AlAsiri, Sulman Basit, Michelle A. Wood-Trageser, Svetlana A. Yatsenko, Elizabeth P. Jeffries, Urvashi Surti, et al. Exome sequencing reveals MCM8 mutation underlies ovarian failure and chromosomal instability. *Journal of Clinical Investigation*. 2015 Jan;125(1):258–62.
61. Smirin-Yosef P, Zuckerman-Levin N, Tzur S, Granot Y, Cohen L, Sachsenweger J, et al. A biallelic mutation in the homologous recombination

- repair gene SPIDR is associated with human gonadal dysgenesis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2017 Feb 1;102(2):681–8.
62. Patiño LC, Beau I, Carlosama C, Buitrago JC, González R, Suárez CF, et al. New mutations in non-syndromic primary ovarian insufficiency patients identified via whole-exome sequencing. *Human Reproduction*. 2017 Jul 1;32(7):1512–20.
 63. Wang J, Zhang W, Jiang H, Wu BL. Mutations in HFM1 in Recessive Primary Ovarian Insufficiency. *New England Journal of Medicine*. 2014 Mar 6;370(10):972–4.
 64. Al-Agha AE, Ahmed IA, Nuebel E, Moriwaki M, Moore B, Peacock KA, et al. Primary ovarian insufficiency and azoospermia in carriers of a homozygous PSMC3IP stop gain mutation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2018 Feb 1;103(2):555–63.
 65. Guo T, Zhao S, Zhao S, Chen M, Li G, Jiao X, et al. Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Human Molecular Genetics*. 2017 Apr 15;26(8):1452–7.
 66. Goldberg Y, Halpern N, Hubert A, Adler SN, Cohen S, Plesser-Duvdevani M, et al. Mutated MCM9 is associated with predisposition to hereditary mixed polyposis and colorectal cancer in addition to primary ovarian failure. *Cancer Genetics*. 2015 Dec 1;208(12):621–4.
 67. Huang C, Guo T, Qin Y. Meiotic Recombination Defects and Premature Ovarian Insufficiency. Vol. 9, *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. Frontiers Media S.A.; 2021 Mar 8;9:652407.
 68. Wilson C. Autoimmunity: Autoimmune Addison disease and premature ovarian failure. Vol. 7, *Nature Reviews Endocrinology*. 2011 Jul 12;7(9):498.
 69. la Marca A, Brozzetti A, Sighinolfi G, Marzotti S, Volpe A. Primary ovarian insufficiency: autoimmune causes. *REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY*. 2010 Aug;22(4):277–82.
 70. Melner M, Feltus F. Editorial: AutoImmune Premature Ovarian Failure-Endocrine Aspects of a T Cell Disease [Internet]. 1999 Aug 1;140(8):3401-03.
 71. Wheatcroft NJ, Salt C, Milford-Ward A, Cooke ID, Weetman AP. Identification of ovarian antibodies by immunofluorescence, enzyme-linked immunosorbent assay or immunoblotting in premature ovarian failure. *Human Reproduction* 1997 Dec;12(12):2617-22.
 72. Yang H, Pang H, Miao C. Ovarian IL-1 α and IL-1 β levels are associated with primary ovarian insufficiency [Internet]. Vol. 11, *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. 2018 Sep 1;11(9):4711-17.
 73. Yin N, Wang Y, Lu X, Liu R, Zhang L, Zhao W, et al. HPMSCT transplantation restoring ovarian function in premature ovarian failure mice is associated with change of Th17/Tc17 and Th17/Treg cell ratios through the PI3K/Akt signal pathway. *Stem Cell Research and Therapy*. 2018 Feb 14;9(1):17.
 74. Sun S, Chen H, Zheng X, Ma C, Yue R. Analysis on the level of IL-6, IL-21, AMH in patients with auto-immunity premature ovarian failure and study of

- correlation. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2018 Oct 1;16(4):3395–8.
75. Xiong J, Tan R, Wang W, Wang H, Pu D, Wu J. Evaluation of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells and FOXP3 mRNA in premature ovarian insufficiency. *Climacteric*. 2020 May 3;23(3):267–72.
 76. Wang J, Zhao X, Luo R, Xia D, Liu Y, Shen T, et al. The causal association between systemic inflammatory regulators and primary ovarian insufficiency: a bidirectional mendelian randomization study. *Journal of Ovarian Research*. 2023 Dec 1;16(1):191.
 77. Wallace WHB, Thomson AB, Saran F, Kelsey TW. Predicting age of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. 2005 Jul 1;62(3):738–44.
 78. Morgan S, Anderson RA, Gourley C, Wallace WH, Spears N. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? *Human Reproduction Update*. 2012 Sep-Oct;18(5):525–35.
 79. Mauri D, Gazouli I, Zarkavelis G, Papadaki A, Mavroeidis L, Gkoura S, et al. Chemotherapy Associated Ovarian Failure. *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2020 Dec 8;11:572388.
 80. Morrison JC, Givens JR, Wiser WL, Fish SA. Mumps oophoritis: a cause of premature menopause. *Fertil Steril*. 1975 Jul;26(7):655-9.
 81. Sharara FI, Seifer DB, Flaws JA. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril*. 1998 Oct;70(4):613-22.
 82. Fridovich-Keil JL, Gubbels CS, Spencer JB, Sanders RD, Land JA, Rubio-Gozalbo E. Ovarian function in girls and women with GALT-deficiency galactosemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2011 Apr;34(2):357-66.
 83. McGlacken-Byrne SM, Conway GS. Premature ovarian insufficiency. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology*. Bailliere Tindall Ltd; 2022 May;81:98-100.
 84. Absolom K, Eiser C, Turner L, Ledger W, Ross R, Davies H, et al. Ovarian failure following cancer treatment: Current management and quality of life. *Human Reproduction*. 2008;23(11):2506–12.
 85. Wu X, Cai H, Kallianpur A, Li H, Yang G, Gao J, et al. Impact of premature ovarian failure on mortality and morbidity among Chinese women. *PLoS One*. 2014 Mar 6;9(3):e89597.
 86. Furness S, Roberts H, Marjoribanks J, Lethaby A. Hormone therapy in postmenopausal women and risk of endometrial hyperplasia. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2012 Aug 15;2012(8):CD000402
 87. Michiko Kodama, Hiroko Komura, Takahiro Kodama, Yukihiro Nishio, Tadashi Kimura. Estrogen therapy initiated at an early age increases bone mineral density in Turner syndrome patients. *Endocrine Journal*. 2012;59(2):153–9.

88. Antoine C, Liebens F, Carly B, Pastijn A, Neusy S, Rozenberg S. Safety of hormone therapy after breast cancer: A qualitative systematic review. *Human Reproduction*. Oxford University Press; 2007 Feb;22(2):616–22.
89. Madalinska JB, Van Beurden M, Bleiker EMA, Valdimarsdottir HB, Hollenstein J, Massuger LF, et al. The impact of hormone replacement therapy on menopausal symptoms in younger high-risk women after prophylactic salpingo-oophorectomy. *Journal of Clinical Oncology*. 2006 Aug 1;24(22):3576–82.
90. Langrish JP, Mills NL, Bath LE, Warner P, Webb DJ, Kelnar CJ, et al. Cardiovascular effects of physiological and standard sex steroid replacement regimens in premature ovarian failure. *Hypertension*. 2009 May 1;53(5):805–11.
91. Canonico M, Plu-Bureau G, Lowe GDO, Scarabin PY. Hormone replacement therapy and risk of venous thromboembolism in postmenopausal women: Systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2008 May 31;336(7655):1227–31.
92. Canonico M, Oger E, Conard J, Meyer G, Le´Vesque H, Trillot N et al. Obesity and risk of venous thromboembolism among postmenopausal women: differential impact of hormone therapy by route of estrogen administration. The ESTHER Study. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2006;4(6):1259–65.
93. Lobo RA. Hormone-replacement therapy: Current thinking. Vol. 13, *Nature Reviews Endocrinology*. Nature Publishing Group; 2017 Apr;13(4):220–31.
94. Swica Y, Warren MP, Manson JE, Aragaki AK, Bassuk SS, Shimbo D, et al. Effects of oral conjugated equine estrogens with or without medroxyprogesterone acetate on incident hypertension in the Women’s Health Initiative hormone therapy trials. *Menopause*. 2018 Jul 1;25(7):753–61.
95. Smith NL, Blondon M, Wiggins KL, Harrington LB, van Hylckama Vlieg A, Floyd JS, et al. Lower risk of cardiovascular events in postmenopausal women taking oral estradiol compared with oral conjugated equine estrogens. *JAMA Intern Medicine* 2014 Jan;174(1):25–31.
96. Hugon-Rodin J, Gompel A, Plu-Bureau G. Mechanisms in endocrinology: Epidemiology of hormonal contraceptives-related venous thromboembolism. *European Journal of Endocrinology*. 2014 Dec 1;171(6):R221–30.
97. Faubion SS, Sood R, Kapoor E. Genitourinary Syndrome of Menopause: Management Strategies for the Clinician. Vol. 92, *Mayo Clinic Proceedings*. Elsevier Ltd; 2017 Dec;92(12):1842–9.
98. Marjoribanks J, Farquhar C, Roberts H, Lethaby A, Lee J. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. Vol. 2017, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2017 Jan 17;1(1):CD004143.
99. Davison SL, Bell R, Donath S, Montalto JG, Davis SR. Androgen levels in adult females: Changes with age, menopause, and oophorectomy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005 Jul;90(7):3847–53.

100. Haring R, Hannemann A, John U, Radke D, Nauck M, Wallaschofski H, et al. Age-specific reference ranges for serum testosterone and androstenedione concentrations in women measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2012 Feb;97(2):408–15.
101. Wåhlin-Jacobsen S, Pedersen AT, Kristensen E, Læssøe NC, Lundqvist M, Cohen AS, et al. Is There a Correlation Between Androgens and Sexual Desire in Women? *Journal of Sexual Medicine*. 2015 Feb 1;12(2):358–73.
102. Wierman ME, Arlt W, Basson R, Davis SR, Miller KK, Murad MH, et al. Androgen therapy in women: A reappraisal: An Endocrine Society clinical practice guideline. Vol. 99, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Endocrine Society; 2014 Oct;99(10):3489–510.
103. Davis S, Papalia MA, Norman RJ, O’neill S, Redelman M, Williamson M, et al. Safety and Efficacy of a Testosterone Metered-Dose Transdermal Spray for Treating Decreased Sexual Satisfaction in Premenopausal Women A Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine*. 2008 Apr 15;148(8):569–77.
104. Goldstat R, Briganti E, Tran J, Wolfe R, Davis SR. Transdermal testosterone therapy improves well-being, mood, and sexual function in premenopausal women. *Menopause*. 2003;10(5):390–8.
105. Baber RJ, Panay N, Fenton A. 2016 IMS Recommendations on womens midlife health and menopause hormone therapy. *Climacteric*. 2016 Mar 3;19(2):109–50.
106. Stuenkel CA, Davis SR, Gompel A, Lumsden MA, Murad MH, Pinkerton JA V., et al. Treatment of symptoms of the menopause: An endocrine society clinical practice guideline. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2015 Nov 1;100(11):3975–4011.
107. Obstet Gynecol. Committee opinion no. 698: hormone therapy in primary ovarian insufficiency. *Obstetrics & Gynecology*. 2017 May;129(5):e134-e141.
108. Faubion SS, Crandall CJ, Davis L, El Khoudary SR, Hodis HN, Lobo RA, et al. The 2022 hormone therapy position statement of The North American Menopause Society. *Menopause*. 2022 Jul 1;29(7):767–94.
109. Neves-E-Castro M, Birkhauser M, Samsioe G, Lambrinoudaki I, Palacios S, Borrego RS, et al. EMAS position statement: The ten point guide to the integral management of menopausal health. *Maturitas*. 2015 May 1;81(1):88–92.
110. Lumsden MA, Davies M, Sarri G, Aspray T, Holloway D, Hope S, et al. Diagnosis and management of menopause: The National Institute of Health and Care Excellence (NICE) guideline. Vol. 176, *JAMA Internal Medicine*. American Medical Association; 2016 Aug 1;176(8):1205–6.
111. Pharmaceuticals Corporation N. Novartis. Vivelle-Dot (estradiol transdermal system): highlights of prescribing information. [Internet]. 2021 [cited 2023 Dec 8].

112. van Kasteren YM, Schoemaker J. Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Human Reproduction Update*. 1999 Sep-Oct;5(5):483-92.
113. Luisi S, Orlandini C, Regini C, Pizzo A, Vellucci F, Petraglia F. Premature ovarian insufficiency: From pathogenesis to clinical management. *Journal of Endocrinological Investigation*. Springer International Publishing; 2015 Jun;38(6):597–603.
114. W Hamish BW, A. Anderson R, D Stewart I. Fertility preservation for young patients with cancer: who is at risk and what can be offered? *The Lancet Oncology*. 2005 Apr;6(4):209–18.
115. El-Shawarby SA, Sharif F, Conway G, Serhal P, Davies M. Oocyte cryopreservation after controlled ovarian hyperstimulation in mosaic Turner syndrome: Another fertility preservation option in a dedicated UK clinic. *BJOG*. 2010 Jan;117(2):234–7.
116. Gayete-Lafuente S, Turan V, Oktay KH. Oocyte cryopreservation with in vitro maturation for fertility preservation in girls at risk for ovarian insufficiency. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2023 Dec;40(12):2777-2785.
117. Oktay K, Buyuk E, Rodriguez-Wallberg KA, Sahin G. In vitro maturation improves oocyte or embryo cryopreservation outcome in breast cancer patients undergoing ovarian stimulation for fertility preservation. *Reproductive Biomedicine Online*. 2010;20(5):634–8.
118. Wallace WHB, Kelsey TW, Anderson RA. Fertility preservation in pre-pubertal girls with cancer: The role of ovarian tissue cryopreservation. Vol. 105, *Fertil Steril*. Elsevier Inc.; 2016 Jan;105(1):6–12.
119. Anderson RA, Mitchell RT, Kelsey TW, Spears N, Telfer EE, Wallace WHB. Cancer treatment and gonadal function: Experimental and established strategies for fertility preservation in children and young adults. *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. Lancet Publishing Group; 2015 Jul;3(7):556–67.
120. Mature oocyte cryopreservation: A guideline. *Fertil Steril*. 2013 Jan;99(1):37–43.
121. Grèze V, Mehdoud S, Vorilhon S, Isfan F, Rouel N, Chaput L, et al. Access to fertility preservation for adolescents and young adults aged 15 to 24 years with cancers in Auvergne, France. *Epub [Internet]*. 2020;107(7–8):773–8.
122. Oktay K, Bedoschi G, Berkowitz K, Bronson R, Kashani B, McGovern P, et al. Fertility Preservation in Women with Turner Syndrome: A Comprehensive Review and Practical Guidelines. Vol. 29, *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*. Elsevier Inc.; 2016 Oct;29(5):409–16.
123. Martel RA, Blakemore JK, Fino ME. The use of oocyte cryopreservation for fertility preservation in patients with sex chromosome disorders: a case series describing outcomes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2022 May 1;39(5):1143–53.
124. Oktay K, Bedoschi G. Oocyte Cryopreservation for Fertility Preservation in Postpubertal Female Children at Risk for Premature Ovarian Failure Due to

- Accelerated Follicle Loss in Turner Syndrome or Cancer Treatments. *Journal of Pediatric and Adolescent Gynecology*. 2014 Dec 1;27(6):342–6.
125. Oktay K, Rodriguez-Wallberg KA, Sahin G. Fertility preservation by ovarian stimulation and oocyte cryopreservation in a 14-year-old adolescent with Turner syndrome mosaicism and impending premature ovarian failure. *Fertil Steril*. 2010;94(2):753.e15-753.e19.
 126. Mamsen LS, Charkiewicz K, Anderson RA, Telfer EE, McLaughlin M, Kelsey TW, et al. Characterization of follicles in girls and young women with Turner syndrome who underwent ovarian tissue cryopreservation. *Fertil Steril*. 2019 Jun 1;111(6):1217-1225.e3.
 127. Gao M, Yu Z, Yao D, Qian Y, Wang Q, Jia R. Mesenchymal stem cells therapy: A promising method for the treatment of uterine scars and premature ovarian failure. *Tissue and Cell*. Elsevier Ltd; 2022 Feb;74:101676.
 128. Zhang X, Zhang L, Li Y, Yin Z, Feng Y, Ji Y. Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSCs) promotes the recovery of ovarian function in a rat model of premature ovarian failure (POF). *Gynecological Endocrinology*. 2021 Apr;37(4):353–7.
 129. Wang Z, Wei Q, Wang H, Han L, Dai H, Qian X, et al. Mesenchymal Stem Cell Therapy Using Human Umbilical Cord in a Rat Model of Autoimmune-Induced Premature Ovarian Failure. *Stem Cells International*. 2020 Jul 4;2020:3249495.
 130. El-Derany MO, Said RS, El-Demerdash E. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Reverse Radiotherapy-Induced Premature Ovarian Failure: Emphasis on Signal Integration of TGF- β , Wnt/ β -Catenin and Hippo Pathways. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2021 Aug; 17(4):1429-45.
 131. Manshadi MD, Navid S, Hoshino Y, Daneshi E, Noory P, Abbasi M. The effects of human menstrual blood stem cells-derived granulosa cells on ovarian follicle formation in a rat model of premature ovarian failure. *Microscopy Research and Technique*. 2019 Jun 1;82(6):635–42.
 132. Deng T, He J, Yao Q, Wu L, Xue L, Wu M, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Ovarian Function in Chemotherapy-Induced Premature Ovarian Failure Mice Through Inhibiting Apoptosis and Inflammation via a Paracrine Mechanism. *Reproductive Sciences*. 2021 Jun 1;28(6):1718–32.
 133. Li J, Yu Q, Huang H, Deng W, Cao X, Adu-Frimpong M, et al. Human chorionic plate-derived mesenchymal stem cells transplantation restores ovarian function in a chemotherapy-induced mouse model of premature ovarian failure. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018 Apr 3;9(1):81.
 134. Guo C, Ma Y, Situ Y, Liu L, Luo G, Li H, et al. Mesenchymal stem cells therapy improves ovarian function in premature ovarian failure: a systematic review and meta-analysis based on preclinical studies. *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media SA; 2023 Jul 6;14:1165574.

135. Hergovich A. Mammalian Hippo signalling: A kinase network regulated by protein-protein interactions. *Biochemical Society Transactions*. 2012 Feb;40(1):124–8.
136. Cheng Y, Feng Y, Jansson L, Sato Y, Deguchi M, Kawamura K, et al. Actin polymerization-enhancing drugs promote ovarian follicle growth mediated by the Hippo signaling effector YAP. *FASEB Journal*. 2015 Jun 1;29(6):2423–30.
137. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2013 Oct 22;110(43):17474–9.
138. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocrine Reviews*. Endocrine Society; 2015 Feb;36(1):1–24.
139. Reddy P, Adhikari D, Zheng W, Liang S, Hämäläinen T, Tohonen V, et al. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*. 2009 Aug 1;18(15):2813–24.
140. Fan HY, Liu Z, Cahill N, Richards JAS. Targeted disruption of Pten in ovarian granulosa cells enhances ovulation and extends the life span of luteal cells. *Molecular Endocrinology*. 2008 Sep;22(9):2128–40.
141. Vo KCT, Kawamura K. Ovarian Fragmentation and AKT Stimulation for Expansion of Fertile Lifespan. Vol. 3, *Frontiers in Reproductive Health*. Frontiers Media S.A.; 2021 Mar 2;3:636771.
142. Adhikari D, Gorre N, Risal S, Zhao Z, Zhang H, Shen Y, et al. The safe use of a PTEN inhibitor for the activation of dormant mouse primordial follicles and generation of fertilizable eggs. *PLoS One*. 2012 Jun 27;7(6):e39034.
143. Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, et al. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2010 Jun 1;107(22):10280–4.
144. Kawamura K, Cheng Y, Sun YP, Zhai J, Diaz-Garcia C, Simon C, et al. Ovary transplantation: To activate or not to activate. Vol. 30, *Human Reproduction*. Oxford University Press; 2015 Nov;30(11):2457–60.
145. Tanaka Y, Park JH, Tanwar PS, Kaneko-Tarui T, Mittal S, Lee HJ, et al. Deletion of tuberous sclerosis 1 in somatic cells of the murine reproductive tract causes female infertility. *Endocrinology*. 2012 Jan;153(1):404–16.
146. Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, Lesche R, Trumpp A, Zack JA, et al. Negative regulation of neural stem/progenitor cell proliferation by the Pten tumor suppressor gene in vivo. *Science* (1979). 2001 Dec 7;294(5549):2186–9.
147. Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hämäläinen T, Cooney AJ, et al. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*. 2009 Oct 20;19(3):397–410.
148. Li Q, Zheng J, Li Z, Xiao Y, Zhang M, Shi W, et al. Drug-free in vitro activation combined with 3D-bioprinted adipose-derived stem cells restores ovarian

- function of rats with premature ovarian insufficiency. *Stem Cell Research & Therapy* 2022 Jul 26;13(1):347.
149. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Human Reproduction*. 2015 Mar 1;30(3):608–15.
 150. Zhai J, Yao G, Dong F, Bu Z, Cheng Y, Sato Y, et al. In vitro activation of follicles and fresh tissue auto-transplantation in primary ovarian insufficiency patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2016 Nov 1;101(11):4405–12.
 151. Luongo F, Colonna F, Calapà F, Vitale S, Fiori ME, De Maria R. Pten tumor-suppressor: The dam of stemness in cancer. Vol. 11, *Cancers*. MDPI AG; 2019 Jul 30;11(8):1076.
 152. Mukherjee R, Vanaja KG, Boyer JA, Gadal S, Solomon H, Chandarlapaty S, et al. Regulation of PTEN translation by PI3K signaling maintains pathway homeostasis. *Molecular Cell*. 2021 Feb 18;81(4):708-723.e5.
 153. Maidarti M, Clarkson YL, McLaughlin M, Anderson RA, Telfer EE. Inhibition of PTEN activates bovine non-growing follicles in vitro but increases DNA damage and reduces DNA repair response. *Human Reproduction*. 2019 Feb 1;34(2):297–307.
 154. McLaughlin M, Innell HL, Anderson RA, Telfer EE. Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. *Molecular Human Reproduction*. 2014 Aug;20(8):736–44.
 155. Fabregues F, Ferreri J, Calafell JM, Moreno V, Borrás A, Manau D, et al. Pregnancy after drug-free in vitro activation of follicles and fresh tissue autotransplantation in primary ovarian insufficiency patient: A case report and literature review. *Journal of Ovarian Research*. BioMed Central Ltd.; 2018 Aug 31;11(1):76.
 156. Ferreri J, Fàbregues F, Calafell JM, Solernou R, Borrás A, Saco A, et al. Drug-free in-vitro activation of follicles and fresh tissue autotransplantation as a therapeutic option in patients with primary ovarian insufficiency. *Reproductive Biomedicine Online*. 2020 Feb 1;40(2):254–60.
 157. Lunding SA, Pors SE, Kristensen SG, Landersoe SK, Jeppesen JV, Flachs EM, et al. Biopsying, fragmentation and autotransplantation of fresh ovarian cortical tissue in infertile women with diminished ovarian reserve. *Human Reproduction*. 2019 Oct 2;34(10):1924–36.
 158. Holcomb JB, Tilley BC, Baraniuk S, Fox EE, Wade CE, Podbielski JM, et al. Transfusion of plasma, platelets, and red blood cells in a 1:1:1 vs a 1:1:2 ratio and mortality in patients with severe trauma: The PROPPR randomized clinical trial. *JAMA - Journal of the American Medical Association*. 2015 Feb 3;313(5):471–82.

159. Scott Sills E, Wood SH. Autologous activated platelet-rich plasma injection into adult human ovary tissue: Molecular mechanism, analysis, and discussion of reproductive response. *Bioscience Reports*. 2019 Jun 4;39(6):BSR20190805.
160. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P. Platelet Rich Plasma: A short overview of certain bioactive components. Vol. 11, *Open Medicine (Poland)*. De Gruyter Open Ltd; 2016 Aug 12;11(1):242–7.
161. Middleton KK, Barro V, Muller B, Terada S, Fu FH Evaluation of the Effects of Platelet-Rich Plasma (PRP) Therapy Involved in the Healing of Sports-Related Soft Tissue Injuries. *Iowa Orthopedic Journal*. 2012;32:150–63.
162. Lee KY, Baker HP, Hanaoka CM, Tjong VK, Terry MA. Treatment of patellar and hamstring tendinopathy with platelet-rich plasma in varsity collegiate athletes: A case series. *Journal of Orthopaedics*. 2020 Mar 1;18:91–4.
163. Shen YP, Li TY, Chou YC, Ho TY, Ke MJ, Chen LC, et al. Comparison of perineural platelet-rich plasma and dextrose injections for moderate carpal tunnel syndrome: A prospective randomized, single-blind, head-to-head comparative trial. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 2019 Nov 1;13(11):2009–17.
164. Badsha H, Harifi G, Murrell WD. Platelet Rich Plasma for Treatment of Rheumatoid Arthritis: Case Series and Review of Literature. *Case Reports in Rheumatology* 2020 Feb 3;2020:1–7.
165. Laver L, Marom N, Dnyanesh L, Mei-Dan O, Espregueira-Mendes J, Gobbi A. PRP for Degenerative Cartilage Disease: A Systematic Review of Clinical Studies. *Cartilage*. SAGE Publications Inc.; 2017 Oct;8(4):341–64.
166. Kassir M, Kroumpouzou G, Puja P, Katsambas A, Galadari H, Lotti T, et al. Update in minimally invasive periorbital rejuvenation with a focus on platelet-rich plasma: A narrative review. *Journal of Cosmetic Dermatology*. 2020 May 1;19(5):1057–62.
167. Xu J, Gou L, Zhang P, Li H, Qiu S. Platelet-rich plasma and regenerative dentistry. Vol. 65, *Australian Dental Journal*. Blackwell Publishing; 2020 Jun;65(2):131–42.
168. Yin S, Yang X, Bi H, Zhao Z. Combined Use of Autologous Stromal Vascular Fraction Cells and Platelet-Rich Plasma for Chronic Ulceration of the Diabetic Lower Limb Improves Wound Healing. *International Journal of Lower Extremity Wounds*. 2021 Jun 1;20(2):135–42.
169. Alves R, Grimalt R. Randomized placebo-controlled, double-blind, half-head study to assess the efficacy of platelet-rich plasma on the treatment of androgenetic alopecia. *Dermatologic Surgery*. 2016;42(4):491–7.
170. Sfakianoudis K, Rapani A, Grigoriadis S, Retsina D, Maziotis E, Tsioulou P, et al. Novel Approaches in Addressing Ovarian Insufficiency in 2019: Are We There Yet? *Cell Transplantation*. SAGE Publications Ltd; 2020 Jan-Dec;29:963689720926154.
171. Cakiroglu Y, Saltik A, Yuceturk A, Karaosmanoğlu O, Yildirim Kopuk S, Scott RT et al. Effects of intraovarian injection of autologous platelet rich plasma on

- ovarian reserve and IVF outcome parameters in women with primary ovarian insufficiency. *Aging* 2020 Jun 5;12(11):10211-10222.
172. Hsu CC, Hsu L, Hsu I, Chiu YJ, Dorjee S. Live Birth in Woman With Premature Ovarian Insufficiency Receiving Ovarian Administration of Platelet-Rich Plasma (PRP) in Combination With Gonadotropin: A Case Report. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Feb 19;11:50.
 173. Sfakianoudis K, Simopoulou M, Nitsos N, Rapani A, Pappas A, Pantou A, et al. Autologous platelet-rich plasma treatment enables pregnancy for a woman in premature menopause. *Journal of Clinical Medicine*. 2019 Jan 1;8(1):1.
 174. Zhang Y, Ouyang X, You S, Zou H, Shao X, Zhang G, et al. Effect of human amniotic epithelial cells on ovarian function, fertility and ovarian reserve in primary ovarian insufficiency rats and analysis of underlying mechanisms by mRNA sequencing [Internet]. *American Journal of Translational Research*. 2020 Jul 15;12(7):3234-3254.
 175. Kaplan S, Türk A. Adalimumab Increases Follicle Reserve and Follicle Development in Rat Ovary: The Effect of Adalimumab on Ovarian Reserve. *Cureus*. 2020 Oct 29;12(10):e11230.
 176. Zhang H, Luo Q, Lu X, Yin N, Zhou D, Zhang L, et al. Effects of hPMSCs on granulosa cell apoptosis and AMH expression and their role in the restoration of ovary function in premature ovarian failure mice. *Stem Cell Research and Therapy*. BioMed Central Ltd; 2018 Jan 31;9(1):20.
 177. Melekoglu R, Ciftci O, Eraslan S, Cetin A, Basak N. Beneficial effects of curcumin and capsaicin on cyclophosphamide-induced premature ovarian failure in a rat model. *Journal of Ovarian Research*. 2018 Apr 26;11(1):33.
 178. Pfeifer S, Butts S, Dumesic D, Fossum G, Giudice L, Gracia C, et al. Testing and interpreting measures of ovarian reserve: A committee opinion. *Fertil Steril*. 2015 Mar 1;103(3):e9–17.
 179. Kappeler CJ, Hoyer PB. 4-vinylcyclohexene diepoxide: A model chemical for ovotoxicity. In: *Systems Biology in Reproductive Medicine*. 2012 Feb;58(1):57-62.
 180. Mayer LP, Devine PJ, Dyer CA, Hoyer PB. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biology of Reproduction*. 2004 Jul;71(1):130–8.
 181. Carolino ROG, Barros PT, Kalil B, Anselmo-Franci J. Endocrine profile of the VCD-induced perimenopausal model rat. *PLoS One*. 2019 Dec 1;14(12):e0226874.
 182. La Marca A, Marzotti S, Brozzetti A, Stabile G, Arterisio AC, Bini V, et al. Primary ovarian insufficiency due to steroidogenic cell autoimmunity is associated with a preserved pool of functioning follicles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2009 Oct;94(10):3816–23.
 183. Falorni A, Brozzetti A, Aglietti MC, Esposito R, Minarelli V, Morelli S, et al. Progressive decline of residual follicle pool after clinical diagnosis of autoimmune ovarian insufficiency. *Clinical Endocrinology (Oxf)*. 2012 Sep;77(3):453–8.

184. Sills ES, Rickers NS, Li X, Palermo GD. First data on in vitro fertilization and blastocyst formation after intraovarian injection of calcium gluconate-activated autologous platelet rich plasma. *Gynecological Endocrinology*. 2018 Sep 2;34(9):756–60.
185. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004 Mar 11;428(6979):145-150.
186. Woods DC, White YAR, Tilly JL. Purification of oogonial stem cells from adult mouse and human ovaries: An assessment of the literature and a view toward the future. *Reproductive Sciences*. 2013 Jan 20(1):7–15.
187. Virant-Klun I, Stimpfel M, Skutella T. Stem Cells in Adult Human Ovaries: From Female Fertility to Ovarian Cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 2012;18(3):283-92.
188. Bhartiya D, Sriraman K, Parte S. Stem Cell Interaction with Somatic Niche May Hold the Key to Fertility Restoration in Cancer Patients. *Obstetrics and Gynecology International*. 2012;2012:921082.
189. Bukovsky A. Ovarian Stem Cell Niche and Follicular Renewal in Mammals. *The Anatomical Record*. 2011 Aug;294(8):1284–306.
190. Zhang H, Zheng W, Shen Y, Adhikari D, Ueno H, Liu K. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2012 Jul 31;109(31):12580–5.
191. Byskov AG, Høyer PE, Yding Andersen C, Kristensen SG, Jespersen A, Møllgård K. No evidence for the presence of oogonia in the human ovary after their final clearance during the first two years of life. *Human Reproduction*. 2011;26(8):2129–39.
192. Dolmans MM, Cordier F, Amorim CA, Donnez J, Vander Linden C. In vitro Activation Prior to Transplantation of Human Ovarian Tissue: Is It Truly Effective? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 Aug 2;10:520.
193. Lunde O, Djøseland O, Grøttum P. Polycystic ovarian syndrome: a follow-up study on fertility and menstrual pattern in 149 patients 15-25 years after ovarian wedge resection. *Human Reproduction*. 2001 Jul;16(7):1479-85.
194. Farquhar C, Lilford R, Marjoribanks J, Vandekerckhove P. Laparoscopic ‘drilling’ by diathermy or laser for ovulation induction in anovulatory polycystic ovary syndrome. In: *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd; 2005 Jul 20(3):CD001122.