

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



PREMATÜR OVER YETMEZLİK SIÇAN
MODELLERİNDE MİTOKONDİYAL
BİYOGENEZ YOLAKLARININ
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİLGİ ERBAY

2018

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans standartlarına uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

TIBBİ BİYOLOJİ

Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi. Deniz ŞEN

Danışman

Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Ebru ÖNALAN

Doç. Dr. İbrahim TEKEDERELİ

Dr. Öğr. Üyesi. Deniz ŞEN



ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Bilgi ERBAY
20.06.2018

A handwritten signature in blue ink, likely belonging to Bilgi ERBAY.

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Deniz ŞEN
Anabilim Dalı
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
ELAZIĞ

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübeleri ile tezimin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde desteğini esirgemeyen değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Deniz ŞEN'e ve tezimin her aşamasındaki yardımlarından dolayı tez projesi yardımcı araştırmacısı Sayın Doç. Dr. Ebru ÖNALAN'a, Tezimin deneysel kısmında laboratuvarlarının kapılarını açarak destek olan Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi Aşkın ŞEN'e, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN'a ve Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Dr. Öğr. Üyesi. Tuncay KULOĞLU'na,

Tezimin gerçekleştirilmesinde değerli emeği bulunan, bütün aşamalarında benden yardımını ve sabrını esirgemeyen Sayın Arş. Gör. Ahmet TEKTEMUR ve Sayın Arş. Gör. İlay BURAN'a,

Yükseklisans eğitimim boyunca tecrübelerini ve desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Halit ELYAS'a,

Tez çalışmam boyunca desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım; Aslı ÇELİK, Tuğçe YAKINBAŞ, Nefsun DANIŞ ve Seda SEFEROĞULLARI'na,

Tezime sağladığı finansmandan dolayı Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (FÜBAP)'ne,

Son olarak eğitim hayatım boyunca en büyük destekçim olan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürlerimle...

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	i
ETİK BEYAN.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR LİSTESİ	ix
1.ÖZET	1
2.ABSTRACT.....	3
3.GİRİŞ	5
3.1. Tanım	5
3.2. POY'un İnsidansı.....	8
3.3. POY'un Etiyolojisi.....	8
3.3.1. Genetik Faktörler	10
3.3.1.1. Kromozomal Anormallikler.....	10
3.3.1.2. Genetik Mutasyonlar.....	11
3.3.2. İatrojenik Faktörler	14
3.3.2.1. Radyoterapi	14
3.3.2.2. Kemoterapi.....	15
3.3.2.3. Operasyonlar	16
3.3.3. Otoimmün Hastalıklar.....	16
3.3.4. Metabolik Hastalıklar.....	17
3.3.5. Enfeksiyon Hastalıkları.....	17
3.3.6. Çevresel Faktörler	17

3.5. Folikülogenezis	19
3.6. Mitokondrial Biyogenez ve POY.....	21
3.7. Stres ve POY	23
3.8. Stres Çalışmalarında Kullanılan Sıçan Modelleri	24
3.10. POY ve Öğrenme Güçlüğü	25
3.9. Davranış Deneyleri	26
3.11. Çalışmanın Amacı.....	28
4. GEREÇ ve YÖNTEM.....	36
4.1. Çalışma Gruplarının Tanımı	36
4.2. Kullanılan Araçlar-Gereçler, Kimyasallar Ve Sarf Malzemeleri.....	37
4.2.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler.....	37
4.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	38
4.3. Yöntemler	39
4.3.1. Hayvanların Vücut Ağırlıkları, Vücut Uzunlukları Ve Over Ağırlıklarının Ölçülmesi	39
4.3.2. Vajinal Simir	39
4.3.3. Stres Protokolü	39
4.3.4. Morris'in Su Tankı Deneyi ve Prob Test	40
4.3.5. ELISA Testi	41
4.3.5.1. Solüsyonların Hazırlanması	41
4.3.5.2. Prosedür	41

4.3.6. Tri Reagent ile RNA İzolasyonu.....	43
4.3.7. RNA Ölçümü	44
4.3.8. Komplementer DNA Sentezi	44
4.3.9. Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu.....	45
4.4. İmmünohistokimyasal Analizler	48
4.5. İstatistiksel Analizler	49
5. BULGULAR.....	50
5.1. Sıçan Boy Verilerinin Değerlendirilmesi.....	50
5.2. Sıçan Kilo Verilerinin Değerlendirilmesi	51
5.4. Siklus Takibi Verilerinin Değerlendirilmesi.....	53
5.5. Morris Su Labirenti Test Verilerinin Değerlendirilmesi.....	54
5.6. Prob Test Verilerinin Değerlendirilmesi.....	56
5.7. ELISA Testi Verilerinin Değerlendirilmesi	56
5.8. qRT-PCR Verilerinin Değerlendirilmesi	58
5.8.1. Over Dokusunda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi	58
5.8.3.Hipotalamus Dokusunda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi.....	64
5.9. İmmünohistokimyasal Verilerin Değerlendirilmesi	66
7. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	82
8. KAYNAKÇA.....	84
9. ÖZGEÇMİŞ	93

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Prematüre over yetmezliğinin temel etiyolojik nedenler.....	9
Tablo 2. Prematür over yetmezliği ile ilgili genler, protein ürünleri, yerleşimleri ve fonksiyonu.....	12
Tablo 3. Öğrenme ile ilişkili genler.....	29
Tablo 4. Mitokondrial Biyogenezle İlişkili Genler.....	30
Tablo 5. Over ile ilişkili genler.....	32
Tablo 6. cDNA karışım miktarı.....	45
Tablo 7. cDNA sentezi PCR programı.....	45
Tablo 8. Hipokampus ve hipotalamus dokularında qRT-PCR ile çalışılan genlere ait primerler.....	46
Tablo 9. Over dokusunda qRT-PCR ile çalışılan genlere ait primerleri.....	46
Tablo 10. Over dokusunda qRT-PCR ile çalışılan genlere ait primerler.....	47
Tablo 11. qRT-PCR için kullanılan bileşikler.....	47
Tablo 12. RT-PCR programı.....	48
Tablo 13. Gruplara göre başlangıç ve son boy ölçümleri.....	50
Tablo 14. Grupların başlangıç ve son vücut ağırlıkları.....	51
Tablo 15. Grupların over ağırlıkları.....	52
Tablo 16. Grupların siklus safhaları.....	53
Tablo 17. ELISA testinde gruplara ait hormon miktar analizi.....	58
Tablo 18. Over dokusunda qRT-PCR ile analiz edilen genlerin mRNA kat değişimleri.....	61
Tablo 19. Hipokampus dokusunda qRT-PCR ile analiz edilen genlerin mRNA kat değişimleri.....	63
Tablo 20. Hipotalamus dokusunda qRT-PCR ile değerlendirilen genlerin mRNA kat değişimi ve p değeri.....	65

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Over anatomisi ve histolojisi.....	18
Şekil 2. Yetişkin yumurtalık rezervinin fetal kökenleri.....	20
Şekil 3. Sıçan immobilizasyon aparatı.....	25
Şekil 4. Morris su tankı.....	27
Şekil 5. Morris'in su tankı analizinde platformu bulma süresi.....	55
Şekil 6. Prob testte hedef bölmede yüzme süresi.....	56
Şekil 7. Over dokusunda qRT-PCR ile analiz edilen genlerin clustergram haritalaması.....	62
Şekil 8. Hipokampus dokusunda qRT-PCR analiz edilen genlerin clustergram haritalaması.....	64
Şekil 9. Hipotalamus dokusunda qRT-PCR analiz edilen genlerin clustergram haritalaması.....	65
Şekil 10. POY over dokularının hematoxilen eosin boyaması.....	66

KISALTMALAR LİSTESİ

ACTH: Adrenokortikotropik Hormon

AMH: Anti-Müllerian Hormon

ATP: Adenozin tri fosfat

cDNA: Komplementer DNA

CTx: Kemoterapi

ESHRE: Avrupa İnsan Üretim ve Embriyoloji Derneği (European Society of Human Reproduction and Embryology)

FSH: Folikül Uyarıcı Hormon

GnRH: Gonadotropin-Salıcı Hormon

LH: Luteinleştirici Hormon

mRNA: Mesajcı RNA

MtDNA: Mitokondrial DNA

POY: Prematüre Over Yetmezlik

rRNA: ribozomal RNA

qRT-PCR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

ROS: Reaktif Oksijen Türü

tRNA: Transfer RNA

SD: Standart sapma

Shbg: Cinsiyet hormonu bağlayıcı globülin

Sİ-POY: Sisplatin ile indüklenmiş Prematüre Over Yetmezlik

STİ-POY: Stres ile indüklenmiş Prematüre Over Yetmezlik

1.ÖZET

Prematür over yetersizliği (POY) 40 yaşından önce ovaryan fonksiyonların durması nedeni ile oluşan amenore durumu olarak tanımlanmaktadır. Bu süreçte reaktif oksijen türleri (ROS) ve mitokondrial biogenezin önemli roller oynadığı ifade edilmektedir. Projede sisplatin ve stresin over dokusu ve öğrenme üzerine olan kötü etkilerinin önlenmesinde AP39'un rolü olup olmadığının ve POY gelişiminde mitokondrial biyogenez yollarının rolünün belirlenmesi amaçlanmıştır.

Sprague Dawley cinsi 60 adet dişi sıçan her grupta 10 hayvan olacak şekilde kontrol, AP39, sisplatin, sisplatin+AP39, stres ve stres+AP39 grubu olarak ayrılmıştır. POY 10 gün süreyle 10mg/kg sisplatin veya immobilizasyon stresi ile oluşturulmuştur. 55 günlük çalışma süresi sonunda son 5 gün boyunca Moris su tankı testi yapılarak POY'un bellek üzerine etkisi incelenmiştir. Sıçanlar dekapite edilerek hormon seviyeleri, boy, kilo, over ağırlığı, siklus takibi, mitokondrial biyogenez gen ifadeleri gibi parametreler kontrol grubuyla karşılaştırılarak araştırılmıştır.

Kontrol grubuna göre sisplatin ve stres gruplarında boy, kilo, over ağırlığı ve serum E2 düzeylerinde anlamlı azalma, siklus döngüsünde bozulma, serum FSH ve LH değerlerinde artma olduğu belirlendi. Mitokondrial biyogenez ve over ile ilişkili genlerin kontrole göre hem sisplatin hem de stres gruplarında anlamlı olarak değiştiği saptandı. Hipokampus ve hipotalamus dokularında öğrenme ilişkili gen ifadelerinin anlamlı olarak değiştiği bulundu. Moris'in su tankı test verileri stres ve sisplatine maruz kalan sıçanlarda kontrole göre öğrenme gücünün oluştuğunu ortaya koydu.

Sisplatinin ve stresin benzer şekilde POY'a yol açtığı, öğrenme sürecini bozduğu ve over dokusunundaki normal mitokondrial biyogenez ve folikülogenez süreçlerini bozduğu ancak AP39'un iyileştirici etkisinin sınırlı düzeyde olduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Prematür Over Yetmezlik, Mitokondrial Biyogenez, Stres, Sisplatin, AP39



2.ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE MITOCHONDRIAL BIOGENESIS PATHWAYS IN PREMATURE OVARIAN FAILURE RAT MODELS

Premature ovarian failure (POF) is defined as the presence of inadequate ovarian function before the age of 40 years. Reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial biogenesis play an important role in this process. The aim of the project was to determine the role of AP39 in the prevention of adverse effects of cisplatin, stress and the role of mitochondrial biogenesis pathways in the development of POF.

Sixty female Sprague Dawley rats were divided into control, AP39, cisplatin, cisplatin + AP39, stress and stress + AP39 groups that with 10 animals in each group. POF was formed with 1,5 mg / kg cisplatin or immobilization stress. Moris water maze was performed to detect the spatial learning and memory. Hormone levels, height, weight, overweight, estrus cycling follow, ROS, mitochondrial biogenesis gene expression levels were determined by different laboratory methods.

It were detected the significant decreases in height, weight, overweight and serum E2 levels and the significant increase in serum FSH and LH values in cisplatin and stress groups according to control. Mitochondrial biogenesis, over-related genes, spatial learning and memory were found to be significantly altered in both cisplatin and stress groups compared to controls, but AP39 was not normalizing all parameters in cisplatin+AP39 and stress+AP39 groups than cisplatin and stress groups.

It has been shown that both cisplatin and stress were cause POF by using similarly molecular pathways, deteriate the learning process and disrupt the normal mitochondrial biogenesis and folliculogenesis processes in over, but the healing effect of AP39 is limited.

Keywords: Premature Overian Failure, Mitochondrial Biogenesis, Stress, Cisplatin, AP39.



3.GİRİŞ

3.1. Tanım

Ovaryumdaki oositlerin çeşitli nedenlerden dolayı menopoz yaşından önce tükenmesi erken menopoz veya prematür over yetmezliği (POY) olarak adlandırılmaktadır (1). POY yumurtalık fonksiyonunun kesilmesi ile klinik olarak tanımlanan erken over disfonksiyonudur (2). Hastalığın bilinen ilk belirtisi düzensiz menstruasyon döngüsüdür (3).

Kadın üreme kapasitesinin edinilmesi ve korunması, hipotalamik-pitüiter-yumurtalık eksenini olarak adlandırılan farklı seviyelerde sayısız düzenleyici sinyalin karmaşık etkileşimini gerektirmektedir. Bu sistem yumurtalık hormon salgısının düzenlenmesi ve ovülasyonda oositlerin aralıklı salınımından sorumlu olan karmaşık bir nörohormonal sistemdir. Başarılı bir ovulasyon esasen FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) salgısı yoluyla yeterli gonadotropin uyarımına ve LH'nin (Luteinleştirici Hormon) neden olduğu oosit uyarımına bağlıdır (4). POY genellikle düşük gonadal hormon seviyeleri (östrojen ve inhibin) ve yüksek gonadotropinler (LH ve FSH) ile karakterizedir (5). Ayrıca primer veya sekonder amenore, kısırlık, cinsel steroid eksikliği görülmektedir (2).

1930'lu yılların başlarında, klinisyenler 'erken menopoz' döneminde anormal derecede yükselmiş gonadotropin seviyeleri gözlemlemiştir. Atria ve arkadaşları erken menopozlu 1950 hastayı incelemiş ve POY'un temel klinik özelliklerini tanımlamışlardır (6). 1960'ların başında Hertz, gonadotropin düzeyi yükselmiş, ancak yumurtalık biyopsisinde çok fazla sayıda folikül bulunan dört

hasta tanımlamıştır. Bunu 1969'da Jones ve Moraes-Ruehsenl'in benzer bulguları içeren normal ovulasyon indüksiyonuna dirençli üç hastayı anlatan bir rapor izlemiştir. İlk çalışmalara dayanarak, POY geri döndürülemez olarak kabul edilmiştir (7).

Goldenberg ve arkadaşları, primer foliküllerin yokluğundan dolayı > 40 IU / I serum folikül uyarıcı hormon (Follicle-Stimulating Hormone; FSH) seviyesinin kalıcı kısırlık ile ilişkili olduğunu ileri sürmüşlerdir. Daha sonraki raporlarda, yumurtalık fonksiyonunun kalıcı olarak kesilmesi fikri tartışılmıştır (8).

Kinch ve arkadaşları POY'da afoliküler ve foliküler olmak üzere iki tip histopatolojik patern belirlemişlerdir. Afoliküler tipte foliküllerin erken yıpranması, foliküllerin hızla tükenmesi ya da sayısının yetersiz olması şeklinde bulgular mevcuttur. Foliküllerin hızla azalması X kromozomunun anomalileri ile birlikte görülmektedir. Prematüre folikül kaybının kesin nedeni bilinmemektedir. Diğer durumlarda primordiyal germ hücreleri göç edemediğinde gonadal farklılaşma olmakta ancak yeterli sayıda cinsiyet hücresinden daha az farklılaşma gerçekleşmektedir ve nihayetinde yumurtalık folikülleri tükenmektedir (9). Amsterdam ve arkadaşları gonadotropinlerin, östrojenin, büyüme faktörlerinin, sitokinlerin, aktin sitoskeletonu ve nitrik oksitin yeniden düzenlenmesinin preovulatuvar foliküllerin hayatta kalmasını sağlamak için işbirliği içinde olduklarını ileri sürmüşlerdir (10).

Foliküler tip sadece çeşitli primordiyal foliküllerin varlığı veya olgunlaşmanın çeşitli aşamalarında foliküllerin varlığı ile karakterizedir. Over biyopsisinde bozulmamış foliküllerin bulunduğu bu tip gonadotropin-dirençli sendrom olarak rapor edilmiştir. Foliküler ve afoliküler POY tiplerinde histolojik

olarak bölünme mantıklı görünmektedir. Bu durum başlangıçta foliküler tipte olan bazı over yetmezliklerinin afoliküler aşamaya ilerlediğini düşündürmektedir. Bu ortamdaki yetersizlik kavramı yumurtalık fonksiyonunun tamamen kesilmesi anlamına gelmemekte, aksine uygun yumurtalık fonksiyonunun kesilmesi anlamına gelmektedir. Bu durumun geçici veya aralıklı doğası ışığında ve artmış gonadotropinlere rağmen kalıcı ovaryum disfonksiyonuna yol açabileceğinden erken over disfonksiyonu adlandırması önerilmiştir (11).

Avrupa İnsan Üretim ve Embriyoloji Derneğine (European Society of Human Reproduction and Embryology; ESHRE) göre, POY en az 4 ay süreyle primer veya sekonder amenore varlığı, hipoöstrojenizm ve serumda yüksek gonadotropin konsantrasyonları ile karakterizedir. Teşhis en az 1 ay arayla yapılan FSH seviyeni ölçen iki kan testiyle doğrulanmalıdır (2). 1 ay aralıklarla bakılan iki FSH değerinin > 30 IU/l olması tanı kriteridir. Östrojen seviyesi genellikle çok düşüktür, ama overin fonksiyonel olduğu dönemler de olabileceğinden zaman zaman östrojen yeterli seviyelerde tespit edilebilmektedir. Her ne kadar FSH ilk akla gelen tetkik olsa da yüksek bir güvenilirliğe sahip değildir. FSH değerleri sikluslar arasında çok değişkendir ve reproduktif durum değerlendirmesinde yanıltıcı olabilmektedir. Bu nedenle daha net ve daha yüksek güvenilirlikli bir belirteç olan Anti-Müllerian Hormon (AMH) POY tanısında kullanılmaya başlanmıştır. AMH folikül sayısının azalması ile yakından ilişkilidir ve menopozda çok düşük seviyelere kadar inmektedir (12). Kadınlarda AMH geç preantral ve küçük antral foliküllerde granülosa hücreler tarafından salgılanmaktadır. AMH diğer biyokimyasal ve biyofiziksel belirteçlere göre bazı

avantajlara sahip çok kararlı bir belirteçtir ve yumurtalık rezervinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (13).

Ovaryumdaki primordiyal folikül havuzunun tükenmesi kadın üreme doğurganlığını ortadan kaldırarak menopoza neden olmaktadır (14). Normal menopoz ortalama 50 yaşında ortaya çıkmakta ve yumurtalık folikül tükenmesinden kaynaklanmaktadır. Normal menopoz geri döndürülemez bir durum olmakla birlikte prematür over yetmezliği genç kadınlarda aralıklı yumurtalık fonksiyonu ile karakterizedir. POY'a sahip genç kadınlar yüksek gonadotropin seviyelerine rağmen aralıklı olarak östrojen üretmekte ve bazen de yumurta oluşturmaktadırlar. Aslında prematüre over yetmezliği tanısı konulduktan sonra gebelik meydana gelebilmektedir (15).

3.2. POY'un İnsidansı

40 yaşın altındaki kadınların yaklaşık % 1'ini, 20 yaşın altında 1: 10,000 kadını ve 30 yaşın altında 1: 1000 kadını etkileyen heterojen bir hastalıktır (5). Kadınların yaklaşık %1'ini etkileyen bu durum; primer amenore olan kadınlarda % 10-28, sekonder amenore olan kadınlarda ise % 4-18 oranında görülmektedir (16). POY' un ailesel formu nadirdir, tüm POY vakalarının % 4 ila 31'inde görülmektedir.

3.3. POY'un Etiyolojisi

POY'un etiyolojisi bazı kadınlarda açıkça tanımlanabilse de önemli miktarda idiyopatik kalmaktadır çünkü vakaların % 75'inden fazlasında sebep belirlenememiştir (18, 19). Sendromik ve sendromik olmayan POF'da genetik

anormallikler tanımlanmış olmakla beraber yalnızca birkaç genin varyantlarının veya mutasyonlarının hastalığa neden olduğu ortaya konulmuştur. Bunun nedeni POY'un gametogenezis, ovulasyon ve oosit kalitesi gibi çok sayıdaki adımından biri veya birkaçını etkileyebilir özellikte olmasıdır (19).

Kadınlarda POY gonadal gelişim defektleri, otozomal ve gonozomal kromozomlardaki hasarlar gibi genetik nedenler, çeşitli maddelerin üretiminde kullanılan ve bu ürünlerden ortaya çıkan toksinler, radyoterapi, kemoterapi, otoimmünite (20), metabolik (galaktozemi), ve iyatrojenik (anti-kanser tedavileri) nedenler çeşitli ve bulaşıcı (kabakulak) hastalıkların (16) ovaryumlara etki etmesi ve dirençli over sendromu gibi nedenlerden dolayı oluşabilmektedir (20).

Olguların büyük bir bölümü iyopatik veya karyotipik normal spontan yumurtalık yetmezliği olarak sınıflandırılmakta iken vakaların yaklaşık % 30' una otoimmün sebepler yol açabilmektedir (2, 16) (Tablo 1).

Tablo 1. Prematüre over yetmezliğinin temel etiyolojik nedenleri (18)

Etiyolojileri	Özellikleri
Genetik: * Kromozomal anormallikler * Genetik mutasyonlar	Monozomi X ve mozaizm: Turner sendromu, triploid sendromu, kısmi delesyon ve X translokasyonu X kromozomları: Frajl X sendromu Diğer kromozomlar: FOX L2, FSHR, NOBOX, GALT, SF1, GDF1 vb.
İatrojenik	Pelvik, Over Cerrahisi Kemoterapi: Alkilleyici Ajanlar ++ vb. Radyoterapi
Otoimmün Hastalıklar	Hipotiroidizm, Tip 1 Diyabet, Addison Hastalığı, Miyasteni, Lupus vb.
Metabolik Hastalılar	Galaktozemi
Enfeksiyon	HIV Kızamık
Çevresel Faktörler	Sigara

3.3.1. Genetik Faktörler

3.3.1.1. Kromozomal Anormallikler

Olguların çoğunda etiyoloji idiyopatik ve muhtemelen genetikdir. POY'un genetik nedenleri kromozomaldır (2). Genetik kusurlar çoğunlukla X kromozomunu içermesine rağmen, çok sayıda çalışma otozomal ilişkiyi de belgelemektedir (Tablo 2) (16).

Ceylaner ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada Türkiye'de POF'un genetik sebeplerinin araştırılması amacıyla POY'lu 75 kadının karyotip analizi yapılmıştır. Bu hastalardan X kromozomunun anormalliğini içeren on sekiz ailevi vaka bulunmuştur (%24). On altı hastada Xq ve Xp delesyonları, translokasyonlar ve nümerik sapmalar gibi kromozomal anormallikler saptanmıştır (%21). 2 hastada Swyer sendromu; 2 hastada kırılğan X premutasyon taşıyıcılığı ve 1 hastada galaktozemi kaynaklı POY bulunmuştur. Böylece 75 hastanın 39'unda (%52) POY'un genetik olduğu tespit edilmiştir (21).

Folikülogenezis ve yumurtalık yetmezliği ile ilgili genlerin çoğunluğu X kromozomunun uzun kolunda bulunmaktadır (22). X kromozomunda büyük sapmalar içeren bozukluklar, bir X'in tamamen silinmesi (Turner sendromu), trizomi X, kısmi silinmeler veya X/otozom translokasyonları POY ile ilişkilendirilmektedir (2). Bu ilişkinin normal yumurtalık fonksiyonu için gerekli olan haployetersizliğe bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir (23).

3.3.1.2. Genetik Mutasyonlar

POY patogeneğinde rol alan çeşitli genetik mekanizmalar, azalmış gen dozajı ve mayozu etkileyen spesifik olmayan kromozom etkilerini içermektedir. Bunlar primordial foliküllerin havuzunda azalmaya, apoptozise bağlı over foliküllerinde artmış atrezi veya folikül olgunlaşmasını bozarak over yetmezliğine neden olabilmektedir (16).

Davis ve arkadaşları idiyopatik ailesel POY üzerinde çalışmış ve çoğu mutasyonun X kromozomu veya maternal olarak kalıtıldığını ve resesif olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte, otozomalarda da birçok aday gen bulunmaktadır. Tek bir genin veya genetik kusurun POY' dan sorumlu olmadığı ve POY' un heterojen bir genetik hastalık olduğu yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır. POY'da önemli bir rol oynadığı bilinen çeşitli aday genler bulunmaktadır (Tablo2) (22).

Tablo 2. Prematür over yetmezliği ile ilgili genler, protein ürünleri, yerleşimleri ve fonksiyonu (22).

Protein (gen)/Sendrom	Gen lokasyonu	Fonksiyon
FSH reseptörü (FSH receptor; FSHR)	2p21-p16	FSHR geni tarafından kodlanan protein, G proteinine bağlı reseptör ailesinden olup gonad gelişiminde işlev görmektedir.
LH reseptörü (LH receptor; <i>LHR</i>)	2p21	LHR hem LH hem de insan koryonik gonadotropin reseptörünü kodlamaktadır. Bu reseptör G-proteinine bağlı reseptör 1 ailesine aittir ve adenilat siklazı aktive eden G proteinleri aktivite olmasına aracılık etmektedir.
Ataksi telenjiektazi mutanı (Ataxia telangiectasia Mutated; ATM)	11q22-q23	Kodlanan protein PI3 / PI4 kinaz ailesine aittir. Fosforillenebilen bu protein, hücre döngüsünde önemli bir kontrol noktası kinazıdır.
Otoimmün düzenleyici (Autoimmune regulator; AIRE); Poliendokrinopati-kandidiaz-ektodermal distrofi	21q22	AIRE, nükleer bedenler oluşturan ve transkripsiyonel koaktivatör CREB bağlayıcı protein ile etkileşime giren bir transkripsiyonel düzenleyici kodlamaktadır.
Büyüme farklılaşma faktörü 9 (Growth differentiation factor 9; GDF9)	5q31.1	GDF9, TGF β süper ailesinin bir üyesidir. GDF9 oositlerde eksprese edilir ve yumurtalık folikülogenezisi için gerekli olduğu düşünülmektedir.
Short stature homeobox (SHOX); idiyopatik büyüme geriliği (Diaphanous; DIA)	Xp22.33 Yp11.3 Xq21.33	SHOX, eşleştirilmiş homeobox ailesine aittir. X ve Y kromozomlarının psödoautozomal bölge 1'de (PAR1) bulunmaktadır. DIA, yumurtalıkların gelişiminde ve normal işlevinde rol oynayabilmektedir. DIA'daki bozukluklar POF ile ilişkilendirilmiştir.
Frajl X mental retardasyon sendromu 1 (Fragile X mental Retardation syndrome 1; FMR1)/Frajl X sendromu	Xq27.3	FMR1 tarafından kodlanan protein RNA'yı bağlar ve polizomlarla ilişkilidir. Kodlanan protein, çekirdekten sitoplazmaya mRNA transferinden sorumludur.
FSH β altbirimi (FSH β)	11p13	Pituiter glikoprotein hormon ailesi, FSH, LH, insan koryonik gonadotropin ve tiroid uyarıcı hormonu içerir. Bu glikoproteinlerin hepsi özdeş bir α altbiriminden ve bir hormona özgü β altbiriminden oluşmaktadır. FSH, LH ile birlikte yumurta ve sperm üretimini başlatmaktadır.
Fosfomannomutaz (Phosphomannomutase; PMM2); glikoprotein sendromu tip 1	16p13.2-p13.3	PMM2 tarafından kodlanan protein, mannoz 6-fosfatın, dolichol-P-oligosakkaritlerin sentezi için gerekli GDP-mannozun öncüsü olan mannoz 1-fosfata izomerizasyonunu katalizlemektedir.

Galaktoz-1-fosfat uridil transferaz (Galactose-1-phosphate uridyl transferase; GALT); Galaktozemi	9p13	GALT, galaktoz metabolizmasının Leloir yolağının ikinci aşamasını, yani UDP-glikoz ve galaktoz-1-fosfatın glikoz-1-fosfat ve UDP-galaktoza dönüşümünü katalizlemektedir.
Forkhead box proteini L2 (FOXL2)	3q23	FOXL2'nin göz kapaklarında ve fetal ve erişkin over foliküler hücrelerinde spesifik olarak eksprese edilen nükleer bir proteindir. FOXL2 memelilerde over farklılaşmasının bilinen en erken belirticidir.
İnhibin a (INHA)	2q33-q36	İnhibin α alt birimi, bir pitüiter FSH salgılayıcı önleyicisi oluşturmak için ya βA veya βB alt birimine katılmaktadır. İnhibinin gonadal stromal hücre çoğalmasında olumsuz şekilde düzenlediği ve tümör baskılayıcı aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir.
Transforming growth factor β 1 (TGF β 1)	11q13.1	TGF β , birçok hücre tipinde proliferasyon, farklılaşma ve diğer fonksiyonları kontrol eden çok işlevli bir peptiddir. TGF β aktivasyonunun ve sinyalizasyonunun bozukluğu apoptoz ile sonuçlanabilmektedir.
Kemik morfogenetik protein 15 (Bone morphogenetic protein 15; BMP15)	Xp11.2	BMP15 tarafından kodlanan protein, TGF β süper ailesinin bir parçası olan kemik morfogenetik protein ailesinin bir üyesidir. Bu proteinin bir homodimer olarak veya ilgili bir protein olan GDF9 ile heterodimerler oluşturarak oosit olgunlaşması ve follikül gelişimine rol oynayabileceği düşünülmektedir.
Dachshund homologu 2 (Dachshund homologue 2; DACH2)	2 Xq21.3	DACH2, X kromozomu üzerinde bulunur ve DNA metilasyonu ile inaktive olmaktadır. Kodlanan protein organogenezin ve miyogenezin düzenlenmesinde ve POY' da rol oynayabilmektedir.
Prematür over yetmezliği tip 1B (Premature ovarian failure type 1B; POF1B)	Xq21.1-q21.2	POF1B'nin erken yumurtalık gelişimi için gerekli olduğu ve germ hücresine dönüşüm basamakları için gerekli olduğu düşünülmektedir.
Progesteron reseptör membran bileşeni 1 (PGRMC1)	Xq22-q24	Progesteron bağlayan protein, bir steroid membran reseptörüdür. Protein ağırlıklı olarak karaciğer ve böbrekte eksprese edilmektedir.
Steroidogenik faktör 1 (Steroidogenic factor 1; SF1)	11q13	Fetüs ve yetişkinlerde çeşitli hücre türlerinde eksprese edilen bir nükleer reseptör olan SF1, üreme sisteminin gelişmesinde rol oynayan farklı genleri, hipotalamik-pitüiter steroidogenezi ve POF'u düzenlemektedir. Gonadal cinsel farklılaşmanın, follikül maturasyonunun ve yumurtalık steroidogenezisinin düzenlenmesinde görevlidir. (3).
Yenidoğan yumurtalık homeobox (newborn ovary homeobox; NOBOX)	7q25	Yenidoğan yumurtalık homeobox geni (NOBOX), erken follikulogenezde oosite özel bir gen olarak işlev görmektedir. (3)

Metilen tetrahidrofolat redüktaz (Methylenetetrahydrofolate reductase; MTHFR)	1p36	MTHFR geninin varyantlarının folikülogenez ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. (3)
Laminin gamma 1 gene (LAMC1)	1q31	Laminin, bazal laminanın en bol bileşenlerinden biridir. LAMC1 ekspresyonunun foliküler gelişim sırasında arttığı bilinmektedir.(3)
Östrojen reseptör 1 (estrogen receptor 1; ESR 1) ve Östrojen reseptör 2 (estrogen receptor 1; ESR 2)	6q25.1- q25.2 14q23.2q2 3.3	İnsanlarda, sırasıyla ESR1 ve ESR2 geni tarafından kodlanan östrojen reseptör- α (ER- α) ve östrojen reseptör- β (ER- β) olmak üzere iki östrojen reseptör (ER) alt tipi bulunmaktadır. Östrojen, ER- α vasıtasıyla hipotalamus-hipofiz-ovaryan (HPO) ekseninde folikülogenezisi düzenlemek için ve yumurtalıkta ER- β yoluyla folikül gelişimini arttırmak için gonadotropinlerin salınımını uyarmaktadır (24).
Kisspeptin ve Kisspeptin reseptör (kisspeptin receptor; KISS1R)	1q32.1 19p13.3	Kisspeptin (KISS1) ve reseptörü (KISS1R) üreme işlevinin önemli düzenleyicisidir. GnRH, LH ve FSH ve cinsiyet steroid hormonlarını uyarmaktadır. Genlerinin mutasyonları cinsel olgunlaşmayı değiştirmektedir (25). Yapılan çalışmalar yumurtalık KISS1R sinyalizasyonunun normal yumurtalık fonksiyonu için gerekli olduğunu ve eksikliğinde POF ile sonuçlandığını göstermektedir (4).

3.3.2. İatrojenik Faktörler

3.3.2.1. Radyoterapi

Malign hastalıklar gelişen hastalarda tedavi için kullanılan radyoterapi POY'a neden olabilmektedir. Yumurtalık radyasyonu insanları infertil hale getirmektedir. Ancak bazı vakalarda ışına maruz kaldıktan sonra gebelik bildirilmiştir. Radyoterapinin etkisi doza, yaşa ve radyasyon tedavi alanına bağlıdır (16).

3.3.2.2. Kemoterapi

Kemoterapinin genç kadın kanserli hastaların yumurtalıklarında primordiyal follikül havuzunun tükenmesini tetikleyerek POY'a ve infertiliteye neden olduğu bilinmektedir (14). Kemoterapi (Chemotherapy; CTx) apoptotik yolları aktive etmek için mitokondriden sitokrom c salınması yoluyla DNA hasarına sahip yüksek oranda bölünen hücreleri elemek üzere tasarlanmıştır. Sonuç olarak, CTx yaygın olarak çeşitli malignitelerin tedavisinde kullanılmaktadır ve kanser hastalarının sağkalım oranını artırabilmektedir (26). Genç kadınlara verilen sitotoksik kemoterapi önemli bir POY etkenidir. Granulosa ve oosit hücrelerinin yapısı ve işlevi kemoterapötik ajanlardan etkilenmektedir. Kemoterapinin gonadotoksik etkisi büyük oranda kemoterapi maddesine ve doza bağlıdır. Ayrıca yaşla da ilgilidir (16). Bu nedenle CTx'in kadınlarda en önemli yan etkisi doğurganlığı azaltmasıdır ve geri dönüşümsüz POY ile sonuçlanmaktadır (26).

Kemoterapi ilaçları over yetmezlik indüklemeye oranlarına göre 3 risk kategorisine ayrılmıştır: Yüksek risk, orta risk ve düşük risk. En şiddetli hasar, oositlerin tahrip edilmesine, foliküler yıkımına ve yumurtalık korteks fibrozuna neden olan alkile edici ajanlar tarafından indüklenmektedir. Düşük riskli ajanlar antimetabolitleri ve antibiyotikleri içermektedir. Bitki alkaloidleri, taksanlar ve platin ajanlar gibi orta riskli ajanların germ hücreleri için toksik olduğu gösterilmiştir.

Antikanser tedavilerinin uzun vadeli yan etkileri ile ilgili klinik verilere dair geniş literatüre rağmen, gonadotoksiteden sorumlu olan biyolojik mekanizmaların anlaşılması konusunda fazla literatür bulunmamaktadır. Ancak

yumurtalık folikülünün hücresel mekanizmasının birçok kemoterapi ajanı tarafından indüklenen apoptozise özgü yüksek bir yatkınlığa sahip olduğu bilinmektedir (27).

Sisplatin (cis-diamminedichloroplatinum II) (Emmerson B.T 1996), çeşitli kanserlerin tedavisinde yaygın olarak kullanılan kemoterapötik ajanlardan biridir, ancak, nefrotoksisite, hepatotoksisite ve ototoksisite gibi kullanımını kısıtlayan yan etkilere sahiptir (28). Sisplatin, testiküler ve jinekolojik kanserler ve osteosarkom tedavisi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Uzun süreli yüksek doz kemoterapi, foliküllerin kaybolmasının yanı sıra amenoreye neden olarak over fonksiyonuna zarar verebilmektedir. Sisplatin, hücresel DNA replikasyonunu ve RNA transkripsiyonunu inhibe ederek G2 fazındaki hücrelerin bölünmesini durdurmaktadır ve apoptosise neden olmaktadır. Artan dozaj ve tedavi süresi ile vücuttaki sisplatin toksisitesi önemli ölçüde artmaktadır. Sisplatin maruziyeti, yumurtalık gelişiminin biyolojik süreçlerini önemli ölçüde azaltmakta ve nihayetinde POY gelişimine sebep olmaktadır (29).

3.3.2.3. Operasyonlar

Hemen hemen bütün pelvik cerrahi operasyonları bölgedeki kan dolaşımını etkileyerek veya inflamasyona neden olarak yumurtalıkta hasara neden olmaktadır (16).

3.3.3. Otoimmün Hastalıklar

POY olgularının % 20-30'unun otoimmün hastalıklarla ilişkili olduğu bildirilmektedir. En sık rastlanan tiroid bozukluklarıdır ve POY vakalarının % 30-

40'ında görülmektedir. Adrenal otoimmünite POY ile ilişkili en sık görülen ikinci otoimmün hastalıktır (30).

3.3.4. Metabolik Hastalıklar

Klasik galaktozemi, GALT eksikliğinin neden olduğu kalıtsal bir hastalıktır. Şiddetli fenotiplerde ölümcül toksik sendromlar, bilişsel ve motor anormallikler görülmektedir. Galaktozemik kadınların % 17-67'sinin POY'a sahip olduğu rapor edilmiştir (31).

3.3.5. Enfeksiyon Hastalıkları

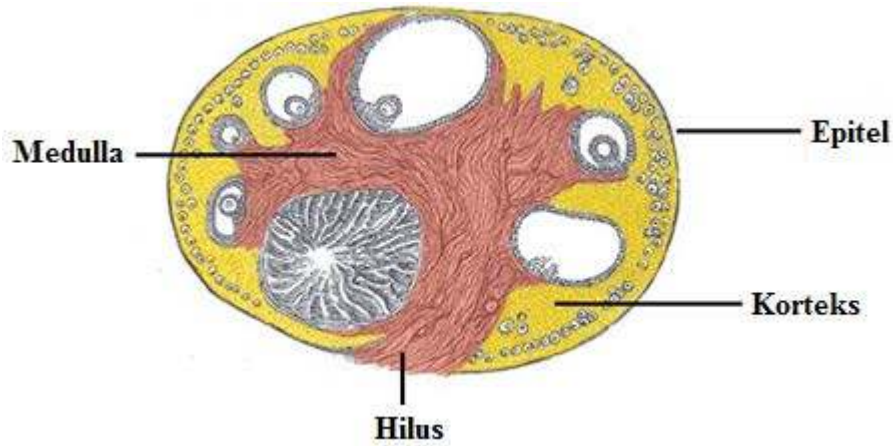
Yumurtalıklar virüslere ve toksinlere maruz kalabilmektedir. Kabakulak ooforiti POY'lu kadınların % 2-8'inde görülmektedir. Diğer nedenler arasında sıtma, varisella, shigella, herpes simpleks, vb. vardır. Kimyasal maddeler yumurtalık fonksiyonunu etkileyebilmektedir. Etki mekanizmaları hormonal bozulma ve bağışıklığın bozulması, DNA değişimi, hücre proliferasyonunun değişmesi veya uygun olmayan hücre ölümü şeklindedir (32).

3.3.6. Çevresel Faktörler

Oosit hasarına neden olan çevresel toksinler POY'a neden olmaktadır. Sigara, primordial germ hücrelerinde artmış apoptoz yoluyla foliküler atrofi ve atreziyi hızlandırarak yumurtalık fonksiyonunu değiştiren yaygın olarak incelenen toksindir. Yapılan hayvan çalışmaları sonucunda endokrin bozucular, ağır metaller, çözücüler, böcek öldürücü ilaçlar, plastik maddeler ve endüstriyel kimyasallar da olumsuz üreme sonuçları ve yumurtalık yetmezliği ile ilişkilendirilmektedir (33).

3.4. Over Anatomisi ve Histolojisi

Over doğum yapmamış kadınlarda 3 cm uzunlukta, 1,5 cm genişlikte, 1 cm kalınlıktadır ve küçük pelvisin yan duvarlarında bulunan *fossa ovarica* adı verilen çukurcularda yer almaktadır (34). Over, ovoid görünümde, dens, gri-ten renkli organlardır. Her biri yaklaşık 5-8 gr ağırlığındadır. Ovülasyon ve gebelik sırasında hacimleri artmaktadır. Kesit yüzünde değişik boyutlarda folliküller ve korpus luteum izlenebilir. Korteks ve medulla olarak iki bölüme ayrılmaktadır (35). Medulla ovaryumun merkezi bölgesinde bulunmaktadır ve gevşek bağ dokusu, nispeten büyük, kıvrımlı kan damarları, lenf damarları ve sinirler içermektedir. Korteks medullayı çevreleyecek şekilde ovaryumun periferik bölgesinde yer almaktadır. Korteks, zengin bir şekilde sellüler bağ dokusu içine gömülü ovaryum folliküllerini içermektedir (36). Ovaryumların ön kısımlarında kan damarlarının ve sinirlerin girdiği hilus adı verilen bölge bulunmaktadır (34).



Şekil 1. Over anatomisi ve histolojisi (37; nolu kaynaktan uyarlanmıştır)

3.5. Folikülogenezis

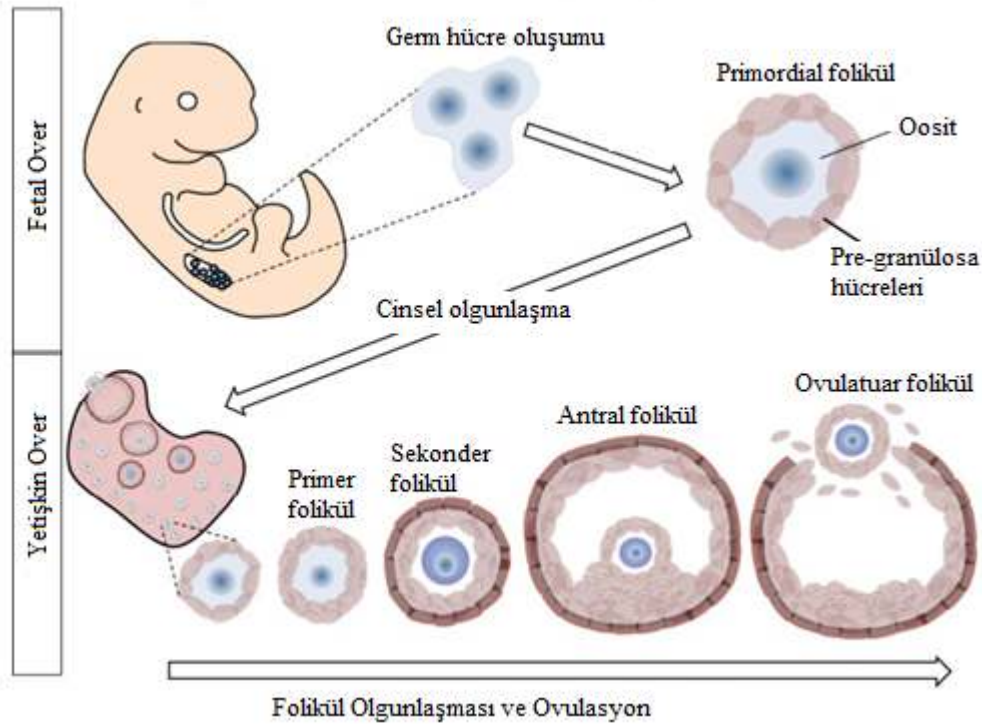
Memelilerde oositler, gelişimin erken döneminde oogoniaya (oositi oluşturacak kök hücreler) dönüşmek için gonadlara göç eden primordial kök hücrelerden köken alırlar. Fetal ve neonatal dönemde pregranüloza hücrelerinin primordial folikül oluşturmak için gelişmesiyle folikülogenezis başlamaktadır (38).

Folikülogenezis folikülün primordiyal fazdan başlayarak morfolojik olarak belirlenen primer, preantral ve antral fazları geçerek preovulatuvar folikül fazına geçmesidir. Folikülogenezis esnasında oositler büyürken granüloza hücreleri de çoğalarak farklılaşmaktadır. Primordial kök hücreler intrauterin folikülogenez esnasında çap olarak büyümekte ve mayotik olgunlaşmaya doğru gitmektedir. Bu işlev primordial kök hücrelerinin mayoz I'in profaz aşamasında durması ile sonuçlanmaktadır. İntrauterin dönemde overlerde profaz I'de tutulan her oosit, pregranüloza hücrelerinden oluşmuş tek katlı yassı hücre tabakası ile çevrilidir. Puberteden sonra gonadotropinlerin etkisi ile foliküllerin büyüme hızı artarak granüloza hücreleri arasında birtakım boşluklar şekillenmekte ve böylece antral foliküllerin oluşumu gerçekleşmektedir (39).

Primordial folliküller gebelik sırasında somatik gonadlara lokalize olan primordial germ hücrelerinden üretilir ve germ hücreli kistler oluşturmak için mitotik bölünmelere uğramaktadırlar. Bu kistler daha sonra somatik bir pregranüloza hücrelerinin bir tabakası ile çevrili oositleri içeren primordiyal follikül havuzunu oluşturmak için çöküntü (breakdown) geçirirler. Cinsel olgunlaşma sırasında, primordial folliküller birincil ve ikincil follikül evrelerine olgunlaşmakta ve sonunda sıvı dolu bir antral boşluğa dönüşmektedirler. Ergenlik

döneminin başlangıcından sonra, olgunlaşmış folliküllerin, oositin daha da olgunlaşmasını ve daha sonra ovulasyonu teşvik eden bir LH dalgalanması ile aktive edilmektedirler (40) (Şekil 2).

Dişi üreme hayatını uzun süre korumak için primordiyal folliküllerin çoğunluğu daha sonra kullanmak üzere dormant fazda muhafaza edilmektedir. Olgun yumurta üretmek için primordiyal folliküller foliküler aktivasyon olarak adlandırılan bir işlem vasıtasıyla, durgun foliküllerin rezervuarından büyüyen foliküler havuza yönlendirilir. Primordiyal folliküllerin aktivasyonu oldukça düzenlenmiş bir süreçtir ve altında yatan mekanizmalar tam olarak ortaya konulamamıştır. Menopoz ya da yumurtalık yaşlanması primordiyal foliküllerin havuzu tükenince oluşmaktadır (41).



Şekil 2. Yetişkin yumurtalık rezervinin fetal kökenleri (40).

3.6. Mitokondrial Biyogenez ve POY

Mitokondri; memeli hücrelerinde biyolojik oksidasyondan sorumlu bir organeldir. Her memeli hücresi birkaç yüz ile bin milyondan fazla mitokondri içermektedir. Mitokondrinin büyüklüğü, şekli ve bolluğu farklı hücre türlerinde değişmektedir ve farklı enerji talebi ve farklı fizyolojik veya çevresel koşullar altında değişebilmektedir. Bir hücrede mitokondrinin bolluğu biyogenez ve organellerin bölünmesi ile belirlenmektedir. Hücre başına mitokondri miktarı, spesifik transkripsiyon faktörlerinin ve sinyal yollarının aktivasyonu ile kontrol edilmektedir (42).

Mitokondrinin kendi genomu vardır ve kendi kendine replike olabilmektedir. Mitokondriyal proteinler nükleer ve mitokondriyal genomlar tarafından kodlanmaktadır. MtDNA (mitokondrial DNA) çift iplikli ve dairesel bir moleküldür. 16.5 kb uzunluğundadır ve elektron transport zinciri kompleksleri I, III, IV ve V'in 13 alt birimini kodlayan 37 gen içermektedir. Diğer mitokondriyal gen ürünleri mitokondriyal matristeki solunum alt birimi mRNA'larının translasyonu için gerekli olan 22 tRNA (transfer RNA) ve iki rRNA'dır (ribozomal RNA'lar).

Mitokondrial biyogenez mitokondrinin büyümesi ve bölünmesi olarak tanımlanabilmektedir. Doğru mitokondriyal biyogenez, nükleer genom tarafından kodlanan ve sitozolik ribozomlar üzerinde sentezlenen yaklaşık 1000-1500 proteinin eş zamanlı sentezini gerektirmektedir. Mitokondriyal biyogenez egzersiz, kalori kısıtlaması, düşük sıcaklık, oksidatif stres ve hücre bölünmesi, yenilenmesi ve farklılaşması gibi çevresel streslerden etkilenmektedir.

Mitokondriyal biyogenez, yalnızca sayıca değişiklik değil aynı zamanda boyut ve kütle değişikliğidir (43).

Mitokondriyal biyogenez ve biyoenerjitikler, oosit olgunlaşması ve embriyo gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Olgun oositler, vücutta en fazla sayıda mitokondriye ihtiyaç duyan dokulardan biridir. Oosit başına mitokondriyal DNA kopya sayısının, bir zigot gelişme olasılığı ile kesin olarak ilişkili olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak POY'lu kadınlarda oositte belirgin bir mitokondriyal tükenme gözlenmektedir (44).

Mitokondriyal enerji üretimi hücre çoğalması ve apoptozda önemli bir role sahiptir. Mitokondrinin kendi genetik materyali (mtDNA) maternal olarak kalıtılmaktadır. Lüteinizan granülosa hücrelerinde yaş arttıkça mtDNA delesyonlarının arttığı, antioksidan enzim düzeylerinde bir düşüş olduğu ve sonuç olarak oositlerde seramid gibi belirli faktörlerin artışı ile apoptozun hızlandığı görülmüştür. Anormal mitokondrideki Ca^{2+} dalgalanmaları normal fizyolojik süreci destekleyen ATP üretimini uyarmamakta ve böylece doğurganlık etkilenmektedir (45).

Birçok çalışma, mitokondriyal değişimin POY patogenezi ile ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır. Bu nedenle, mitokondriyal disfonksiyon patolojik değişikliklere neden olarak normal ATP seviyelerinin üretimini bozmakta ve reaktif oksijen türlerini (reactive oxygen species; ROS) arttırarak granüler hücre fonksiyonunu ve oositlerin gelişimini etkilemektedir (46). ROS birikimi yumurtalık fonksiyonuna zarar verebilmektedir. Çevresel faktörler tarafından indüklenen ROS'un antral follikül apoptozunun başlatılmasına katıldığına dair somut kanıtlar bulunmaktadır (18).

3.6.1. Mitokondri Koruyucu Ajan: AP39

AP39 mitokondriyal hedefli H₂S donörüdür. H₂S, memeli hücrelerinde bir elektron donörü ve potansiyel bir inorganik enerji kaynağı olarak görev yapmaktadır. Bu da hücrel oksijen kullanımında ve ATP üretiminde artışa neden olmaktadır. AP39, mitokondride H₂S düzeylerini arttırır. Hücre içi ROS seviyeleri, oksidatif stresin temel bir göstergesidir. AP39 ROS seviyelerini etkili bir şekilde düşürmektedir. Sıçanlarda AP39'un kan basıncını, kalp hızını ve nabız dalga hızını azalttığı gözlenmiştir. En önemli bulgulardan biri de AP39'un mtDNA bütünlüğünü açıkça korumasıdır. Sonuç olarak, AP39'un mitokondriyal disfonksiyona karşı koruma sağladığı ortaya konulmuştur (47).

3.7. Stres ve POY

Duygusal faktörlerin, hipotalamus düzeyinde hipofiz-yumurtalık eksenini etkilediği gösterilmiştir. En iyi bilinen örnek, çevresel ve endojen kaynaklı stres ile hipotalamik amenore arasındaki bağlantıdır. Bu durumun gonadotropin salınım hormonunun (GnRH) dengeli salgılanmasındaki eksiklikten kaynaklandığı düşünülmektedir (48).

Kronik stres maruziyetinin kardiyovasküler hastalık, ateroskleroz, diyabet, nörodejeneratif hastalıklar ve diğer zihinsel rahatsızlıklar gibi zayıflatıcı bazı hastalıklara yol açtığı bilinmektedir (49).

Psikolojik stres POY'un yaygın ve önemli bir sebebi haline gelmiştir. Bu nedenle, psikolojik stres kaynaklı POY mekanizmalarını keşfetmek çok önemlidir. Çalışmalar göstermektedir ki, kronik endişe, hüzn, korku ve diğer olumsuz duygular gibi psikolojik stres, hipotalamik-pituiter-yumurtalık eksenini

bozukluğunun ortaya çıkmasına neden olan hipotalamik-pitüiter-hedef bez aksının işlevini değiştirerek POY'a yol açabilmektedir (50).

Over yetmezliği, ROS yumurtalık dokusuna zarar vererek folikül tükenmesine yol açmaktadır. Oksidatif stres, iğ yapısı bozulması, erken primordiyal follikül aktivasyonu, antral folikül yıkımı, bozulmuş oosit füzyonu, mitokondri türevli ATP eksikliği ve postovulatuvar yaşlanmaya yol açarak oosit bütünlüğünü etkilemektedir. ROS'un aşırı üretimi mitokondriyal disfonksiyona aracılık edebilmekte ve antioksidan mekanizmaları azaltabilmektedir. Her iki durumda da daha fazla ROS oluşumuna katkıda bulunarak apoptozise neden olabilmektedir (51). Şu ana kadar yapılan çalışmalarda stresin over dokuda mitokondriyal biyogenez veya yumurta kalitesinin göstergesi olan gen ifadeleri üzerine etkileri bilinmemektedir.

3.8. Stres Çalışmalarında Kullanılan Sıçan Modelleri

3.8.1. Kısıtlama Stresi

Kemirgenlerde kısıtlama stresi basit ve ağrısız olup hem oksidatif hem de psikolojik strese neden olduğundan, psikolojik stres için model olarak kullanılmaktadır. Kısıtlama stresinin beyin fonksiyonlarını ve morfolojisini etkileyerek korteks, striatum ve hipokampus gibi çeşitli beyin bölgelerinde olumsuz sonuçlara yol açtığı bilinmektedir (52).

Kısıtlamanın yöntem olarak farklı bir alt tipi olan immobilizasyon stresi yaygın olarak hareket sınırlayıcı olarak tanımlanır, ancak diğer sınırlama tekniklerinin çoğunun yaptığı gibi belli bir uzuv hareketini sınırlamaya çalışmamaktadır. Kısıtlama ve immobilizasyon stresleri fiziksel işlemler

oluştururken psikiyatrik stres modelleri olarak da kullanılmaktadır. Bu tür stres faktörleri kullanmanın avantajlarından biri de, kısıtlama süresi sona erdikten sonra canlıda herhangi bir bedensel zararın oluşmamasıdır. Bu da gözlemlenen sonuçların kronik yaralanmadan ziyade uygulanan stresörden kaynaklandığının kanıtıdır. Stres etkileri uzun vadeli ve geri döndürülemezdir (53).



Şekil 3. Sıçan immobilizasyon aparatı (54)

3.10. POY ve Öğrenme Güçlüğü

Menapoz yumurtalık yaşlanmasının son adımıdır. Literatürdeki veriler, ömür boyu östrojen maruziyetinin ham bir göstergesi olan menarş ve menopoz arasındaki zamanın uzunluğunun kadın sağlığı üzerinde önemli etkileri olduğunu göstermektedir. Erken menopozun, kardiyovasküler hastalıklar, osteoporoz ile ilişkili kemik kırıkları ve bilişsel işlevde gerileme ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (55).

Östrojen eksikliği olan çeşitli popülasyonlarda östrojen tedavisinin biliş ve davranış üzerindeki etkilerinin yararlı olduğu bildirilmiştir. Erken menopoz bilhassa sözel belleği içeren bilişteki değişiklikler kadar östrojendeki ani

düşüşlerle de ilişkilidir. Dolayısıyla, östrojen eksikliğinin bilişsel işlevlerde değişikliğe neden olduğu ve POY'lu kadınlarda da bilişsel işlevlerde değişikliklerin görüldüğü bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda POY kadınları ve kontroller arasında bilişsel farklılıkların olmaması, östrojen desteğinin östrojen eksikliği bağlamında ortaya çıkabilecek bilişsel etkilerin önlenmesinde oldukça başarılı olduğunu düşündürmektedir (56).

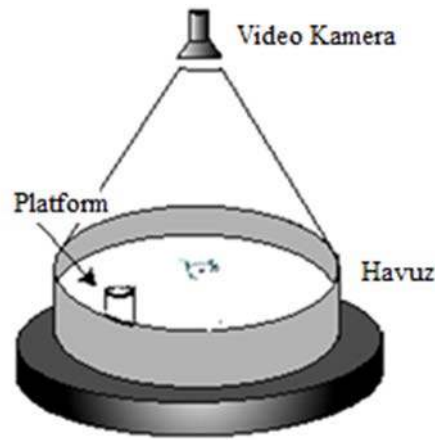
Ryan ve ark tarafından yapılan bir çalışmada prematür over yetmezliğinin sonraki yaşamdaki bilişsel işlev üzerinde uzun süreli olumsuz etkilere sahip olduğuna dair kanıtlar elde etmişlerdir. Endojen östrojen seviyeleri ile bilişsel işlev arasında pozitif korelasyon bildirmişlerdir. Hormon tedavisi yoluyla östrojen takviyesi ile postmenopozal kadınlarda bilişsel düşüşü ve demans riskini azaltmaya yardımcı olabileceği belirtilmiştir (57). Sıçan POY modellerinde POY'un öğrenme üzerine olumsuz etkilerinin çalışıldığı araştırma sayısı oldukça azdır.

3.9. Davranış Deneyleri

3.9.1. Morris'in Su Tankı Testi ve Prob Testi

Morris'in su tankı testi Richard Morris tarafından geliştirilmiş ve ilk olarak 1980'lerin başında iki yayında açıklanmıştır. Morris su tankı, mekansal öğrenme ve hafızanın psikolojik süreçlerini ve sinirsel mekanizmalarını incelemek için kullanılan en yaygın yöntemlerden biridir. Kemirgenler geniş yuvarlak bir havuza bırakılır ve yeri yalnızca uzamsal bellek kullanarak belirlenebilen gizli bir platform üzerine çıkmak zorundadır (58).

Su tankı testi için farklı protokoller geliştirilmiştir. Protokol genellikle iki veya dört gün süreyle uygulanmaktadır (59). Havuza koyulan platformu 2 cm aşacak şekilde 26° C su ile doldurulmaktadır. Havuz, hayali 2 çizgi ile 4 eşit parçaya bölünmektedir. Hayvanın platformu bulmasını sağlayacak ışık, renkli kağıt gibi ipuçları deney sonuna kadar aynı yere koyulmaktadır. Deneye başlamadan önce kullanılan protokole uygun olarak 2 veya 4 gün yüzme alıştırmaları yaptırılmaktadır. Alıştırma için hayvanlar 90 sn yüzdürülmektedir. Platformu bulamayan hayvan 30 sn platforma bırakılmaktadır. Bu işlem her 4 yön için tekrarlanmaktadır. Platforma kaçış süresi kaydedilerek 5. gün platform sudan çıkartılır ve hayvanlar 4 yönden 60'ar sn yüzdürülür. Platformun önceden bulunduğu taraftaki yüzme süreleri değerlendirilir (60). Bu yolla bilgi edinme ve kalıcılık değerlendirilmektedir (59). Tipik olarak, iyi eğitilmiş bir sıçan, havuzun hedef çeyreğine ve başka yerlerde aramaya başlayana kadar platformun eski yerinde defalarca yüzecektir. Çeşitli yollarla ölçülen bu mekansal önyargı, mekânsal bellek için bir kanıt oluşturmaktadır. Hipokampus lezyonları veya kombine lezyonlara sahip sıçanlar, antrenman sonrası prob testlerinde kötü sonuç vermektedir (58).



Şekil 4. Morris su tankı (58 nolu kaynaktan uyarlanarak alınmıştır.)

Morris'in su tankı testinde yer değiştirme, sinir sistemindeki çeşitli rahatsızlıkların, yaşlanmanın, nörodejeneratif hastalığın veya yeni terapötik ilaçların potansiyel etkisinin test edilmesi için genel olarak bilişsel işlevin genel bir tahlili olarak kullanılmaktadır (61).

3.11. Çalışmanın Amacı

Menapoz süresince beyinde pek çok molekülün değiştiği ve bu moleküllerin dişilerde kognitif fonksiyonların azalmasına aracılık ettiği ifade edilmektedir. Gore ve arkadaşları menopoza giren dişi sıçanların hipotalamuslarında Kiss-1 ve Esr-1 gen ifadelerinin değiştiğini belirlemişlerdir (62, 63). Ancak POY'ta hipotalamus bölgesinde bu genlerin ifadelerinin nasıl değiştiği bilinmemektedir. Özellikle beynin öğrenmeden sorumlu olan hipotalamus bölgesinde öğrenme ile ilişkili gen ifadelerinin sıçan POF modellerinde değerlendirildiği çalışmalara rastlanmamıştır. Tablo 3'te verilen öğrenme ile ilişkili (64) gen ifadeleri beynin hipotalamus ve hipokampus bölgesinde değerlendirilerek AP39 'un beyindeki öğrenme fonksiyonları üzerine etkileri de açıklığa kavuşturulmuş olacaktır.

Tablo 3. Öğrenme ile ilişkili genler

Sembol	İsim	Lokus	Özellik
Kiss-1	Kiss-1 metastasis suppressor	1q32.1	Metastaz baskılayıcı bir gen dir. Kodladığı protein, kemotaksiyi ve istilayı inhibe edebilir ve böylece malign melanomalarda metastazı zayıflatabilir. Bu genin bir proteini olan kisspeptin, gonadotropin salınım hormonu (GnRH) ile tetiklenen gonadotropin salınımını uyarır ve GnRH nöronlarının pubertal aktivasyonunu düzenler.
Kiss-1R	KISS1 receptor	19p13.3	KISS1 tarafından kodlanan bir peptid olan metastine bağlanan G protein reseptörüdür. Pubertenin başlangıcında bir rol oynadığı bilinmektedir.
BDNF	Brain derived neurotrophic factor	11p14.1	Sinir büyüme faktörü ailesinin bir üyesini kodlamaktadır. Stres tepkisinin düzenlenmesinde ve duygu durum bozukluklarının biyolojisinde rol oynamaktadır.
GDNF	Glial cell derived neurotrophic factor	5p13.2	GDNF'nin primordiyal follikül gelişimini teşvik ettiği ve folikülogenez sırasında gerekli olan otokrin ve parakrin hücre-hücre etkileşimlerini yönlendirdiği bilinmektedir (65).
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	17q21.31	Olgun astrositlerin ana ara filament proteinlerinden birini kodlamaktadır. Gelişme sırasında astrositleri diğer glial hücrelerden ayırt etmek için bir belirteç olarak kullanılmaktadır.

Çalışmada ayrıca sıçanlarda stres ve sisplatin ile oluşturulan prematür over yetmezlik modelinde over dokusunda özellikle mitokondrial biyogenezle ilişkili gen (Tablo 4) ifadelerinin kontrolle karşılaştırılarak araştırılması amaçlanmaktadır. POF oluşumunda mitokondrial biyogenezin rolü ortaya konacak ve mitokondri biyogenezini düzenleyen ve mtDNA'yı koruyan bir ajan olan AP39'un muhtemel koruyucu etkileri belirlenecektir. AP39 kullanımının koruyucu etkinliğinin olup olmadığı ve muhtemel koruyucu etkilerinde aracılık eden moleküler mekanizmalar aydınlatılmış olacaktır. Deney sonunda AP39'un mitokondrial biyogenezi koruyarak POF üzerine muhtemel iyileştirici etkileri belirlenebilirse, bu veri yeni bir tedavi yaklaşımı olarak AP39 kullanılabilirliğini mümkün kılacaktır. Bu da ulusal ekonomimiz açısından pozitif yönde bir katkı sağlayacaktır.

Tablo 4. Mitokondriyal Biyogenezle İlişkili Genler

Sembol	İsim	Lokus	Özellik
ATP5B	ATP synthase subunit beta, mitochondrial	12q13.3	Mitokondriyal ATP sentazın β altbirimini kodlar. Mitokondriyal ATP sentaz, oksidatif fosforilasyon sırasında iç zar boyunca protonların elektrokimyasal gradyanını kullanan ATP sentezini katalize eder.
PPARGC1A	PPARG coactivator 1 alpha	12q13.3	Bu gen tarafından kodlanan protein, enerji metabolizmasına katılan genleri düzenleyen bir transkripsiyonel koaktivatördür. Dış fizyolojik uyarılar ile mitokondriyal biyogenezin düzenlenmesi arasında doğrudan bir bağ sağlar.
PPARGC1B	PPARG coactivator 1 beta	5q32	Östrojen reseptörü alfa, nükleer respiratuar faktör 1 ve glukokortikoid reseptör gibi nükleer reseptörlerin ve birçok transkripsiyon faktörünün aktivitesini uyarır, yağ oksidasyonu, oksidatif olmayan glikoz metabolizması ve enerji harcamalarının düzenlenmesinde rol oynar.
PRKAA2	Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2	1p32.2	AMP ile aktive olan protein kinazın (AMPK) katalitik bir altbirimidir. Hücre metabolik streslere yanıt olarak, AMPK aktive edilir ve böylece yağ asidi ve kolesterol biyosentezinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır.
NRF1	Nuclear respiratory factor 1	7q32.2	Solunum, heme biyosentezi ve mitokondriyal DNA transkripsiyonu ve replikasyonu için gerekli nükleer genleri düzenler Hücre büyümesini, metabolik genlerin sentezini aktive eden bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görür.
MNF2	Mitofusin 2	1p36.22	Bu gen, mitokondriyal füzyona katılan ve mitokondriyal ağın bakım ve işletilmesine katkıda bulunan bir mitokondriyal membran proteinini kodlamaktadır.
OPA 1	Mitochondrial dynamin like gtpase	3q29	Nükleer olarak kodlanmış bir mitokondriyal protein olup, dynamin ile ilgili GTPazlara benzerlik gösterir. İç mitokondriyal membrana lokalizedir. Mitokondriyal stabilite ve enerji çıkışını düzenlemeye yardımcı olur.

HIF-1	Hypoxia inducible factor 1	14q23.2	Enerji metabolizması, anjiyogenez, apoptoz ve oksijen dağıtımını sağlayan genler dahil olmak üzere birçok genin transkripsiyonunu aktive eder.
CHRM 1	Cholinergic receptor muscarinic 1	11q12.3	Muskarinik kolinerjik reseptörler, G proteinine bağlı reseptörlerden oluşan büyük bir ailenin üyeleridir.
TFAM	Transcription factor A, mitochondria 1	10q21.1	İki yüksek hareket kabiliyetli motif içeren anahtar mitokondriyal transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Kodlanan protein aynı zamanda mitokondriyal DNA kopyalama ve onarımında da işlev görmektedir.
NFE2L2	Nuclear factor, erythroid 2 like 2	2q31.2	Lösın zipper proteinlerinden oluşan küçük bir ailenin üyesi olan bir transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır. Kodlanan transkripsiyon faktörü, promoterlerinde antioksidan yanıt elementleri içeren genleri düzenler; bu genlerin birçoğu, serbest radikallerin üretimini içeren yaralanma ve enflamasyona tepki gösteren proteinleri kodlamaktadır.

Bu ön çalışmadan elde edilecek veriler sonucunda stres ve sislatinin POF üzerindeki moleküler yolağı aydınlatılması ve yeni tedavi yaklaşımı ile ilgili ön veriler elde edilmiş olacaktır. Sisplatin ve stresin over dokusundaki etkilerini araştırmak amacıyla Tablo 5’te verilen over ile ilişkili genlerin Real Time PCR ile ifade düzeyleri karşılaştırılarak POY’a neden olan etmenlerin moleküler mekanizması aydınlatılmaya çalışılacaktır.

Tablo 5. Over ile ilişkili genler

Sembol	İsim	Lokus	Özellik
Dppa 3	Developmental pluripotency associated 3	12p13.31	Farelerde gelişmenin preimplantasyon aşamasında bir maternal faktör görevi görebilecek bir proteini kodlar. Farelerde transkripsiyonel baskı, hücre bölünmesi ve hücre pluripotansiyelliliğinin korunmasında rol oynayabilir.
FIGLA	Folliculogenesis specific bhlh transcription factor	2p13.3	Postnatal oosit-spesifik gen ekspresyonunda işlev gören bir proteini kodlamaktadır. Folikülogenezde rol oynayan genler ve zona pellucida'yı kodlayan genler de dahil olmak üzere, çok sayıda oosite spesifik geni düzenleyen temel heliks-loop-heliks transkripsiyon faktörüdür. Gendeki mutasyonlar, prematür over yetmezliğine neden olmaktadır.
DAZL	Deleted in azoospermia like	3p24.3	DAZ gen ailesi, erkek ve kadınların prenatal ve postnatal germ hücrelerinde ifade edilen potansiyel RNA bağlama proteinlerini kodlamaktadır. Fetal germ hücrelerinin çekirdeğinde ve sitoplazmasında, gelişmekte olan oositlerin sitoplazmalarına lokalizedir.
ZP1	Zona pellucida glycoprotein 1	11q12.2	Zona pellucida'nın yapısal bütünlüğünü sağlamaktadır. Zona pellucida, oositi ve erken embriyoyu çevreleyen hücre dışı bir matristir. Gendeki mutasyonlar, oosit olgunlaşması defekti ve infertiliteye neden olmaktadır.
ZP2	Zona pellucida glycoprotein 2	16p12.3-p12.2	Glikozillenmiş olgun peptid, zona pellucida'nın yapısal bileşenlerinden biridir ve akrozomla reaksiyona giren spermatozanın sekonder bağlanması ve nüfuz etmesinde işlev görmektedir. Bu geni içermeyen dişi fareler stabil zona matrisi oluşturmazlar.
POU5F1	POU class 5 homeobox 1	6p21.33	Embriyonik gelişim ve pluripotenside önemli bir rol oynayan bir POU homeodomaini içeren transkripsiyon faktörünü kodlamaktadır.

Npm 2	Nucleoplasmin 2	8p21.3	Nükleoplazmin (NPM) şaperon aileleri [NPM1, NPM2, NPM3] kromatin yeniden şekillendirme, genom istikrarı, ribozom biyogenezi, DNA duplikasyonu ve transkripsiyonel regülasyon gibi hücrel süreçlerde çeşitli işlevlere sahiptir (66). NPM2'nin ektopik ekspresyonu, pluripotikliğe bağlı genlerin sentezlenmesine neden olmaktadır. NPM2, erken embriyogenez sırasında kromatin yapısının düzenlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır (67).
H1FOO	H1 histone family member O oocyte specific	3q22.1	DNA bağlayıcı bir histon olan H1 protein bu gen tarafından kodlanmaktadır. Histon ailesinin bir üyesi olan H1 replikasyondan bağımsız bir histondur. Bu gen, çoğu histon geninden farklı olarak intronlar içermektedir. İlgili fare geni sadece oositlerde eksprese edilmektedir.
DNMT1	DNA methyltransferase 1	19p13.2	DNA metilasyonunda görevli bir enzimdir. Bu protein, DNA replikasyonundan sonra metilasyon kalıplarının muhafaza edilmesinden sorumlu olan ana enzimdir. DNA'nın metilasyonu memeli epigenetik gen düzenlenmesinin önemli bir bileşenidir.
DNMT3A	DNA methyltransferase 3 alfa	2p23.3	Bakım metilasyonundan ziyade de novo metilasyonda işlev gördüğü düşünülen bir DNA metil transferazıdır. Sitoplazma ve çekirdeğe lokalize olan proteinin ifadesi gelişimsel olarak düzenlenmektedir.
DNMT3B	DNA methyltransferase 3 beta	20q11.21	Bakım metilasyonundan ziyade de novo metilasyonda işlev gördüğü düşünülen bir DNA metil transferazını kodlamaktadır. Protein öncelikle çekirdeğe yerleşir ve ifadesi gelişimsel olarak düzenlenmektedir.
KAT 2A	Lysine acetyltransferase 2A	17q21.2	KAT2A transkripsiyonel aktivatör olarak işlev gören bir histon asetiltransferazdır (68). Oosit yetkinliği bir oositin olgunlaşması, döllenmesi ve embriyonik gelişim yeteneğidir. Çalışmalar, olgunlaşma sırasında oositte histonların asetilasyon enzimlerinin önemini ve bunların oosit yetkinliği ile ilişkisi bildirmektedir (69).

HDAC 3	Histone deacetylase 3	5q31.3	Histon deasetilaz aktivitesine sahip olup transkripsiyonu baskılamaktadır. p53 fonksiyonunu azaltarak hücre büyümesini ve apoptozu düzenlemektedir.
SIRT 7	Sirtuin 7	17q25.3	Sınıf III histon deasetilaz (HDAC) 'e ait olan sirtuenler, yedi üyeden (SIRT1-7) oluşur ve deasetilatlanma histonlarının ve histon proteinlerinin örnekleridir. Mitoz, hücre sinyal iletimi ve DNA hasar onarımı gibi genetik düzenleyici ağın vazgeçilmez parçasıdır (70).
MBD 2	Methyl-cpg binding domain protein 2	18q21.2	Metilasyon sinyalinin biyolojik sonuçlarının bir aracısı olarak işlev görmektedir. DNA metilasyonu gen sessizleştirmesine neden olduğu için, bu proteinin transkripsiyonu etkinleştirmek için bir demetilaz olarak işlev gördüğü de bildirilmektedir.
KMT2A	Lysine methyltransferase 2A	11q23.3	Erken gelişme ve hematopoez sırasında gen ekspresyonunu düzenlemede önemli bir rol oynayan bir transkripsiyonel koaktivatör kodlamaktadır.
SMARCA 1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 1	Xq25-q26.1	SWI / SNF protein ailesinin bir üyesini kodlamaktadır. Çeşitli dokularda eksprese olan ve transkripsiyona katılan kromatin yeniden biçimlendirme kompleksine katkıda bulunan bir ATPaz'tır. Protein aynı zamanda kanser hücrelerinin DNA hasar, büyüme inhibisyonu ve apoptozunda da rol oynamaktadır.
ESR 1	Estrogen receptor 1	6q25.1-q25.2	Östrojen reseptörü kodlamaktadır. Reseptör hormona bağlanma, DNA bağlama ve transkripsiyon aktivasyonu için önemli birkaç bölgeden oluşan bir ligand-aktif transkripsiyon faktörüdür. Östrojen ve reseptörleri cinsel gelişim ve üreme işlevleri için gereklidir.
GTF2H1	General transcription factor IIH subunit 1	11p15.1	Bazal transkripsiyona katılır ve birçok durumda transaktivasyonu modüle eder (71).

MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	15q22.31	Kinaz ailesinin bir üyesi olup bir mitojen-aktif protein kinaz (MAP) görevi görmektedir. Proliferasyon, farklılaşma, transkripsiyon düzenleme ve gelişim gibi birçok hücrel süreçte yer almaktadır.
NCOA1	Nuclear receptor coactivator 1	2p23.3	Steroid ve nükleer hormon reseptörleri için bir transkripsiyonel koaktivatör olarak görev yapmaktadır. Nükleer reseptörlere doğrudan bağlamakta ve transkripsiyonel aktiviteleri hormona bağlı bir biçimde uyarmaktadır.
TBP	TATA-box binding protein	6q27	TATA bağlayıcı protein olan TBP'yi kodlamaktadır. TBP'nin N-ucunda uzun bir glutamin dizisi bulunmaktadır. Proteinin bu bölgesi, C-ucunu DNA bağlanma aktivitesini düzenlemektedir. DNA bağlanmasının modülasyonu, transkripsiyon kompleksinin oluşum hızını ve transkripsiyonu başlatmayı etkilemektedir.
MED15	Mediator complex subunit 15	22q11.21	RNA polimeraz II transkripsiyonunda bir transkripsiyonel koaktivatör olarak işlev görmektedir.
POLR2C	RNA polymerase II subunit C	16q21	Ökaryotlarda mRNA sentezinden sorumlu polimeraz olan RNA polimeraz II'nin en büyük üçüncü alt birimini kodlamaktadır.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Çalışma Gruplarının Tanımı

Çalışmada denek olarak, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinden (FÜDAM) temin edilen 320-330 gr ağırlığında 60 adet Spraque-Dawley cinsi dişi sıçan kullanıldı. Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 05.05.2017 tarihli, 9. toplantı ve 112.no ile çalışma onayı alındı.

Sıçanlar standart şartlarda (12 saat günışığı, 12 saat karanlık, havalandırılmalı, sabit ısılı odalarda) barındırıldı. Sıçanlar 8 mm'lik standart sıçan pellet yemi ile beslendi ve içme suyu olarak musluk suyu verildi. Sıçanların istedikleri kadar yem yeme ve su içmelerine izin verildi. Kontrol grubu bu şartlarda deney sonuna kadar yaşatılmaya devam ettirilirken diğer gruplara yöntemler kısmında bahsedilen çeşitli uygulamalar yapıldı. Deney stres gruplarında 45 diğer gruplarda 55 gün içerisinde bitirildi.

Çalışmada her grupta 10 hayvan olacak şekilde 6 grup oluşturuldu.

Kontrol Grubu (K): Yöntemler bölümünde detaylı olarak anlatılan Morris'in su tankı testi uygulandı.

AP39 Grubu: Deneyin 11-55. günler arası intraperitoneal yolla 100 nM/kg AP39 verildi. Deney sonunda Morris'in su tankı testi uygulandı.

Sisplatin/POY Grubu: İlk 10 gün 1,5 mg/kg/gün sisplatin intraperitoneal yolla enjekte edildi. Deney sonunda Morris'in su tankı testi uygulandı.

Sisplatin/POF+AP39 Grubu: İlk 10 gün 1,5 mg/kg/gün sisplatin uygulanarak POF oluşturulan sıçanlara deneyin 11-55. günler arası intraperitoneal

yolla 100 nM/kg AP39 uygulandı. Deney sonunda Morris'in su tankı testi uygulandı.

Stres/POF Grubu: 45 gün boyunca yöntem bölümünde ayrıntılı bir şekilde açıklanmış olan stres protokolü uygulandı. Deney sonunda Morris'in su tankı testi uygulandı.

Stres/POF+AP39 Grubu: 45 gün boyunca stres protokolü uygulandı. Aynı zamanda 11-55. günler arası 100 nM/kg AP39 intraperitonel olarak verildi. Deney sonunda Morris'in su tankı testi uygulandı.

4.2. Kullanılan Araçlar-Gereçler, Kimyasallar Ve Sarf Malzemeleri

4.2.1. Kullanılan Araçlar-Gereçler

- -20°C derin dondurucu: Arçelik, Türkiye
- -80°C derin dondurucu: Nuaire, Meksika
- Etüv: Gallenkamp, Economy Incubator Size, Ukranya
- ELISA cihazı: Biotek, ELX800, ABD
- Falkon Tüp: Corning® 430766, 15 mL Centrifüğe Tube, Meksika
- Homojenizatör: Next Advance, Averill Park NY, Bullet Blender Storm, Katalog No: BBY24M, ABD
- Homojenizatör Boncuğu: Next Advance, GB05-RNA 0.5mm Dia, RNase-Free Glass Beads, Katalog No: GB05, ABD
- Mini Plate Spin: Labnet C1000, ABD
- Otomatik Pipetler: Socorex, Acura 825, İsviçre
- PCR ve Qubit tüpleri (0.6ml): Neptune, Katalog No: 3737.S.X, Biotix Laboratory Media, İngiltere

- Plate Yapıştırıcı: Applied Biosystems, MicroAmp, Optical Adhesive Film, Katalog No: 4311971, ABD
- Plate: AB Applied Biosystems, MicroAmp, Fast Optical 96-Well Reaction Plate With Barcode (0,1 mL), Katalog No: 4346906, Singapur
- Termal Döngü Cihazı: Biometra, Almanya
- Real Time-PCR cihazı: Applied Biosystems, ABI Prism 7500 Fast Real Time PCR Instrument, Foster City, CA
- Santrifüj: Sigma 3K30, Almanya
- Spin: Labnet International, Katalog No:C1031B-230V, Kore
- Vorteks: Elektro-Mag, Türkiye

4.2.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Sisplatin Kocak Farma İlaç ve Kimya Sanayi A.Ş. TÜRKİYE

AP39 Cayman Chemical Company. Kat No: 17100, Michigan 48108 USA

Tri Reagent

Rat LH (Luteinizing Hormone) ELISA Kit: Wuhan Fine Biotech Co., Ltd.

Cat No: ER1123, CHINA

Rat FSH (Follicle Stimulating Hormone) ELISA Kit: Wuhan Fine Biotech

Co., Ltd. Cat No: ER0960, CHINA

Rat Shbg (Sex hormone-binding globulin) ELISA Kit: Wuhan Fine

Biotech Co., Ltd. Cat No: ER0290, CHINA

Rat GnRH (Gonadotropin-Releasing Hormone) ELISA Kit: Wuhan Fine

Biotech Co., Ltd. Cat No: ER1003, CHINA

Rat Cor (Cortisol) ELISA Kit: Wuhan Fine Biotech Co., Ltd. Cat No: EU0391, CHINA

Rat E2 (Estradiol) ELISA Kit: Wuhan Fine Biotech Co., Ltd. Cat No: ER1507, CHINA

Rat ACTH (Adrenocorticotropic Hormone) ELISA Kit: Wuhan Fine Biotech Co., Ltd. Cat No: ER0387, CHINA

4.3. Yöntemler

4.3.1. Hayvanların Vücut Ağırlıkları, Vücut Uzunlukları Ve Over Ağırlıklarının Ölçülmesi

Vücut ağırlıkları ve vücut uzunluğu haftalık olarak kaydedilmiştir. Vücut uzunluğu anüsten buruna kadar olan uzunluk temel alınarak hesaplanmıştır. Deney sonunda dekapitasyonun ardından bileteral over ağırlıkları tartılarak ortalama değer over ağırlığı olarak alınmıştır.

4.3.2. Vajinal Simir

Vajinal simirler ilk günden deney sonuna kadar siklusun safhalarını tanımlamak için günlük olarak gözlemlenmiştir. Deney süresince her gün, sabah 9:00'da bir kez simir alınmak suretiyle, östrus fazları takip edilmiştir.

4.3.3. Stres Protokolü

Stres gurubu hayvanlarına kronik immobilizasyon stres modeli uygulandı. Her sıçan aparata sınırsız solunum yapmaya izin verilerek yerleştirildi. Protokol toplam 45 gün uygulandı. Sıçanlar ilk 15 gün 1 saat, ikinci 15 gün 2 saat ve

üçüncü 15 gün 3 saat immobilizasyon torbasında tutularak stres modeli oluşturuldu.

4.3.4. Morris'in Su Tankı Deneyi ve Prob Test

Tüm gruplara deneyin son 5 günü uygulandı.

1. Morris'in su tankı halkasal bir tank olup 120 cm çapında galvanizli ve 50 cm yüksekliğindedir. Tank koyulan platformu 2 cm aşacak şekilde 26° C su ile dolduruldu.
2. Hayvanın platformu bulmasını sağlamak amacıyla renkli kağıt deney sonuna kadar platformun olduğu tarafa koyuldu.
3. Deneye başlamadan önce 4 gün yüzme alıştırmaları yaptırıldı. Alıştırma için sıçanlar 90 sn yüzdürüldü. Platformu bulamayan sıçan 30 sn platforma bırakıldı. Bu işlem her 4 yön için tekrarlandı. Platformu bulma süreleri kaydedildi.
4. Belleğin pekiştirilme işlemini test etmek için 4 günlük testten 24 saat sonra prob test yapıldı. Beşinci gün platform sudan çıkartılarak denekler 4 yönden 60'ar sn yüzdürüldü.
5. Platformun önceden bulunduğu kısımdaki yüzme sürelerinin değerlendirilmesi için video kaydı yapıldı.

Deneyler sonucunda hayvanlar dekapite edilip kan, beyin ve over örnekleri alındı. Her bir hayvanın beyin dokusu hipokampus ve hipotalamus bölgelerine ayrıldı. Dokular sıvı azotta dondurularak -80 °C'de saklandı.

4.3.5. ELISA Testi

Serum örneklerinde FSH, LH, östrojen, kortizol, GNRH, ACTH seviyelerinin tayini için ELISA testleri yapıldı. Yöntemin uygulanabilmesi için dekapite edilen sıçanların kanları aprotininli tüplere toplandı. Santrifüjleme (3500 RPM'de, 5 dk) işlemi uygulandıktan sonra supernatant kısım alınarak ELISA testinde kullanıldı. Çalışma protokolü aşağıda detaylı olarak verilmiştir.

4.3.5.1. Solüsyonların Hazırlanması

Yıkama Tamponu: Kitte bulunan konsantre yıkama solüsyonundan 30 ml alındı ve üzerine 750 ml deiyonize distile su koyuldu.

Standart Solüsyonu: Her kitin protokolüne bağlı kalınarak 6 farklı konsantrasyonda standart hazırlandı.

Biotin-Etiketli Antikor Çalışma Solüsyonu: Her bir numune için 1 µl Biotin-etiketli antikor üzerine 99 µl antikor seyreltme tamponu eklendi (Örn: Numune sayısı*1 µl Biotin-etiketli antikor ve numune sayısı*99 µl antikor seyreltme tamponu).

HRP-Streptavidin Konjuge (SABC) Çalışma Solüsyonu: Her bir numune için 1 µl SABC üzerine 99 µl SABC seyreltme tamponu eklendi (Örn: Numune sayısı*1 µl SABC ve numune sayısı*99 µl SABC seyreltme tamponu).

4.3.5.2. Prosedür

1. Standartlardan ve numunelerden her bir kuyucuğa 50 µl koyuldu.

Örneklerin kuyucuklardaki yerleri kaydedildi.

2. Kuyucuklardaki standart ve numunelerin üzerine 50 µl Biotin-Etiketli Antikor Çalışma Solüsyonu eklendi. Plate koruma membranı ile kapatılıp 37 °C'de 45 dk inkübasyona bırakıldı.
3. İnkübasyondan sonra plate koruma membranı çıkarıldı. Sıvı boşaltılarak her kuyucuk 100 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyucuklarda yıkama tamponu 1 dk bekletilip döküldü ve yeniden eklendi. Bu işlem 3 kez tekrarlandı.
4. Yıkama işleminin ardından her bir kuyucuğa 100 µl SABC çalışma solüsyonu eklendi. Plate koruma membranı ile kapatılıp 37 °C'de 30 dk inkübasyona bırakıldı.
5. İnkübasyondan sonra plate koruma membranı çıkarıldı. Sıvı boşaltılarak her kuyucuk 100 µl yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı. Tampon kuyucuklarda her defasında 1-2 dk bekletildi. Beşinci yıkama yapıp kuyucuklardaki sıvı boşaltıldı.
6. Yıkamayı takiben her bir kuyucuğa 90 µl TMB substrat eklendi. Plate koruma membranı ile kapatılıp 37 °C'de 15-20 dk karanlık ortamda inkübasyona bırakıldı. (Kuyucuklarda renk maviye dönüştü.)
7. İnkübasyondan sonra her bir kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi (Mavi renk hemen sarı renge dönüştü).
8. Referans olarak 450 nm dalga boyunda ELISA cihazında okuma yapıldı.
9. Hesaplama işlemi gerçekleştirildi.

4.3.6. Tri Reagent ile RNA İzolasyonu

1. 30-40 mg doku alındı, ependorf tüplere konularak üzerlerine 500 µl Tri Reagent eklendi.
2. Homojenizasyon boncuklarından doku miktarı kadar eklendi.
3. Homojenizatörün 8. hızında 5 dk homojenize edildi.
4. 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
5. Tüpler içindeki homojenizatör boncukları ile birlikte 12.000 x g'de 2 dk santrifüj edildi.
6. Süpernatant kısımlar yeni tüplere aktarıldı üzerine 100 µl kloroform eklenip yaklaşık 15 sn vortekslendi.
7. Tüpler oda sıcaklığında 2-3 dk bekletildi.
8. 12.000 x g'de 2-4°C'de 15 dk santrifüj edildi.
9. Santrifüj işleminden sonra 3 faza ayrılan sıvının en üst fazı başka tüpe alındı.
10. 250 µl izopropil alkol eklendi.
11. 10 dk oda sıcaklığında bekletildi.
12. 12.000 x g'de 2-4°C'de 10 dk santrifüj edildi.
13. Süpernatant kısım döküldü.
14. Pellet üzerine 500 µl % 75'lik etanol eklendi.
15. Vortekslendi ve 7500 x g'de 2-4°C'de 5 dk santrifüj edildi.
16. Süpernatant atıldı ve etanol ile yıkama işlemi tekrarlandı.
17. Süpernatant atıldı ve tüpler bir müddet oda sıcaklığında bekletilerek etanolün uçması sağlandı.

18. Kuruyan tüplerin üzerine dietilpirokarbonatlı (DEPC) su eklendi ve pipetaj yapıldı.

19. İzole edilen RNA'lar -80°C'de saklandı.

4.3.7. RNA Ölçümü

RNA ölçümüne başlamadan önce kör olarak distile su okutulmasıyla cihaz kalibre edildi. BioSpec-nano (Shimadzu) cihazının ölçüm alanına 1 µl RNA konularak RNA miktarı ng/µl olarak ölçüldü. Her örnek okumasının ardından cihaz temizlenerek 2 dakika bekletildi.

Komplementer DNA (cDNA) sentezinde eşit RNA miktarlarında çalışılabilmesi için okunan en düşük RNA değeri standart olarak alındı. Kontrol grubu, AP39 grubu, Sisplatin grubu, Sisplatin+AP39, stres grubu ve stres+AP39 grubu olmak üzere toplamda 6 RNA havuzu oluşturuldu.

4.3.8. Komplementer DNA Sentezi

RT-PCR'ı için kullanılacak cDNA'ların hazırlanmasında havuz yapılan RNA örnekleri kullanıldı. Bunun için her örnekten 5 µl RNA alındı. cDNA sentezi toplam 10 µl hacimde gerçekleştirildi. Sentez için 5µl RNA örneği, 1 µl 5×RT random primer, 1 µl 10×RT buffer, 0,4 µl 25×dNTP mix, 2.1 µl nükleaz içermeyen su ve en son olarak 0,5 µl MultiScribe™ Reverse Transcriptase enzimi kullanıldı (Tablo 6). Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi. 25°C'de 10 dk, 37°C'de 120 dk, 85°C'de 5 dk ve en son sıcaklık 4°C olacak şekilde cihazda bekletildi (Tablo 7). Oluşan cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

Tablo 6. cDNA karışım miktarı (10µl'lik reaksiyon) (The High Capacity RNA-to-cDNA™ Kit, Applied Biosystems, Katalog No: 4387406)

Bileşik	Hacim (µl)
10X RT tamponu	1,0
25X dNTP karışımı (100mM)	0,4
MultiScribe™Revers Transkriptaz (50U/µl)	0,5
10XRT Random Primer	1,0
Nükleaz içermeyen H ₂ O	2,1
RNA örneği	5
Reaksiyon toplamı	10

Tablo 7. cDNA sentezi PCR programı

PCR	1.Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	30 dk	120 dk	5 dk	∞

4.3.9. Gerçek Zamanlı (Real Time) Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile cDNA Amplifikasyonu

Revers transkripsiyon ile elde edilen cDNA'lar sekans spesifik primerlerin varlığında Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (qRT-PCR) ile amplifiye edildi. Deneklerin beyinlerinin hipokampus ve hipotalamus bölgelerinde Tablo 8'da, overde ise Tablo 9 ve 10'da belirtilen genlerin ifade düzeyleri incelendi. qRT-PCR analizleri sonucunda gen ekspresyonundaki farklılıkların hesaplanmasında $2^{-\Delta\Delta CT}$ metodu kullanıldı.

Tablo 8. Hipokampus ve hipotalamus dokularında qRT-PCR ile çalışılan genlere ait primerler (Qiagen, Almanya)

Primerler	Katalog Numarası
Kiss-1	PPR51615A
Kiss-1R	PPR50246B
BDNF	PPR45333A
GDNF	PPR50730A
GFAP	PPR52927G
ESR1	PPR44939B

Tablo 9. Over dokusunda qRT-PCR ile çalışılan genlere ait primerleri (Qiagen, Almanya)

Primerler	Katalog Numarası
Atp5b	PPR53179A
Ppargc-1 α	PPR46783A
Ppargc-1 β	PPR51585A
Prk α 2	PPR51543A
Mfn -1	PPR46301A
Mfn-2	PPR44137A
Opa 1	PPR44480A
Hif 1	PPR52433A
Chrm 1	PPR06806A
Tfam	PPR46611A
Nfe2l2	PPR45094A
Nrf 1	PPR48314A

Tablo 10. Over dokusunda qRT-PCR ile çalışılan genlere ait primerler (Sentegen Biyoteknoloji tarafından sentezlenmiştir, Ankara/Türkiye)

Primerler	
Dppa 3	Hdac 3
Figla	Sirt 7
Dazl	Mbd 2
ZP 1	Kmt2a
ZP 2	Smarca 1
Pau5f1	Esr 1
Npm 2	Gtf2h1
H1foo	Map2k1
Dnmt1	Ncoa1
Dnmt3a	Tbp
Dnmt2b	Med 15
Kat 2a	Polr2c

Real Time-PCR üç tekrarlı olarak gerçekleştirildi. Plate kuyucuklarına cDNA örneklerinden 0,5 µl koyuldu. Her bir örnek için 1µl Eva Green Master Mix, 3 µl nükleaz içermeyen su ve 0,5 µl primer hibridizasyon probu örnek sayısına göre bileşen miktarları hesaplanarak ependorflara bırakıldı ve vortekslendi. Plate'deki cDNA örneklerinin üzerine hazırlanan karışımdan 4,5 µl pipet ile bırakılarak plate'in üzeri optik filmle kapatıldı (Tablo 11). Plate örneklerin tamamen dibe çökmesi ve oluşan kabarcıkların yok edilmesi amacıyla mini plate spin cihazında 1 dakika santrifüjleme işlemine tabi tutuldu.

Tablo 11. qRT-PCR için kullanılan bileşikler

Bileşikler	Hacim (µl)	X
Örnek Sayısı		
cDNA	0,5	
Primer-prob	0,5	
Green Master Mix	1	
Nükleaz içermeyen H ₂ O	3	

Gen ekspresyon seviyeleri, Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR sistemi ile ölçüldü. Çalışmada GAPDH kontrol gen (housekeeping) olarak kullanıldı. Isı koşulları 50°C’de 2 dakika, 95°C’de 10 dakika, 95°C’de 15 saniye ve 60°C’de 1 dakika olacak şekilde ayarlandı (Tablo 12).

Tablo 12. RT-PCR programı

RT-PCR	1. Adım	2. Adım	3. Adım	4. Adım
Sıcaklık (°C)	50	95	95	60
Zaman	2 dk	10 dk	15 sn	1 dk

4.4. İmmünohistokimyasal Analizler

Over dokularında POY’un tespiti için klasik hematoksilin eosin boyama yöntemi kullanılarak over dokusu değerlendirildi. Over dokuları parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan 5–6 mm kalınlığında alınan kesitler polilizinli lamlara alındı. Deparafinize edilen dokular dereceli alkol serilerinden geçirilip antijen geri kazanımı için sitrat tampon solüsyonunda pH: 6’da mikrodalga fırında (750W) 7+5 dakika tutuldu. Zemin boyasını engellemek için Ultra V Block solüsyonu ile muameleden sonra primerler ile 60 dakika inkübe edildi. Dokular, primer antikor uygulanmasından sonra sekonder antikor (30 dakika), Streptavidin Alkaline Phosphatase (30 dakika) ve Fast Red Substrate System ile inkübe edildi. Mayer’s hematoksileni ile zıt boyaması yapılan dokular PBS (Phosphate Buffered Saline) ve distile sudan geçirilerek kapatma solusyonu ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda incelenip fotoğraflandı.

4.5. İstatistiksel Analizler

Tüm istatistiksel analizler için SPSS 20 (Statistical Package for the Social Sciences) paket programı kullanıldı. qRT-PCR, kilo, boy, siklus, over ağırlığı, ELISA hormon değerleri, Morris'in Su Tankı ve Prob test gibi parametrelerin gruplar arasında karşılaştırılması için t testi ve Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ değeri istatistiksel açıdan anlamlı kabul edildi.



5. BULGULAR

5.1. Sıçan Boy Verilerinin Değerlendirilmesi

Başlangıç ve son boy değerleri karşılaştırıldığında AP39 ($p=0,002$), Sisplatin ($p=0,001$), Sisplatin/AP39 ($p=0,006$), Stres ($p=0,003$) ve Stres/ AP39 ($p=0,004$) gruplarında anlamlı azalma belirlendi.

Gruplar arasında karşılaştırma yapıldığında ilk boylar arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır. Son boylar arasında;

Kontrol grubuna göre AP39 ($p=0,013$), Sisplatin ($p=0,000$), Sisplatin+AP39 ($p=0,000$) ve Stres+AP39 ($p=0,001$) gruplarında anlamlı azalma belirlendi. Sisplatin grubuna göre Stres ($p=0,001$) grubunda anlamlı artma belirlendi. Sisplatin+AP39 grubuna göre Stres ($p=0,004$) grubunda anlamlı artma belirlendi. Stres grubuna göre Stres+AP39 ($p=0,029$) grubunda anlamlı azalma belirlendi.

Tablo 13. Gruplara göre başlangıç ve son boy ölçümleri.

Grup	İlk Boy	Son Boy	t	p
Kontrol	23,35 $\pm$ 0,41	23,45 $\pm$ 0,49	-0,802	0,443
AP39	23,50 $\pm$ 0,76	22,57 $\pm$ 0,79 ^a	5,461	0,002
Sisplatin	23,07 $\pm$ 0,61	21,57 $\pm$ 0,93 ^a	4,148	0,001
Sisplatin/AP39	23,58 $\pm$ 0,38	21,92 $\pm$ 0,80 ^a	4,663	0,006
Stres	23,94 $\pm$ 0,527	23,22 $\pm$ 0,67 ^{cd}	4,274	0,003
Stres/AP39	24,20 $\pm$ 0,45	22,40 $\pm$ 0,42 ^{ae}	6,000	0,004

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bAP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cSisplatin grubuna göre karşılaştırıldığında. ^dSisplatin/AP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^eStres grubuna göre karşılaştırıldığında, $p<0.05$. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

5.2. Sıçan Kilo Verilerinin Değerlendirilmesi

Grupların başlangıç ve deney sonundaki kiloları karşılaştırıldığında;

Kontrol grubuna göre Sisplatin ($p=0,000$) ve Sisplatin+AP39 gruplarında ($p=0,044$) anlamlı azalma olduğu belirlendi.

AP39 grubuna göre Sisplatin ($p=0,000$) ve Sisplatin+AP39 gruplarında ($p=0,008$) anlamlı azalma olduğu saptandı.

Sisplatin grubuna göre Stres grubunda ($p=0,002$) anlamlı artma olduğu bulundu.

Tablo 3. Grupların başlangıç ve son vücut ağırlıkları.

Grup	Başlangıç Kilo	Son Kilo
Kontrol	301,30 $\pm$ 18,21	301 $\pm$ 25,42
AP39	308,71 $\pm$ 22,12	313,93 $\pm$ 29,54
Sisplatin	323,57 $\pm$ 16,36	235,71 $\pm$ 35,02 ^{ab}
Sisplatin+AP39	314 $\pm$ 11,88	259,67 $\pm$ 31,25 ^{ab}
Stres	311,67 $\pm$ 12,67	290,39 $\pm$ 11,53 ^c
Stres+AP39	310,27 $\pm$ 16,89	282,30 $\pm$ 35,96

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bAP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cSisplatin grubuna göre karşılaştırıldığında. ^dSisplatin/AP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^eStres grubuna göre karşılaştırıldığında, $p<0.05$. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

5.3. Over Ağırlıklarının Değerlendirilmesi

Deney sonunda grupların over ağırlıkları karşılaştırıldığında;

Kontrol grubuna göre Sisplatin ($p=0,001$) ve Sisplatin+AP39 ($p=0,001$) gruplarında anlamlı azalma belirlendi.

AP39 grubuna göre Sisplatin ($p=0,002$) ve Sisplatin+AP39 ($p=0,004$) grubunda anlamlı azalma görüldü.

Sisplatin grubuna göre Stres ($p=0,001$) ve Stres+AP39 ($p=0,012$) gruplarında anlamlı artma bulundu.

Sisplatin+AP39 grubuna göre Stres grubunda ($p=0,000$) ve Stres+AP39 ($p=0,012$) gruplarında anlamlı artma saptandı.

Tablo 4. Grupların over ağırlıkları

Grup	Over
Kontrol	0,1060±,01776
AP39	0,1100±,02160
Sisplatin	0,0671±,01976 ^{ab}
Sisplatin/AP39	0,0733±,01211 ^{ab}
Stres	0,1000±,01000 ^{cd}
Stres/AP39	0,1060±,02408 ^{cd}

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bAP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cSisplatin grubuna göre karşılaştırıldığında. ^dSisplatin/AP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^eStres grubuna göre karşılaştırıldığında, $p<0.05$. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

5.4. Siklus Takibi Verilerinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna göre Sisplatin ($p=0,008$), Sisplatin+AP39 ($p=0,029$) ve Stres+AP39 ($p=0,002$) gruplarında disöstrus evresinde anlamlı artma belirlendi.

Kontrol grubuna göre Stres+AP39 ($p=0,030$) grubunda proöstrus evresinde anlamlı azalma belirlendi.

Kontrol grubuna göre Sisplatin ($p=0,000$), Sisplatin+AP39 ($p=0,001$), Stres ($p=0,004$) ve Stres+AP39 ($p=0,000$) gruplarında östrus evresinde anlamlı azalma belirlendi.

Kontrol grubuna göre AP39 ($p=0,028$), Sisplatin ($p=0,037$) ve Sisplatin+AP39 ($p=0,020$) gruplarında metaöstrus evresinde anlamlı artma belirlendi.

Tablo 516. Grupların siklus safhaları

Gruplar	Diöstrus	Proöstrus	Östrus	Metaöstrus
Kontrol	18,80 $\pm$ 3,91	13,20 $\pm$ 2,20	19,60 $\pm$ 3,10	4,40 $\pm$ 1,17
AP39	17,29 $\pm$ 9,78	14,00 $\pm$ 4,47	16,56 $\pm$ 6,77	6,86 $\pm$ 2,91 ^a
Sisplatin	25,57 $\pm$ 5,16 ^a	10,57 $\pm$ 2,99	12,00 $\pm$ 3,83 ^a	6,86 $\pm$ 3,13 ^a
Sisplatin/AP39	25,50 $\pm$ 7,24 ^a	11,17 $\pm$ 3,31	10,17 $\pm$ 5,38 ^a	8,17 $\pm$ 4,36 ^a
Stres	21,33 $\pm$ 7,53	13,11 $\pm$ 2,67	13,33 $\pm$ 4,95 ^a	7,22 $\pm$ 4,44
Stres/AP39	26,60 $\pm$ 3,36 ^a	9,40 $\pm$ 3,91 ^a	12,00 $\pm$ 2,65 ^a	5,00 $\pm$ 2,65

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bAP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cSisplatin grubuna göre karşılaştırıldığında. ^dSisplatin+AP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^eStres grubuna göre karşılaştırıldığında, $p<0.05$. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. Veriler toplam 55 gün içerisindeki her bir safhanın sayısını yansıtmaktadır.

5.5. Morris Su Labirenti Test Verilerinin Değerlendirilmesi

Moris su labirenti testinin birinci gününde platforma kaçış süreleri değerlendirildiğinde;

Kontrol grubuna göre Sisplatin+AP39 ($p=0,31$) grubunda anlamlı bir azalma ve stres grubunda ($p=0,39$) anlamlı bir artma saptandı.

Moris su labirenti testinin ikinci gününde platforma kaçış süreleri değerlendirildiğinde;

Kontrol grubuna göre Sisplatin+AP39 ($p=0,031$) ve Stres ($p=0,020$) gruplarında anlamlı artma belirlendi.

Moris su labirenti testinin üçüncü gününde platforma kaçış süreleri değerlendirildiğinde;

Kontrol grubuna göre Sisplatin+AP39 ($p=0,002$) grubunda anlamlı bir artma belirlendi.

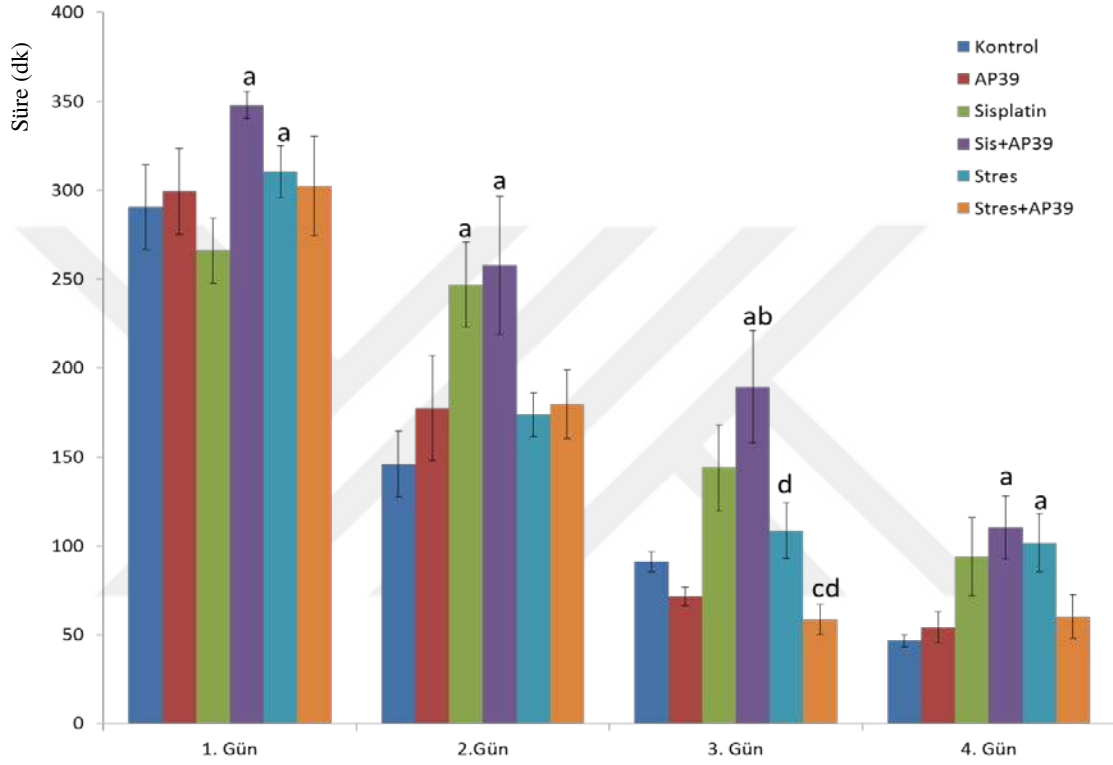
AP39 grubuna göre Sisplatin ($p=0,050$) grubunda ve Sisplatin+AP39 grubunda ($p=0,000$) anlamlı bir artma belirlendi.

Sisplatin grubuna göre Stres+AP39 ($p=0,028$) grubunda anlamlı bir azalma belirlendi.

Sisplatin+AP39 grubuna göre Stres ($p=0,19$) grubunda anlamlı azalma belirlendi.

Moris su labirenti testinin dördüncü gününde platforma kaçış süreleri değerlendirildiğinde;

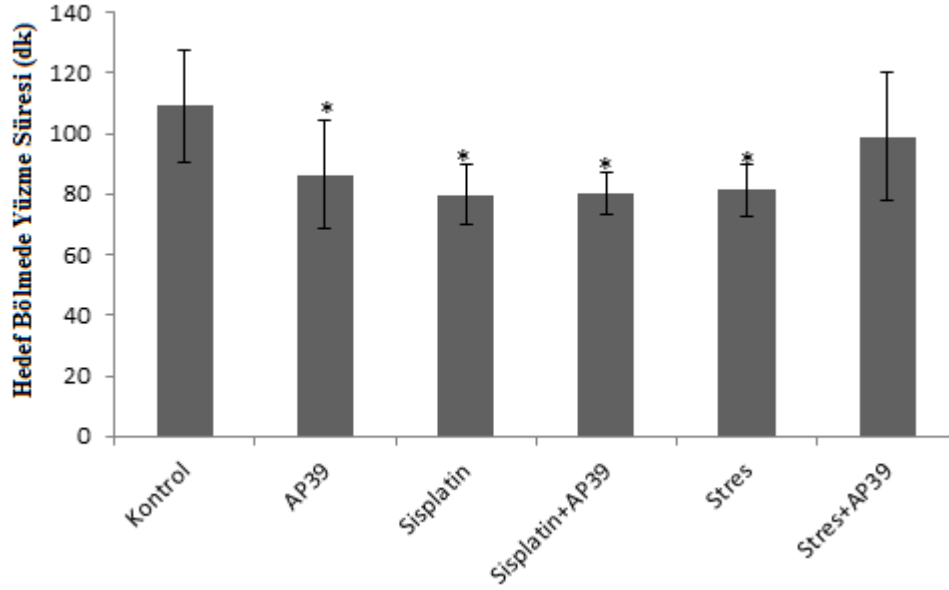
Kontrol grubuna göre Sisplatin+AP39 ($p=0,031$) ve Stres ($p=0,039$) gruplarında anlamlı artma belirlendi.



Şekil 5. Morris'in su tankı analizinde platformu bulma süresi. ^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bAP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cSisplatin grubuna göre karşılaştırıldığında. ^dSisplatin+AP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^eStres grubuna göre karşılaştırıldığında, $p<0.05$. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi.

5.6. Prob Test Verilerinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna göre AP39 ($p=0,037$), Sisplatin ($p=0,004$), Sisplatin+AP39 ($p=0,003$) ve Stres ($p=0,003$) gruplarında anlamlı azalma belirlendi.



Şekil 6. Prob testte hedef bölmede yüzme süresi (Mean±SD). * Kontrol grubuna göre karşılaştırıldığında, $p<0.05$. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verildi.

5.7. ELISA Testi Verilerinin Değerlendirilmesi

E2 hormonunda;

AP39 grubuna göre Sisplatin ($p=0,017$) grubunda anlamlı azalma belirlendi. Sisplatin grubuna göre Stres+AP39 ($p=0,001$) grubunda anlamlı artma belirlendi.

ACTH hormonunda;

Kontrol grubuna göre AP39 ($p=0,042$) grubunda anlamlı artma belirlendi. Sisplatin+AP39 grubuna göre Stres+AP39 ($p=0,034$) grubunda anlamlı artma saptandı.

FSH hormonunda;

Kontrol grubuna göre AP39 ($p=0,001$), Sisplatin ($p=0,000$), Sisplatin+AP39, Stres ($p=0,002$) ve Stres+AP38 ($p=0,008$) gruplarında anlamlı artma saptandı.

SHBG hormonunda;

Kontrol grubuna göre Sisplatin+AP39 ($p=0,037$) ve Stres+AP39 ($p=0,011$) gruplarında anlamlı azalma saptandı. AP39 grubuna göre Sisplatin+AP39 ($p=0,041$) ve Stres+AP39 ($p=0,002$) gruplarında anlamlı azalma saptandı. Stres grubuna göre Stres+AP39 ($p=0,000$) grubunda anlamlı azalma belirlendi.

LH Hormonunda;

Kontrol grubuna göre Sisplatin ($p=0,042$) grubunda anlamlı artma saptandı. AP39 grubuna göre Sisplatin ($p=0,043$) grubunda anlamlı azalma saptandı. Sisplatin grubuna göre Stres ($p=0,004$) ve Stres+AP39 ($p=0,003$) grubunda anlamlı azalma belirlendi.

Tablo 17. ELISA testinde gruplara ait hormon miktar analizi

	E2	ACTH	FSH	Kortizol	GnRH	SHBG	LH
Kontrol	45,05±	80,34±	30,76±	17,03±	181,24±	349,25±	28,73±
	7,00	10,45	22,99	2,91	53,40	89,66	10,74
AP39	44,73±	111,50±	122,6±	34,78±	158,34±	309,22±	23,80±
	4,58	21,77 ^a	25,85 ^a	26,13	24,94	41,06	15,18
Sisplatin	37,90±	94,54±	134,24±	23,80±	139,48±	253,10±	41,67±
	1,70 ^b	10,17	34,44 ^a	9,48	73,14	47,49	5,32 ^{ab}
Sisplatin+	54,16±	85,46±	179,41±	23,99±	158,25±	257,41±	35,26±
AP39	16,18	12,75	67,38 ^a	7,34	148,0	44,10 ^{ab}	3,03
Stres	44,44±	98,24±	105,79±	26,14±	138,99±	286,69±	27,47±
	7,19	11,76	41,31 ^a	11,0	40,30	11,23 ^d	6,08 ^c
Stres+	46,22±	109,90±	93,34±	23,02±	161,30±	190,21±	19,99±
AP39	2,54 ^c	12,53 ^d	17,29 ^{ad}	5,16	40,17	23,09 ^{abc}	9,60 ^c

^aKontrol grubuna göre karşılaştırıldığında. ^bAP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^cSisplatin grubuna göre karşılaştırıldığında. ^dSisplatin+AP39 grubuna göre karşılaştırıldığında. ^eStres grubuna göre karşılaştırıldığında, p<0.05. Değerler ortalama ± standart sapma olarak verildi.

5.8. qRT-PCR Verilerinin Değerlendirilmesi

5.8.1. Over Dokusunda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna göre AP39 grubunun MFN2 (p=0,023), ATP5B (p=0,033), TFAM (p=0,048), CHRM1 (p=0,005), OPA1 (p=0,007), NFE2L2 (p=0,027), DAZL (p=0,005), ZP1 (p=0,010), ZP2 (p=0,006), NPM2 (p=0,006), H1FOO (p=0,006), DNMT1 (p=0,006), DNMT3B (p=0,010), KAT2A (p=0,006), HDAC3 (p=0,006), SIRT7 (p=0,006), MBD2 (p=0,007), KMT2A (p=0,030), SMARCA1 (p=0,034), ESR1 (p=0,004), MAP2K1 (p=0,004), NCOA1 (p=0,0388), MED15 (p=0,007), POLR2C (p=0,01) genlerinde anlamlı artış belirlendi. PPARGC1A (p=0,005), PRKAA2 (p=0,048), DPPA-3 (p=0,009), GTF2H1 (p=0,013) genlerinde anlamlı azalma saptandı.

Kontrol grubuna göre Sisplatin grubunun MFN2 (p=0,020), ATP5B (p=0,017), TFAM (p=0,043), HIF1A (p=0,014), OPA1 (p=0,006), NFE2L2 (p=0,041), DAZL (p=0,005), ZP1 (p=0,039), ZP2 (p=0,006), NPM2 (p=0,005), H1FOO (p=0,018), DNMT1 (p=0,006), DNMT3B (p=0,009), KAT2A (p=0,005), HDAC3 (p=0,006), SIRT7 (p=0,006), MBD2 (p=0,006), KMT2A (p=0,014), ESR1 (p=0,004), MAP2K1 (p=0,004), MED15 (p=0,005), POLR2C (p=0,010) genlerinde anlamlı artış belirlendi. PPARGC1A (p=0,009), PRKAA2 (p=0,042), DPPA-3 (p=0,007), TBP (p=0,017), GTF2H1 (p=0,008) genlerinde anlamlı azalma saptandı.

Kontrol grubuna göre Sisplatin+AP39 grubunun HIF1A (p=0,010), OPA1 (p=0,012), NFE2L2 (p=0,044), DAZL (p=0,001), ZP2 (p=0,005), NPM2 (p=0,012), H1FOO (p=0,007), DNMT1 (p=0,006), DNMT3B (p=0,005), KAT2A (p=0,005), HDAC3 (p=0,004), SIRT7 (p=0,005), MBD2 (p=0,004), KMT2A (p=0,011), SMARCA1 (p=0,022), ESR1 (p=0,004), MAP2K1 (p=0,004), MED15 (p=0,006), POLR2C (p=0,011), GTF2H1 (p=0,018) genlerinde anlamlı artış belirlendi. NRF1 (p=0,042), PPARGC1A (p=0,009), CHRM1 (p=0,030), PRKAA2 (p=0,038), PPARGC1B (p=0,011), DPPA-3 (p=0,006), FIGLA (p=0,018), ZP1 (p=0,042), POU5F1 (p=0,007), NCOA1 (p=0,007) TBP (p=0,012) genlerinde anlamlı azalma saptandı.

Kontrol grubuna göre Stres grubunun MFN2 (p=0,038), CHRM1 (p=0,007), HIF1A (p=0,017), OPA1 (p=0,008), NFE2L2 (p=0,027), DAZL (p=0,005), ZP1 (p=0,005), ZP2 (p=0,004), NPM2 (p=0,005) H1FOO (p=0,007), DNMT1 (p=0,005), DNMT3B (p=0,010), KAT2A (p=0,005), HDAC3 (p=0,005), SIRT7 (p=0,005), MBD2 (p=0,005), KMT2A (p=0,013) SMARCA1 (p=0,041),

ESR1 (p=0,004), MAP2K1 (p=0,004), MED15 (p=0,007), POLR2C (p=0,015) genlerinde anlamlı artış belirlendi. PPARGC1A (p=0,009), PRKAA2 (p=0,031), PPARGC1B (p=0,048), DPPA-3 (p=0,006), NCOA1 (p=0,007), TBP (p=0,006), GTF2H1 (p=0,009) genlerinde anlamlı azalma saptandı.

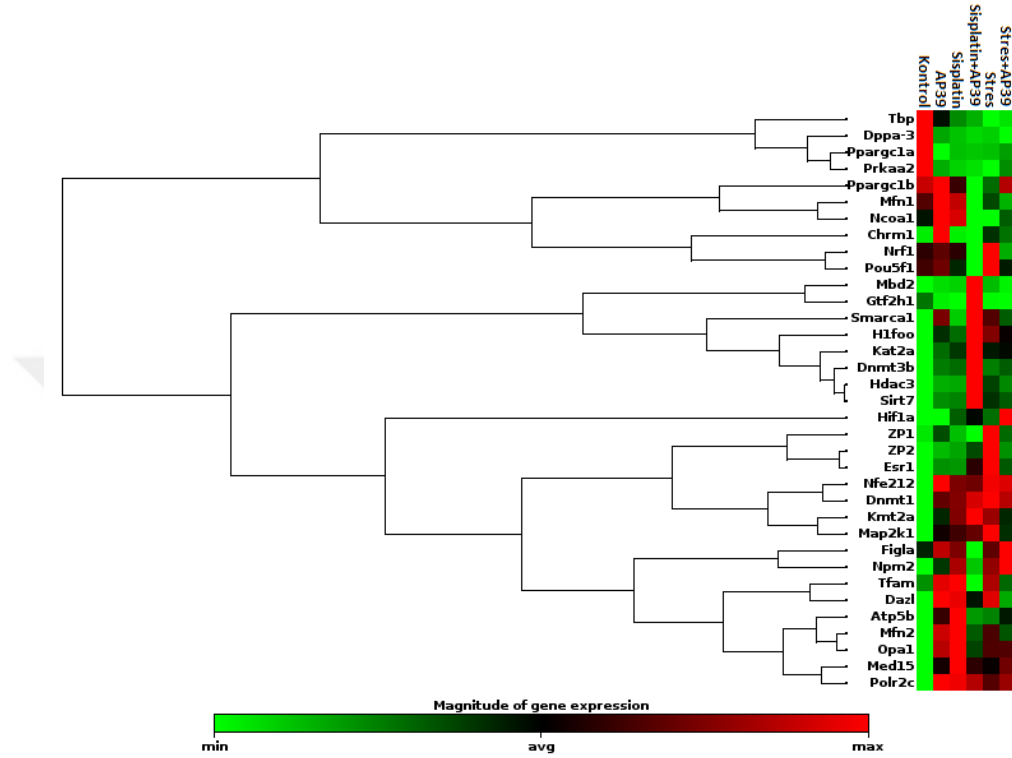
Kontrol grubuna göre Stres+AP39 grubunun ATP5B (p=0,034), CHRM1 (p=0,008), HIF1A (p=0,006), OPA1 (p=0,007), NFE2L2 (p=0,029), DAZL (p=0,016), ZP1 (p=0,013), ZP2 (p=0,005), NPM2 (p=0,005), H1FOO (p=0,010), DNMT1 (p=0,006), DNMT3B (p=0,008), KAT2A (p=0,005), HDAC3 (p=0,005), SIRT7 (p=0,005), MBD2 (p=0,016), KMT2A (p=0,030), ESR1 (p=0,004), MAP2K1 (p=0,004), MED15 (p=0,006), POLR2C (p=0,012) genlerinde anlamlı artış belirlendi. PPARGC1A (p=0,012), DPPA-3 (p=0,004), TBP (p=0,007), GTF2H1 (p=0,008) genlerinde anlamlı azalma saptandı (Tablo 18).

Tablo 18. Over dokusunda qRT-PCR ile analiz edilen genlerin mRNA kat değişimleri

	AP39		Sisplatin		Sisplatin+ AP39		Stres Grubu		Stres+ AP39	
	Grubu		Grubu		Grubu				Grubu	
Sembol	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri	mRNA kat değişimi	p değeri
GAPDH	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
MFN2	2,82	0,02	3,03	0,020	1,65	0,11	2,31	0,04	1,68	0,110
NRF1	1,08	0,74	0,99	0,978	0,45	0,04	1,39	0,26	0,60	0,113
ATP5B	2,42	0,033	3,36	0,017	1,46	0,199	1,57	0,15	2,07	0,034
TFAM	2,12	0,048	2,20	0,043	0,67	0,187	1,96	0,06	1,13	0,651
PPARGC1A	0,06	0,00	0,18	0,009	0,17	0,009	0,18	0,01	0,24	0,012
CHRM1	20,8	0,005	0,93	0,788	0,40	0,030	8,69	0,01	6,06	0,008
HIF1A	1,01	0,978	3,66	0,015	5,10	0,010	3,39	0,02	9,38	0,006
OPA1	8,34	0,007	9,51	0,006	4,14	0,012	6,54	0,01	6,59	0,008
PRKAA2	0,50	0,048	0,45	0,042	0,43	0,038	0,40	0,03	0,53	0,072
MFN1	1,19	0,514	1,12	0,651	0,63	0,138	0,83	0,48	0,71	0,240
NFE2L2	2,66	0,027	2,23	0,041	2,19	0,044	2,62	0,03	2,55	0,029
PPARGC1B	1,10	0,728	0,75	0,310	0,22	0,011	0,467	0,05	0,97	0,892
DPPA-3	0,18	0,009	0,12	0,007	0,08	0,006	0,10	0,01	0,01	0,004
FİGLA	1,71	0,104	1,49	0,181	0,31	0,018	1,40	0,24	1,91	0,069
DAZL	16,2	0,005	15,67	0,005	8,06	0,007	15,35	0,01	3,46	0,016
ZP1	4,79	0,010	2	0,038	0,45	0,042	12,82	0,01	4,06	0,013
ZP2	10,8	0,006	13,36	0,006	25,99	0,005	71,51	0,00	16,11	0,005
POU5F1	1,13	0,633	0,71	0,248	0,11	0,007	1,54	0,16	0,75	0,310
NPM2	13,1	0,006	26,72	0,005	4,35	0,012	25,28	0,00	31,78	0,005
H1FOO	4,14	0,012	3,20	0,018	8,69	0,007	6,82	0,01	4,96	0,010
DNMT1	11,3	0,005	12,30	0,006	14,72	0,006	15,89	0,01	13,83	0,006
DNMT3B	5,13	0,010	5,66	0,009	17,15	0,005	5,10	0,01	6,19	0,008
KAT2A	12,8	0,006	17,27	0,005	42,22	0,005	19,70	0,01	20,97	0,005
HDAC3	10,6	0,006	11,47	0,006	63,12	0,004	24,08	0,00	15,24	0,005
SİRT7	12,6	0,006	14,03	0,006	54,95	0,005	22,94	0,00	18,50	0,005
MBD2	8	0,007	10,56	0,006	114,5	0,004	15,67	0,01	3,51	0,016
KMT2A	2,53	0,030	3,71	0,014	4,59	0,011	3,89	0,01	2,54	0,030
SMARCA1	2,40	0,034	1,18	0,530	2,89	0,022	2,25	0,04	1,60	0,134
ESR1	82,7	0,004	78,25	0,004	221,3	0,004	380,0	0,00	124,5	0,004
MAP2K1	99,7	0,004	116,1	0,004	130,7	0,004	187,4	0,00	77,71	0,004
NCOA1	2	0,039	1,87	0,074	0,13	0,007	0,13	0,01	0,73	0,264
TBP	0,52	0,069	0,304	0,017	0,24	0,012	0,10	0,01	0,15	0,007
MED15	9,13	0,007	16,11	0,005	9,85	0,006	8,82	0,01	11,87	0,006

POLR2C	4,99	0,01	4,89	0,010	4,40	0,014	3,65	0,014	4,19	0,012
GTF2H1	0,25	0,01	0,16	0,01	3,27	0,017	0,183	0,009	0,16	0,008

p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.



Şekil 7. Over dokusunda qRT-PCR ile analiz edilen genlerin clustergram haritalaması.

5.8.2.Hipokampus Dokusunda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna göre AP39 grubunun KISS1R (p=0,012), GDNF (p=0,011), ESR1 (p=0,032) genlerinde anlamlı azalma saptandı.

Kontrol grubuna göre Sisplatin grubunun KISS1R (p=0,008) ve GDNF (p=0,008) genlerinde anlamlı azalma belirlendi.

Kontrol grubuna göre Sisplatin+AP39 grubunun KISS1 (p=0,036), KISS1R (p=0,012), GDNF (p=0,032) genlerinde anlamlı azalma belirlendi.

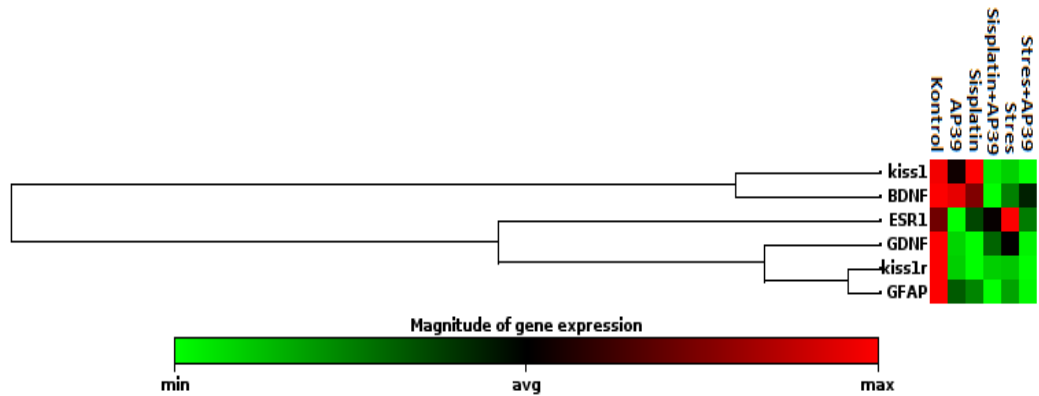
Kontrol grubuna göre Stres grubunun KISS1 (p=0,044) ve KISS1R (p=0,013) genlerinde anlamlı azalma belirlendi (Tablo 26).

Kontrol grubuna göre Stres+AP39 grubunun KISS1 (p=0,031), KISS1R (p=0,008) ve GDNF (p=0,008) genlerinde anlamlı azalma belirlendi (Tablo 19).

Tablo 19. Hipokampus dokusunda qRT-PCR ile analiz edilen genlerin mRNA kat değişimleri

	AP39 Grubu			Sisplatin Grubu			Sisplatin+ AP39 Grubu			Stres Grubu			Stres+ AP39 Grubu		
Sembol	mRNA kat değişimi	p Değeri		mRNA kat değişimi	p Değeri		mRNA kat değişimi	p Değeri		mRNA kat değişimi	p Değeri		mRNA kat değişimi	p Değeri	
GAPDH	1	0		1	0		1	0		1	0		1	0	
KISS1	0,73	0,264		1,01	0,957		0,42	0,036		0,46	0,044		0,40	0,031	
KISS1R	0,24	0,012		0,16	0,008		0,24	0,012		0,25	0,013		0,17	0,008	
GDNF	0,22	0,011		0,16	0,008		0,41	0,032		0,58	0,099		0,16	0,008	
BDNF	0,99	0,957		0,15	0,008		0,71	0,232		0,78	0,364		0,84	0,498	
ESR1	0,41	0,032		0,71	0,232		0,83	0,483		1,23	0,440		0,62	0,130	
GFAP	0,67	0,187		0,63	0,142		0,52	0,066		0,60	0,116		0,52	0,068	

p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.



Şekil 8. Hipokampus dokusunda qRT-PCR analiz edilen genlerin clustergram haritalaması.

5.8.3.Hipotalamus Dokusunda mRNA Kat Değişimi Verilerinin Değerlendirilmesi

Kontrol grubuna göre AP39 grubunun BDNF ($p=0,033$) geninde anlamlı artma ve KİSS1 ($p=0,005$) geninde anlamlı azalma saptandı.

Kontrol grubuna göre Sisplatin grubunun BDNF ($p=0,025$) ve ESR1 ($p=0,043$) genlerinde anlamlı artma belirlendi. KİSS1 ($p=0,005$) geninde anlamlı azalma saptandı.

Kontrol grubuna göre Sisplatin+AP39 grubunun GDNF ($p=0,007$) ve BDNF ($p=0,048$) genlerinde anlamlı artma saptandı. KİSS1 ($p=0,005$) geninde anlamlı azalma belirlendi.

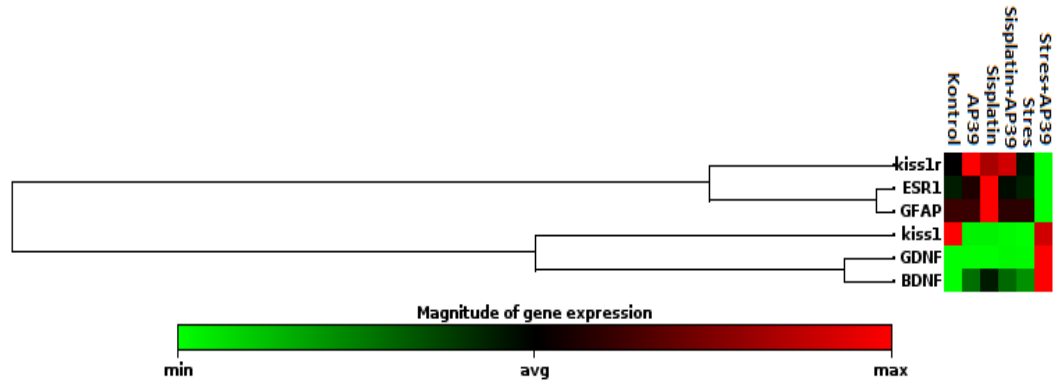
Kontrol grubuna göre Stres grubunun GDNF ($p=0,011$) geninde anlamlı artma ve KİSS1 ($p=0,005$) geninde anlamlı azalma belirlendi.

Kontrol grubuna göre Stres+AP39 grubunun GDNF ($p=0,001$) ve BDNF ($p=0,010$) genlerinde anlamlı artma belirlendi. KİSS1R ($p=0,010$), ESR1 ($p=0,005$) ve GFAP ($p=0,004$) genlerinde anlamlı artma belirlendi (Tablo 20).

Tablo 20. Hipotalamus dokusunda qRT-PCR ile değerlendirilen genlerin mRNA kat değişimi ve p değeri

	AP39		Sisplatin		Sisplatin+		Stres Grubu		Stres+ AP39	
	Grubu		Grubu		AP39 Grubu				Grubu	
Sembol	mRNA kat değişimi	p Değeri	mRNA kat değişimi	p Değeri	mRNA kat değişimi	p Değeri	mRNA kat değişimi	p Değeri	mRNA kat değişimi	p Değeri
GAPDH	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0
KISS1	0,05	0,005	0,05	0,005	0,04	0,005	0,03	0,005	0,91	0,728
KISS1R	1,80	0,084	1,54	0,160	1,66	0,116	0,95	0,829	0,19	0,010
GDNF	1,62	0,127	1,01	0,956	7,31	0,007	4,69	0,011	15,74	0,001
BDNF	2,08	0,033	2,71	0,025	2,13	0,048	1,82	0,082	4,823	0,010
ESR1	1,24	0,413	2,20	0,043	1,06	0,808	0,99	0,957	0,029	0,005
GFAP	0,99	0,978	1,62	0,126	0,95	0,850	0,95	0,850	0,010	0,004

p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi.

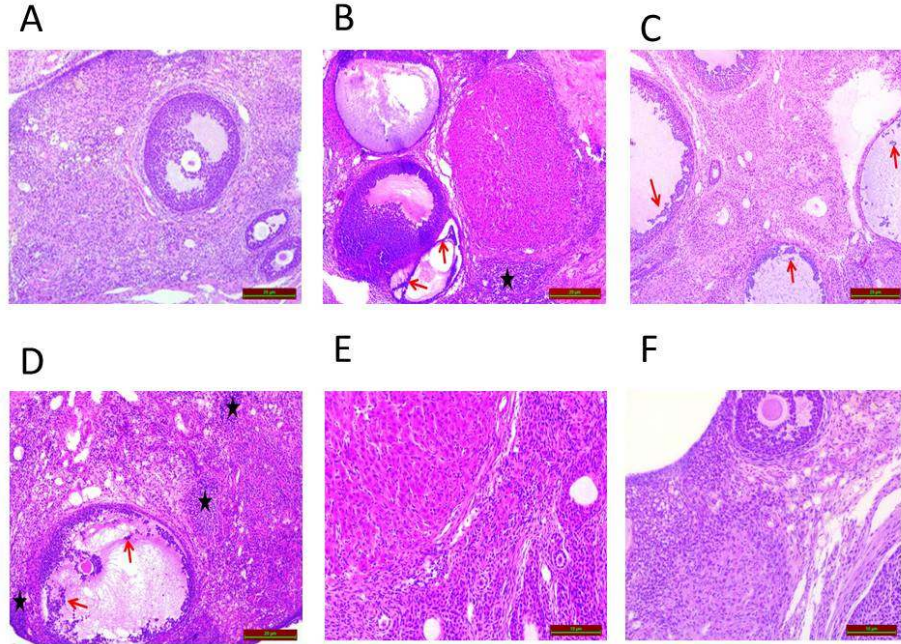


Şekil 9. Hipotalamus dokusunda qRT-PCR analiz edilen genlerin clustergram haritalaması.

5.9. İmmünohistokimyasal Verilerin Değerlendirilmesi

Yapılan hematoxilen & eozin boyanmanın ışık mikroskopi altında değerlendirilmesi sonucunda; kontrol grubuna ait over dokuları normal görünümdeydi (Şekil 10). Kontrol grubu sıçanlarda primer, sekonder ve antral olmak üzere foliküler gelişimin tüm aşamaları izlendi. Sisplatin ve stress gruplarında POY over görünümüyle benzer bir histopatolojik görünüm izlendi.

Kontrol grubuyla kıyaslandığında AP39 (D) , Sisplatin (B) ve Stres (C) gruplarında belirgin olarak stromal hücresellikte artış (siyah yıldız) ve foliküler epitelyal hücrelerde dejenerasyon (kırmızı ok) izlendi. Sisplatin (B) ve Stres (C) grupları arasında histopatolojik olarak anlamlı bir değişiklik izlenmedi. Sisplatin ve Stres grupları ile kıyaslandığında Sisplatin+AP39 (E) ve Stres+AP39 (F) gruplarında histopatolojik değişikliklerde azalma izlendi.



Şekil 10. POY over dokularının hematoxilen eozin boyaması. A: Kontrol, B: Sisplatin, C: Stress, D: AP39, E: Sisplatin + AP39, F: Stres+ AP39

6. TARTIŞMA

Menopoz, yumurtalık işlevlerinin azalması ve menstrüasyonun kalıcı olarak sona ermesidir. Dünya genelinde menopoz yaş ortalaması 51 olarak belirlenmiştir (72). Türkiye’de ortalama menopoz yaşının 48-52 arasında farklılık gösterdiği bildirilmektedir (73). Prematür over yetmezliği (POY) ise menarş yokluğunda (primer amenore) veya over folliküllerinin prematür tükenmesiyle (sekonder amenore) karakterize primer bir over kusurudur ve 40 yaşından önce görülmektedir (17).

Mevcut çalışmada, sıçanlarda sisplatin ve stres ile oluşturulan POY’un moleküler mekanizması gen ifadeleri, hormon seviyeleri, boy, kilo, siklus takibi gibi parametreler kontrol grubuyla karşılaştırılarak araştırılmıştır.

POY kemoterapi sırasında kanserli genç kadınlar için ciddi bir sorundur. Bu hastaların doğurganlığını korumak için, kemoterapi ile indüklenen over yetmezliğini önlemeye yönelik yaklaşımlara ihtiyaç vardır (14). Sisplatin, klinikte kanser tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir kemoterapötik ajandır. Genellikle düşük doğurganlık ve POY gibi yumurtalık fonksiyonları üzerinde olumsuz etkilere neden olduğu bilinmektedir (74). Sisplatin, oositin sağkalım ve folikül gelişimi için gerekli olan granülosa hücre apoptozunu indüklemektedir. Zhou ve ark tarafından yapılan bir çalışmada sisplatin verilen sıçanların kilo ve over ağırlıklarında azalma meydana geldiği belirtilmiştir (75). Çalışmamızda da Zhou ve arkadaşlarının bulgularını destekleyecek şekilde sisplatin uygulanan gruplarda boy, kilo ve over ağırlıklarında önemli azalmalar olduğu belirlenmiştir. Bu bulgu sıçan sisplatin ile indüklenmiş POY modelimizin doğru oluştuğunun

göstergelerinden ilkidir. Sisplatin+AP39 grubunda da sisplatin grubuna benzer olarak boy, kilo ve over ağırlıklarında azalmalar olduğu görülmüştür. Bu durum AP39'un POY modelinde boy, kilo ve over ağırlıkları üzerine iyileştirici etkisinin olmadığını göstermektedir.

Stres, insan ve hayvanları etkileyebilen; davranış değişikliklerine ve çeşitli hastalıklara neden olan çevresel bir faktördür. Stres, beyin fonksiyonlarında ve bilişte bir düzenleyici olarak kabul edilmektedir (76). Yapılan pek çok çalışmada serum ve beyinde pek çok hormon, biyokimyasal ve nörokimyasal maddenin düzeylerinde kronik strese bağlı değişiklikler olduğu gösterilmiştir (77). Wang X ve ark tarafından yapılan çalışmada psikolojik stresin hipofiz-adrenal eksenindeki biyomoleküllerin değerlerini azalttığı ve hipotalamustaki biyomoleküllerin etkisiyle hipotalamus-hipofiz-over aksın çalışmasını bozarak POY'a yol açtığı bulunmuştur (50). Çalışmamızda Stres ve Stres+ AP39 gruplarında boy, kilo ve over ağırlığı bakımından kontrol grubuna göre anlamlı farklılıklar bulunmazken sisplatin grubuna göre anlamlı artış görülmüştür. Sonuçlar karşılaştırıldığında Sisplatin'in strese kıyasla boy, kilo ve over ağırlığında daha fazla tahribata yol açtığı açıktır.

Dişi sıçanların üreme döngüsüne östrus döngüsü denmektedir. Döngü proestrus, östrus, metaöstrus ve diestrus fazlarından oluşmaktadır. Ovulasyon proestrus başlangıcından östrusun sonuna kadar oluşmakta ve bu kısa çevrim ortalama 4 gün sürmektedir (78). Üreme çağındaki kadınlar için, sisplatin kaynaklı gonadotoksisite, adet döngüsünde değişikliklere ve apoptozla primordiyal foliküllerin kaybına neden olmaktadır. Bu süreçte reaktif oksijen türlerinin (ROS) üretiminin artması over rezervinin tükenmesine, antioksidan

kapasitede azalmaya ve mitokondriyel DNA'da hasarın artmasına neden olmaktadır (79). Sisplatin gruplarında östrus döngüsünde bozulmaların olduğu ve özellikle diöstrus fazında artışın ve östrus fazında azalmanın meydana geldiği bulunmuştur. Bu veriler yumurta olgunlaşmasının durduğunun en önemli göstergesidir. Bu bulgu özellikle sıçan sisplatin ile indüklenmiş POY (Sİ-POY) modelimizin oluştuğunun en önemli göstergelerinden ikincisidir. Sisplatin grubuna benzer olarak stres grubunda da östrus döngüsünde bozulmaların olduğu saptanmıştır. Aynı şekilde stres grubunda diöstrus fazında artışın ve östrus fazında azalmanın meydana geldiği bulunmuştur. Bu bulgu stres ile indüklenmiş POY (STİ-POY) modelimizde over rezervinde azalmanın oluştuğunun kanıtlamaktadır. Ancak AP39'un hem Sİ-POY hem de STİ-POY'da menstrual döngü bozulmaları üzerine olumlu etkilerinin olmadığı belirlenmiştir.

Farklı POY kemirgen modellerinin kullanıldığı pek çok çalışmada POY'lu kemirgenlerin FSH ve LH hormon değerlerinde artma ve E2 hormon değerinde ise azalma olduğu görülmüştür (29, 50, 80, 81). Mevcut çalışmamızda kan hormon seviyeleri değerlendirildiğinde sisplatin grubunda E2 hormon değerinin AP39 grubuna göre azalmış olduğu bulunmuştur. Sisplatin, Sisplatin+AP39, Stres ve Stres+AP39 gruplarında kontrole göre FSH değerinde anlamlı artış meydana geldiği belirlenmiştir. Sisplatin grubunda kontrol grubuna kıyasla LH değerinde de artış olduğu saptanmıştır. Çalışmamız sisplatinin ve stresin hipotalamus-hipofiz-yumurtalık aksında biyomoleküler ağda tahribata yol açtığı ve hormon düzenlemesini bozarak POY'a yol açtığını göstermektedir. Ancak AP39'un hormon seviyeleri üzerine tedavi edici etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Testosteron ve estradiolün hedef dokulara ulaşımı cinsiyet hormonu bağlayıcı

globülin (SHBG) ile düzenlenmektedir. POY gibi over dokuda fonksiyon bozukluklarına yol açan hastalıklarda SHBG seviyesinin azaldığı bildirilmiştir (82, 83). Çalışmamızda Sisplatin+AP39 ve Stres+AP39 gruplarında hem kontrole hem de AP39 grubuna göre azalma meydana geldiği bulunmuştur. Aynı zamanda Stres+AP39 grubunda stres grubuna göre SHBG seviyesinde azalma meydana geldiği tespit edilmiştir. Bu veri AP39'un SHBG hormonu üzerine de herhangi bir iyileştirici etkisinin olmadığı göstermektedir. Bakalov ve ark tarafından yapılan çalışmada POY'lu hastalarda ACTH seviyesinin yükseldiği bulunmuştur (84). Wang ve ark tarafından yapılan diğer bir araştırmada ise POY'da ACTH seviyesinde azalma meydana geldiği bulunmuştur (50). Mevcut çalışmamızda ACTH seviyesinin Stres+AP39 grubunda Sisplatin+AP39 grubuna göre artmış olduğu belirlenmiştir. AP39 grubunda kontrol grubuna göre anlamlı artma olduğu bulunmuştur. AP39'un ACTH seviyelerini artırıcı bir etkisi olduğu belirlenmiştir. Ancak şu aşamada bu etkisini hangi yollar üzerinden gerçekleştirdiğini ortaya koyacak herhangi bir çalışma veya veri bulunmamaktadır. Özellikle AP39'un bu etkisinin altında yatan moleküler mekanizmaların daha detaylı değerlendirilmesine ihtiyaç vardır. Saif ve ark tarafından yapılan çalışmada POY teşhisi konulan genç bir kadında kortizol seviyesinin normal değerlerin altında olduğu tespit edilmiştir (85). Çalışmamızda kontrole göre sisplatin veya stress gruplarının kortizol seviyelerinde herhangi bir değişim tespit edilmemiştir.

Sisplatin ovarian morfolojide de değişimlere yol açmaktadır. Bu değişimler arasında folliküllerdeki granuloza hücreleri ve oositlerde orta düzeyde dejenerasyon ve nekrozis olduğu belirlenmiştir (80). Liu ve arkadaşları sisplatinle uyardıkları POY modelinde hematoksilen eozin boyaması yaparak over

dokusunda dejenere folikül gelişimi ve antral foliküller ile az sayıda primordial folikül olduğunu göstermişlerdir (86). Çalışmamızda da histopatolojik olarak kontrol grubuna ait over dokularında herhangi bir patolojik görünüm izlenmemiştir. AP39, Sisplatin ve Stres gruplarında belirgin olarak stromal hücresellikte artış ve foliküler epitelyal hücrelerde dejenerasyon izlendi. Sisplatin ve Stres grupları arasında histopatolojik olarak anlamlı bir değişiklik izlenmedi. Sisplatin ve Stres grupları ile kıyaslandığında Sisplatin+AP39 ve Stres+AP39 gruplarında histopatolojik değişikliklerde azalma izlendi. Çalışmamızdaki ilginç bulgulardan biride AP39'un sağlıklı hayvanlara uygulanmasının overde dejenerasyona neden olmasıdır. Ancak sisplatin ya da stress ile AP39'un beraber uygulanmasının iyileştirici etkileri olduğu gözlenmiştir.

Oogenesis sırasında, dişi germ hücreleri, erken embriyonik gelişim için gerekli olan çeşitli protein, RNA, enerjik substratlar ve organelleri biriktirmektedir. Birçok çalışma mitokondriyal değişimin POY patogenezi ile ilişkili olduğunu kanıtlamaktadır. Özellikle insanlarda oosit büyümesi sırasında yaklaşık 250.000 mtDNA kopyası ile mitokondriyal içerikte büyük bir artış görülmektedir (87). Bu süreçte meydana gelen mitokondriyal disfonksiyon patolojik değişikliklere yol açmaktadır. Oositlerin gelişiminin yanı sıra granüler hücre fonksiyonunu da etkilemektedir (44, 46, 88-90).

MFN2, NRF1, ATP5B, TFAM, PPARGC1A, PPARGC1B, CHRM1, HIF1A, OPA1, PRKAA2, MFN1 ve NFE2L2 genleri mitokondriyal biyogenez ile ilişkili genlerdir. Çalışmamızda bu genlerin over dokuda mRNA ifade düzeyleri incelenerek mitokondriyal biyogenez ve POY arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Mitokondriyal dış zar üzerinde bulunan ve mitokondriyal füzyon sürecine dahil olan korunmuş dinamin benzeri GTPaz görevi olan Mfn2, ATP üretiminin artırılmasına yardımcı olmaktadır. Mfn2 PERK yollarını inhibe ederek mitokondriyal fonksiyonu düzenlemektedir. Ayrıca, Mfn2'nin düşük ifadesinin, granülosa hücrelerinde apoptozu arttırabildiği gösterilmiştir. POY'da görülen yumurtalık morfolojisi ve fonksiyonundaki değişikliklerle Mfn2'nin yetersiz ifadesi arasında yakın bir ilişkisi olduğu düşünülmektedir (46). Çalışmamızda sıçanların yumurtalık dokularında Sisplatin, Stres ve AP39 gruplarında MFN2 mRNA düzeyinde artış olduğu bulunmuştur. Bu artış özellikle POY durumunda yumurtalık dokusunun korunması adına Mfn2 düzeylerinin arttığını göstermektedir. Sisplatin+AP39 ve Stres+AP39 gruplarında kontrole göre anlamlı farklılık görülmemiştir.

TFAM, mtDNA kopya sayısını ve mtDNA transkripsiyon aktivitesini düzenleyen, ana mitokondriyal transkripsiyon faktörlerinden biridir. NRF1'in, solunum zinciri altbirimlerini kodlayan genler dahil olmak üzere, TFAM gibi bazı mitokondriyal genlerin promotörlerini transaktive ettiği bilinmektedir. TFAM ve NRF1'in oosit olgunlaşması sırasında aktif olarak transkribe edildiği bildirilmiştir (91, 92). Çalışmamızda TFAM'ın gen mRNA ifadesini AP39 ve Sisplatin gruplarında arttığı diğer gruplarda değişmediği saptanmıştır. Wang ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada yüksek yağlı diyet uygulanan sıçanların over dokusunda disfonksiyon olduğu bulunmuştur. Yumurtalık çekirdeklerinde farklı aşamalarda ifade edilen NRF-1'in hastalık gruplarında ifade düzeyinde azalma olduğu bulunmuştur (93). Mevcut çalışmamızda Sisplatin+AP39 grubunda

kontrole kıyasla NRF1’de anlamlı azalma olduğu tespit edilmesine rağmen diğer gruplarda anlamlı farklılık bulunmamıştır.

PPARGC1A ve PPARGC1B geni, solunum zincirinin aktivitesi tarafından üretilen ROS’a bağlı oksidatif hasarın korunmasında yer alan mitokondriyal biyogenezin ve solunumun ana uyarıcısıdır (94). PGC-1 α ’nın artmış mRNA ifadesinin kültüre alınmış nöronal hücreleri oksidatif stres aracılı hücre ölümünden koruduğu bulunmuştur (95). Çalışmamızda kontrole göre bütün gruplarda PPARGC1A geninin mRNA miktarında azalma meydana geldiği kanıtlanmıştır. PPARGC1B geninin ekspresyon düzeyinin Sisplatin+AP39 ve Stres gruplarında azaldığı bulunmuştur. Bu durum over dokuda sisplatin ve strese bağlı olarak mitokondriyal biyogenez yollarının bozulduğunu kanıtlamaktadır.

ATP5B mitokondriyal ATP sentazın (kompleks V) alt ünitesini kodlayan bir genidir. Bu mitokondriyal elektron nakil zinciri komplekslerinin her birinin önemli rolü göz önüne alındığında, bu bileşenlerin bir veya daha fazlasında meydana gelen değişikliklerin mitokondriyal fonksiyonu bozacağı muhtemeldir. Elektron taşıma zinciri ile ilişkili transkriptlerin seviyesindeki değişiklikler ATP seviyelerinde bir azalmaya yol açarak oositlerin gelişimsel yeterliliğini bozabilmektedir (96). Çalışmamızda AP39, Sisplatin ve Stres+AP39 gruplarının ATP5B gen ekspresyonunda anlamlı artış meydana geldiği bulunmuştur. AP39+Sisplatin grubu hariç diğer AP39 gruplarında ATP5B ifadesini artırarak mitokondriyal enerji üretimine önemli katkılar sağlayabilir.

HIF-1 α mitokondriyal biyogenezi negatif olarak düzenlemektedir. HIF1’in aşırı ifadesi TFAM ifadesini ve böylece mitokondriyal biyogenezi baskılamaktadır (97, 98). Çalışmamızda HIF1A gen ifadesinin Sisplatin, Sisplatin+AP39, Stres ve

Stres+AP39 gruplarında anlamlı olarak arttığı görülmüştür. Böylece bu gruplarda over dokuda mitokondrial biyogenezin stres ve sisplatin faktörleri altında benzer şekilde bozulduğu ve AP39'un mitokondrial biyogenez üzerinde olumlu bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

OPA1, mtDNA'yı koruyan ve mitokondriyal füzyonda yer alan önemli bir proteindir (94). OPA1, kristanın işlevsel bütünlüğünü korumaktadır ve eksikliğinde matrikste bütünlüğünde ve füzyon-fisyon dengesinde bozulma meydana geldiği bilinmektedir (99). OPA1, oosit yetkinliği için gerekli olan yeterli bir mtDNA havuzunun oluşturulmasında önemli bir rol oynamaktadır (94). Çalışmamızda OPA1'in bütün gruplarda anlamlı olarak arttığı görülmüştür.

Memelilerde Mfn2 hem dış mitokondriyal membran hem de iç mitokondriyal membranın füzyonu için gereklidir. Mfn2 GTPaz görevi görerek füzyon komplekslerinin birleşmesini düzenlemektedir. MFN2 eksikliğinde mitokondride fonksiyon bozuklukları meydana gelmektedir (100). Çalışmamızda MFN2 mRNA kat artışında kontrol grubuna göre diğer gruplarda anlamlı farklılık bulunmamıştır.

PRKAA2 mitokondriyal homeostazın ve metabolik fonksiyonun korunmasında rol oynayan önemli bir proteindir. Mitokondriyal biyogenezi arttırmaktadır. Hasarlı mitokondrilerin otofajiye bağlı olarak ortadan kaldırılmasını desteklemektedir (101). Çalışmamızda PRKAA2 geninin mRNA düzeyinin AP39, Sisplatin, Sispaltin+AP39 ve Stres gruplarında anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. PRKAA2 geninin ifadesindeki azalma bu gruplarda mitokondrial dengenin bozulduğunu işaret etmektedir.

NFE2L2 transkripsiyon faktörü olarak ROS, Ca²⁺ ve anti-inflamatuar sinyal yolları ile mitokondriyal kalite kontrolünün düzenlenmesinde görevlidir. Çeşitli gen ifadelerini düzenleyerek ederek geri besleme döngülerine katılarak biyogenezi düzenlemektedir (102). Çalışmamızda NFE2L2 gen ifadesinin tüm gruplarda artış gösterdiği bulunmuştur.

Mitokondri biogenez ilişkili gen ifadeleri sisplatin grubunda genel olarak değerlendirildiğinde kontrole göre MFN2, ATP5B, TFAM, HIF1A, OPA1, NFE2L2 gen ifadelerinde anlamlı artış ve PPARGC1A, PRKAA2 gen ifadelerinde ise anlamlı azalma olduğu belirlenmiştir. Miranda ve arkadaşlarıda oksidatif strese bağlı olarak HELA hücre hatlarında TFAM ve NRF1'in arttığını göstermişlerdir (103). Bu bağlamda sisplatinin mitokondrial biogenezi olumsuz olarak bozduğu ve oluşan oksidatif strese karşı mitokondriyel biyogeneze etkili gen ifadelerinin genel olarak arttığı belirlenmiştir. Sisplatin+AP39 grubunda ise MFN2, ATP5B, TFAM gen ifadelerinin normalleştiği gösterilmiştir. Ancak sisplatin+AP39 grubunda PPARGC1B gen ifadesinin anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur.

Mitokondrial biogenez ilişkili gen ifadeleri stres grubunda genel olarak değerlendirildiğinde kontrole göre MFN2, CHRM1, HIF1A, OPA1, NFE2L2 gen ifadelerinde anlamlı artış ve PPARGC1A, PRKAA2 gen ifadelerinde ise anlamlı azalma olduğu belirlenmiştir. Bu bulgunun en ilgi çekici yanı genlerdeki mRNA artış ve azalmalarının sisplatin grubuyla benzerliğidir. Her iki gruptaki hayvanlarda da CHRM1 hariç benzer bir gen ifade transkriptomu olduğu gösterilmiştir. Bu veri dış uyarıcı ne olursa olsun POY sürecinde over dokusunda

benzer genlerin etkilerini ve muhtemelen hormonal olarak ortak bir mekanizmanın varlığını göstermektedir.

Oosit içinde depolanan maternal mRNA, embriyonik genom tamamen işlevsel hale gelene kadar oosit olgunlaşması, döllenme ve ilk embriyonik bölünme periyodu sırasında kritik öneme sahiptir (96). Çalışmamızda over ile ilişkili genlerin mRNA ifade seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Verilerimize göre, oosit kalitesinin göstergesi olan gen ifadeleri genel olarak değerlendirildiğinde en dikkat çekici özellik gen artış ve azalmaları açısından Sisplatin ve stres gruplarının benzer gen ifade düzeyleri göstermeleridir. Kontrole göre diğer POY grupları ile karşılaştırıldığında FIGLA ve POU5F1'in gen ifadelerinin değişmediği, DPPA-3, TBP ve GTF2H1 gen ifadelerinin anlamlı olarak azaldığı, analiz edilen diğer gen ifadelerinin ise anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Bu bulgu özellikle hem sisplatinin hemde stresin benzer yollar üzerinden overdeki yumurta kalitesini bozduğu ve ilerleyen süreçte POY'a neden olduğunu göstermektedir. Bir mitokondrial koruyucu ajan olarak ifade edilen AP39'un over kalitesinin göstergesi olan gen ifadelerini normalleştirmede belirlenmiştir. Aşağıda analiz edilen genlerin oosit gelişimi ve döllenme açısından önemleri konunun daha açık bir şekilde anlaşılması amacıyla ayrı ayrı tartışılmıştır.

POY'da belirgin olarak etkilenen iki gen Kiss1 ve Esr1'dir. Bu iki genin üreme üzerindeki önemi hem bağımsız olarak hem de kombinasyon halinde oldukça önemlidir. Kiss1 kemirgenlerin ve diğer türlerin ovulatuvar süreçlere girme kapasitesinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Sıçan ve insanlarda POY'da meydana gelen üreme kapasitesinde azalma Kiss1 mRNA seviyesinde azalma ile

ilişkilendirilmektedir (62). Östrojen, östrojen reseptörlerine 1 (ESR1) bağlanır ve granuloza hücre çoğalması, folikülogenezis ve fertilitede önemli roller oynar. ESR1 POF için olası bir aday gen olarak önerilmektedir. Özellikle dişi ESR knockout farelerde anovulasyon görüldüğü ve infertilite meydana geldiği bildirilmesi ESR1'in POY oluşumunda ne kadar önemli roller oynadığının en önemli göstergelerinden biridir (104). Kontrole göre diğer gruplarda over dokusunda ESR1 mRNA'sının anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir. Hem sisplatin hem de stres gruplarında benzer şekilde ESR1'in artışı her iki uyarıcısında overde benzer moleküler mekanizmaları tetikleyerek POY'a neden olduğunu göstermektedir.

FIGLA ve DAZL erken folikülogenez için gerekli olan genlerdir. Bu genler, normal germ hücre gelişimi için gerekli olan; transkripsiyon faktörlerini, mRNA bağlayıcı proteinleri kodlamaktadırlar. Bu genlerin ortadan kalkması germ hücrelerinden yoksun yetişkin yumurtalık oluşumu ile sonuçlanmaktadır (105). Çalışmamızda kontrol grubuna göre Sisplatin+AP39 grubunda FIGLA geninin mRNA kat değişiminde azalma olduğu tespit edilmiştir. Bu durum Sisplatinin erken folikülogenezisi olumsuz etkilediğini düşündürmektedir. DAZL geninin ekspresyon seviyesinde bütün gruplarda artma olduğu bulunmuştur.

DPPA3 ve NPM2 erken embriyonik gelişimi etkileyen oosit-spesifik genlerdir. DPPA3 normal preimplantasyon gelişimi için önemli olan maternal bir etki genidir (105). Eksikliğinde embriyonik gelişimin olumsuz etkilendiği bilinmektedir. DPPA3'ün ovulasyon sonrası infertilite için aday bir gen olduğu düşünülmektedir (105, 106). Çalışmamızda DPPA3 geninde bütün gruplarda azalma meydana geldiği bulunmuştur. Bu durum çalışmamızda Sisplatinin ve

stresin oosit üzerinde olumsuz etkiler meydana getirdiğini ve AP39'un herhangi bir olumlu etki oluşturmadağını ispatlamaktadır. Memelilerde NPM2, oosit ve erken zigotlarda histon deasetilasyonu ve nükleolusu çevreleyen heterokromatin oluşumu için oldukça önemlidir. Eksikliğinde başarısız mitoz bölünme meydana geldiğinden NPM2 eksik dişi farelerin subfertil olduğı bilinmektedir (105, 107). Çalışmamızda NPM2 geninde bütün gruplarda anlamlı artış oluştuğı görülmüştür.

ZP1 ve ZP2 oosit olgunluğu ve fertilizasyon yeterliliğı ile ilişkilidir. Canosa ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada olgunlaşmamış oositlerde ZP1 ve ZP2 mRNA ekspresyonunun anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir (108). Çalışmamızda sadece sisplatin grubunda ZP1'in mRNA ekspresyonunun anlamlı azalma meydana geldiğı bulunmuştur. Ancak diğer gruplarda ZP1 ve ZP2 mRNA ekspresyonunun anlamlı artış gösterdiği belirlenmiştir.

POU5F1 embriyonik gelişimdeki pluripotensin düzenlenmesinde kritik bir role sahiptir. Wang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada POU5F1'deki mutasyonların POF riskini artırdığı gösterilmiştir (109). Diğer taraftan farelerde, POU5F1'in azalmış veya artmış ifadesinin gelişimsel programlamada değişikliklere yol açtığı bulunmuştur (110). Çalışmamızda Sisplatin+AP39 grubunda POU5F1 mRNA ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur.

H1FOO geni H1 histon yapısına katılarak kromatinin yeniden yapılanmasında önemli rol oynamaktadır. Oosit ve zigot olgunlaşmasında görev almaktadır (111). Li ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada folikül sayısı ve ağırlığında azalma olan over dokuda H1FOO mRNA ekspresyonunun azaldığı bulunmuştur (112). Çalışmamızda bu durumun aksine bütün gruplarda mRNA ifadesinde artış olduğu bulunmuştur.

İnsanlarda DNA metilasyonu, gen ifadesinin düzenlenmesinde ve genomik imprinting, hücre farklılaşması ve birçok hücrel sürecin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan genomun önemli bir epigenetik modifikasyonudur. DNA metilasyon memelilerde oogeneze ve erken embriyo gelişiminde kritik rol oynadığı bilinmektedir. Son yıllarda, aşırı metilasyonun insan hastalıkları ile ilişkili olduğunu ileri süren pek çok çalışma bulunmaktadır (113-116). Çalışmamızda DNA metiltransferazını kodlayan DNMT1, DNMT3A ve metil bağlayan bölge proteini MBD2 genlerinin ekspresyon düzeylerinin bütün gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı olarak artış gösterdiği tespit edilmiştir. İki gende de artış olması POY oluşumunda over dokunun aynı şekilde etkilendiğini ve AP39'un olumlu bir etki göstermediğini ispatlamaktadır.

Histon deasetilazlar (HDAC'ler), büyük ölçüde transkripsiyon üzerindeki baskıcı etkileriyle, çeşitli biyolojik süreçlerde önemli rollere sahip olan çok geniş bir enzim ailesinin bir parçasıdır (117). Qu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada bir over disfonksiyonu olan polikistik over sendromunda HDAC3 mRNA ekspresyon seviyesinin anlamlı olarak artış gösterdiğini bulmuşlardır (118). Çalışmamızda benzer olarak HDAC3 mRNA ekspresyonunda bütün gruplarda artış olduğu kaydedilmiştir.

Yumurtalık rezervi, primordial foliküllerin sayısı ile ifade edilmektedir. Zhang ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada kemoterapiye tabi tutulan farelerde primordial folikül sayısında ve SIRT1, SIRT3 ve SIRT6 gen ifade düzeylerinde azalma meydana geldiği bulunmuştur (119). Çalışmamızda bütün gruplarda SIRT 7 mRNA ifadesinin artmış olduğu bulunmuştur.

Yumurtalıkta, SMARCA1 granuloza hücrelerinde ifade edilir ve ifadesi foliküllerin olgunlaşması için gereklidir. Bununla birlikte, SMARCA1'in folikülogenezisteki rolü veya overdeki SMARCA1 fonksiyon kaybının sonuçları hakkında çok az şey bilinmektedir. Pepin ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada SMARCA1 knockout farelerde folikül olgunlaşmasında anormallikler görülürken doğurganlığın normal olduğu saptanmıştır (120). Çalışmamızda SMARCA1'in mRNA ifadesinin AP39, Sisplatin+AP39 ve Stres gruplarında arttığı gözlemlenmiştir.

Falender ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada TBP-null farelerde oosit gelişiminde bozukluklar meydana geldiği bulunmuştur (121). Çalışmamızda benzer şekilde TBP mRNA ifadesinin Sisplatin, Siplatin+AP39, Stres ve Stres+AP39 gruplarında anlamlı olarak azaldığı görülmüştür. Bu sonuç beklenildiği üzere hastalık gruplarında oosit yapısında bozulmalar meydana geldiğinin göstergesidir. Diğer taraftan AP39'un tedavi edici bir etkisi görülmemektedir.

Li ve arkadaşları tarafından yapılan sisplatin direnci konulu çalışmada DNA tamiri ile ilişkili bir gen olan GTF2H1'in (122) mRNA ifadesi düzeyinde anlamlı bir değişim olmadığı saptanmıştır. Ancak çalışmamızda AP39, Sisplatin, Stres ve Stres+AP39 azalma meydana geldiği bulunmuştur. Sisplatin+AP39 grubunda artış olduğu tespit edilmiştir.

POLR2C oositlerde ifade edilmektedir. POLR2C'nin DNA transkripsiyonundaki en belirgin artış, germ hücre mitozunda ve primordial aşamadan erken antral aşamaya kadar oositlerin büyümesi sırasında meydana gelmektedir. Moriwaki ve arkadaşları tarafından yapılan çalışma POLR2C

geninde meydana gelen mutasyonun POY'a yol açtığını bildirmektedir (123). Çalışmamızda bütün gruplarda bu genin mRNA ifade düzeyinde artış meydana geldiği bulunmuştur.

Çalışmamızda KAT2A, MAP2K1, KMT2A, MED15 genlerinin mRNA ifadelerinde bütün gruplarda artış meydana geldiği gözlenmiştir. CHRM1 geninin mRNA ifadelerinde Sisplatin+AP39 grubunda anlamlı azalma görülürken Sisplatin grubunda anlamlı değişim tespit edilmemiştir. AP39, Stres ve Stres+AP39 gruplarında anlamlı artış bulunmuştur.

Yumurtalık hormon kaybının veya değişiminin bilişsel gerilemeye katkıda bulunduğuna dair klinik ve temel bilimsel kanıtlar bulunmaktadır (124). Ryan ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada erken menopoza sonrasında kadınlarda bilişsel fonksiyonlarda gerileme meydana geldiği bulunmuştur (57). Çalışmamızda beynin öğrenmeden sorumlu bölgesi olarak kabul edilen hipokampusta KISS1 geninin mRNA ifadesinin Sisplatin+AP39, Stres ve Stres+AP39 gruplarında anlamlı olarak azaldığı bulunmuştur. KISS1R ve GDNF genlerinin mRNA ifadesinin bütün gruplarda azaldığı bulunmuştur. Morris su tankı testi verilerine göre Sisplatin, Sisplatin+AP39, Stres ve Stres+AP39 gruplarının platformu bulma süreleri azalmıştır. Bu gruplarda bulunan sıçanların prob testte hedef bölmede yüzme sürelerinin de kontrol grubuna göre anlamlı olarak azaldığı tespit edilmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz qRT-PCR sonuçlarına göre hipokampusta Kiss1 mRNA seviyesinin Sisplatin ve Stres gruplarında azaldığı ancak AP39'un bu azalmayı düzeltmediği belirlenmiştir. Bu bulgu özellikle POY'da KISS1, KISS1R ve GDNF genlerinin ifadesinde bozulmalar sonucu öğrenmenin etkilenebileceğini göstermektedir.

7. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Çalışmamızda sisplatin indüklü grupların over dokularında hem mRNA düzeyinde hem de morfolojik olarak kontrole göre farklılıklar bulunmuştur. Sisplatinin; östrus siklusunu olumsuz etkileyerek sıçanların diöstrus fazında sabit kaldığı görülmüştür. Diöstrus fazının artması over dokunun işlevsiz olduğunun temel göstergelerindendir ve aynı sıçanların gen ifade seviyelerinde de anlamlı değişimler görülmüştür. Sıçanlarda POY oluşumunun takibi için düzenli siklus takibi önerilmektedir.

Stres indüklü gruplarda sisplatin gruplarına benzer sonuçların alınması stres faktörlerinin over üzerine olumsuz etkilerini ispatlamıştır. Çalışmamızda immobilizasyon aparatı kullanılarak stres oluşturulmuştur. Gelecek çalışmalar için farklı stres faktörlerinin uygulanmasının over dokusu ve gen ifadeleri üzerine etkilerinin araştırılması önerilmektedir.

AP39'un bütün gruplarda iyileştirici etki oluşturmaması POY için farklı tedavi yollarının araştırılması gerekliliğini açıkça göstermektedir. Bakılan gen ifade ve hormon seviyeleri göz önüne alınarak farklı tedavi seçeneklerinin oluşturulabileceği görülmektedir.

Sonuç olarak, çalışmamız POY oluşumunda mitokondrial biyogenезin rolünü ortaya koymuştur. POY'un tedavisi için AP39 kullanımının koruyucu etkinliğinin sınırlı düzeyde olduğu gösterilmiştir. Over dokusunda özellikle mitokondrial biogenezele ilişkili genlerin POY gelişimine katkı sağlayabileceği gösterilmiştir. Bu bağlamda özellikle mitokondri koruyucu farklı ajanların POY'da koruyucu etkilerinin olup olmadığının belirlenmesi gerekmektedir.

Beyin dokularında ise hem mitokondrial biogenez hem de öğrenme ile ilişkili gen ifadelerinin kontrolle karşılaştırılarak araştırılması hastalığın mekanizması ile ilgili önemli sonuçlar bulunmasına fayda sağlamıştır. İleride yapılacak çalışmalarda daha farklı gen ifadelerinin değerlendirilerek hastalık patogenezinde görevli genlerin tanımlanması yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine olanak sağlayacaktır.



8. KAYNAKÇA

1. Lebovic DI, Naz R. Premature ovarian failure: Think Eautoimmune Disorderf. *Sexuality, Reproduction and Menopause* 2004; 4: 230-233.
2. Cordts EB, Christofolini DM. Genetic Aspects of Premature Ovarian Failure: A Literature Review. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2011; 3: 635-643.
3. Pouresmaeili F, Fazeli Z. Premature ovarian failure: a critical condition in the reproductive potential with various genetic causes. *International Journal of Fertility & Sterility* 2014; 1: 1.
4. Gaytan F, Garcia-Galiano D, Dorfman MD, et al. Kisspeptin receptor haplo-insufficiency causes premature ovarian failure despite preserved gonadotropin secretion. *Endocrinology* 2014; 8: 3088-3097.
5. Petraglia F, Zanin E, Faletti A. Inhibins: Paracrine and endocrine effects in female reproductive function. *Curr Opin Obstet Gynecol* 1999; 11: 241-247.
6. Atria A. La Menopausia Precoz Y Su Tratamiento Hormonal. *Rev Med Chile* 1950; 78, 373-377.
7. Jones GS, De Moraes-Ruehsen M. A New Syndrome Of Amenorrhea In Association With Hypergonadotropism And Apparently Normal Ovarian Follicular Apparatus. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 1969; 4: 597-600.
8. Goldenberg RL, Grodin RL, Rodbard D, et al. Gonadotropins in Women with Amenorrhea. *American Journal of Obstetrics Gynecology* 1973; 116: 1003-1009
9. Kinch RAH, Plunkett ER, Smout MS, et al. Primary ovarian failure: a clinicopathological and cytogenetic study. *American Journal of Obstetrics Gynecology* 1965;91: 630-641.
10. Amsterdam A, Dantes A, Selvaraj N, et al. Apoptosis in Steroidogenetic Cells: Structurefunction Analysis *Steroids* 1997;62: 207-211.
11. Laml T, Schulz-Lobmeyr I, Obruca A, et al. Premature Ovarian Failure: Etiology and Prospects. *Gynecological Endocrinology* 2000; 4: 292-302.
12. Eryılmaz Ö, Yılmaz S, Doğanay M, et al. Prematur Over Yetersizligi. *Jinekoloji-Obstetrik ve Neonatoloji Tıp Dergisi* 2012; 9: 36-39.
13. Kruszyńska A, Słowińska-Srzednicka J. Anti-Müllerian hormone (AMH) As A Good Predictor of Time of Menopause. *Prz Menopauzalny* 2017; 2 :47-50.
14. Jang H, Na Y, Hong K, et al. Synergistic Effect of Melatonin and Ghrelin in Preventing Cisplatin-Induced Ovarian Damage Via Regulation of FOXO3a Phosphorylation and Binding To The p27Kip1 Promoter in Primordial Follicles. *Journal of Pineal Research* 2017; 3: e12432.
15. Kalantaridou SN, Nelson LM. Premature Ovarian Failure is not Premature Menopause. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2000; 1: 393-402.

16. Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Human Reproduction Update* 2005; 4: 391-410.
17. Beck-Peccoz P, Persani L. Premature ovarian failure. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2006; 1: 9.
18. Vabre P, Gatimel N, Moreau J, et al. Environmental Pollutants, A Possible Etiology For Premature Ovarian Insufficiency: A Narrative Review of Animal And Human Data. *Environmental Health* 2017; 1: 37.
19. Carlosama C, El Zaiat, M Patiño, et al. A Homozygous Donor Splice-Site Mutation in The Meiotic Gene MSH4 Causes Primary Ovarian Insufficiency. *Human Molecular Genetics* 2017; 199: 3161-3166.
20. Davis SR. Premature Ovarian Failure. *Maturitas* 1996; 23: 1-8.
21. Ceylaner G, Altinkaya SO, Mollamahmutoglu L, et al. Genetic Abnormalities in Turkish Women with Premature Ovarian Failure. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 2010; 2: 122-124.
22. Dixit H, Rao L, Padmalatha V, et al. Genes Governing Premature Ovarian Failure. *Reproductive Biomedicine Online* 2010; 6: 724-740.
23. Vitek WS, Pagidas K, Gu G, et al. Xq; autosome translocation in POF: Xq27. 2 Deletion Resulting in Haploinsufficiency for SPANX. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2012; 1: 63-66.
24. Liu L, Tan R, Cui Y, et al. Estrogen Receptor α gene (ESR1) Polymorphisms Associated with Idiopathic Premature Ovarian Failure in Chinese Women. *Gynecological Endocrinology* 2013; 2: 182-185.
25. Pankov YA. Kisspeptin and Leptin in the Regulation of Fertility. *Molecular Biology* 2015; 5: 631-637.
26. Xiao GY, Cheng CC, Chiang YS, et al. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. *Scientific Reports* 2016; 6: 23120.
27. Sanchez AM, Giorgione V, Viganò P, et al. Treatment with anticancer agents induces dysregulation of specific Wnt signaling pathways in human ovarian luteinized granulosa cells in vitro. *Toxicological Sciences* 2013; 1: 183-192.
28. Sabuncuoğlu S, Özgüneş H. Sisplatin Toksisitesi: Oksidatif Stresin Önemi ve Antioksidanların Etkisi. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi* 2011; 1: 18-25.
29. Li D, Chen Y, Qi L, et al. Differentially expressed genes in cisplatin-induced premature ovarian failure in rats. *Animal Reproduction Science* 2013; 3: 205-213.
30. Ayesha VJ, Goswami D. Premature Ovarian Failure: An Association with Autoimmune Diseases. *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 2016; 10: 10-12.
31. Jin M, Yu Y, Huang H. An update on primary ovarian insufficiency. *Science China Life Sciences* 2012; 8: 677-686.

32. Vujović S, Ivović M, Tančić-Gajić M, et al. Premature ovarian failure. *Srpski Arhiv Za Celokupno Lekarstvo* 2012; 11: 806-811.
33. Hernández-Angeles C, Castelo-Branco C. Early menopause: A hazard to a woman's health. *The Indian Journal of Medical Research* 2016; 4: 420.
34. Girgin A. Kör fare'nin sindirim kanalı organları ile tiroid, hipofiz, beyin, kalp ve böbreklerinde CalbindinD28K dağılımının immünohistokimyasal yöntemle belirlenmesi. Doktora tezi, Niğde: Ömer Halisdemir Üniversitesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2014.
35. Güveloğlu E. Meme, over ve tuba karsinomlarında BRCA1 ve BRCA2 protein ekspresyonlarının prognostik önemi: immünohistokimyasal ve kinikopatolojik çalışma. Uzmanlık Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2006.
36. Sayar A. Primer Over Ve Endometrium Berrak Hücreli Karsinomalarında Napsin-A İmmünohistokimyasal Antikorumun Ekspresyonunun Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Bursa: Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2005.
37. "The Ovaries". <http://teachmeanatomy.info/>. 23.07.2017.
38. McLaughlin EA, McIver SC. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction* 2009; 1: 1-11.
39. Çelik Ö, Yıldırım A. Folikülogenezisin Moleküler Temelleri. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2010; 1: 59-63.
40. Grive KJ, Freiman RN. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development* 2015; 15: 2554-2563.
41. Adhikari D, Flohr G, Gorre N, et al. Disruption of Tsc2 in oocytes leads to overactivation of the entire pool of primordial follicles. *Molecular Human Reproduction* 2009; 12: 765-770.
42. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2005; 4: 822-834.
43. Jornayvaz FR, Shulman GI. Regulation of mitochondrial biogenesis. *Essays in Biochemistry* 2010; 47: 69-84.
44. Bonomi M, Somigliana E, Cacciatori C, et al. Blood cell mitochondrial DNA content and premature ovarian aging. *PloS One* 2012; 8: e42423.
45. Şükür YE, Kıvançlı İB, Özmen B. Ovarian aging and premature ovarian failure. *Journal of the Turkish German Gynecological Association* 2014; 3: 190-196.
46. Chen W, Xu X, Wang L, et al. Low Expression of Mfn2 Is Associated with Mitochondrial Damage and Apoptosis of Ovarian Tissues in the Premature Ovarian Failure Model. *Plos One* 2015; 9: e0136421.
47. Zhao F, Fang F, Qiao P F et al. AP39, a mitochondria-targeted hydrogen sulfide donor, supports cellular bioenergetics and protects against Alzheimer's disease by preserving mitochondrial function in APP/PS1 mice and neurons. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2016; 2016: 8360738.

48. Harlow BL, Signorello LB. Factors associated with early menopause. *Maturitas* 2000; 1: 3-9.
49. Khan AR, Hansen B, Wiborg O, et al. Diffusion MRI and MR spectroscopy reveal microstructural and metabolic brain alterations in chronic mild stress exposed rats: A CMS recovery study. *Neuroimage* 2018; 167: 342-353.
50. Wang XF, Zhang L, Wu Q. H, et al. Biological mechanisms of premature ovarian failure caused by psychological stress based on support vector regression. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015; 11: 21393.
51. Jeelani R, Khan SN, Shaeib F, et al. Cyclophosphamide and acrolein induced oxidative stress leading to deterioration of metaphase II mouse oocyte quality. *Free Radical Biology and Medicine* 2017; 110: 11-18.
52. De Souza Mota C, Weis SN, Almeida RF, et. Chronic Stress Causes Sex-Specific and Structure-Specific Alterations in Mitochondrial Respiratory Chain Activity in Rat Brain. *Neurochemical Research* 2017; 11: 3331-3340.
53. Buynitsky T, Mostofsky DI. Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 2009; 7: 1089-1098.
54. 'Animal Research Facility'. <http://210.212.254.115:198/arf/p1.php>. 23.09.2017
55. Isaac R. Early natural menopause – a marker of adverse life situations in women across the world: Not unique in Indian women. *The Indian Journal of Medical Research* 2016; 3: 317-318.
56. Ross J L, Stefanatos GA, Kushner H, et al. The effect of genetic differences and ovarian failure: intact cognitive function in adult women with premature ovarian failure versus Turner syndrome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 2004; 4: 1817-1822.
57. Ryan J, Scali J, Carriere I, et al. Impact of a premature menopause on cognitive function in later life. *An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 2014; 13: 1729-1739.
58. Morris RG. Morris water maze. *Scholarpedia* 2008; 8: 6315.
59. Nunez J. Morris water maze experiment. *Journal of Visualized Experiments* 2008; 19: 897.
60. Karson A, Onat F, Balcı F, et al. Absans Epilepsili WAG/Rij Sıçanlarda Lokomotor Aktivite, Öğrenme ve Bellek. *Journal of The Turkish Epilepsy Society* 2008; 167.
61. D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Research Reviews* 2001; 1: 60-90.
62. Gore AC, Walker DM, Zama AM, et al. Early life exposure to endocrine-disrupting chemicals causes lifelong molecular reprogramming of the hypothalamus and premature reproductive aging. *Mol Endocrinol* 2011; 12: 2157-2168.
63. Koebele SV, Mennenga SE, Hiroi R, et al. Cognitive changes across the menopause transition: A Longitudinal Evaluation Of The Impact Of Age and Ovarian Status On Spatial Memory. *Horm Behav* 2017; 87: 96-114.

64. Rajasekar N, Nath C, Hanif K, et al. Intranasal insulin improves cerebral blood flow, Nrf-2 expression and BDNF in STZ (ICV)-induced memory impaired rats. *Life Sciences* 2017; 173: 1-10.
65. Dole G, Nilsson EE, Skinner MK. Glial-derived neurotrophic factor promotes ovarian primordial follicle development and cell-cell interactions during folliculogenesis. *Reproduction* 2008; 5: 671-682.
66. Frehlick LJ, Eirín-López JM, Ausio J. New insights into the nucleophosmin/nucleoplasmin family of nuclear chaperones. *Bioessays* 2007; 1: 49-59.
67. Okuwaki M, Sumi A, Hisaoka M, et al. Function of homo- and hetero-oligomers of human nucleoplasmin/nucleophosmin family proteins NPM1, NPM2 and NPM3 during sperm chromatin remodeling. *Nucleic Acids Research* 2012; 11: 4861-4878.
68. Bonakdar E, Edriss MA, Bakhtari A, et al. A physiological, rather than a superovulated, post-implantation environment can attenuate the compromising effect of assisted reproductive techniques on gene expression in developing mice embryos. *Molecular Reproduction and Development* 2015; 3: 191-206.
69. Pontelo TP, Rodrigues SDAD, Kawamoto TS, et al. Transcripts levels of enzymes involved in histone acetylation in bovine oocytes of different competences. *Anim Reprod* 2017; 3: 892.
70. Wang HL, Lu RQ, Xie SH, et al. SIRT7 exhibits oncogenic potential in human ovarian cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2015; 8: 3573-77.
71. Wu W, Liu H, Lei R, et al. Genetic variants in GTF2H1 and risk of lung cancer: A case-control analysis in a Chinese population. *Lung Cancer* 2009; 2: 180-186.
72. Ouzounian S, Christin-Maitre S. What is menopause. *La Revue du Praticien* 2005; 4: 363-368.
73. Çoban A, Nehir S, Demirci H, et al. Klimakterik dönemdeki evli kadınların eş uyumları ve menopoza ilişkin tutumlarının menopozal yakınmalar üzerine etkisi. *Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi* 2008; 6: 343-349.
74. Li X, Yang S, Lv X, et al. The mechanism of mesna in protection from cisplatin-induced ovarian damage in female rats. *Journal Of Gynecologic Oncology* 2013; 2: 177-185.
75. Zhou D, Tan RJ, Lin L, et al. Activation of hepatocyte growth factor receptor, c-met, in renal tubules is required for renoprotection after acute kidney injury. *Kidney Int* 2013; 3: 509-520.
76. Dayi A, Cetin F, Sisman AR, et al. The effects of oxytocin on cognitive defect caused by chronic restraint stress applied to adolescent rats and on hippocampal VEGF and BDNF levels. *Medical Science Monitor* 2015; 21, 69-75.
77. Dastgerdi AH, Radahmadi M, Pourshanazari AA, et al. Effects of Crocin on Learning and Memory in Rats Under Chronic Restraint Stress with Special Focus on the Hippocampal and Frontal Cortex Corticosterone Levels. *Advanced Biomedical Research* 2017; 1: 157.

78. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Brazilian Journal of Biology* 2002; 62: 609-614.
79. Barberino RS, Menezes VG, Ribeiro AE, et al. Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. *Biology of Reproduction* 2017; 6: 1244-1255.
80. Zhang T, Yan D, Yang Y, et al. The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 2016; 81: 223-232.
81. Said RS, Nada AS, El-Demerdash E. Sodium selenite improves folliculogenesis in radiation-induced ovarian failure: a mechanistic approach. *Plos One* 2012; 12:e50928.
82. Bemardi F, Hartmann B, Casarosa E, et al. High levels of serum allopregnanolone in women with premature ovarian failure. *Gynecological Endocrinology* 1998; 5: 339-345.
83. Hogeveen KN, Cousin P, Pugeat M, et al. Human sex hormone-binding globulin variants associated with hyperandrogenism and ovarian dysfunction. *The Journal of Clinical Investigation* 2002; 7: 973-981.
84. Bakalov VK, Vanderhoof VH, Bondy CA, et al. Adrenal antibodies detect asymptomatic auto-immune adrenal insufficiency in young women with spontaneous premature ovarian failure. *Human Reproduction* 2002; 8: 2096-2100.
85. Saif A, Assem M. Premature ovarian failure could be an alarming sign of polyglandular autoimmune dysfunction. *Endocrine Regulations* 2017; 2: 114-116.
86. Liu J1, Zhang H, Zhang Y, L et al. Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Mol Cells* 2014; 12: 865-872.
87. St. John JC, Facucho-Oliveira J, Jiang Y, et al. Mitochondrial DNA transmission, replication and inheritance: a journey from the gamete through the embryo and into offspring and embryonic stem cells. *Human Reproduction Update* 2010; 5: 488-509.
88. Cha KY, Lee SH, Chung HM, et al. RETRACTED: Quantification of mitochondrial DNA using real-time polymerase chain reaction in patients with premature ovarian failure. *Fertility and Sterility* 2005; 6: 1712-1718.
89. Venkatesh S, Kumar M, Sharma A, et al. Oxidative stress and ATPase6 mutation is associated with primary ovarian insufficiency. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 2010; 3: 313-318.
90. Van Blerkom J. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. *Mitochondrion* 2011; 5: 797-813.
91. Novin MG, Allahveisi A, Noruzinia M, The relationship between transcript expression levels of nuclear encoded (TFAM, NRF1) and mitochondrial encoded (MT-CO1) genes in single human oocytes during oocyte maturation. *Balkan Journal of Medical Genetics* 2015; 1: 39-46.

92. Zhang GM, Deng MT, Lei ZH, et al. Effects of NRF1 on steroidogenesis and apoptosis in goat luteinized granulosa cells. *Reproduction* 2017; 2: 111-122.
93. Wang N, Luo LL, Xu JJ, et al. Obesity accelerates ovarian follicle development and follicle loss in rats. *Metabolism-Clinical and Experimental* 2014; 1: 94-103.
94. Boucret L, Chao de la Barca JM, Moriniere C, et al. Relationship between diminished ovarian reserve and mitochondrial biogenesis in cumulus cells. *Human Reproduction* 2015; 7: 1653-1664.
95. St-Pierre J, Drori S, Uldry M, et al. Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell* 2006; 127:397–408.
96. Roth Z. Physiology And Endocrinology Symposium: Cellular and molecular mechanisms of heat stress related to bovine ovarian function. *Journal of Animal Science* 2015; 5: 2034-2044.
97. Lin XW, Tang L, Yang J, et al. HIF-1 regulates insect lifespan extension by inhibiting c-Myc-TFAM signaling and mitochondrial biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 2016; 11: 2594-2603.
98. Zhang H, Gao P, Fukuda R, et al. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 2007; 5: 407-420.
99. Olichon A, Baricault L, Gas N, et al. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2003; 10: 7743-7746.
100. Romanello V, Sandri M. Mitochondrial biogenesis and fragmentation as regulators of muscle protein degradation. *Current Hypertension Reports* 2010; 6: 433-439.
101. Wang Q, Wu S, Zhu H, et al. Deletion of PRKAA triggers mitochondrial fission by inhibiting the autophagy-dependent degradation of DNM1L. *Autophagy* 2017; 2: 404-422.
102. Cherry AD, Piantadosi CA. Regulation of mitochondrial biogenesis and its intersection with inflammatory responses. *Antioxidants & Redox Signaling* 2015; 12: 965-976.
103. Miranda S1, Foncea R, Guerrero J, et al. Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 1: 44-9.
104. He M, Shu J, Huang X, et al. Association between estrogen receptor gene (ESR1) PvuII (T/C) and XbaI (A/G) polymorphisms and premature ovarian failure risk: evidence from a meta-analysis. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2015; 2: 297-304.
105. Zheng P, Dean J. Oocyte-specific genes affect folliculogenesis, fertilization, and early development. In *Seminars in Reproductive Medicine* 2007; 25: 243-251.
106. Pangas SA, Rajkovic A. Transcriptional regulation of early oogenesis: in search of masters. *Human Reproduction Update*. 2005; 1: 65-76.

107. Burns KH, Viveiros MM, Ren Y, et al. Roles of NPM2 in chromatin and nucleolar organization in oocytes and embryos. *Science* 2003; 5619: 633-636.
108. Canosa S, Adriaenssens T, Coucke W, et al. Zona pellucida gene mRNA expression in human oocytes is related to oocyte maturity, zona inner layer retardance and fertilization competence. *MHR: Basic Science of Reproductive Medicine* 2017; 5: 292-303.
109. Wang J, Wang B, Song J, et al. New candidate gene POU5F1 associated with premature ovarian failure in Chinese patients. *Reproductive Biomedicine* 2011; 3: 312-316.
110. Niwan H, Miyazaki JI, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics* 2000; 4: 372.
111. Meczekalski B. Oocyte-Specific Genes: Role in Fertility And Infertility. *Journal of Endocrinological Investigation* 2009; 5: 474-481.
112. Li Y, Zhang W, Liu J, et al. Prepubertal Bisphenol A Exposure Interferes With Ovarian Follicle Development And Its Relevant Gene Expression. *Reproductive Toxicology* 2014; 44: 33-40.
113. Scarano MI, Strazzullo M, Matarazzo MR, et al. DNA Methylation 40 Years Later: Its Role in Human Health and Disease. *Journal of Cellular Physiology* 2005; 1: 21-35.
114. Robertson KD. DNA Methylation and Human Disease. *Nature Reviews Genetics* 2005; 8: 597.
115. Liu CC, Fang TJ, Ou TT, et al. Global DNA methylation, DNMT1, and MBD2 in patients with rheumatoid arthritis. *Immunology Letters* 2011; 1-2: 96-99.
116. Uysal F, Akkoyunlu G, Ozturk S. Dynamic expression of DNA methyltransferases (DNMTs) in oocytes and early embryos. *Biochimie* 2015; 116: 103-113.
117. Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature Reviews Genetics* 2009; 1: 32.
118. Qu F, Wang FF, Yin R, et al. A Molecular Mechanism Underlying Ovarian Dysfunction of Polycystic Ovary Syndrome: Hyperandrogenism Induces Epigenetic Alterations in The Granulosa Cells. *Journal of Molecular Medicine* 2012; 8: 911-923.
119. Zhang J, Fang L, Lu Z, et al. Are sirtuins markers of ovarian aging. *Gene* 2016; 2: 680-686.
120. Pépin D, Paradis F, Perez-Iratxeta C, et al. The Imitation Switch Atpase Snf2l is Required For Superovulation and Regulates Fgl2 In Differentiating Mouse Granulosa Cells. *Biology of Reproduction* 2013; 6: 142-1.
121. Falender AE, Shimada M, Lo YK, et al. TAF4b, a TBP associated factor, is required for oocyte development and function. *Developmental Biology* 2005; 2: 405-419.
122. Liu M, Zhang X, Hu CF, et al. MicroRNA-mRNA functional pairs for cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Chinese Journal of Cancer* 2014; 6: 285.

- 123.Moriwaki M, Moore B, Mosbrugger T, et al. POLR2C Mutations Are Associated With Primary Ovarian Insufficiency in Women. *Journal of the Endocrine Society* 2017; 3: 162-173.
- 124.Acosta JJ, Mayer L, Talboom JS, et al. Transitional Versus Surgical Menopause in A Rodent Model: Etiology of Ovarian Hormone Loss Impacts Memory and The Acetylcholine System. *Endocrinology* 2009; 9: 4248-4259.



9. ÖZGEÇMİŞ

25.01.1994 tarihinde Elazığ'da doğdum. 2012 yılında Elazığ Kaya Karakaya Anadolu Lisesi'nden mezun olarak aynı yılın Eylül ayında Fırat Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomühendislik Bölümü'nde lisans öğrenimime başladım. 2016 yılında lisans eğitimimi tamamlayıp 2016 yılı güz döneminde Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım. 2018 yılında Milli Eğitim Bakanlığı YLSY programında bursiyer olmaya hak kazandım ve program dahilinde öğrenim hayatıma devam etmekteyim.