



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**SİKLOFOSFAMİD İLE İNDÜKLENEN SIÇAN
PREMATÜRE OVARYAN YETMEZLİK MODELİNDE
DENTAL PULPA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN ETKİSİ**

Münevver KAHRAMAN

Denizli, 2022

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**SİKLOFOSFAMİD İLE İNDÜKLENEN SIÇAN
PREMATÜRE OVARYAN YETMEZLİK MODELİNDE DENTAL
PULPA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK
HÜCRELERİN ETKİSİ**

**KÖK HÜCRE ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Münevver KAHRAMAN

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Nazlı ÇİL

Denizli, 2022

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Adı Soyadı: Münevver KAHRAMAN

İmza:

ÖZET

SİKLOFOSFAMİD İLE İNDÜKLENEN SIÇAN PREMATÜRE OVARYAN YETMEZLİK MODELİNDE DENTAL PULPA KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN ETKİSİ

Münevver KAHRAMAN
Yüksek Lisans Tezi, Kök Hücre AD
Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Nazlı ÇİL

Prematüre over yetmezliği (POY), kadınlarda 40 yaşından önce, amenore, hipergonadotropik serum seviyesi, hipoöstrojenizm ve graaffolikül eksikliği gibi semptomlarla kendini göstermektedir. Kök hücreler, POY tedavisinde yeni bir terapötik ajan olarak ilgi çekmektedir. Dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücreler (DP-MSK) elde edilmesi diğer kök hücre kaynaklarına göre non-invazivdir ve etik kaygılar barındırmaz. Çalışmada amacımız, siklofosfamid (CTX) ile indüklenen POY hayvan modelinde DP-MSK'lerin ovaryum dokusunda etkisini değerlendirmek ve Wnt/ β -katenin yolağı üzerinde görmektir.

Otuz iki adet Wistar Albino erişkin dişi sıçan rastgele olarak 4 gruba ayrıldı. Kontrol Grubu (K)'na hiçbir işlem uygulanmazken, Sham Grubuna (S) intraperitoneal olarak 14 gün boyunca serum fizyolojik uygulandı. POY Grubunda (POY) ilk gün 200mg/kg CTX ve devam eden 14 gün boyunca 8 mg/kg CTX intraperitoneal olarak uygulanarak POY oluşturuldu. MSC Grubuna (MSC) ise POY modeli oluşturulmasını takiben sıçan başına 2×10^6 olarak insan kaynaklı DP-MSK overe lokal olarak uygulandı. FSH, LH ve AMH seviyeleri ELİZA yöntemiyle belirlendi. Ovaryuma histopatolojik analizler yapıldı.

POY grubunda FSH değeri Sham grubuna istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Primordial, primer, sekonder ve tersiyer folikül sayımına göre MSC grubunda POY grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır. Wnt-1 ekspresyonu POY dışında tüm gruplarda primordial foliküllerde kuvvetli ekspresyon göstermiştir. Wnt-4 ekspresyonu kontrol, sham ve MSC grubunda pozitif izlenirken POY grubunda reaksiyonun negatif olduğu bulunmuştur.

Sonuç olarak İnsan DP-MSK'leri ovaryumda folikül sayısını korumuş ve ovaryum fonksiyonlarını Wnt/ β -katenin sinyal yolu üzerinden düzenlemiştir. Bizim çalışmamız DP-MSK'lerin POY hastalarında over yapısının ve işlevlerinin korunduğunu gösteren ilk çalışmadır. Bununla birlikte bu deneysel çalışmanın devamı olarak deneysel ve klinik çalışmalarla gebelik geliştirme potansiyellerine bakmak çalışmanın etkinliğini arttıracaktır.

Anahtar Kelimeler: Siklofosfamid, Premature Over Yetmezliği, Kök Hücre, Wnt-Beta Katenin Yolağı.

Bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından (Proje no: 2021SABE023) desteklenmiştir.

ABSTRACT

THE EFFECT OF HUMAN DENTAL PULP MESENCHYMAL STEM CELLS IN CYCLOPHOSPHAMIDE-INDUCED PREMATURE OVARIAN FAILURE RAT MODEL

Münevver KAHRAMAN
M. Sc. Thesis in Stem Cell
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nazlı ÇİL

Premature ovarian failure (POF) presents itself with symptoms such as amenorrhea, hypergonadotropic serum level, hypoestrogenism, and graaffollicular deficiency in women before the age of 40. Stem cells are of interest as a new therapeutic agent in the treatment of POF. Obtaining dental pulp-derived mesenchymal stem cells (DPMSC) is non-invasive compared to other stem cell sources and does not have ethical concerns. Our aim in the study is to evaluate the effect of DPMSCs in the ovarian tissue in the animal model of cyclophosphamide (CTX)-induced POF and to see it through the Wnt/ β -catenin pathway.

Thirty two Wistar Albino adult female rats were randomly divided into 4 groups. Control Group (K), Sham Group (S) were administered saline intraperitoneally for 14 days. In the POY Group (POY), POY was created by intraperitoneally administering 200mg/kg CTX on the first day and 8mg/kg CTX for the next 14 days. In the MSC Group (MSC), after the POY model was established, 2×10^6 human DPMSC was applied locally to the ovary per rat. FSH, LH and AMH levels were determined by ELISA method. Histopathological analyzes of the ovary were performed.

FSH value was statistically higher in the POY group than in the Sham group. Primordial, primary, secondary and tertiary follicle counts were found to be significantly higher in the MSC group than in the POY group. Wnt-1 expression showed strong expression in primordial follicles in all groups except POY. Wnt-4 expression was positive in the control, sham and MSC groups, while the reaction was negative in the POY group.

As a result, Human DPMSCs preserved the number of follicles in the ovary and regulated ovarian functions via the Wnt/ β -catenin signal pathway. Our study is the first to show that ovarian structure and functions are preserved in POF patients with DPMSCs. However, as a continuation of this experimental study, looking at pregnancy development potentials with experimental and clinical studies will increase the effectiveness of the study.

Keywords: Cyclophosphamide, Premature Ovarian Failure, Stem Cells, Wnt/Beta-Catenin Pathway.

This study was supported by Pamukkale University Scientific Research Projects Fund (Project no: 2021SABE023).

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca ve tezimin her aşamasında değerli tecrübeleri ile destek olan tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Nazlı ÇİL hocama sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam süresince yardımını esirgemeyen ve değerli yorumlarıyla tezime katkı sağlayan Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı ve Öğretim Üyesi Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE'ye saygı ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca cerrahi aşamada yardımcı olan veteriner hekim BARBAROS ŞAHİN'e ve kadın doğum hocalarım ve asistan doktorlarına teşekkür ederim.

Pamukkale Üniversitesi bünyesinde tanışma fırsatı bulduğum değerli araştırma görevlisi ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma destekleri için teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde büyük katkısı olan canım aileme ve her zaman başaracağıma inanan sevgili eşime teşekkürlerimi sunarım.

Münevver KAHRAMAN

Denizli, 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
TABLolar DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1.Amaç.....	3
2. KURUMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	4
2.1. Ovaryum Embriyolojisi	4
2.2. Ovaryum Histolojisi	5
2.3. Oositin Genel Yapısı	6
2.4. Ovaryum Folikülleri ve Foliküler Gelişim.....	6
2.4.1. Primordial Foliküller.....	8
2.4.2. Primer Foliküller	8
2.4.3. Sekonder Foliküller.....	9
2.4.4. Olgun (Graaf) Folikül	10
2.5. Ovulasyon	11
2.6. Korpus Luteum (Sarı Cisim).....	12
2.7. Menstrual Döngü	12
2.8. Ovaryum Fizyolojisi.....	13
2.9. Prematüre Ovaryan Yetmezlik	14
2.9.1. Premature Over Yetersizliği Etiyolojisi	14
2.9.2. Premature Over Yetmezliğinde Tedavi Stratejileri	17
2.10. Kök Hücreler	19
2.10.1. Kökenine Göre Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	21
2.11. WNT Sinyal Yolağı.....	26
2.11.1. Kanonik (β -katenin bağımlı) Wnt Sinyal İletimi.....	27
2.11.2. Kanonik Olmayan Wnt Sinyal İletimi	29
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	31
3.1. Deney Hayvanları ve Premature Over Yetmezliğinin Oluşturulması	31
3.2. İnsan Kaynaklı DP-MSC'lerin Çözülmesi ve Hücre Kültürü	31

3.3. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu	32
3.4. POY Hayvan Modeline DP-MSC Uygulanması	32
3.5. Ovaryum Örneklerinin Alınışı	34
3.6. ELİSA Yöntemi	34
3.6.1. AMH Ölçümü	35
3.6.2. FSH Ölçümü	36
3.6.3. LH Ölçümü	37
3.7. Histolojik Teknikler	38
3.7.1. Fiksasyon	38
3.7.2. Doku Takip Yöntemi	38
3.7.3. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi	39
3.7.4. Folikül Sayımı Yöntemi	40
3.7.5. İmmünohistokimyasal Boyama Yöntemi	41
3.8. İstatistiksel Analiz	43
4. BULGULAR	44
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu	44
4.2. Hayvan Ağırlıkları Bulguları	45
4.3. Serum AMH, FSH ve LH Ölçümleri	47
4.4. Folikül Sayımı Bulguları	48
4.5. Mikroskopik Bulgular	51
4.5.1. Kontrol Grubu	51
4.5.2. Sham Grubu	53
4.5.3. POY Grubu	54
4.5.4. MSC Grubu	56
4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular	58
4.6.1. Wnt-1 Belirtecinin İmmünohistokimyasal Bulguları	58
4.6.2. Wnt-4 Belirtecinin İmmünohistokimyasal Bulguları	59
4.6.3. β -katenin Belirtecinin İmmünohistokimyasal Bulguları	61
5. TARTIŞMA	63
6. SONUÇ	72
7. KAYNAKÇA	73
EKLER	86

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.2.1. Ovaryumun kortikal bölge ve medular bölgesini gösteren fotomikrograf.....	5
Şekil 2.4.1. Foliküllerin farklı gelişim evrelerindeki kesit görüntüsü	7
Şekil 2.4.1.1. Primordial folikül ve primer folikül	8
Şekil 2.4.3.1. Over kesitinde bulunan sekonder folikül.....	10
Şekil 2.4.4.1. Ovaryum korteksinde bulunan graaf folikül	11
Şekil 2.7.1. Mensteruel Siklus Boyunca Meydana Gelen Değişiklikler.....	13
Şekil 2.10.1.2.2.1.1. Dental kök hücreler.....	26
Şekil 2.11.1.1.1. Kanonik (β -katenin bağımlı) Sinyal Yolağının İnaktif Formu	28
Şekil 2.11.1.2.1. Kanonik (β -katenin bağımlı) Sinyal Yolağının Aktif Formu	29
Şekil 3.4.1. Uygulama Öncesi Hazırlık.....	33
Şekil 3.4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Ovaryum İçine Enjeksiyonu.....	33
Şekil 3.5.1. Ovaryum örneklerinin in vivo alınışı.....	34
Şekil 4.1.1. İnsan DP-MSK'lerin Flow Sitometri Bulguları.....	44
Şekil 4.1.2. İnsan DP-MSK'lerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik dokulara farklılaşması.....	45
Şekil 4.2.1. Gruplara ait deney başlangıç ağırlıkları ve deney bitiş ağırlıklarının karşılaştırılması.....	46
Şekil 4.3.1. Deney gruplarına ait serum AMH, FSH ve LH düzeylerinin karşılaştırılması.....	47
Şekil 4.4.1. Deney gruplarına ait primordial, primer, sekonder, tersiyer, atretik, korpus luteum ve kistik folikül sayısının karşılaştırması.....	51
Şekil 4.5.1.1. Kontrol grubuna ait over kesiti.....	52
Şekil 4.5.2.1. Sham grubuna ait over kesiti.....	53
Şekil 4.5.2.2. Sham grubuna ait over kesiti.....	54
Şekil 4.5.3.1. POY grubuna ait over kesiti.....	55
Şekil 4.5.3.2. POY grubuna ait over kesiti.....	55
Şekil 4.5.4.1. MSC grubuna ait over kesiti.....	57
Şekil 4.6.1.1. Gruplardaki ovaryum dokusunda Wnt-1 ekspresyonu.....	58
Şekil 4.6.2.1. Gruplardaki ovaryum dokusunda Wnt-4 ekspresyonu.....	60
Şekil 4.6.3.1. Gruplardaki ovaryum dokusunda β -katenin ekspresyonu.....	61

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.9.1.1. Premature over yetmezliğinin nedenlerine göre sınıflandırılması.....	15
Tablo 3.6.1.1. Doku Takibi Basamakları ve Yapılan İşlemler.....	38
Tablo 3.7.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi Basamakları ve Yapılan İşlemler.....	39
Tablo 3.7.4.1. Foliküllerin sınıflandırılmasında kullanılan kriterler	41
Tablo 4.2.1. Gruplara ait deney başlangıç ağırlıkları, deney sonundaki vücut ağırlıkları ve vücut ağırlığı değişikliklerinin karşılaştırılması.....	46
Tablo 4.3.1. Deney gruplarına ait serum AMH, FSH ve LH düzeylerinin karşılaştırılması.....	47
Tablo 4.4.1. Deney gruplarına ait primordial, primer, sekonder, tersiyer, atretik, korpus luteum ve kistik folikül sayılarının karşılaştırılması.....	50
Tablo 4.6.1.1. Wnt-1'in folikül oosit ve granüloza hücrelerinde gruplararası dağılımı.....	59
Tablo 4.6.2.1. Wnt-4'in folikül oosit ve granüloza hücrelerinde gruplararası dağılımı.....	60
Tablo 4.6.3.1. β -katenin'in folikül oosit ve granüloza hücrelerinde gruplararası dağılımı.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C: Santigrat derece

µl: Mikrolitre

AMH: Anti müllerian hormon

Bu: Busulfan

CTX: Siklofosamid

DHEA: Dehidroepiandrosteron

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

E2: Östrojen

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay

ESHRE: Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Topluluğu

FBS: Fetal Bovine Serum

FSH: Folikül stimule edici hormon

Fz: Frizzled

GnRH: Gonadotropin salgılatıcı hormon

H&E: Hematoksilen-Eozin Boyama

HKH: Hematopoetik kök hücre

HRT: Hormon replasman tedavisi

ISCT, UHTD: Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği

IVF: İn vitro fertilizasyon

Kİ-MSK: Kemik iliği mezenkimal kök hücresi

LH: Luteinize edici hormon

MSC: Mezenkimal kök hücre

ml: Mililitre

PBS: Fosfatla tamponlanmış tuz çözeltisi

POY: Prematüre over yetmezliği

SSPS: Sosyal bilimler için istatistik paketi

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

µl: Mikrolitre

1. GİRİŞ

Prematüre over yetmezliği (POY), ovaryum primordial folikül havuzunun erken tükenmesine bağlı olarak görülen, kısırlığın en yaygın sebeplerinden biridir (Wesevich V, 2020). POY, kadınlarda 40 yaşından önce, en az dört aylık amenore öyküsü, hipergonadotropik serum profil seviyesi, düşük östrojen seviyesi, matür folikül eksikliği gibi semptomlarla kendini gösterir (Hoffman BL, 2016). Avrupa İnsan Üreme ve Embriyoloji Topluluğu (ESHRE), prematüre over yetmezliğini; en az 4 ay oligo/amenore ve yüksek Folikül stimule edici hormon (FSH) düzeyinin 4 haftadan fazla aralıklarla >25IU/l görülmesi olarak tanımlamaktadır (2016). Klinik muayenede; hipoöstrojenizm, hipergonadotropizm, gelişen foliküllerin eksikliği ve kısmi foliküler olgunlaşma gibi prematüre ovarian yetmezliğin klasik semptomları görülmektedir. Over dokusunun histopatolojik incelemelerinde önemli ölçüde atrofi ve fibrozis, belirgin foliküler atrezi ve normal foliküler evrelerin (primordial folikül, antral folikül, kumulus ooforus ve matür oosit içeren) yokluğu bulunmaktadır (Liu T, 2016).

POY'in nedenleri genetik, otoimmünite, kemoterapi hasarı gibi birçok karmaşık faktörle ilişkilidir. Bunun yanında POY, idiyopatik olarak da ortaya çıkabilir. Şu anda, POY'in önlenmesi ve tedavisi son derece sınırlıdır. En yaygın olarak kullanılan hormon replasman tedavisi, over fonksiyonunu etkili bir şekilde iyileştirmede yetersizdir. Bu sebeple, POY tedavisi için yeni ve etkili terapötiklere ihtiyaç artmıştır (Fu YX, 2021).

Kök hücreler, kendileri ile benzer hücreler üretebilme kabiliyetine ve çeşitli spesifik somatik hücrelere farklılaşma potansiyeline sahip farklılaşmamış hücreler olarak bilinmektedir. Mezenkimal kök hücreler (MSC'ler), proliferatif kabiliyetine, kendini yenileme ve farklılaşma potansiyeline sahiptir (Spangrude GJ, 2003). Bu hücreler kemik iliği, diş pulpası, kas, sinir, karaciğer, deri olmak üzere insan vücudunun çeşitli yerlerinde elde edilebilir. Bu hücreler, osteoblast, kondroblast, adiposit ve nöron benzeri hücreler gibi diğer hücrelere farklılaşma potansiyeline sahiptir (Shyu WC, 2004). İn vitro çalışmalar, MSC'ler de dahil olmak üzere farklı tipte kök hücrelerin diş germ hücrelerine farklılaşabileceğini göstermiştir (Danner S, 2007). Bu nedenle, prematüre over yetmezliği doğrudan hücre tedavisi için MSC'lerin uygulanması gelecekte önemli bir seçenektir. Özellikle, MSC'lerin in vitro diş germ hücrelerine farklılaşma potansiyeline sahip oldukları gösterilmiştir (Lorzadeh N, 2018). Ek olarak

yapılan deneysel hayvan modellerinde bu hücrelerin tedavi edici etkileri gösterilmiştir (Shyu WC, 2004).

Kök hücreler için yeni bir kaynak olan dental dokular, fibroblast benzeri yapı, mezenkimal kök hücrelere özgü yüzey antijenlerinin ekspresyonu, rejenerasyon yeteneği, farklılaşma kapasitesi ve immünomodülatör özellikler gibi mezenkimal kök hücre özelliklerini sağlamaktadır (Aydın S, 2019). Dental pulpa mezenkimal kök hücreleri (DP-MSC'ler), dental folikül progenitör hücreler (DFPC'ler), apikal papilla (SCAP) kök hücreleri, diş germ kök hücreleri (TGSC'ler), periodontal bağ kök hücreleri (PDLSC'ler), diş dokularından ve ayrıca dökülen süt dişlerinden (SHED) elde edilen kök hücrelerdir. Dental kök hücreler, Stro-1, CD146, CD106, CD90, CD73 CD29 ve CD13 gibi mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese eder. Ancak CD11b, CD45 ve CD34 gibi hematopoietik kök hücre belirteçlerini eksprese etmezler (Aydın S, 2019). DP-MSC'ler, diğer kök hücrelerden, kemik iliği kök hücresi (Kİ-KH) ve adiposit kaynaklı kök hücrelerden daha fazla proliferasyon sergiler. Hücre sel büyüme eğrisinin analizi, DP-MSC'lerin 3 ila 5 gün arasında log fazında kaldığını ve Kİ-MSC'lerin 10 günlük bir süre boyunca DPSC'lerden daha uzun bir nüfusu ikiye katlama süresine sahip olduğunu göstermektedir. Yapılan BrdU hücre proliferasyonu tahlilinde DP-MSC'lerin Kİ-MSC'lerden daha yüksek proliferasyon yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Tsutsui TW, 2020).

DP-MSC'ler üzerine araştırma alanı büyük bir potansiyele sahiptir. Hücreler iyi farklılaşma potansiyeli ve kültürlenmesi kolay özelliklere sahip olmakla birlikte aynı zamanda atılan çekilmiş dişlerden de uygun bir şekilde elde edilebilirler. Kİ-MSC'lerle karşılaştırıldığında, çekilmiş dişlerden DP-MSC'lerin elde edilmesi daha az invaziv ve daha uygulanabilir (Shi X, 2020). DP-MSC'ler, kök hücrelerin son teknoloji araştırma alanında ve rejeneratif tıp uygulamalarının geliştirilmesinde umut verici bir hücre popülasyonu sağlamaktadır (Tsutsui TW, 2020). Yakın zamanda yapılan çalışmalarda, insan dental pulpa dokusundan elde edilen mezenkimal hücrelerin, hastalık modellerinde (böbrek, akciğer, beyin, omurilik, karaciğer, kas, kemik, deri, pankreas, göz ve bağışıklık sistemi) nakledildiğinde olumlu sonuçlar göstermiştir (Shi X, 2020).

Wnt sinyalleri embriyo gelişiminin, erişkin dokuların oluşumunun ve bu dokuların homeostazının sağlanmasına ek olarak hücre polaritesi, migrasyonu ve proliferasyonu dahil birçok hücre sel fonksiyonların düzenlenmesinde rol oynamaktadır. Yolaktaki aksaklıklar doku boyutunun, düzenlenmesinin ve fonksiyonunun anormal olarak değişmesine neden olmaktadır. Hücre içi sinyal transdüksiyonu, β -katenin bağımlı

(kanonik yol) veya β -katenin bağımsız (kanonik olmayan yol) olarak ayrılmaktadır (Castagnoli L, 2020).

Yapılan bir çalışmada, Wnt yolağının ovaryumda normal işleyiş için temel bir öneme sahip olduğunu ve çok çeşitli fizyolojik süreçleri etkileyebileceğini göstermiştir. Wnt-1'in, Wnt/ β -katenin yolağı aracılığıyla in vitro olarak granüloza hücre proliferasyonunu pozitif olarak düzenlediği gösterilmiştir (Castagnoli L, 2020). Yapılan başka bir çalışmada Wnt/ β -katenin yolunun dişi üreme sisteminin büyümesi ve gelişmesi için gerekli olduğunu göstermektedir. Wnt-4'ten yoksun farelerin zayıf over gelişimine ve daha az sağlıklı foliküllere sahip olduğunu bulunmuştur (Naillat F, 2015). Wnt/ β -katenin yolu, FSH ve luteinize edici hormon (LH) tarafından overde steroid kontrolünün üretiminde önemli ölçüde yer almaktadır (Parakh TN, 2006). Ovaryumdaki Wnt/ β -katenin sinyal yolunun mekanizmaları son yıllarda giderek odak noktası haline gelmektedir.

1.1.Amaç

Yapılan son çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin prematür ovaryan yetmezlikte ovaryum dokusunu ve folikülleri iyileştirdiği bildirilmiştir. Bizim bu çalışmada amacımız CTX ile indüklenen premature over yetmezliği hayvan modelinde dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin ovaryum dokusunda etkisini değerlendirmek ve Wnt/ β -katenin yolağı üzerinde görmektir. Ulaşılması amaçlanan bilgiler ışığında ise prematüre over yetmezliğinde alternatif tedavilerin geliştirilebilmesine katkı sağlaması amaçlanmıştır.

2. KURUMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Ovaryum Embriyolojisi

Embriyonun genetik ve kromozomal cinsiyeti, genetik olarak döllenme sırasında belirlenmesine rağmen gelişimin 7. Haftasına kadar gonadlar, erkek ya da dişi morfolojik özelliklerine sahip değildir. Genital sistemin yapısının her iki cinste de aynı olduğu bu erken dönem farklanmamış evre olarak adlandırılmaktadır.

Gonadlar sölom boşluğunun arka duvarında, genital (gonadal) kabartıların içinde gelişmeye başlarlar. 5. Haftada gonadların üzerini örten dorsal sölom epiteli hücreleri, altındaki mezenşime parmak biçiminde girerek destek hücreleri olan primitif seks kordonlarını oluştururlar. Organın, hücre kordonlarının yer aldığı dış kısmı korteks, iç kısmı ise medulla olarak adlandırılır. Altıncı haftadan sonra medulla ve korteks dişi ve erkekte farklı biçimde gelişmektedir. XX kromozom kompleksi taşıyan embriyolarda gonadın korteks kısmı ileri gelişmeye uğrayıp ovaryumu oluştururken, medulla kısmı ise geriler.

Primordial germ hücreleri 4. haftanın başlarında allantoisin başlangıç yerine yakın endodermal hücreler arasında ortaya çıkarlar. Bu bölge embriyonun katlanıp ilkel bağırsağın oluşması sırasında gövde içinde kalır. Bu sırada primordial germ hücreleri arka bağırsağın dorsal mezenteriy boyunca göç ederek 6. haftada gelişmekte olan gonadal kordonlara dâhil olurlar (Yürüker S., 2006).

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaş seyir etmektedir. Ovaryum yapısı histolojik olarak 10. hafta dolaylarında ayırt edilebilmektedir. Dişide X kromozomunun ovaryumun gelişmesi için genler içermektedir. İlkel seks kordonları ovaryumun medullasına kadar uzanırlar ve rete ovarii'yi oluştururlar. Primordial germ hücrelerinin de içlerinde bulunduğu rete ovarii daha sonra dejenere olarak ortadan kalkar ve yerlerini ovaryum medullasını oluşturan damarlı stromaya bırakırlar (Moore KL, 2002).

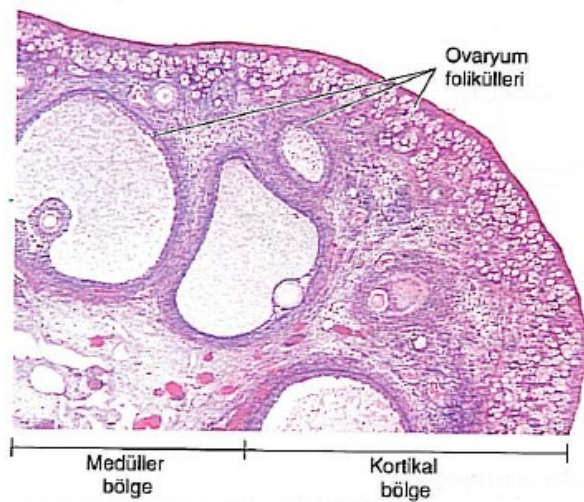
Erken fetal dönemde gonadın yüzeyini örten epitel çoğalarak kortikal kordonları oluşturur. Primordial germ hücreleri bu kordonların içine karışırlar. Yaklaşık 16. Haftada kortikal kordonlar primordial folikül denilen ayrı hücre gruplarına bölünürler. Her bir hücre grubu ortasında bir oogonyum ile onu çevreleyen tek sıra yassı epitel hücrelerinden oluşur. Fetal dönemde milyonlarca oogonyum sık mitozla bölünerek

çoğalır ve primordial foliküller oluşur. Postnatal dönemde oogonyumların mitozu durur ve yeni primordial folikül oluşmaz (Yürüker S, 2006). Doğumdan sonra germinal epitel düzleşir ve ovaryumun hillusunda periton mezoteli ile devam eder. (Moore KL, 2002).

2.2. Ovaryum Histolojisi

İnsanlarda ovaryumlar a. iliaca interna ile a. iliaca externa arasında bulunan, pelvis yan duvarındaki fossa ovaricaya yerleşmiştir. Puberteye kadar bütünüyle periton ile örtülüdürler, puberteyle birlikte peritoneum vasfını kaybeder ve dışarı atılan olgun ovum hücreleri nedeniyle delikli bir hal almaktadır (Karakoç L. ve ark., 2019).

Ovaryumlar, yaklaşık 3 cm uzunluk, 1,5 cm genişlik ve 1 cm kalınlığında badem şeklinde yapılardır. Yüzeyleri tek katlı yassı epitel ya da kübik epitel (germinal epitel) ile kaplıdır. Germinal epitelin altında, ovaryumun beyazımsı rengini veren ve tunika albuginea olarak adlandırılan bağ dokusu katmanı yer almaktadır. Tunika albugineanın altında oositleri içeren ovaryum foliküllerinin bulunduğu korteks yer almaktadır. Foliküller, kortikal bölgenin stroması içine gömülüdür. Ovaryumun en iç kısmı olan medulla bölgesi gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren yapıdır. Korteks kısmı medullayı çevreleyerek ovaryumun periferik bölgesinde yer almaktadır. Korteks, selüler bağ dokusu içine gömülü ovaryum foliküllerini içermektedir. Ovaryum bölümleri histolojik olarak birbirinden farklılık göstermekle birlikte korteks ve medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır bulunmamaktadır (Junqueira L. ve ark., 2003).



Şekil 2.2.1. Ovaryumun kortikal bölge ve medular bölgesini gösteren fotomikrograf. H&E boyama (Junqueira L. ve ark., 2003).

Ovaryum korteksi organın dış ve işlevsel bölümüdür. Çeşitli gelişim aşamasındaki folikülleri ve korpus luteumu içermektedir. Puberteden önce kortekste primordial foliküller bulunurken puberteden sonra primer, sekonder ve antral foliküller bulunur. Seksüel olgunluk döneminde bu foliküllere ek olarak korpus luteum ve atretik foliküller bulunur. Menopoz döneminde ise folikül sayıları oldukça azalır. Korteks stromasında kollajen, elastik lifler ve lif ağları ve stroma hücreleri bulunur. Stroma hücreleri fibroblastlardan farklı olarak teka interna hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir (Kierszenbaum A.L ve ark 2006).

Ovaryum medullası kan, lenf damarları ve sinir ağlarından zengin olan açık renkli iç bölgedir. Medulla oksidasyon enzimlerini ve diğer enzimleri içeren hücreler bulunur; bunların sayıları yaşla birlikte artar, menopozda ise %80 oranında bulunurlar (Junqueira L. ve ark., 2003).

2.3. Oositin Genel Yapısı

Foliküler gelişimin erken aşaması olan oositler; büyük, eksentrik yerleşimli, çekirdekçiği belirgin ve yaygın kromatin içeren veziküler tipte çekirdeğe sahiptir. Birinci mayoz bölünmenin profaz aşamasındaki oositin germinal vezikül (GV) adı verilen büyük çekirdeği ışık mikroskopunda net olarak seçilebilmektedir (Inoue A. ve ark. 2007). Oosit golgi aygıtı ve çok sayıda mitokondri ile çevrelenmiştir. Perinükleolar yerleşimli olarak, merkezde golgi aygıtı ve çevresinde mitokondriler dışında endoplazmik retikulum, lizozomlar ve granülofibriler yapıların da içinde bulunduğu bir organel topluluğu bulunmaktadır (Moore K ve ark. 2002). Enerji ihtiyacını karşılamak için, glikojen granülleri, lipid damlacıkları ve fibröz yapıları içeren sitoplazmik inklüzyonlar ooplazmada dağılmış şekilde bulunmaktadır (Niimura S ve ark. 2004).

2.4. Ovaryum Folikülleri ve Foliküler Gelişim

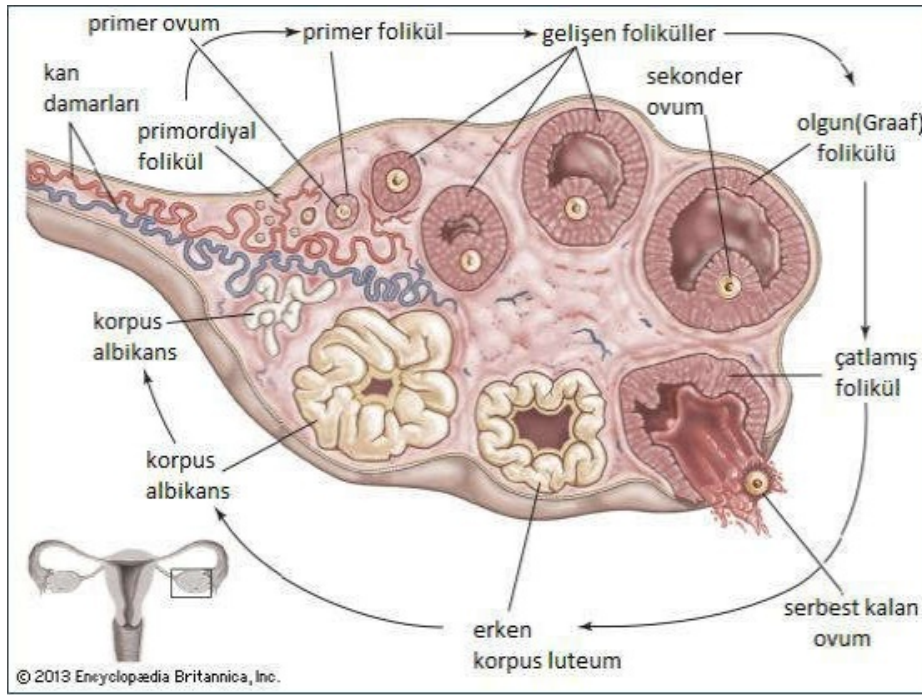
Ovaryum folikülü, bir ya da daha fazla folikül hücresi ya da granüloza hücresi katmanıyla çevrili olarak bir oosit içerir. Fetal yaşam sırasında oluşan foliküller (primordial foliküller) ise tek sıralı yassı folikül hücreleriyle çevrili olarak bir primer oosit içerir. Bu foliküller kortikal bölgenin en üst katmanında yer almaktadır. Primordial folikülün içindeki oosit yaklaşık olarak 25 µm çapında, küre şeklinde bir hücredir. Büyük bir nükleusu ve büyük bir nükleolusu bulunmaktadır. Bu hücreler, mayoz bölünmenin birinci profaz evresinde yer almaktadır. Sitoplazma içerisinde bulunan organeller nükleusa yakın olarak küme oluşturma eğilimi gösterirler. Sitoplazmada çok sayıda

mitokondri, birkaç Golgi kompleksi ve endoplazmik retikulum sarnıçları yer almaktadır (Junqueira L. ve ark., 2003).

Folikül gelişiminde ilk farklanma; primordial folikülün primer foliküle farklılaştığı aşamadır. Folikül gelişirken oositte, foliküler hücrelerde ve komşu stromada değişiklikler olmaktadır. Foliküler hücreler ilk olarak yassı hücreden kübik hücreye dönüşür (Eşrefoğlu M, 2004). Oosit ve çevresindeki foliküler hücreler arasında homojen, oldukça koyu boyanan, asidofilik ve kesintisiz bir tabaka olan zona pelusida bulunur (Moore K ve ark. 2002).

Oogenezin erken aşamaları fetal hayatta gerçekleşmektedir. Bu dönemde çok sayıda mitotik bölünme sayesinde oogonyumların sayısı artmaktadır. Doğumda mevcut halde olan oositler gelişimin birinci mayotik bölünmesinde arreste uğramaktadır. Puberte döneminden itibaren küçük bir primordial folikül grubunda, foliküler büyüme olarak adlandırılan süreç başlar (Ross ve Pawlina 2011).

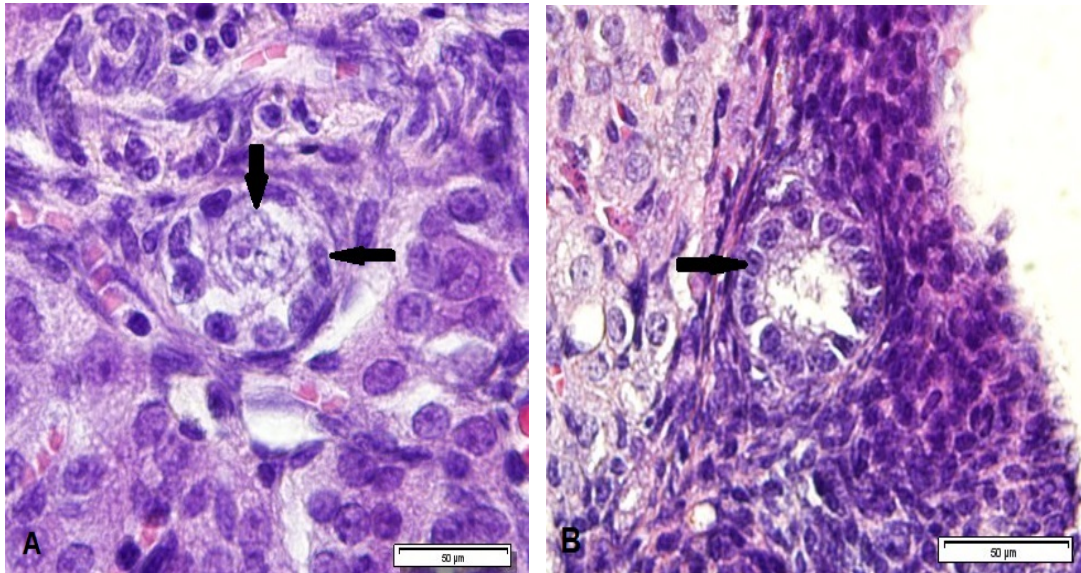
Gelişim evrelerine göre histolojik olarak 3 tip ovaryum folikülü tanımlanmıştır: primordial foliküller, gelişmekte olan foliküller (primer ve sekonder folikül olarak alt gruplara ayrılır) ve olgun (graaf) folikülleri olarak adlandırılmaktadır (Ross ve Pawlina 2011).



Şekil 2.4.1. Foliküllerin farklı gelişim evrelerindeki kesit görüntüsü (Britannica E,2013).

2.4.1. Primordial Foliküller

Foliküler gelişimin en erken aşaması olup, primordial foliküller ilk olarak fetal gelişimin üçüncü ayında ortaya çıkmaktadır. Primordial foliküllerin erken gelişim aşamaları gonadotropin uyarımından bağımsızdır (Ross ve Pawlina 2011). Primer oosit ve onu çevreleyen yassı tek tabakalı foliküler hücrelerden oluşmaktadır (Gartner ve Hiatt 2007) (**Şekil 2.4.1.1**). Folikül hücrelerin dış yüzeyi bazal lamina ile sınırlanmış olarak bulunur. Folikülün iç kısmında bulunan oosit 30 µm çapında ve iyi biçimde sağılmış kromatin ve nükleolus içeren çekirdeğe sahiptir. Ooplazma olarak adlandırılan oosit sitoplazması Balbiani cisimciği içermektedir. Balbiani cisimciği, golgi membranları ve vezikülleri, endoplazmik retikulum, birçok mitokondriyum ve lizozomlardan meydana gelmektedir (Ross ve Pawlina 2011).



Şekil 2.4.1.1. Primordial folikül ve primer folikül A: Primordial folikül, yassı granüloza hücre tabakası (←), oosit (↓), B: Primer folikül, kübik granüloza hücre tabakası (→), H&E, Bar 50µm.

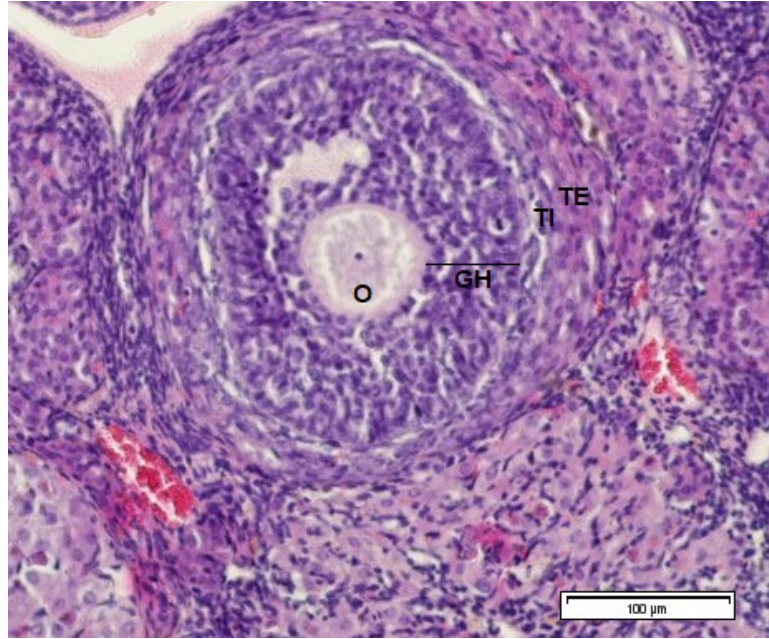
2.4.2. Primer Foliküller

Puberteden itibaren bazı foliküller büyüme evresine girerler. Bir primordial folikül, büyümekte olan folikül haline gelirken oositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler meydana gelmektedir. İlk olarak oosit büyür ve etrafını saran yassı folikül hücreleri kübik şekil alır (**Şekil 2.4.1.1**). Folikül hücrelerinin kübik bir hal aldığı bu evrede folikül, primer folikül olarak tanımlanmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011). Primer oositin çapı büyümüş nükleusu ile birlikte 100-150 µm çapa ulaşır (Gartner ve Hiatt 2007). Oosit büyürken spesifik proteinler salgılamaktadır ve bu proteinler bir araya

gelerek ekstraselüler bir kılıf olan zona pellusidayı oluşturmaktadır. Hızlı bir mitotik çoğalma ile oositin etrafında bulunan tek tabakalı folikül hücreleri membrana granülozayı (stratum granülozum) oluştururlar (Ross ve Pawlina, 2011).

2.4.3. Sekonder Foliküller

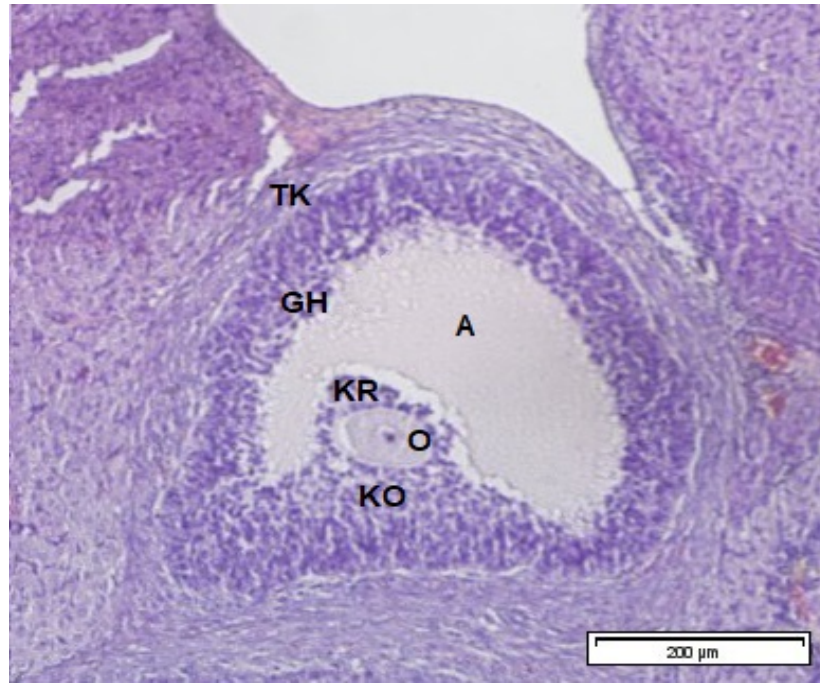
Sekonder foliküller sıvı içeren antrum ile karakterizedir. Oosit ve folikül gelişiminde FSH, büyüme faktörleri ve kalsiyum iyonları (Ca^{+2}) gibi çeşitli faktörler gerekmektedir (Ross ve Pawlina, 2011). Folikül epiteli ve çevresinde bulunan stroma, foliküllerin olgunlaşması ile bağlantılı olarak hem hiperplaziye hem de hipertrofiye uğrar. Bu komponentler solid, multilaminar özellikte olan sekonder folikülü oluşturur. Folikülde bulunan granüloza hücreleri mitoz ile çok katlı bir duruma gelmektedir. Granuloza hücrelerinin oluşturdukları bu çok katlı epitelyum, stratum granulozum olarak adlandırılmaktadır. Bu tip foliküllere ayrıca multilaminar primer folikül de denilmektedir (Junqueira 2003, Sternberg SS. 1997). Granüloza hücrelerinin arasında bulunan likör folikülü biriktikçe kavite birleşir ve antrum adı verilen hilal biçiminde tek bir kavite oluşur. Folikül artık sekonder folikül veya antral folikül olarak tanımlanır. 125 µm çapa sahip oosit daha fazla büyümmez. Büyüme inhibisyonu, granüloza hücreleri tarafından antral sıvı içerisine salgılanan 1-2 kilodalton ağırlığındaki bir peptid olan oosit maturasyon inhibitörü (OMI) tarafından gerçekleştirilmektedir. Oosit maturasyon inhibitörünün konsantrasyonu, küçük foliküllerde olgun foliküllere göre daha yüksek miktarda bulunmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011). Sekonder foliküldeki granüloza hücrelerinin proliferasyonunun seyri hipofiz ön lobundaki bazofilik hücrelerden salgılanan FSH'a bağlıdır (Gartner ve Hiatt 2007). Folikülün boyutu arttıkça granüloza hücre tabakası tarafından döşenen antrum da genişler. Stratum granülozum, oosit ile ilişkili olduğu bölgenin dışında bulunan yerlerde nispeten eşit kalınlığa sahiptir. Burada granüloza hücreleri antruma doğru çıkıntı yapan kumulus ooforus adı verilen bir tümsek meydana getirirler. Kumulus ooforus hücreleri kısa sürede oositin etrafını çevreler ve korona radiata adını alırlar. Korona radiata, zona pellusidaya doğru mikrovilluslarını gönderirler ve oluklu bağlantılar sayesinde oositin mikrovilluslarıyla iletişim kurarlar. Ekstraselüler olarak bulunan ve PAS pozitif boyanan Call-Exner cisimcikleri, granüloza hücrelerinin arasında görülebilir. Bu cisimcikler granüloza hücreleri tarafından salgılanmaktadır (Ross ve Pawlina, 2011). Over kesitinde görünen sekonder folikül **Şekil 2.4.3.1'** de gösterilmektedir.



Şekil 2.4.3.1. Over kesitinde bulunan sekonder folikül, O: Oosit, GH: Granüloza hücre tabakası, TI: Teka interna tabakası, TE: Teka eksterna tabakası, H&E, Bar 100µm.

2.4.4. Olgun (Graaf) Folikül

Graaf folikül olarak da adlandırılan olgun folikülün çapı yaklaşık olarak 10 mm ya da daha fazladır. Graaf folikülün büyük boyutundan dolayı ovaryum korteksinde çukurluk oluşturur. Folikül maksimum boyutuna ulaşırken granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi yavaşlamaktadır. Antrumun boyutu genişledikçe stratum granulozum tabakası incelik. Folikül bu aşamadayken teka tabakası daha belirgin bir hal alır. Bu dönemde teka interna hücrelerinin sitoplazmasında lipid damlacıkları ortaya çıkar ve hücreler steroid üreten hücrelerle aynı ultrastrüktürel görünüm kazanırlar (Ross ve Pawlina, 2011). Over kesitinde görünen graaf folikül **Şekil 2.4.4.1'**de gösterilmektedir.



Şekil 2.4.4.1. Ovaryum korteksinde bulunan graaf folikül, TK: Teka tabakası, GH: Granüloza hücre tabakası, A: Antrum boşluğu, KR: Korona Radiata, O: Oosit, KO: Kümülüs Ooforus, H&E, Bar 200µm.

2.5. Ovulasyon

Preovulatuvar olgun bir folikül 15-25 mm çapında olup geniş bir antruma sahiptir. Etrafında vaskülarize teka hücreleri bulunur. Teka tabakası üzerinde foliküle ait düz kas hücreleri vardır. Ovaryum stroması içindeki bağ dokusu arasında yer alan dominant folikül giderek overin korteksine yaklaşarak over yüzeyinde çıkıntı yapar ve folikül tepe noktası açılarak sekonder oosit (oosit II) çevre kumulus kompleksi ile dışarı atılır. Bu olaya ovulasyon olarak adlandırılmaktadır. Ovulasyon sonrasında geride kalan granüloza ve teka hücreleri korpus luteumu oluşturmaktadır. Bu aşama, 28 günlük menstriyal döngünün yaklaşık 14. gününde gerçekleşir. Atılan oosit II tuba uterinanın fimbriya ovarikalari ile tutularak tuba uterinanın içerisine alınır. Oositin tuba uterinadaki yolculuğu yaklaşık dört gün sürmektedir. Oosit bu sürede bir spermium tarafından döllenirse ikinci olgunluk bölünmesi tamamlanır. Ovum ve ikinci kutup cisimciği oluşur. Döllenme olmadığında ise sekonder oosit 24 saat içinde dejenere olmaktadır (Tekelioğlu M., 2002).

Ovulasyon anı LH salınımı başlangıcından 34-36 saat, LH pikinden 10-12 saat sonrasında meydana gelmektedir. LH yüksekliği folikülde granüloza hücre LH reseptörleri üzerinden progesteron yapımını artırır. Progesterondaki bu önemli olan az fakat kısa süreli yükselişin pozitif feedback etkisi ile LH piki (tepe noktası) oluşumu ve

midsiklus FSH piki oluşumu hızlanır. LH artışı ile oositte durmuş olan mayozun yeniden başlamasını, granüloza hücre luteinizasyonunu, oosit ve çevresindeki kumulus tabakasının sertleşmesini ve folikülruptürü için gerekli olan prostaglandinlerin sentezini sağlar. Gonadotropinlerin etkisinde folikül sıvısında plazminojenaktivatörlerin sentezi artar. Bu sayede plazminojenden oluşan plazmin etki ile folikül duvarının gerilim gücü zayıflamaktadır (Speroff L. ve ark, 1999).

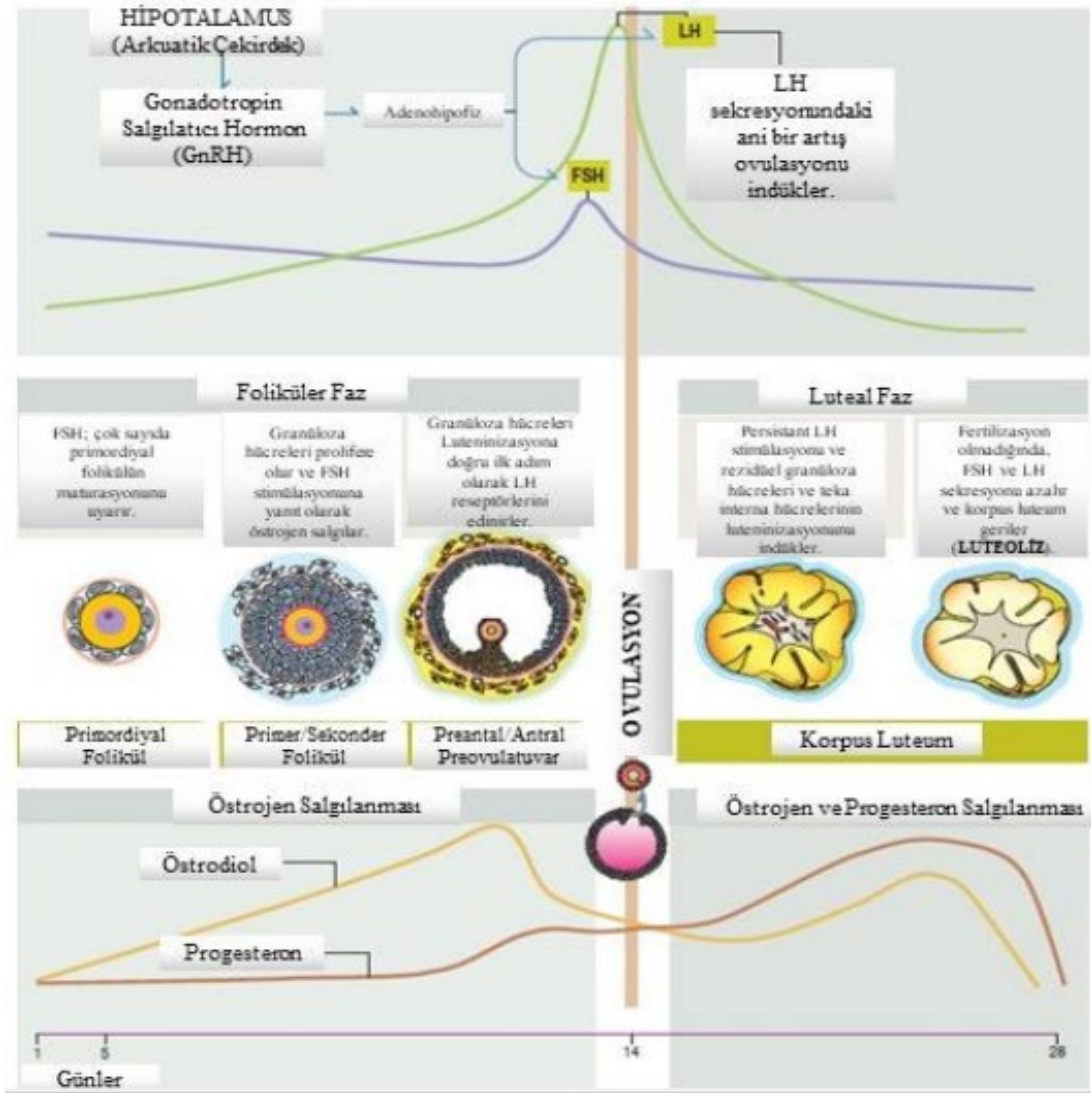
2.6. Korpus Luteum (Sarı Cisim)

Ovulasyondan sonra, folikülün granüloza hücreleri ile teka interna ve eksterna tabakaları korpus luteumu (sarı cisim) oluşturur. Korpus luteum ovaryumun korteks bölgesinde yer almaktadır. Folikül duvarı, folikül sıvısının boşalması ile kıvrımlı hale gelir (Speroff L. ve ark, 1999).

Korpus luteumun asıl görevi salınmış olan oositi desteklemek ve endometriumu implantasyona hazırlamak için progesteronu salgılamaktır. Progesteron, LH salgısından 6-8 gün sonra pik noktasına ulaşır. Korpus luteumdan salgılanan progesteronun santral ve lokal etkisi, östrojen ve inhibinin de etkisiyle yeni folikül gelişimini durdurucu etki gösterir. Gebelik oluşmazsa ovulasyondan 9-11 gün sonra korpusluteum küçülür ve progesteron, östrojen ve inhibin seviyeleri düşer (Speroff L. ve ark, 1999). Korpus luteum bozulduktan sonra kandaki steroidkonsantrasyonu azalır ve başka bir folikülün büyümesini uyarmak ve bir sonraki menstrual döngüyü başlatmak için FSH salgılanması artar. Korpus luteumdan arta kalanlar makrofajlar tarafından fagosite edilir ve sonra ortama fibroblastlar gelir. Bunun sonucunda korpus albicans (beyaz cisim) adı verilen sıkı bağ dokusundan bir skar dokusu meydana gelir (Junqueira LC, 2003).

2.7. Menstrual Döngü

Ovaryum folikülleri ve korpus luteumun gelişimi hipofiz gonadotropinleri olan FSH ve LH tarafından kontrol edilir. Bunlar ovaryum hormonları olan östrojen ve progesteron seviyelerinde değişikliğe neden olmaktadır. Menstrüal döngü sürecinde, bu hormonların salınımları değişkenlik gösterir. Döngünün farklı evrelerinde salgılanma düzeyleri farklı olmaktadır (Noyan A, 2003). Mensteruel siklus boyunca meydana gelen değişiklikler **Şekil 2.7.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 2.7.1. Mensteruel Siklus Boyunca Meydana Gelen Değişiklikler (Kierszenbaum A.L., 2016).

2.8. Ovaryum Fizyolojisi

Kadın hormonal sistem hormonları üç gruba ayrılmaktadır;

1. Hipotalamik-serbestleştirici hormon ya da Gonadotropin salgılatıcı Hormon (GnRH).
2. FSH ve LH hormonu; her ikisi de hipotalamusta sentezlenen GnRH etkisiyle hipofiz ön lobundan salgılanırlar.
3. Ovaryum hormonları olan östrojen ve progesteron hormonları hipofiz ön lobundansalınan FSH ve LH' ye yanıt olarak ovaryumlarda salgılanırlar (Noyan A, 2003).

2.9. Prematüre Ovaryan Yetmezlik

Prematüre overyan yetmezlik (POY) ya da primer over yetmezliği, ilk kez 1942 yılında Fuller Albright tarafından 40 yaşının altındaki kadınlarda dört ay ya da daha uzun süreamenore, hipoöstrojenizm ve yüksek serum gonadotropin seviyeleri ile karakterize bir hastalık olarak tanımlanmıştır (Albright, 1942). Premature overyan yetmezlik, 40 yaşın altındaki kadınlarda yaklaşık olarak her 100 kadından 1 inde görülmektedir (Huntaniemi ve ark., 2018). Primer over yetmezliği tablosu menopozdan farklıdır. Bunun sebebi vakaların yaklaşık %50'sinde değişken olarak ovaryum fonksiyonu ve yaklaşık olarak %5-10'unun tanıyı aldıktan sonra gebe kalabilmesidir (Rebar RW 1990).

POY, doğurganlık çağındaki kadınlarda görülen infertilitenin başlıca nedenlerinden birisidir. POY insidansı her geçen yıl artarak hastaların fiziksel ve ruhsal sağlığını etkilemesiyle birlikte aile ve toplum üzerine ekonomik yük oluşturmaktadır (Wang J. ve ark, 2021). Ayrıca POY'un depresyon, anksiyete gibi bir dizi sağlık sorununa yol açabileceği, yaşam kalitesi ve cinsel işlevde bozulmaya sebep olabileceği bildirilmektedir (Chen L, 2018).

2.9.1. Premature Over Yetersizliği Etiyolojisi

POY, doğurganlık çağındaki kadınların üreme sağlığını tehdit eden en ciddi sorunlardan biri haline gelmiştir. Oluşumu, yetersiz bir primordial foliküler sisterna rezervi, hızlanmış foliküler atrezi, baskın foliküler rekrutman değişiklikleri, foliküler olgunlaşma bozuklukları vb. ile ilişkili olabilir (Xiang ve ark, 2019). POY, birincil (spontan) veya ikincil (iyatrojenik) olarak ortaya çıkabilir. Tanısal gelişmelere rağmen spontan vakaların büyük bir kısmı idiyopatik olarak kalır (%90) ve hiçbir neden bulunamaz. Ancak POY'a yatkınlık oluşturan birçok faktör tanımlanmıştır (Goswami D, 2007). POY oluşumunda altta yatan olası nedenler kromozomal anormallikleri, gen mutasyonlarını, otoimmüniteyi, metabolik bozuklukları, enfeksiyonları ve bir şekilde folikül disfonksiyonuna veya folikül tükenmesine yol açan iyatrojenik tedavileri kapsamaktadır (**Tablo 2.9.1.1**).

POY'un nedenlerine göre sınıflandırılması	
Etiyoloji	Bilinen risk faktörleri
Genetik	Kromozomal anomaliler
	X kromozomunda mutasyona uğramış POY ile ilgili genler
	Otozomda mutasyona uğramış POY ile ilgili genler
Metabolik	Klasik galaktozemi
	17-OH eksikliği
Otoimmün	OPS eşliğinde Sjögren sendromu, myasteniagravis, romatoidartrit, sistemik lupuseritematozus
İyatrojenik	Kemoterapi (Siklofosfamid)
	Radyoterapi
	Cerrahi girişimler
Virüsler	Kabakulak, HIV enfeksiyonu
Yaşam tarzı/Çevresel	Sigara kullanımı, toksinler (VCD) , yaşam boyu düzensiz adet periyotları
Mevcut somatik hastalıklar	Epilepsi vb.
OPS;otoimmün poliglandüler sendrom, VCD;4-vinilsikloheksen diepoksit.	

Tablo 2.9.1.1. Premature over yetmezliğinin nedenlerine göre sınıflandırılması (Jin M. ve ark, 2012).

2.9.1.1. POY'un Genetik Nedenleri

Premature over yetmezliğini oluşumunda yer alan genetik nedenler, karyotipleme veya Floresan In Situ Hibridizasyon (FISH) kullanılarak tespit edilen; X monozomi (Turner Sendromu), trizomi X, X kromozom mozaisizmi, delesyonlar veya dengeli X/otozomal translokasyonlardır (Jin M. ve ark 2012). POY'un yaklaşık %3-4'ü aileseldir. Bu nedenle X kromozom anomalileri bu hastalıkta en önemli role sahiptir (Sheikhansari G, 2018).

Turner sendromu; X kromozomlarından birinin olmaması (45X0) ile karakterize olan ve prematüre over yetmezliği oluşmasına neden olan bir genetik hastalıktır. Bu sendromda kromozom eksikliğine bağlı olarak atrezikfolikül oluşumu görülmektedir (Reyraud K., 2004).

POY vakalarının yaklaşık %5'i X kromozomu anormalliklerinden kaynaklanır. X kromozomunun delesyonu, translokasyonu veya sayısal değişikliklerinden oluşmaktadır (Assumpção, 2014). POY ile ilişkili mutasyonlarda giderek artan sayıda gen tanımlanmaktadır. X kromozomuyla ilgili genler; BMP15, FMR1, FMR2 ve POF1b olarak bildirilmiştir (Goswami D, 2005).

POY'ne neden olan otozomal genler ise; FSH reseptörü, LH reseptörü, İnhibin A, FOXL2, GALT, FSH beta-alt birim varyantı, POLG, NOGGIN, LH- β ve AIRE olarak bildirilmiştir (Goswami D, 2005). FSH reseptörü, bazı Fin ailelerinde (C566T) POY'a yol açan bir mutasyon olarak bulunmuştur. FSH beta alt birim genlerinin, KAL geninin ve DAX-1 geninin mutasyonu, gonadotropinlerin sentezini değiştirmektedir. LH reseptör mutasyonu, tanımlanan hastalar Tanner ölçeğinin 4. veya 5. pubertal evrelerine ulaştığında, birincil veya ikincil amenore ile kendini gösterebilir (Assumpção CR, 2014). Klasik galaktozemi ise GALT geni eksikliğine bağlı oluşan POY'un nadir bir nedenidir (Goswami D, 2007).

2.9.1.2. POY'un Otoimmün Nedenleri

POY vakalarının yaklaşık %30'u patogenezinde otoimmün mekanizmalar rol oynar. Çeşitli otoantikorlar, over otoimmünitesinin serolojik belirteçleri olarak araştırılmıştır. Bunlar, steroidojenik enzimlere (3β -hidroksisteroid dehidrojenaz gibi), gonadotropinlere ve bunların reseptörlerine, korpus luteuma, zona pellucida ve oositlere karşı oluşan antikorları içerir (Forges T, 2004). POY ile ilişkili otoimmün hastalıklar; Addison hastalığı, vitiligo, myastenia gravis, Sjögren sendromu, sistemik lupus eritematozus, çölyak hastalığı ve otoimmün poliglandüler sendromdur (Sheikhansari G, 2018).

2.9.1.3. Kemoterapi

Kemoterapi, premature over yetmezliğinin iyatrojenik sebepleri arasında yer almaktadır (Jin M. ve ark, 2012). Kanser hastalarında kemoterapi tedavisi ömrü uzatsa da kemoterapi, kanserden kurtulan kadınlarda primordial foliküllerin tükenmesine bağlı olarak erken menopoza ve kısırılığa sebep olmaktadır. Kemoterapötik ilaçlar, ovulasyon sırasında çoğalan germ hücreleri ve foliküler hücreler üzerinde hasara neden

olmaktadır (Beşikcioğlu ve ark., 2019). CTX ve busulfan (Bu) gibi kemoterapötikler, hastalarda premature ovaryal yetmezliğe yol açan en gonadotoksik ajanlardır (Bahrehbar K ve ark, 2020). Kemoterapötik ajanların over tahribindeki ilk fazı gelişen foliküllerin primer komponenti olan granüloza ve teka hücrelerinin tahribini içerir. Özellikle alkilleyici grup kemoterapik ajanlar hücresel DNA'yı değiştirerek hücre ölümüne sebep olurlar. Bu ajanlar over tahribinin ikinci fazı olan non-prolifere primordial folikülleri ilgilendirir. Kemoterapi sonrası over disfonksiyonu gelişme riski, kişinin yaşına, doza ve ilaç tipine bağlıdır. 40 yaşın altındaki kadınlarda CTX tedavisi sonrası amenore bulgusu oluşum dozu, daha yaşlı olan kadınlara göre iki kat daha fazladır (Apperley JF, 1995).

2.9.1.4. Çevresel Faktörler

Viral enfeksiyonlar, sigara kullanımı gibi çeşitli çevresel faktörler infertiliteye ve POY'a neden olabilir. Yapılan çalışmalarda sigara kullanımının premature over yetmezliğine yol açabileceğini göstermiştir (Shareghi-Oskoue O, 2021). Sigara dumanı, germ hücresine toksik özellik gösteren polisiklik hidrokarbonlar içerir (Mattison DR, 1978). Sigara içen kadınların menopoza girmesi sigara içmeyenlere göre daha erken görülür ve bu da sigaranın over fonksiyonu üzerinde oluşan olası zararlı bir etkisi olduğunu düşündürür (Di Prospero F, 2004).

Viral enfeksiyonlar arasında kabakulak hastalığı POY'a neden olabilmektedir. Bir salgın sırasında kabakulak hastalarının %3-7'sinde POY bildirilmiştir (Rebar RW, 1990).

2.9.2. Premature Over Yetmezliğinde Tedavi Stratejileri

POY yönetiminde güncel olarak, hormon replasman tedavisi (HRT) ve infertilite tedavisini içerir. HRT'yi izlemek ve sağlık sürveyansı için uzun vadeli takip esas olacak şekilde ilişkili patolojinin değerlendirilmesi ve yönetilmesi gerekmektedir (Goswami D, 2007). Bununla birlikte, HRT normal over fonksiyonunu eski haline getirmez. Ayrıca bir çalışma, HRT'nin meme kanseri riskini artırabileceğini göstermiştir (Edessy M, 2016). Bu nedenle, POY'lu hastaların over fonksiyonunu eski haline getiren yeni terapötik stratejiler gerekmektedir (Chen L, 2018). POY tedavisinde uygulanan diğer yaklaşımlar ise diyet, egzersiz, psikolojik destek, donör oositlerini içermektedir (Sheikhansari G, 2018).

Doğurganlığın korunması için over koruma yöntemi olarak; oosit veya over dokusu kriyoprezervasyonu ve embriyo dondurma kanser teşhisi koyulan kadınlarda

kullanılan stratejilerdir. Ancak bu yöntemlerin kanser hücrelerinin yeniden vücuda girme riski, kanser tedavisinde yaşanacak gecikme ve düşük başarı oranı gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu nedenle POY'lu hastalar için gelişmiş tedavi seçenekleri geliştirmek gerekmektedir (Bahrehbar K ve ark, 2020).

2.9.2.1. Hormon Replasman Tedavisi

Menapoz semptomlarının hafifletilmesi ve osteoporoz gibi östrojen eksikliğinin uzun vadeli sağlık sonucunun önlenmesi için hormon replasman tedavisi (HRT) gereklidir. Östrojen replasmanı genellikle, devam eden tedavinin risk ve yararlarının gözden geçirildiği 50 yaşına kadar sürdürülür (Goswami D, 2007). POY hastalarında kemik kaybını ve menopoz semptomlarını önlemek ve kardiyovasküler sağlığı iyileştirmek için östrojen replasmanı önerilmektedir (Cartwright B, 2016). Östrojen replasmanı için oral, transdermal, subkutan ve vajinal yolla uygulamaları için çeşitli HRT preparatları mevcuttur. Uygulanacak östrojen replasmanı dozu hastanın ihtiyaçlarına göre belirlenmektedir (Goswami D, 2007).

2.9.2.2. Melatonin Takviyesi

Yapılan çalışmalar melatonin takviyesinin, gonadotropin düzeylerini, tiroid fonksiyonunu, doğurganlık ve menstrüasyonu iyileştirmede olumlu etkisi olduğunu göstermiştir (Vanecek J, 1992, Baltacı AK, 2004, Yang Y, 2019). Melatonin, hem in vitro hem de in vivo bağışıklık sistemini düzenler. Spesifik olmayan hümmoral ve hücre aracılı bağışıklığın yanı sıra antikör aracılı bağışıklığı uyarır. Bunun nedeni melatoninin kanseri tedavi etmek için kullanılmış olmasıdır (Jankowska K, 2017). Melatonin DNA'nın foliküller üzerindeki antioksidan etkileri ve koruyucu özellikleri ile kanserden kurtulan kadınlar için faydalı olabilmektedir (Huang J, 2020).

2.9.2.3. Dehidroepiandrosteron (DHEA)

Endojen bir steroid olarak dehidroepiandrosteron (DHEA), kadınlarda over monositlerinin zona reticularis'ten ve adrenal korteksten kaynaklanır. DHEA, ovaryumun foliküler steroidogenezinde önemli bir prohormon olarak görev yapar (Mamas L, 2009). Çalışmalar, premature over yetmezliği olan hastalarda DHEA uygulamasının gebelik oluşumunu arttırdığını, anöploidiyi azaltarak düşük yapma riskini azaltarak ve IVF tedavisini daha başarılı hale getirdiğini göstermiştir (Jankowska K, 2017, Qin JC, 2016).

2.9.2.4. İmmünomodülasyon Tedavisi

İmmün modülasyon ile POY tedavisi, ovaryumda otoimmün hasarın neden olduğu durumlarda etkilidir. Bu tedavide immünosupresif tedavi için kortikosteroid kullanımı ve monoklonal antikor yaygındır. POY'da bazı otoantikorlar, steroid üreten hücre antikorlarıdır. Bu antikorlar korpus luteuma, granüloza hücrelerine, hiler hücrelere ve teka hücrelerine bağlanır. Oluşan oto-antikorlar, POY ve Addison hastalığını aynı anda görülen hastalarda tanımlanmıştır (Sheikhansari G, 2018).

2.9.2.5. Kök Hücre Tedavisi

Son yıllarda, başta mezenkimal kök hücreler (MSC) olmak üzere çeşitli kök hücre türleri, Bağışıklık düzenleyici, anti-enflamasyon, anjiyogenez, anti-apoptozis ve trofiklik gibi özelliklerinden dolayı üreme tıbbında yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, hücre tedavisinin güvenlikleri, maliyetleri ve üretimleri nedeniyle kapsamlı klinik uygulaması gecikmektedir (Goa M. ve ark., 2022).

Kök hücre tedavisi, POY'un klinik tedavisi için yeni bir yaklaşım sunarak, hasarlı dokuları onarmak ve eski haline getirmek için potansiyel bir terapötik araç olarak tanımlanmıştır (Antoine C, 2014). Yapılan çalışmalar, kök hücrelerin POY hayvan modellerine transplant edildiğinde ovaryum fonksiyonunu geri kazandırdığını ve olgunlaşmamış oositler ürettiğini ortaya koymuştur (Liu T 2016, Agung M 2006). Bununla birlikte, POY tedavisi için kök hücre nakli üzerine yapılan araştırmalar çoğunlukla hayvan deneyleriyle bildirilmiş olup nadiren klinik çalışmalar uygulanmıştır (Blumenfeld Z, 2012, Balachandar S, 2015).

2.10. Kök Hücreler

Kök hücreler, mitoz bölünme sırasında simetrik ve/veya asimetric bölünebilme yeteneğine ve farklılaşma potansiyelinesahiptirler. Sahip oldukları bu özellikler sayesinde 21. yüzyılın yeni sağlık alanı olan rejeneratif tıpta eşsiz bir hücre grubu olarak yerini almaktadır. Asimetric bölünme ile kendi özelliklerini ve organizmadaki miktarlarını sabit tutmaya çalışırken kendilerini yenileyerek, diğer yandan doku hasarı varlığında doku onarımına katkıda bulunmak için farklılaşarak rejeneratif özellik gösterirler (Berika M, 2014 ve Stoltz JF, 2015).

Kök hücreler;

1. Farklanma (plastisite)
2. Kendini yenileme (self-renewal),
3. Köklülük (Stemness) olmak üzere üç temel özellik gösterirler (Karaöz E., 2010).

Kök hücreler özelleşmemiş hücrelerdir ve bu hücrelerin her biri yeni spesifik hücre fonksiyonları ile özelleşmiş hücrelere dönüşebilirler. Bu hücreler, uygun şartlarda farklılaşmadan sınırsız sayıda bölünebilme, kendilerini yenileyebilme ve doku onarımında ve homeostazda çok önemli rol oynayan en az bir farklı hücre tipine dönüşebilme yetenekleri bulunur (Spangrude GJ, 2003). Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri farklılaşma kapasitelerinin yüksek olmasıdır (Huang SJ, 2012).

Kök hücreler farklılaşabilme yeteneklerine göre totipotent, pluripotent ya da multipotent olarak sınıflandırılırlar. Totipotent kök hücreler, canlı bir hayvanın uterusuna implante edildiğinde tam bir organizmayı oluşturabilir. Pluripotent kök hücreler, ekstra embriyonik dokular (örneğin plasenta) dışında bir organizmanın her hücresinin oluşmasına neden olabilir. Multipotent kök hücreler, yetişkin kök hücrelerdir ve sadece hücrelerin belirli soylarını üretebilirler (Nadig RR, 2009).

Totipotent kök hücreler, canlının yapısındaki bütün hücrelere farklılaşma yeteneğinde olan ilk embriyonik kök hücrelerdir ve bu hücrelere her şeyi yapabilme kabiliyetinde olan "totipotent hücre" denilmektedir. Plasental yapıları oluşturabilmesi (dış hücre kitlesi ile trofoektoderm) ve tüm dokulara farklılaşabilmesi (iç hücre kitlesi ile) gibi özelliklere sahip olan bu kök hücreler, erken embriyonik dönemde canlıyı tekrar oluşturabilme kapasitesine sahiptirler. Bu hücreler fonksiyonel bir canlıyı en baştan oluşturabilecek tüm hücre tiplerine farklılaşabilme özelliği sergilerler. Bununla birlikte amniyon kesesi ve plasenta gibi embriyo dışı dokulara da dönüşme potansiyeli bulunmaktadır (Morgani SM, 2013).

Pluripotent kök hücreler ise, fertilizasyondan sonra, pre-implantasyon döneminin 5. Gününde oluşan blastosist fazındaki embriyoda bulunan hücrelerdir. Blastosist yapı olarak; trofoblast hücreleri, blastosöl ve iç hücre kitlesi olmak üzere üç yapıdan oluşur. Pluripotent hücreler, 3 germ tabakasının hepsinden (endoderm, mezoderm ve ektoderm) dokuya farklılaşabilmektedir (Kolios G, 2013). Pluripotent kök hücreler; embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden kaynak alan hücrelerdir. Canlıdaki tüm doku ve organları oluşturabilmesi ile totipotent kök hücrelere benzerdir. Ancak plasental yapıları oluşturamazlar. Buna bağlı olarak yeni bir canlıyı

meydana getiremezler. Ancak bu hücreler gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilme potansiyelleri bulunmaktadır (Morgani SM, 2013).

Multipotent kök hücreler, embriyonik gelişimin daha ileri evresine ait hücreler olup, erişkin kök hücrelerine dönüşürler ve özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler. Multipotent kök hücreler insanda embriyo gövdesinde 16. günden ve intrauterin evrede 4. aydan itibaren tüm kan hücreleri ve birçok organa özgü çeşitli hücrelere farklılaşabilen kök hücrelerdir (Friedenstein AJ, 1976). Multipotent kök hücreler, erişkin bireylerin dokularında bulunan tek bir germ yaprağına ait ve birbirine yakın hücre gruplarına farklılaşabilen hücrelerdir. Multipotent kök hücreler ilk olarak kemik iliğinden Friedenstein ve ark. tarafından izole edilmiştir (1976).

2.10.1. Kökenine Göre Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

2.10.1.1. Embriyonik Kök Hücreler

1981 yılında Dr. Martin Evans ve Dr. Kaufman tarafından fareler ile yapılan deneyde 5 günlük blastosistlerin iç hücre kitlesinden sınırsız sayıda çoğalabilen embriyonik kök hücreler izole edilmiştir. Embriyonik kök hücrelerin izolasyonu ve laboratuvar ortamında farklılaşmadan çoğalabilme özelliklerinin gösterildiği ilk çalışmadır. (Evans MJ. ve Kaufman MH, 1981). İleri tarihte yapılan çalışmalarda ise insan embriyonik kök hücreleri izole edilmiştir. Fare embriyonik kök hücrelerinin izole edilmesi ile edinilen tecrübelerin katkısıyla Thomson ve arkadaşları 1988 yılında insan embriyolarının iç hücre kitlesinden embriyonik kök hücreleri izole etmişlerdir (Thomson JA, 1998).

Blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilirler ve yüksek telomeraz aktivitelerinden dolayı sonsuz sayıda DNA sentezleme potansiyeline sahiptirler (Trounson A, 2006). Embriyonik kök hücreler organizmanın tüm doku tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahip pluripotent hücrelerdir (Pera MF, 2000). Pluripotent insan embriyonik kök hücreleri 5 veya 6 günlük blastokistin iç hücre kitlesinden geliştirilebilir. Embriyonik gelişim sırasında iç hücre kitlesi 2 ayrı katmanı içerir; epiblast ve hipoblast. Hipoblast daha sonra yumurta kesesini oluşturur. Epiblast katmanı ise 3 germ tabakasına farklılaşır; ektoderm, endoderm, mezoderm (Bongso A. ve ark., 2005).

2.10.1.2. Yetişkin Kök Hücreler

Yetişkin kök hücreler gelişim sürecinin ileri aşamalarında görülür ve kendilerini yenileyebilen, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen, doku ve organlarda bulunan

farklılaşmamış hücrelerdir. Yüksek telomeraz aktivitesine gösterirler fakat embriyonik kök hücreler ile kıyaslandıklarında farklılaşma potansiyelleri daha azdır (Fuchs E, 2004). Bu hücrelerin insan vücudunda az sayıda bulunduğu, aynı zamanda kültür ortamında çoğaltılmalarının zor olduğu düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar ile bu hücrelerin plastik yüzeylere yapışabilme oranlarının yüksek olduğu gösterilmiştir (Prentice D, 2004).

Yetişkin kök hücreler, kemik iliği, diş pulpası, kas, sinir, karaciğer, deri olmak üzere insan vücudunun çeşitli yerlerinde bulunabilirler. Bu hücrelerin yoğunlukta bulunduğu bölge ise kemik iliğidir. Bu bölgelerden izole edilen hücrelerin farklılaşabildikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Farklılaşma özellikleri korunarak bu hücrelerin çoğaltılması klinik uygulamalarda kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Ek olarak yapılan deneysel hayvan modellerinde bu hücrelerin tedavi edici etkileri gösterilmiştir (Shyu WC, 2004).

Yetişkin kök hücreler hasarlı dokuyu hedef alarak dokuyu bulur ve oraya yerleşirler. Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve stromal hücre kaynaklı faktör-1 (Stro-1) hasar bulunan bölgelerde arttığı düşünülüp, buldukları bölgede kök hücrelerin çağırılması için gerekli sinyalleri oluşturdukları düşünülmektedir (Özcan T, 2007).

2.10.1.2.1. Hematopoetik Kök Hücre

Kan hücreleri, lenfoid hücreler (T, B ve doğal öldürücü hücreler) ve miyeloid hücreler (granülositler, monositler, eritrositler ve megakaryositler) olmak üzere iki ana sınıfa ayrılır. Tüm kan hücrelerinin sınırlı bir ömrü vardır. Bu süre; granülositler için birkaç saat, kırmızı kan hücreleri için birkaç hafta ve T hücreleri için birkaç yıl kadardır. Bu nedenle, kan hücresi kalıcı olarak üretilmesi gerekir. Kanın hücresel elemanlarını ve immün sistem hücrelerini oluşturan bu hücrelere hematopoetik kök hücreler (HKH) adı verilir (Gunsilius E, 2001).

HKH'ler, kendini yenileme ve olgun kan hücresi soylarına farklılaşma yoluyla hematopoezin ömür boyu korunmasından sorumludurlar (Hurwitz SN, 2020). HKH'ler kendilerini yenileyebilme ve farklılaşabilme özelliklerini kontrol altında tutabilirler. Bu sebeple hücre sayıları azalmadan devam eder ve bu sayede kan hücreleri yaşam boyu üretilir. Aynı zamanda bu hücreler nadir olarak bölünürler bu şekilde dokuların homeostazını sağlarlar bunun yanında onkojenik olayların oluşumunu da engellerler (Martinez-Agosto JA, 2007). HKH' ler farklılaştıklarında ise kendilerini yenileyebilme özelliklerini kaybederler (Lai AY, 2008). HKH'lerin gelişimi, farklılaşmaları, istirahat

sevk edilmeleri, kendi-kendini yenileyebilmeleri ve periferik kana mobilize olmaları transkripsiyon faktörleri aracılığıyla sağlanmaktadır (Huang X, 2007).

HKH' lerin izole edilebildiği yerler; kemik iliği, periferik kan ve kordon kanıdır (Koçyiğit I, 2008). HKH' lerin CD34, CD133, CD150 eksprese ettikleri ve CD38 yüzey antijenini eksprese etmedikleri bilinmektedir (Ratajczak MZ, 2008).

2.10.1.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Cohnheim tarafından yapılan çalışmalarda kemik iliğinde hematopoetik olmayan kök hücrelerin varlığı bulunmuştur. Friedenstein ve arkadaşları tarafından 1970 yıllarında mezenkimal kök hücreleri tanımlanmıştır. Friedenstein yaptığı çalışmalarda aspiratın fetal buzağı serumu içeren kültür ortamına yaymıştır ve morfolojik olarak fibroblast benzeri hücrelerin varlığını gözlemlemiştir. Aynı zamanda bu hücrelerin yüzeye yapışabilme, kemik, kıkırdak ve yağ hücrelerine farklılaşabilme özellikleri olduğunu saptamıştır (Friedenstein AJ, 1976). Yapılan çalışmalarda bu kök hücrelerin üç germ tabakasından gelişen hücre ve dokulara farklılaşabilen, hematopoetik olmayan, multipotent hücreler olduğu bildirilmiştir. Bu hücreler mezodermal kökenli hücrelere farklılaşabilme potansiyelinden dolayı mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılmaktadır (Jiang Y, 2002).

Hücrelerin farklılaşma ve immünomodulator özellikleri, in vivo etkinliği gibi konularda hücrelerin geliştirildiği çevre koşullarına bağlı değişiklikler olduğu bildirilmektedir. Bu nedenden dolayı ötürü Uluslararası Hücresel Tedavi Derneği (ISCT, UHTD), hem temel araştırmalar hem de pre-klinik çalışmalar için insan MSC'leri tanımlamasında gerekli kriterler önermiştir. Bu hücreler, UHTD tarafından, "kök hücre" olarak adlandırmak yerine "mezenkimal stromal hücre" veya "multipotent mezenkimal stromal hücre" olarak adlandırılmasını önermiştir. MSC tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan özellikler; plastik yüzeye yapışması (plastik adherens), stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma yetenekleridir (Silva WA Jr, 2003).

Mezenkimal kök hücreler; morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen, kültürlerde plastik yüzeylere yapışabilen, in vitro olarak adipojenik, kondrojenik ve osteojenik soylara farklılaşabilen hücrelerdir. Mezenkimal kök hücreler CD105, CD73 CD90 yüzey antijenlerini eksprese ederler. Bunun yanında CD34, CD45, CD14, CD19, CD79a, HLA-DR yüzey antijenlerini eksprese etmezler (Dominici M, 2006).

MSC'ler, kemik iliği, iskelet kası dokusu, yağ dokusu, sinovyal membran, safen venler, diş pulpası, periodontal ligament, Wharton jeli, göbek kordonu, göbek kordon kanı, amniyotik sıvı, plasenta, akciğer dokusu ve karaciğer dokusu olmak üzere çeşitli dokulardan izole edilmiştir (Squillaro T, 2016).

Organizmanın zengin kök hücre kaynaklarından olan kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök hücreler bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda kemik iliği aspirasyonunda 1×10^6 mononükleer hücreye karşı ortalama 2 ile 100 arasında değişen sayıda MSC içerdiği gösterilmiştir (Colter, C.D. ve ark 2001).

MSC'ler multilineage farklılaşma potansiyelleri, hazır bulunabilmeleri ve in vitro ekspansiyon kapasiteleri dahil olmak üzere MSC'lerin benzersiz özelliklerine ek olarak, dokunun yeniden şekillenmesini destekleyen trofik faktörlerin salgılanması ve immün düzenleyici özelliklerisayesinde bu hücreleçoğu uygulama için uygun adaylar haline getirmiştir (Squillaro T, 2016).

2.10.1.2.2.1.Dental Kök Hücreler

Kök hücre özelliğine sahip hücre popülasyonları, dişin farklı bölümlerinden izole edilmiştir. Bu bölümler; hem dökülmüş süt dişleri (çocuk) hem de yetişkin dişlerin pulpasından, diş kökünü kemiğe bağlayan periodontal bağdan, gelişmekte olan köklerin uçlarından ve diş folikülünden gelen hücreleri içerir. Dental kaynaklı kök hücreler, mezenkimal hücre soylarına (osteoblastlar, kondrositler ve adipositler) farklılaşma dahil olmak üzere mezenkimal kök hücre benzeri özelliklere sahiptir. Bununla birlikte, farklı hücre popülasyonları, kültürdeki büyüme oranlarının, işaretleyici gen ekspresyonunun ve hücre farklılaşmasının belirli yönlerinde farklılık gösterir, ancak bu farklılıkların kaynak dokusuna, işlevine veya kültür koşullarına ne ölçüde atfedilebileceği belirsizliğini korumaktadır (Volponi AA, 2010). Dental kaynaklı mezenkimal kök hücreler çeşitli bölgelerden (Şekil 2.10.1.2.2.1.1) izole edilebilmektedir (Ansari S, 2017).

Diş yaralanmasından sonra, dişin onarıcı dentin oluşturabildiği uzun zamandır bilinmektedir. Bu nedenle diş pulpasında yerleşik olarak kök hücre popülasyonu varlığıdüşünülmüştür (Kitamura C, 1999). Bu düşünce, insankalıcıdişlerinde bulunan dental pulpa mezenkimal kök hücrelerinin (DP-MS C'ler) keşfedilmesiyle kanıtlanmıştır (Gronthos S, 2000). DP-MS C'ler, izole edilen ve tanımlanan ilk orofasiyal kök hücrelerdir. Bunun yanında mezenkimal kök hücreler gibi; in vitro olarak çok soylu

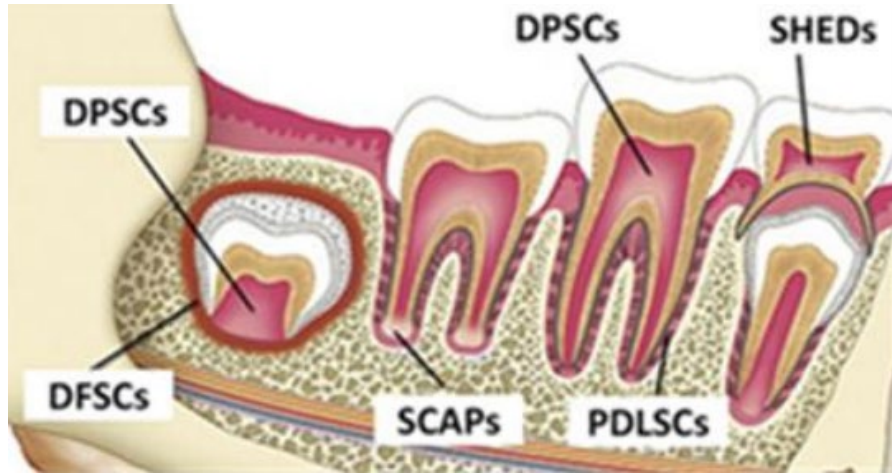
farklılaşma yetenekleri, plastik yapışma ve klonojenik özellikler gibi tipik özellikler sergilemektedirler (Gronthos S, 2000).

Dental pulpada bulunan mezenkimal kök hücrelerinin keşfinden dolayı diş pulpası son zamanlarda bir kök hücre kaynağı olarak dikkat çekmiştir ve klinik uygulamaları araştırılmıştır (Liu J, 2015 ve Yamada Y, 2020). Hayvanlarla karşılaştırıldığında elde edilmesi nispeten daha kolay olduğu için insan diş pulpası kullanılarak birçok araştırma yapılmıştır. Diş pulpasını oluşturan başlıca hücre tipleri; fibroblastlar, odontoblastlar, endotelyal hücreler ve Schwann hücreleridir (Osaki J, 2022).

Dental kök hücreler, Stro-1, CD146, CD106, CD90, CD73 CD29 ve CD13 gibi mezenkimal kök hücre belirteçlerini ifade eder. Ancak CD11b, CD45 ve CD34 gibi hematopoietik kök hücre belirteçlerini ifade etmezler (Aydın S. ve ark, 2019). DP-MSC'ler, kemik iliği mezenkimal kök hücresi (Kİ-MSC) ve adiposit kaynaklı dahil olmak üzere diğer kök hücrelerden daha fazla proliferasyon gösterirler. Hücresel büyüme eğrisinin analizi, DP-MSC'lerin 3 ila 5 gün arasında log fazında kaldığını ve Kİ-MSC'lerin 10 günlük bir süre boyunca DP-MSC'lerden daha uzun bir sürede hücre popülasyonunu arttırmaktadır. Yapılan BrdU hücre proliferasyonu tahlilinde DP-MSC'lerin Kİ-MSC'lere göre daha yüksek proliferasyon yeteneğine sahip olduğunu görülmüştür (Tsutsui TW, 2020).

Diş pulpası kaynaklı kök hücreler tedavi amaçlı olarak gerekli olan bütün özellikleri karşılamasının yanında bu hücreler kolay bir şekilde izole edilebilmektedir. DP-MSC'lerin farklılaşabilme potansiyelleri yüksektir. Dondurma ve çözündürme aşamaları sonrasında bir problem oluşmamaktadır (Todorovic V, 2008).

DP-MSC'ler üzerine araştırma alanı büyük bir potansiyele sahiptir. Hücreler iyi farklılaşma potansiyeli ve kültürlenmesi kolay özelliklere sahip olmakla birlikte aynı zamanda atılan çekilmiş dişlerden de uygun bir şekilde elde edilebilirler. Kİ-MSC'lerle karşılaştırıldığında, çekilmiş dişlerden DP-MSC'lerin elde edilmesi non-invaziv ve daha uygulanabilir (Shi X, 2020). Bu nedenle DP-MSC'ler, son teknoloji araştırma alanında ve rejeneratif tıp uygulamalarının geliştirilmesinde umut verici bir hücre kaynağı oluşturmaktadır (Tsutsui TW, 2020).



Şekil 2.10.1.2.2.1.1. Dental kök hücreler: Dental pulpa kök hücreleri (DPSCs), periodontal ligament kök hücreleri (PDLSCs), dental apikal papilla kök hücreleri (SCAPs), dental apikal folikül prekürsör kök hücreleri (DFPCs), dökülen süt dişlerinde bulunan kök hücreler (SHEDs) ve gingivada bulunan mezenkimal kök hücreler. (GMSCs) (Ansari S, 2017).

2.11. WNT Sinyal Yolağı

Wnt ismi bir fare protoonkogeni olan int1 ve onun drosophiladaki homoloğu olan wingless (wg) geninin isimlerinin birleşmesinden oluşur (Clevers H, 2006). WNT'ler, çok çeşitli hücre tiplerinde hücre kaderi belirleme, farklılaşma, proliferasyon, motilite ve apoptoz gibi çeşitli süreçleri düzenledikleri, çoğunlukla embriyogenezdeki rolleri ile bilinen geniş bir sinyal glikoprotein ailesidir (Boyer A, 2010).

Wnt sinyali ve Wnt sinyal iletim yolunun belirli bileşenleri dişi gelişimi için kritik öneme sahiptir (Vainio S, 1999). Özellikle Wnt-4 yokluğunda, tipik kadın özellikleri bozulması ve testosteron üretimi gibi bazı erkek özelliklerinin görülmesi sebebiyle Wnt-4'ün kadın gelişimini destekleyen önemli bir sinyal olarak tanımlanmaktadır (Heikkilä M, 2005). Wnt ligandları, Wnt genlerinin hormonal regülasyonu, frizzled reseptörleri ve östrus döngüsünün farklı aşamalarında overde eksprese edilen aşağı akış sinyal bileşenleri dahil olmak üzere Wnt sinyal ağının üyelerinin ekspresyonunun normal ovaryum fonksiyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (Hernandez Gifford JA, 2015).

Wnt'ler, heterotrimerik G proteinlerine ve kıvrılmış yedi transmembran reseptörüne bağlanabilen glikoproteinlerdir (Huelsenken J, 2002). Wnt sinyalleri embriyogenez, erişkin dokuların oluşumu ve doku homeostazının sağlanmasının yanında hücre polaritesi, migrasyonu ve proliferasyondahil birçok hücre

fonksiyonun düzenlenmesinde rol almaktadır (Routledge D, 2019). Wnt sinyal yolağı estrasellüler iletim yolu olarak bilinmekte ve yanıt sağlarken temelde lipit ile modifiye edilmiş bir Wnt ligandı ekstrasellüler ve sitoplazma arasında gömülü olarak bulunan reseptör Frizzled (FZD) ve aşağı akış sinyal kaskadının aktifleşmesinde rol oynayan scaffold protein Dishevelled (DVL) kompleksinden oluşmaktadır (Castagnoli L, 2020). Wnt proteinlerinin uzunluğu 350-400 amino asit arasında değişir ve boyutu yaklaşık ~40kDa'dır (Cadigan KM, 1997).

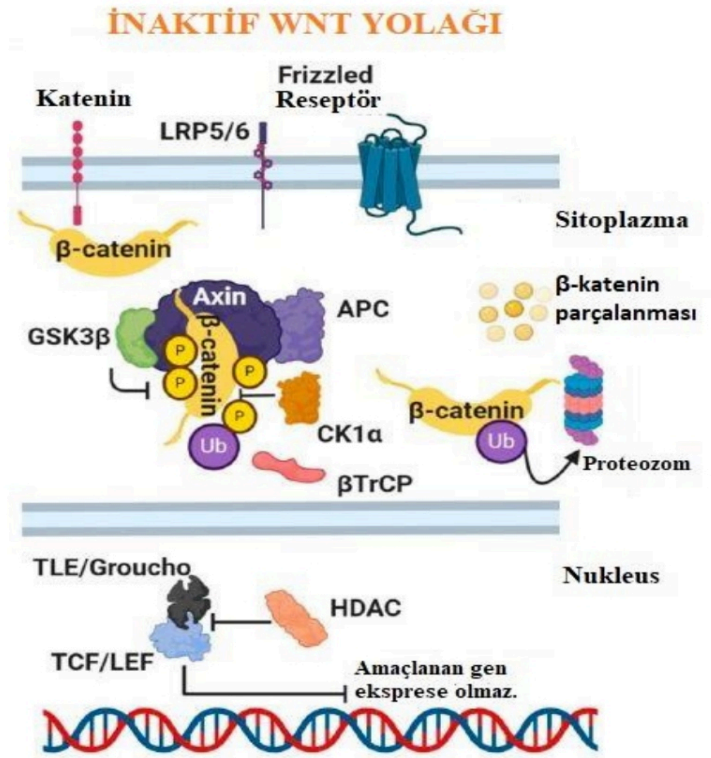
Wnt sinyal iletimi; kanonik (β -katenin bağımlı), kanonik olmayan düzlemsel hücre polaritesi (PCP) ve kanonik olmayan (Wnt/Ca^{+2}) olmak üzere 3 çeşit olarak tanımlanmaktadır (Huelsenken J, 2002). Wnt sinyalleri, hücre kaderinin belirlenmesi için kanonik yola ve hücre hareketinin ve doku polaritesinin kontrolü için kanonik olmayan yola iletilir (Kato M, 2007).

2.11.1. Kanonik (β -katenin bağımlı) Wnt Sinyal İletimi

β -katenin, hücreler arası adezyonun regülasyonda görev alan bir protein olarak keşfedilmiştir ve sitoplazmadan nükleusa geçerek transkripsiyonelregülatör olarak görev yapmaktadır (Kikuchi A, 2011). Sinyal iletimi, Wnt ligandı varlığında aktif formda olurken Wnt ligandı yokluğunda inaktif formda olmaktadır (Stamos JL, 2013).

2.11.1.1. Wnt Sinyali İnaktif Formu

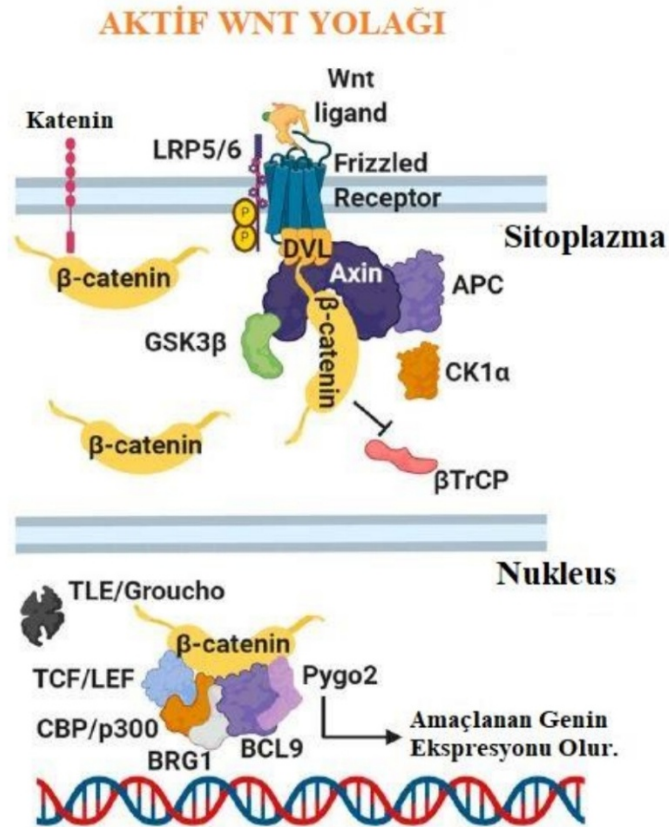
Wnt ligandı yokluğunda, Wnt sinyal yolu inaktiftir ve efektör molekülü β -katenin sitoplazmada bozulur ve inaktif hale getirilir. Spesifik olarak β -katenin, scaffold proteinleri (Axin), tümör baskılayıcı adenomatöz polipoz koli (APC), glikojen sentazkinaz 3 β (GSK-3 β) ve kazein kinaz 1 α 'dan (CK1a) oluşan multiprotein yıkım kompleksi tarafından fosforile edilir. Fosforilasyonunun ardından β -katenin, ubikuitinli gaz kompleksinin bir parçası olan ve proteazom etkisiyle parçalanmış bir protein olan β -transdüsün (β -TrCP) tarafından tanınır (Hagen T, 2002). β -katenin proteininin sitoplazmada parçalanmasıyla hücre nükleusuna ilgili sinyal ulaşmamış olur. Bu sebeple, nükleusta T hücre faktörü/lenfoid arttırıcı faktör (TCF/LEF) ve transdüsün benzeri ayrılmış arttırıcı (TLE/Groucho) tarafından oluşturulan bir kompleksin transkripsiyonunu durdurmak için histon deasetilazları (HDAC) bağlar (Stamos JL, 2013).



Şekil 2.11.1.1.1. Kanonik (β -katenin bağımlı) Sinyal Yolağının İnaktif Formu (Castagnoli L, 2020).

2.11.1.2. Wnt Sinyali Aktif Formu

Aktif Wnt sinyal yolağında, Wnt ligandlarının FZD reseptörlerine ve LRP5/6 koreseptörlerine bağlanmasını takiben aşağı akış sinyal araçlarının alımını tetikler. Bu şekilde Wnt yolağı aktif forma geçer. Spesifik olarak, LRP reseptörleri daha sonra Disheveled (DVL) proteinlerini polimerize oldukları ve aktive oldukları plazma zarına alan CK1 α ve GSK-3 β tarafından fosforile edilir. Böylece sitoplazmada serbest halde bulunan β -katenin proteininin parçalanması engellenmektedir. Nükleer β -katenin, CREB bağlayıcı protein (CBP/p300), Brahma ilişkili Gen 1 (BRG1), B hücreli CLL/lenfoma gibi koaktivatörleri bağlayan TCF/LEF proteinleri ile aktif bir moleküler kompleks oluşturarak TLE/Groucho baskılayıcıların yerini alır. Bu sayede hedef genlerin ekspresyonunun gerçekleşmesine aracılık etmektedir (Metcalf C, 2010).



Şekil 2.11.1.2.1. Kanonik (β -katenin bağımlı) Sinyal Yolağının Aktif Formu (Castagnoli L, 2020).

2.11.2. Kanonik Olmayan Wnt Sinyal İletimi

2.11.2.1. Wnt/Düzlemsel Hücre Polaritesi (PCP)

Düzlemsel hücre polaritesi, organizmanın oluşumunda ve organların gelişiminde önemli rolleri bulunmasının yanı sıra homeostazın sağlanmasında kritik öneme sahiptir. Düzlemsel hücre polaritesi (PCP) hem lokal hem de genel sinyallerin üretilmesi için önemli bir sinyal yolu olarak tanımlanmaktadır. PCP yolağı doku polaritesi ve hücre migrasyonu kontrolü için FZD ve DVL proteinleriyle etkileşim halinde bulunur. Aynı zamanda GTPazproteinleri olan Rac1 ve Rho GTPaz (RHOA) aktive eder. RHOA proteini ise sinyal iletimi için RHO ile ilişkili sarmal-sarmal içeren protein kinaz 1'i (ROCK1) aktive eder. Rac ise Jun N-terminal kinaz (JNK) proteinini aktifleştirerek sinyalin nükleusa geçmesini sağlar. Bu sırada, fosforilat aktive edici transkripsiyon faktörü 2 (ATF2), hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve migrasyondan sorumlu hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu tetikler (Yamamoto S, 2008).

2.11.2.2. Wnt/Ca²⁺ Yolağı

Kanonik olmayan Wnt sinyal yolunun ikinci dalı, Wnt/Ca²⁺ yolağı olarak adlandırılır. Bu sinyal yolağı dorsal eksen oluşumu için kanonik sinyali ve gastrulasyon hücre hareketleri için düzlemsel hücre polaritesi sinyalini modüle eder (Kohn AD, 2005). Wnt/Ca²⁺ sinyalleşmekademesinde, Frizzled reseptörü aracılığıyla Wnt ligandı ve PLC kompleksi, kalmodline bağımlı kinaz II (CaMKII), protein kinaz C (PKC) ve fosfatazkalsinrini aktive eden bir G proteiniyle bağlanır. Bu adımda, diğer sinyal yolaklarının uyarılmasını sağlayan hücre içerisindeki kalsiyum düzeyinde artış görülür (Sheldahl LC, 2003).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Deneysel Hayvanlar ve Premature Over Yetmezliğinin Oluşturulması

Bu araştırma Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından PAUHDEK-2021/38 numarasıyla onaylanmıştır. Çalışmamızda Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 32 adet Wistar Albino erişkin dişi sıçan kullanılmıştır. Deneysel protokolü boyunca; sıçanlar 21 ± 1 °C oda sıcaklığında, rutubeti (65-70%) kontrol edilen 12 saat ışık-karanlık çevrimi olan sessiz bir oda içinde, ayrı kafeslerde tutuldu. Deneysel gruplarına, günlük içme suyu (çeşme suyu) ve standart sıçan yemi (pelet yem) verilerek ad libitum olarak beslendi. Sıçan ağırlıkları (250-350gr) ölçüldükten sonra rastgele olarak 4 gruba ayrılarak işaretlendi.

I.Grup (n:8) Kontrol Grubu (K): Bu gruptaki sıçanlara herhangi bir uygulama yapılmadı.

II.Grup (n:8) Sham Grubu (S): Bu gruptaki sıçanlara intraperitoneal olarak 14 gün boyunca serum fizyolojik uygulandı.

III.Grup (n:8) POY Grubu (POY): CTX ile indüklenen prematüre over yetmezlik oluşturulan hayvan modeli grubu. İlk gün 200mg/kg CTX intraperitoneal olarak enjekte edildi. Devam eden 14 gün boyunca 8 mg/kg CTX intraperitoneal olarak verilmeye devam edildi.

IV.Grup (n:8) Dental pulpa mezenkimal kök hücreleri Grubu (MSC): İlk gün 200mg/kg CTX intraperitoneal olarak enjekte edildi. Devam eden 14 gün boyunca 8 mg/kg CTX intraperitoneal olarak verilmeye devam edildi. CTX ile premature over yetmezliği modeli oluşturulan bu gruba, 15. Günün sonunda sıçan başına 2×10^6 olarak insan kaynaklı DP-MSC 20 µL PBS içerisinde her iki overe lokal olarak uygulanmıştır.

DP-MSC'lerin lokal uygulanmasından 10 gün sonra sıçanlara anestezi uygulanarak over dokusu histopatoloji için toplandı. Sıçanların kan örnekleri alınıp elisa yöntemiyle FSH, LH, AMH değerlerine bakıldı ve istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.2. İnsan Kaynaklı DP-MSC'lerin Çözülmesi ve Hücre Kültürü

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 'Fiberle Güçlendirilmiş Bir Kompozitin Yirmi Yaş Dışından İzole Edilen Pulpal Kök Hücreler Üzerindeki Sitotoksitesinin İncelenmesi' başlıklı Doç. Dr.

Başak Yazkan'ın projesinden elde edilen hem akım sitometriyle hem de farklılaşma deneyleriyle mezenkimal kök hücre olduğunu desteklediğimiz insan DP-MS C'leri kullanıldı. 3. pasajda dondurduğumuz hücreleri bazal medium hazırlayarak steril şartlarda ve 37°C de laminar kabin altında çözdürüldü. T75 flasklara ekilen hücrelerin çoğalması takip edildi.

Bazal medium içeriği;

- 450 ml DMEM (BI, Mem-Alpha, REF01-042- 1A),
- 50 ml %10 FBS (FetalBovine Serum),
- 5 ml Penisilin-streptomisin (Gibco, PenStrep, REF15070-063, ABD),

3.3. Mezenkimal Kök Hücre Karakterizasyonu

Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için akım sitometri analizi ve farklılaşma deneyleri yapıldı. Mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizi yüzey belirteçleri olarak CD73, CD90 ve CD34 yönlerinden yapıldı. Bu hücrelerin akım sitometrik analizleri hematopoetik kök hücre belirteci olan CD34 ve mezenkimal kök hücre belirteci olan CD73, CD90 ekspresyon yönünden değerlendirildi.

Kök hücreler farklılaşma besiyerleri kullanılarak; adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma potansiyelleri analiz edildi. Hücreler farklılaşma prosedürü sonrasında faz kontrast mikroskop altında incelendi.

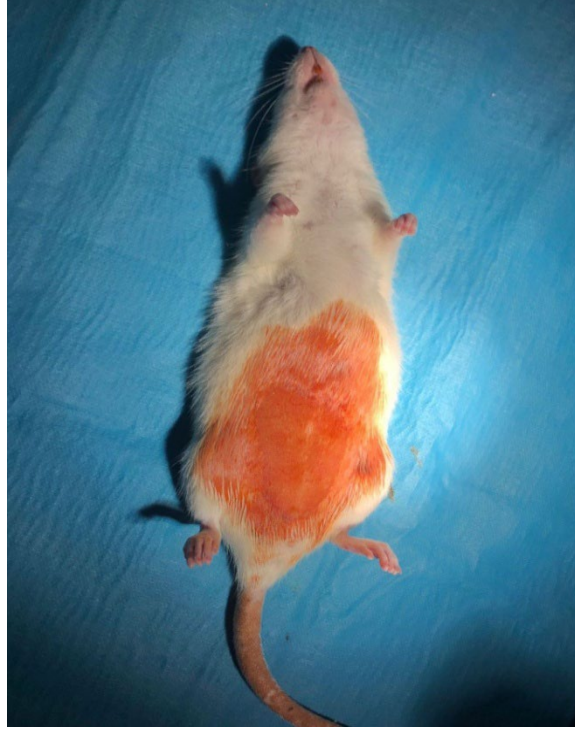
-Adipojenik farklılaşma için Oil Red O boyama,

-Osteojenik farklılaşma için Alizarin Red S boyama,

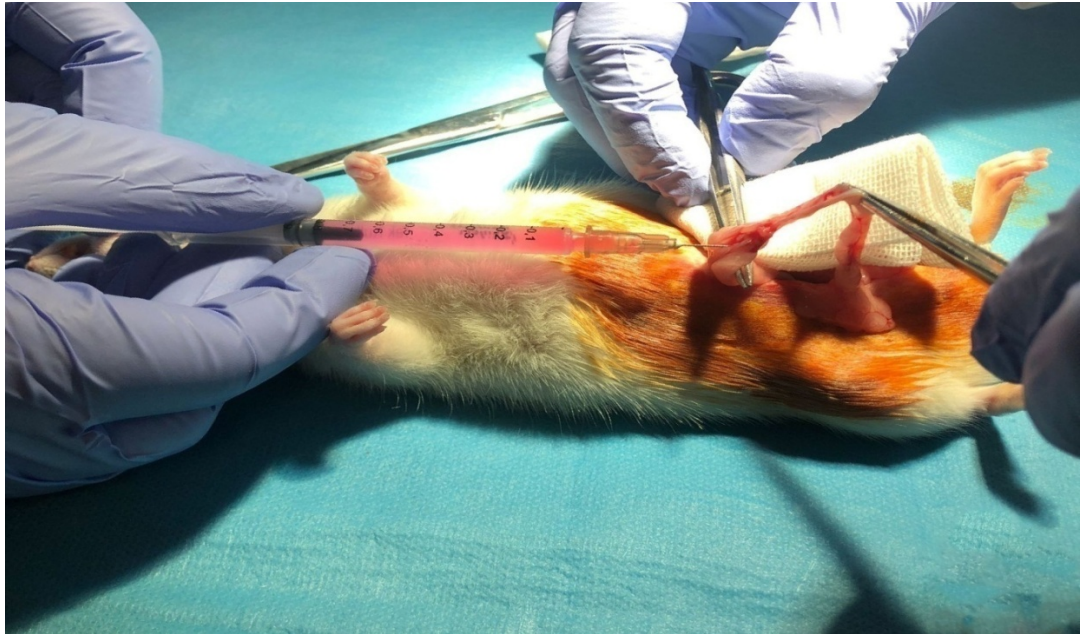
-Kondrojenik farklılaşma için Alcian Mavisi boyama tekniği ile değerlendirildi.

3.4. POY Hayvan Modeline DP-MS C Uygulanması

Deney prosedürü oluşturulduktan sonra MS C grubundaki sıçanlara anestezi işlemi, 50 mg/kg ketamin ve 5-10 mg/kg ksilazin hidroklorid ile intraperitoneal olarak sağlandı. Genel anestezi altındaki sıçanlara, cerrahi işlemin gerçekleştirileceği batın orta hattı traş edildi. Operasyonun gerçekleştirileceği bölge batikon ile temizlendi. Sıçan başına 2×10^6 hücre/mL dozunda mezenkimal kök hücre 20 µl PBS içerisinde her iki overe lokal olarak uygulandı. Deney işlemleri tamamlandıktan sonra bütün sıçanlar kafese alındı ve her sıçana ağrıyı azaltmak için 5 mg/kg dozunda subkutan ketoprofen enjeksiyonu yapıldı.



Şekil 3.4.1. Uygulama Öncesi Hazırlık



Şekil 3.4.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Ovaryum İçine Enjeksiyonu.

3.5. Ovaryum Örneklerinin Alınışı

DP-MSK'lerin lokal uygulamasından 10 gün sonra sıçanlara anestezi uygulanarak servikal dislokasyon ile ötenazi yapıldı. Ötanaziden (servikal dislokasyon) sonra ovaryum kanalı çıkarıldı ve ovaryum toplandı. Ovaryum dokuları fiksatif solüsyonu bulunan kaplara aktarıldı ve etiketlendi.



Şekil 3.5.1. Ovaryum örneklerinin in vivo alınışı (O:Ovaryum, U:Uterus, TU:Tuba Uterina)

3.6. ELİSA Yöntemi

Anestezi uygulanmış farelerden intrakardiyak olarak kanlar toplandı ve tüplere aktarılıp etiketlendi. Örnekler 1 saat oda sıcaklığında inkübe edildi ve 4000 devirde 15 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant toplandı. Elde edilen serumlar ependorflara ayrılarak çalışma gününe kadar -80 derecede etiketlenerek saklandı. Çalışma günü numuneler oda sıcaklığına getirildi. Elde edilen serumlardan Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemi kullanılarak AMH (BT LAB, Rat Mullerian Inhibiting Substance / Anti-Mullerian hormone ELISA Kit), FSH (BT LAB, Rat Follicle-stimulating Hormone ELISA Kit) ve LH (BT LAB, Rat Luteinizing Hormone ELISA Kit) değerlerine bakıldı. Test prosedürüne göre uygulandıktan sonra 450 nanometrede (nm) Biotek Elix800 Mikroplaka okuyucu (BioTek Instruments Inc., USA) kullanılarak

kuyucukların absorbans değerleri okundu. Gen5 data analiz programı ile serum absorbans değerleri kullanılarak konsantrasyonlar hesaplandı.

3.6.1. AMH Ölçümü

Reaktifler ve solüsyonlar kit talimatlarına göre hazırlandı. 25X yıkama tamponu 1X olacak şekilde steril distile su ile seyreltildi. Konsantrede kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı. Çalışmaya başlamadan önce standart solüsyonlar ticari kit prosedürüne göre oluşturuldu. 24 ng/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120 µl standart ve 120 µl standart seyreltici kullanıldı. Sırasıyla 12, 6, 3 ve 1.5 ng/ml solüsyonlar üretmek için standart stok solüsyonu (24 ng/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyreltilerek çift standart kuyucukları oluşturuldu.

Assay Prosedürü:

1. Çalışmaya başlamadan önce kitler, malzemeler ve numuneler oda sıcaklığına getirildi.
2. Testte kullanılacak şeritler kit çerçevesine yerleştirildi. AMH değerinin ölçümü ikili kontrol olarak yapıldı.
3. Standart kuyulara sırasıyla hazırlanan standartlar 50 µl olarak eklendi.
4. Numune kuyularına 40 µl numune eklendi.
5. Numune kuyularına 10 µl anti-AMH antikorı eklendi. (Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyuya antikor eklenmemektedir.)
6. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl streptavidin-HRP eklendi ve plaka kapatıcısıyla kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 5 kez hazırlanan yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama 30 saniye ile 1 dakika süreyle 0,35 ml yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
8. Her kuyuya 50 µl substrat A solüsyonu eklendi.
9. Her kuyuya 50 µl substrat B solüsyonu eklendi.
10. Karanlıkta 37 °C'de 10 dakika boyunca yeni bir plaka kapatıcı ile kaplanmış olarak inkübe edildi.
11. Her kuyucuğa 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi. Solüsyon eklendikten sonra mavi renk sarı renge dönüşmüştür.
12. 450 nm'de mikropilaka okuyucu ile her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.
13. Sonuçlar hesaplanarak analiz edildi.

3.6.2. FSH Ölçümü

Reaktifler ve solüsyonlar kit talimatlarına göre hazırlandı. 25X yıkama tamponu 1X olacak şekilde steril distile su ile seyreltildi. Konsantrede kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı. Çalışmaya başlamadan önce standart solüsyonlar ticari kit prosedürüne göre oluşturuldu. 32 mIU/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120 µl standart ve 120 µl standart seyreltici kullanıldı. Sırasıyla 16, 8, 4ve 2mIU/ml solüsyonlar üretmek için standart stok solüsyonu (32mIU/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyreltilerek çift standart kuyucukları oluşturuldu.

Assay Prosedürü:

1. Çalışmaya başlamadan önce kitler, malzemeler ve numuneler oda sıcaklığına getirildi.
2. Testte kullanılacak şeritler kit çerçevesine yerleştirildi. FSH değerinin ölçümü ikili kontrol olarak yapıldı.
3. Standart kuyulara sırasıyla hazırlanan standartlar 50 µl olarak eklendi.
4. Numune kuyularına 40 µl numune eklendi.
5. Numune kuyularına 10 µl anti-FSH antikoru eklendi. (Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyuya antikor eklenmemektedir.)
6. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl streptavidin-HRP eklendi ve plaka kapatıcısıyla kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 5 kez hazırlanan yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama 30 saniye ile 1 dakika süreyle 0,35 ml yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
8. Her kuyuya 50 µl substrat A solüsyonu eklendi.
9. Her kuyuya 50 µl substrat B solüsyonu eklendi.
10. Karanlıkta 37 °C'de 10 dakika boyunca yeni bir plaka kapatıcı ile kaplanmış olarak inkübe edildi.
11. Her kuyucuğa 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi. Solüsyon eklendikten sonra mavi renk sarı renge dönüşmüştür.
12. 450 nm'demikroplaka okuyucu ile her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.
13. Sonuçlar hesaplanarak analiz edildi.

3.6.3. LH Ölçümü

Reaktifler ve solüsyonlar kit talimatlarına göre hazırlandı. 25X yıkama tamponu 1X olacak şekilde steril distile su ile seyreltildi. Konsantrede kristaller tamamen eriyene kadar hafifçe karıştırıldı. Çalışmaya başlamadan önce standart solüsyonlar ticari kit prosedürüne göre oluşturuldu. 20 mIU/ml standart stok solüsyonu oluşturmak için 120 µl standart ve 120 µl standart seyreltici kullanıldı. Sırasıyla 10, 5, 2.5 ve 1.25 mIU/ml solüsyonlar üretmek için standart stok solüsyonu (20 mIU/ml) 1:2 standart seyreltici ile seri olarak seyreltilerek çift standart kuyucukları oluşturuldu.

Assay Prosedürü:

1. Çalışmaya başlamadan önce kitleler, malzemeler ve numuneler oda sıcaklığına getirildi.
2. Testte kullanılacak şeritler kit çerçevesine yerleştirildi. LH değerinin ölçümü ikili kontrol olarak yapıldı.
3. Standart kuyulara sırasıyla hazırlanan standartlar 50 µl olarak eklendi.
4. Numune kuyularına 40 µl numune eklendi.
5. Numune kuyularına 10 µl anti-LH antikoru eklendi. (Standart çözelti biyotinlenmiş antikor içerdiğinden, standart kuyuya antikor eklenmemektedir.)
6. Numune kuyularına ve standart kuyulara 50 µl streptavidin-HRP eklendi ve plaka kapatıcısıyla kapatılarak 37 °C'de 60 dakika inkübe edildi.
7. İnkübasyon sonrası kuyucuklar 5 kez hazırlanan yıkama tamponu ile yıkandı. Her yıkama 30 saniye ile 1 dakika süreyle 0,35 ml yıkama tamponu ile kuyucuklar yıkandı.
8. Her kuyuya 50 µl substrat A solüsyonu eklendi.
9. Her kuyuya 50 µl substrat B solüsyonu eklendi.
10. Karanlıkta 37 °C'de 10 dakika boyunca yeni bir plaka kapatıcı ile kaplanmış olarak inkübe edildi.
11. Her kuyucuğa 50 µl durdurma (stop) solüsyonu eklendi. Solüsyon eklendikten sonra mavi renk sarı renge dönüşmüştür.
12. 450 nm'demikroplaka okuyucu ile her kuyunun optik yoğunluğu (OD değeri) belirlendi.
13. Sonuçlar hesaplanarak analiz edildi.

3.7. Histolojik Teknikler

3.7.1.Fiksasyon

Nötral tamponlanmış formalin solüsyonu:

- %40'lık formalin.....100ml
- Distile su.....900ml
- Sodyum fosfat, monobazik, monohidrat.....4 gr
- Sodyum fosfat, dibazik, anhidroz.....6.5 gr

Fiksatif için nötral tamponlanmış formalin solüsyonu hazırlanırken distile su, %40'lık formalin, sodyum fosfat monobazik monohidrat ve sodyum fosfat dibazik anhidroz yukarıda belirtilen miktarlarda karıştırılıp, Ph metre ile ölçüm yapılarak Ph değerinin 6,5 olması sağlandı. Her denekten alınan dokular farklı kaplarda olacak şekilde kaplar numaralandırıldı ve etiketlendi. Kaplar içerisine hazırlanan fiksatif solüsyonu eşit miktarlarda aktarıldı. Fiksatif miktarı dokunun en az 100 katı olacak şekilde eklendi. Alınan dokular 7 gün formaldehitte fikse edildi.

3.7.2. Doku Takip Yöntemi

Basamaklar	Yapılan İşlem
1. Basamak	Alınan dokular 7 gün formaldehitte bekletildi.
2. Basamak	Akan suda 1 saat yıkandı
3. Basamak	%50 etil alkolde 1 saat bekletildi
4. Basamak	%70 etil alkolde 1 saat bekletildi
5. Basamak	%80 etil alkolde 1 saat bekletildi
6. Basamak	%90 etil alkolde 1 saat bekletildi
7. Basamak	%100 etil alkolde 1 saat bekletildi
8. Basamak	KsilenI'de 1 saat bekletildi
9. Basamak	KsilenII'de 1 saat bekletildi
10. Basamak	Parafin I'de 1 saat bekletildi
11. Basamak	Parafin II'de 1 gece bekletildi
12. Basamak	Dokular parafin bloklara gömüldü

13. Basamak

Blokler etiketlendi.

Tablo 3.6.1.1. Doku Takibi Basamakları ve Yapılan İşlemler

Doku takibinde kullanılan etil alkol solüsyonları, %100 etil alkol (Ethanol, IsoLab) ve distile su kullanılarak yüzdeler oranlarına göre hesaplanarak hazırlandı.

3.7.3. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi

Parafine gömülen dokular buz kalıbı üzerinde bekletildi ve dokuların etrafında bulunan parafinin katı formda olduğundan emin olundu. Mikrotom cihazı kullanılarak blokler halinde olan dokulardan 5 mikronluk seri kesitler alındı. Kesitler su banyosuna aktarıldı. Su banyosunda 5-10 saniye bekletilen kesitler pozitif yüklü lamlara aktarıldı ve etiketlendi. Lamlara aktarılan dokular daha sonra 3 saat boyunca etüvde tutularak deparafinizasyona uğratıldı. Etüvden alınan dokulara sırasıyla aşağıdaki basamaklardan geçirildi.

Basamaklar	Yapılan İşlem
1. Basamak	Ksilen I' de 30 dakika bekletildi
2. Basamak	KsilenII'de 30 dakika bekletildi
3. Basamak	%100 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
4. Basamak	%90 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
5. Basamak	%80 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
6. Basamak	%70 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
7. Basamak	%50 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
8. Basamak	Distile suda 10 dakika bekletildi
9. Basamak	Hematoksilende 3 dakika bekletildi
10. Basamak	Akan suda 1 dakika yıkandı
11. Basamak	Asit-alkol batırıp çıkarma
12. Basamak	Akan suda yıkandı
13. Basamak	Amonyak batırıp çıkarma
14. Basamak	Akan suda yıkandı
15. Basamak	Eozinde 3 dakika bekletildi
16. Basamak	%50 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
17. Basamak	%70 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
18. Basamak	%80 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
19. Basamak	%90 etil alkol'de 5 dakika bekletildi
20. Basamak	%100 etil alkol'de 5 dakika bekletildi

21. Basamak	KsilenI'de 5 dakika bekletildi
22. Basamak	KsilenII'de 5 dakika bekletildi
23. Basamak	Entellan ile kapatma işlemi yapıldı

Tablo 3.7.3.1. Hematoksilen-Eozin Boyama Yöntemi Basamakları ve Yapılan İşlemler

Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi kullanılan etil alkol solüsyonları, %100 etil alkol (Ethanol, IsoLab) ve distile su kullanılarak yüzdeler oranlarına göre hesaplanarak hazırlandı. Kullanılacak ksilen (XyloI, Isımerengemisch, Supelco) miktarı kaplara alınarak kullanıma hazır hale getirildi. Doku takibi bitiminde lamlara entellan (Merck) damlatıldı ve hava kabarcığı bırakılmayacak şekilde lamellerle kapatıldı. Işık mikroskopunda incelenmeye hazır hale getirildi.

3.7.4. Folikül Sayımı Yöntemi

Doku takibi yapıp ovaryum dokuları parafin bloklara gömüldükten sonra mikrotom cihazıyla 5 mikronluk kesitler alındı. Bütün sıçanların ovaryum dokularından 1., 5. ve 10. kesitler su banyosunda bekletildikten sonra pozitif yüklü lamlara alındı ve taşıma sepetine yerleştirildi. Hematoksilen-Eozin boyama prosedürü uygulandıktan sonra ışık mikroskobu ile folikül sayımı yapıldı. Folikül sayımında primordial, primer, sekonder, tersiyer ve atretikfoliküllerin sayımı yapıldı. **Tablo 3.7.4.1.**'de belirtilen kriterlere göre ovaryum kesitlerinde folikül sınıflandırması yapıldı.

Her bir sıçan ovaryumundan alınan 1., 5. ve 10. kesitlerde bulunan foliküller sayıldı ve toplandı. Ayrıca overlerde bulunan korpus luteum ve folikül kistlerinin de sayımı yapıldı. Azalmış granüloza hücre tabakası ve kalın tekainterna tabakası ile içi sıvı dolu büyük yapılar folikül kisti olarak değerlendirildi.

Folikül Tipi	Morfolojik Özellikler
Primordial Folikül	Oositin etrafı tek katlı yassı granüloza hücreleri ile çevrili olan foliküller
Primer Folikül	Oositin etrafı tek katlı kübik granüloza hücreleri ile çevrili olan foliküller
Sekonder Folikül	Oosit tek tabakadan fazla kübik granüloza hücreleri ile çevrili ve çok katlı granüloz hücreleri arasında antral boşluk bulunmayan foliküller
Tersiyer (Graaf) Folikül	Oositin etrafı çok tabakalı kübik granüloza hücreleri ile çevrili ve bir ya da daha fazla antum boşluğu ve muhtemelen kumulus ooforus, teka tabakası içeren foliküller
Atretik Folikül	Ovulasyon olmadan dejenerasyon sürecine girmiş folikül, oosit nükleusu küçülüp büzülmüş, kromozomlar ve sitoplazma erimiş, granüloza hücre tabakası azalmış ve foliküler membran hücreleri hipertrofik olan şekilde değerlendirilmiştir.

Tablo 3.7.4.1. Foliküllerin sınıflandırılmasında kullanılan kriterler (Çil N, 2021; Springer LN, 1996; Mayer LP, 2002; Myers M, 2004).

3.7.5. İmmunohistokimyasal Boyama Yöntemi

Over dokularında Wnt-1, Wnt-4 ve β -katenin ekspresyonu için immunohistokimyasal boyama protokolü uygulanmıştır. Protokol için bloklanan dokulardan, mikrotom cihazıyla 5 μ m'lik kesitler alındı ve kesitler su banyosuna aktarıldı. Kesitler, su banyosundan pozitif yüklü lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.

Uygulanan protokol sırasıyla aşağıdaki gibidir:

- 1) Lam taşıma sepeti 1 gece etüvde bekletildi.
- 2) Kesitlerde 1 saat deparafinizasyon işlemi için bekletildi.
- 3) Kesitler sırasıyla %100, %90, %80, %70, %50 azalan etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletilerek rehidrasyon işlemi sağlandı.
- 4) Distile su ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
- 5) Antijen retrieval işlemi ısıyla sağlandı. Hazırlanan sodyum sitratbuffer (1 L distile su, 2.94 gr tri-sodium citrate, 0,5 mL Tween 20, pH 6,0) içerisine alınarak

mikrodalgaya konuldu. Kaynamaya başladıktan sonra 5 dakika beklendi ve çıkartılıp soğutuldu.

- 6) PAP pen ile dokuların etrafı yuvarlak şekilde çizildi.
- 7) Phosphate Buffered Saline (PBS) (PBS 10X, BioWhittaker, Lonza) ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
- 8) Dokulardaki endojenperoksidaz aktivitesi, % 30'luk H₂O₂ (450 ml absolut metanol-IsoLab, 50 ml hidrojen peroksit solüsyonu-IsoLab) ile 10 dakikalık uygulama ile ortadan kaldırıldı.
- 9) PBS ile 3 kez 5 dakika süreyle yıkandı.
- 10) Sekonder kitin immün blok solüsyonu (Seytek Laboratories) pappen ile sınırlandırılmış doku üzerine damlatılıp bekletildi.
- 11) Primer antikolar datasheette yazıldığı şekilde distile su ile dilüe edildi. Kesitlerin bulunduğu lamlar üzerine seçili primer antikolar damlatılarak 1 gece karanlık ortam oluşturularak inkübasyona bırakıldı. Bu çalışmada kullanılan primer antikolar; Wnt-1 (Biossantibodies, bs-1739R,dilüe1:300, USA), Wnt-4 (Bioss antibodies, bs-6134R,dilüe 1:300, USA) ve β -katenin (Bioss antibodies, bs-1165R,dilüe 1:300, USA)'dir.
- 12) Kesitler PBS ile 3 kez 5 dakika yıkandı.
- 13) Primer antikolarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikor (Scy Tek Lab. Anti-Polyvalent Biotinylated Antibody) damlatılıp 40 dakika bekletildi.
- 14) PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 15) Biotinlenmiş sekonder antikorla kolayca bağlanabilen horse radish peroksidaz konjugatı streptavidin (Scy Tek Lab, HRP-SA) dokuların üzerine damlatılarak 40 dakika bekletildi.
- 16) Kesitler PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 17) Kromojen boyası için DAB (1 ml substrat, 2 damla kromojen) hazırlandı. Lamaların üzerinde bulunan kesitlere DAB (Thermo Scientific) damlatılıp 15 dakika karanlık ortamda bekletildi.
- 18) Distile su ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 19) Antijen lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için hematoksilin (BesLab) ile 10 saniye muamele edilerek zıt boyama yapıldı.
- 20) Akan suda yıkandı.
- 21) Kesitler sırasıyla %50, %70, %80, %90, %96 ve %100'lük artan etil alkol serilerinde 2'şer dakika bekletildi.
- 22) KsilenI'de 2 dakika bekletildi.
- 23) KsilenII'de 2 dakika bekletildi.

24) Lamalara entellan (Merck) damlatıldı ve hava kabarcığı bırakılmayacak şekilde lamellerle kapatıldı.

İmmünohistokimyasal reaksiyonlar, ışık mikroskobu ile incelendi. Wnt-1, Wnt-4 ve β -katenin'e karşı immünoreaktivite, kahverengi rengin yoğunluğuna göre ayrı ayrı değerlendirildi. Koyu kahverengi güçlü immünoreaktivite (+++), açık kahverengi zayıf immünoreaktivite (+) olarak puanlandı ve koyu kahverengi ile açık kahverengi arasındaki bir ara renk, orta immünoreaktivite (++) olarak puanlandı. Kahverengi ile boyanmayan yerler negatif (-) olarak puanlandı.

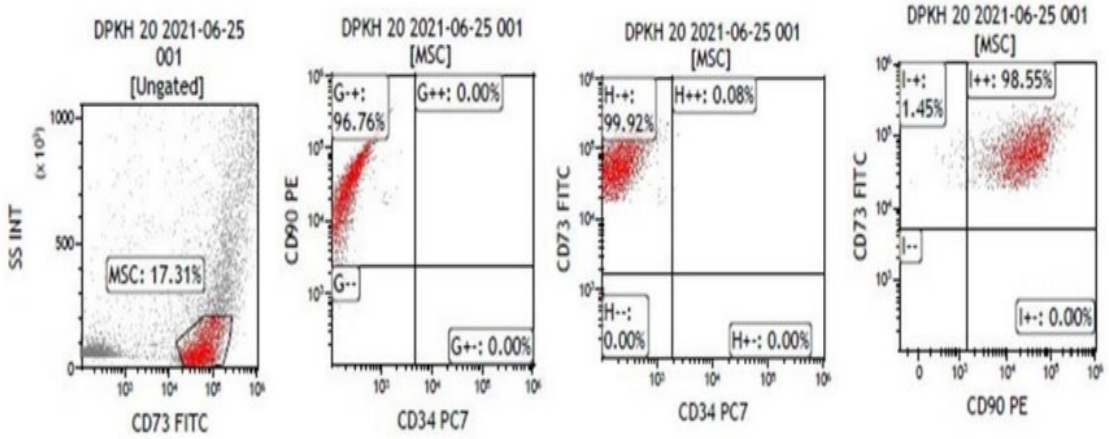
3.8. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.) paket programıyla analiz edildi. Sürekli değişkenler ortalama \pm standart sapma, ortanca (25 ve 75.yüzdellikler), en küçük-en büyük değerler ve kategorik değişkenler ise sayı ve yüzde olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Bağımsız grup incelemelerinde; Parametrik test varsayımları sağlandığında Tek Yönlü Varyans Analizi (post hoc: Tukey testi), parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise Kruskal Wallis Varyans Analizi (post hoc: Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi) kullanıldı. Ölçümler arasındaki farklılıkların karşılaştırılmasında parametrik test varsayımları sağlandığında İki Eş Arasındaki Farkın Önemlilik Testi, parametrik test varsayımları sağlanmadığında ise Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi kullanıldı. Tüm analizlerde $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

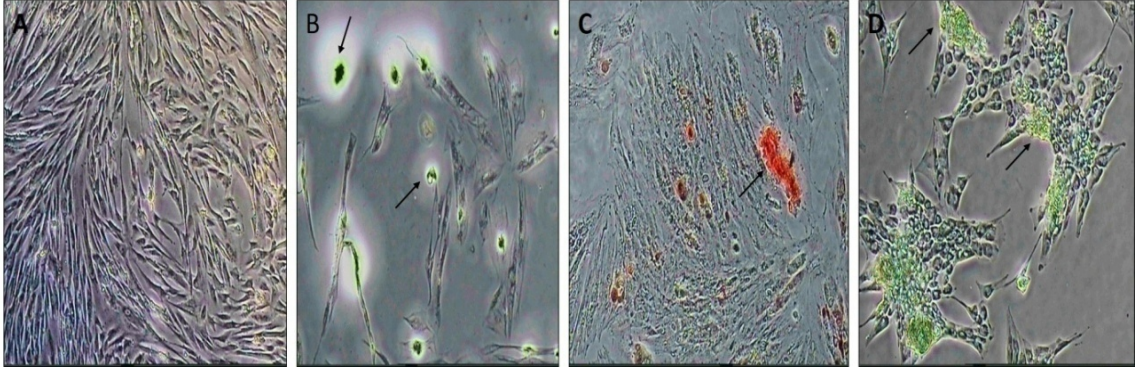
4.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Karakterizasyonu

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen ‘Fiberle Güçlendirilmiş Bir Kompozitin Yirmi Yaş Dışından İzole Edilen Pulpal Kök Hücreler Üzerindeki Sitotoksitesinin İncelenmesi’ başlıklı projeden elde edilen Mezenkimal Kök Hücrelerin Akım sitometri analizi yüzey belirteçleri olarak CD73, CD90 ve CD34 yönlerinden yapılmıştır. Bu hücrelerin akım sitometrik analizleri sonucunda hematopoetik kök hücre belirteci olan CD34 işaretlerini yüzeylerinde göstermedikleri görüldü. Aynı zamanda bu hücrelerde mezenkimal kök hücre işareti olan CD90 (%96.76) ve CD73’ü (%99.92) yüzeylerinde eksprese ettikleri görüldü (Şekil 4.1.1).



Şekil 4.1.1. İnsan DP-MSC’lerin Flow Sitometri Bulguları: CD34 (% 0.08) negatif ekspresyon gösterirken, MSC’lara özgü CD90 (%96.76) ve CD73 (%99.92) pozitif olduğu saptandı.

Flow sitometri analizine ek olarak yapılan farklılaşma deneyleri sonucunda kök hücrelerin adipojenik, kondrojenik ve osteojenik farklılaşma potansiyeli olduğu gösterilerek, elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu akım sitometri analiz sonuçlarına destek olarak gösterilmiştir (Şekil 4.1.2).



Şekil 4.1.2. İnsan DP-MSC'lerin adipojenik, osteojenik ve kondrojenik dokulara farklılaşması. İnsan DP-MSC'nin normal görüntüsü (A), adipojenik farklılaşmanın Oil red boyama ile gösterimi (B), osteojenik farklılaşmanın Alizarin red boyama ile gösterimi (C) ve kondrojenik farklılaşmanın Alsian mavisi boyama ile gösterimi (D), X20, inverted mikroskop.

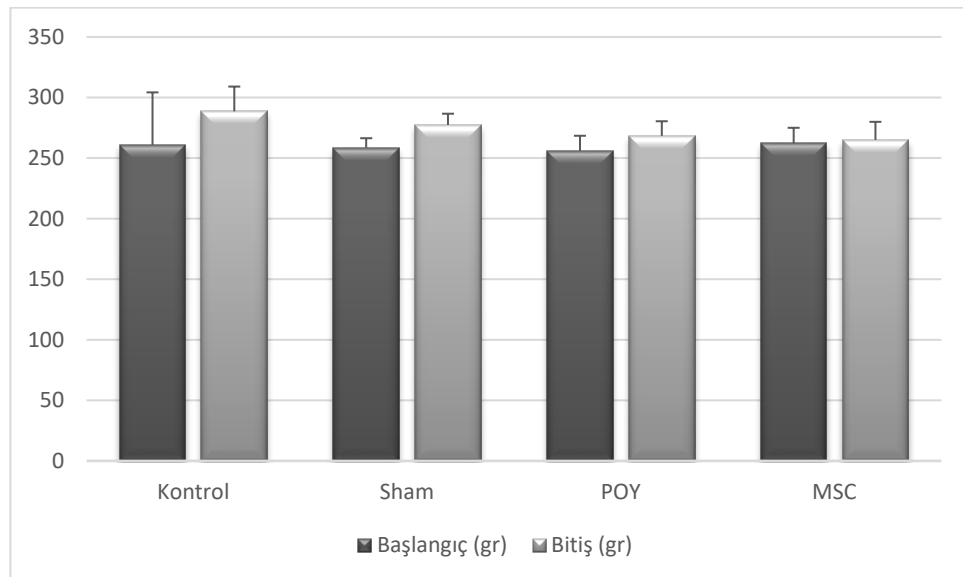
4.2. Hayvan Ağırlıkları Bulguları

Deney başlangıcında sıçanlar rastgele 4 gruba ayrıldı ve tartıldı. Kontrol grubundaki sıçanların başlangıçtaki ortalama vücut ağırlığı 260.8 ± 43.45 gr, sham grubunun başlangıçtaki ortalama vücut ağırlığı 258.43 ± 7.98 gr, POY grubunun başlangıç ortalama ağırlığı 256 ± 12.43 gr ve MSC grubunun başlangıçtaki ortalama vücut ağırlığı 262.1 ± 12.91 gr olarak ölçüldü. Grupların başlangıç ağırlıkları karşılaştırıldığında, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($p > 0,05$). Deney bitiminde ortalama vücut ağırlıkları kontrol grubunda 288.6 ± 20.44 gr, sham grubunda 277.43 ± 9.2 gr, POY grubunda 268.33 ± 12.08 gr ve MSC grubunda 265 ± 14.93 gr olarak ölçüldü. Grupların deney sonundaki vücut ağırlıkları karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın ortaya çıktığı görüldü. Kontrol grubunun bitiş ağırlığı, MSC grubunun bitiş ağırlığına göre anlamlı olarak daha yüksek saptandı ($p = 0.024$). Gruplar arasında vücut ağırlığı değişimi karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptandı. Sham grubunun vücut ağırlığı değişimi, MSC grubuna göre anlamlı olarak yüksek saptandı ($p = 0.029$). Gruplara ait deney başlangıç ağırlıkları, deney sonundaki vücut ağırlıkları ve vücut ağırlığı değişiklikleri yönünden karşılaştırılması **Tablo 4.2.1'** de gösterilmiştir.

Tablo 4.2.1. Gruplara ait deney başlangıç ağırlıkları, deney sonundaki vücut ağırlıkları ve vücut ağırlığı değişimlerinin karşılaştırılması.

Deney grupları		Başlangıç ağırlığı (gr)	Bitiş ağırlığı (gr)	Vücut ağırlığı değişimi (gr)
K	A.O.±S.S	260.8±43.45	288.6±20.44	27.8±35.18
	Med (IQR)	273 (219.5-296)	296 (267.5-306)	35 (-6.5-58.5)
	min-maks	192-297	260-308	22-68
S	A.O.±S.S	258.43±7.98	277.43±9.2	19±7.81 ^b
	Med (IQR)	255 (253-265)	277 (268-286)	19 (13-24)
	Min-maks	249-271	265-290	9-33
POY	A.O.±S.S	256±12.43	268.33±12.08	12.33±9.5
	Med (IQR)	250 (245-266)	270 (259-281)	12 (4-18.5)
	min-maks	244-279	248-283	4-31
MSC	A.O.±S.S	262.1±12.91	265±14.93 ^a	2.9±15.41
	Med (IQR)	260 (252-268.5)	262 (257.5-272.5)	-2.5 (-5-10)
	min-maks	247-292	245-292	-13-42
p değeri		p>0,05	p=0.024	p=0.029

p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25.-75. Yüzdeler); min – maks: En küçük – en büyük değerler. a: Kontrol grubuna göre anlamlı farklılık vardır (p=0.024) b: POY grubuna göre anlamlı farklılık vardır (p=0.029).



Şekil 4.2.1. Gruplara ait deney başlangıç ağırlıkları ve deney bitiş ağırlıklarının karşılaştırılması.

4.3. Serum AMH, FSH ve LH Ölçümleri

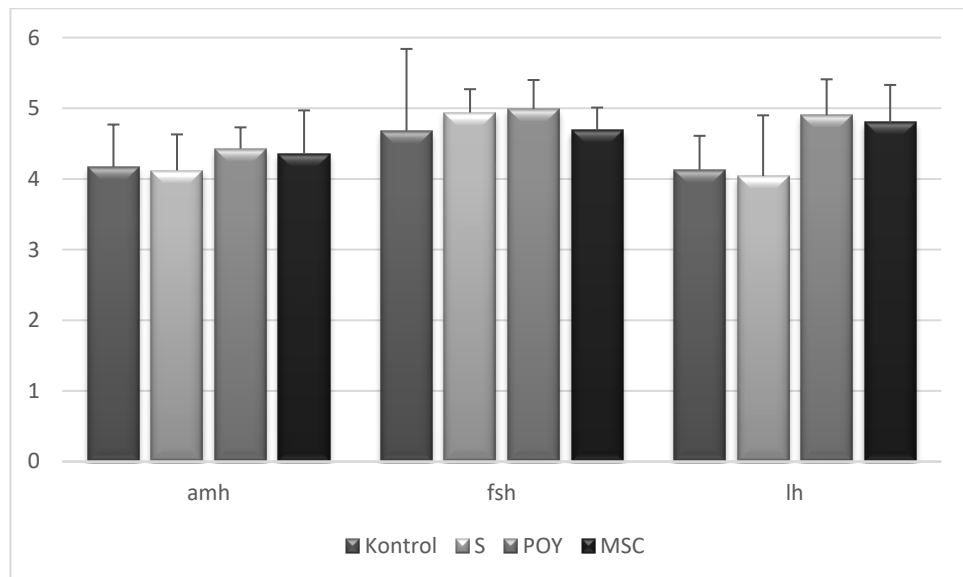
Deney gruplarına ait serum AMH, FSH ve LH düzeylerinin karşılaştırılması

Tablo 4.3.1' de gösterilmiştir. Bu bulgulara göre:

Tablo 4.3.1. Deney gruplarına ait serum AMH, FSH ve LH düzeylerinin karşılaştırılması.

Deney grupları		AMH (ng/ml)	FSH (mIU/ml)	LH (mIU/ml)
K	A.O.±S.S	4.17±0.6	4.68±1.16	4.13±0.48
	Med (IQR)	4.23 (3.67-4.64)	5.02 (3.7-5.49)	4.15 (3.7-4.56)
	min-maks	3.23-4.83	2.69-5.49	3.5-4.79
S	A.O.±S.S	4.12±0.51	4.94±0.33	4.04±0.86
	Med (IQR)	3.86 (3.71-4.59)	4.91 (4.86-5.01)	4.34(3.42-4.81)
	min-maks	3.58-4.93	4.43-5.56	2.69-4.93
POY	A.O.±S.S	4.43±0.3	4.99±0.41	4.9±0.51 ^a
	Med (IQR)	4.34 (4.22-4.68)	5.19 (4.53-5.33)	4.86 (4.48-5.3)
	min-maks	3.98-4.97	4.41-5.46	4.11-5.76
MSC	A.O.±S.S	4.36±0.61	4.69±0.32	4.8±0.53
	Med (IQR)	4.55 (4.13-4.77)	4.72 (4.51-4.92)	4.97 (4.53-5.1)
	min-maks	2.81-4.86	4.01-5.19	3.67-5.57
		p>0,05	p>0,05	p=0.017

p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25.-75. Yüzdeler); min – maks: En küçük – en büyük değerler. a: S grubuna göre anlamlı farklılık (p=0.017).



Şekil 4.3.1. Deney gruplarına ait serum AMH, FSH ve LH düzeylerinin karşılaştırılması.

Deney gruplarında incelendiğinde serum AMH düzeyi en yüksek olarak mezenkimal kök hücre uygulanan MSC grubunda (4.36 ± 0.61 ng/ml) saptanmıştır. Grupların serum AMH düzeyleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır ($p > 0,05$).

Grupların serum FSH düzeyleri karşılaştırıldığında gruplar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir ($p > 0,05$). Serum FSH düzeyi en düşük 4.68 ± 1.16 mIU/ml olarak kontrol grubunda görülürken en yüksek serum FSH seviyesi 4.99 ± 0.41 mIU/ml olarak POY grubunda saptandı.

Serum LH düzeyleri değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır ($p = 0.017$). Sham grubunda 4.04 ± 0.86 mIU/ml olarak POY grubuna (4.9 ± 0.51 mIU/ml) göre daha düşük olduğu görüldü. FSH değeri gibi LH değeri de POY grubunda diğer deney gruplarına göre en yüksek seviyede olduğu görülmüştür.

4.4. Folikül Sayımı Bulguları

Deney gruplarının primordial folikül sayıları değerlendirildiğinde; kontrol grubunda 19.8 ± 3.9 , sham grubunda 24.57 ± 4.72 , POY grubunda 10.67 ± 2.18 ve MSC grubunda 20 ± 2.36 olarak bulundu. Deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, primordial folikül sayısı yönünden gruplar arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. Sham ve MSC grubundaki primordial folikül sayısı POY grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p = 0.0001$).

Grupların primer folikül sayısı değerlendirildiğinde; kontrol grubunda 8.2 ± 1.92 , sham grubunda 9.43 ± 2.07 , POY grubunda 5.56 ± 2.24 ve MSC grubunda 10.4 ± 3.75 olarak belirlenmiştir. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p = 0.006$). POY grubunda bulunan primer folikül sayısı sham ve MSC grubuna göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur.

Sekonder folikül sayıları kontrol grubunda 7 ± 4.3 , sham grubunda 7.29 ± 3.4 , POY grubunda 5.78 ± 3.27 ve MSC grubunda 11 ± 2.79 olarak belirlenmiştir. Deney grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında, sekonder folikül sayısı yönünden gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmuştur ($p = 0.013$). Mezenkimal kök hücre uygulanan MSC grubundaki sekonder folikül sayısı POY grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır.

Deney gruplarının tersiyer folikül sayısı değerlendirildiğinde; kontrol grubunda 6.2 ± 1.92 , sham grubunda 4 ± 1.83 , POY grubunda 1.44 ± 1.67 ve MSC grubunda 6.6 ± 3.57 olarak görüldü. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında tersiyer folikül sayısı yönünden anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0.001$). POY grubunda bulunan tersiyer folikül sayısı, kontrol ve MSC grubuna göre anlamlı olarak daha düşük belirlenmiştir.

Gruplarda atretik folikül sayısı değerlendirildiğinde; kontrol grubunda 3.8 ± 0.84 , sham grubunda 2.71 ± 1.38 , POY grubunda 13.89 ± 4.01 ve MSC grubunda 5.5 ± 1.43 adet atretik folikül bulundu. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında atretik folikül sayısı yönünden anlamlı farklılık bulunmuştur ($p=0.0001$). POY grubunda bulunan atretik folikül sayısı diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır.

Deney gruplarında bulunan korpus luteum sayıları incelendiğinde; kontrol grubunda 26 ± 4 sham grubunda 22.86 ± 5.67 , POY grubunda 20.11 ± 7.41 ve MSC grubunda 28.6 ± 5.34 adet korpus luteum bulundu. Gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında istatistiksel olarak korpus luteum sayısında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.029$). MSC grubunda bulunan korpus luteum sayısı POY grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır.

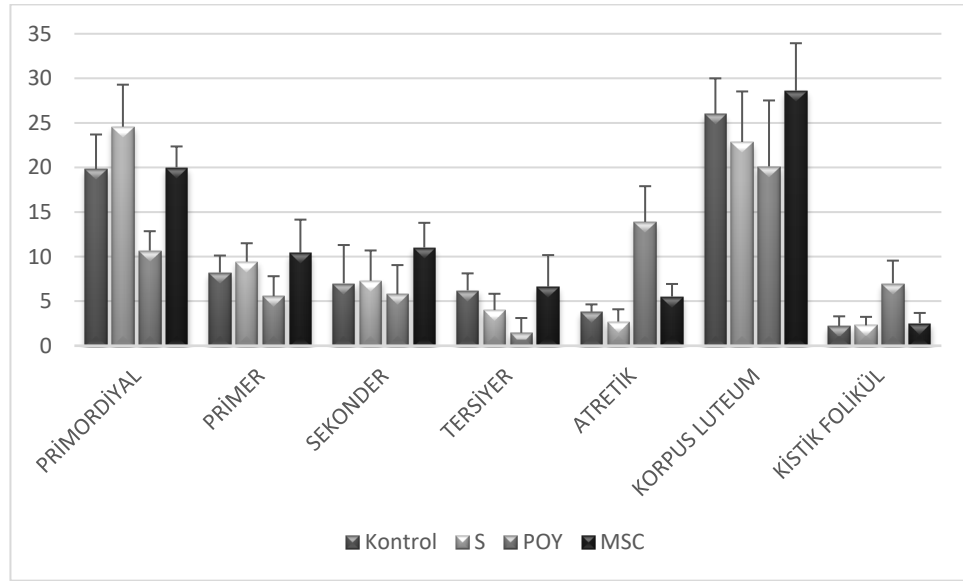
Gruplarda bulunan kistik foliküllerin sayısı incelendiğinde; kontrol grubunda 2.2 ± 1.1 , sham grubunda 2.29 ± 0.95 , POY grubunda 7 ± 2.55 ve MSC grubunda 2.5 ± 1.18 adet kistik folikül bulundu. Gruplar kendi aralarında incelendiğinde istatistiksel olarak kistik folikül sayısında anlamlı farklılık bulundu ($p=0.001$). POY grubunda bulunan kistik folikül sayısı diğer gruplara göre anlamlı olarak daha yüksek saptanmıştır.

Deney gruplarına ait primordial, primer, sekonder, tersiyer, atretik, korpus luteum ve kistik folikül sayısının karşılaştırması **Tablo 4.4.1'** de gösterilmiştir.

Tablo 4.4.1. Deney gruplarına ait primordial, primer, sekonder, tersiyer, atretik, korpus luteum ve kistik folikül sayılarının karşılaştırılması.

		Primordial Folikül	Primer Folikül	Sekonder Folikül	Tersiyer Folikül	Atretik Folikül	Korpus Luteum	Kistik Folikül
K	A.O.±S.S Med(IQR) min-maks	19.8±3.9 20 (16.5- 23) 16-26	8.2±1.92 8 (6.5-10) 6-11	7±4.3 7 (3.5-10.5) 3 - 14	6.2±1.92 ^b 6 (4.5- 8) 4 - 9	3.8±0.84 ^b 4 (3- 4.5) 3 - 5	26 ± 4 25 (23-29.5) 2 -32	2.2±1.1 ^b 3 (1-3) 1 - 3
S	A.O.±S.S Med(IQR) min-maks	24.57±4.72 ^b 24 (22-28) 16 - 30	9.43±2.07 ^b 9 (-10) 6 - 13	7.29±3.4 7 (5 - 9) 4 - 14	4±1.83 4 (3-5) 1 -7	2.71±1.38 ^b 3 (1 - 4) 1 - 4	22.86±5.67 23 (17- 29) 15 - 30	2.29±0.95 ^b 3 (1 - 3) 1 - 3
P O Y	A.O.±S.S Med(IQR) min-maks	10.67±2.18 ^{a, c} 11 (8 - 13) 8 - 13	5.56±2.24 ^{a, c} 6 (4 - 7.5) 1 - 8	5.78±3.27 ^a 5 (3 - 8.5) 2 - 12	1.44±1.67 ^{a, d} 1 (0 - 2.5) 0 - 5	13.89±4.01 ^{a, c, d} 13(10.5 - 17.5) 10 - 21	20.11±7.41 ^a 18 (15.5-27) 9 - 32	7±2.55 ^{a, c, d} 7 (4.5-9.5) 3 - 10
M S C	A.O.±S.S Med(IQR) min-maks	20±2.36 ^b 19 (18-22.25) 17 - 24	10.4±3.75 ^b 10.5 (7.5-12.25) 5 - 18	11±2.79 ^b 11 (8.75-12.25) 7 - 17	6.6±3.57 ^b 6 (4- 9.5) 1 - 13	5.5±1.43 ^b 6 (4- 6.25) 4 - 8	28.6±5.34 ^b 29 (23.5 - 33.5) 22 - 37	2.5±1.18 ^b 2 (2-3.25) 1 - 5
Gruplar arası p;		0.0001*	0.006*	0.013*	0.001*	0.0001*	0.029*	0.001*

*p<0.05 istatistiksel olarak anlamlı farklılık; A.O: Aritmetik ortalama; S.S: Standart Sapma; Med (IQR): Ortanca (25.-75. Yüzdeler); min – maks: En küçük – en büyük değerler. a: MSC grubuna göre anlamlı farklılık; b: POY grubuna göre anlamlı farklılık; c: S grubuna göre anlamlı farklılık; d: Kontrol Grubuna göre anlamlı farklılık.



Şekil 4.4.1. Deney gruplarına ait primordial, primer, sekonder, tersiyer, atretik, korpus luteum ve kistik folikül sayısının karşılaştırması.

4.5. Mikroskopik Bulgular

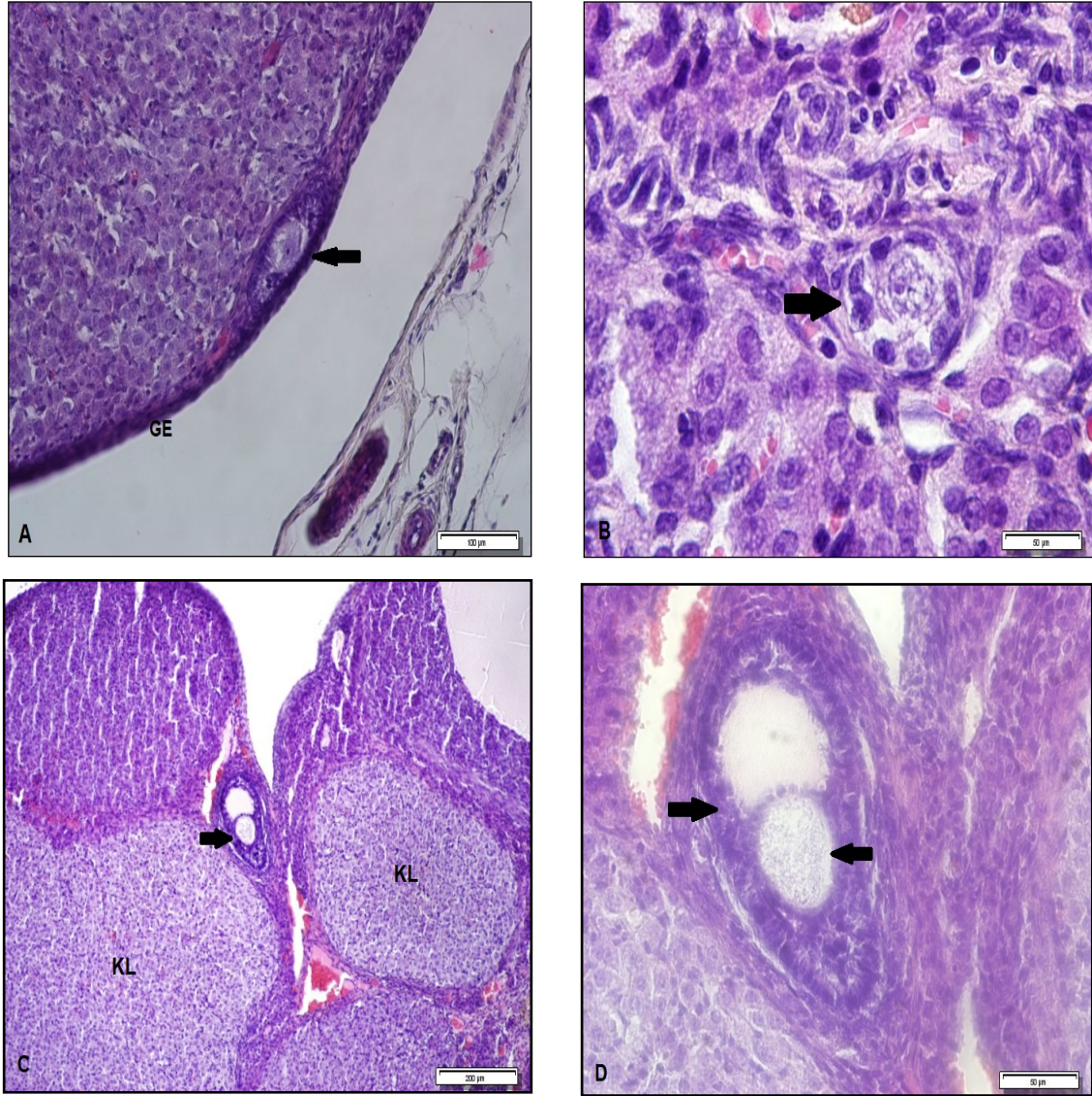
4.5.1. Kontrol Grubu

Kontrol grubuna ait ovaryum preparatları incelendiğinde ovaryum korteksini en dışta bulunan tek katlı kübik epitel yapısındaki germinal epiteli düzenli olarak gözlemlendi. Germinal epitel altındaki yoğun bağ doku özelliğine sahip tunika albuginea tabakası yer almaktadır. Bu tabakanın altında korteks bölgesinde farklı gelişim aşamasında olan foliküller gözlemlendi.

Over korteksinde foliküllerin çevresinde hücreden zengin bağ dokusu yapısında olan stroma yer almaktaydı. Korteksin tunika albugineaya yakın bölümünde primordial foliküller bulunmaktaydı. Primordial foliküllerin iç kısmında oosit ve oositin çevresinde tek katlı yassı granuloza hücreleri yer almaktaydı. Primordial foliküllere ek olarak primer foliküller de ovaryumun korteks kısmında yer almaktaydı. Granuloza hücrelerinin aralarında boşluk bulunan ve oositin merkezde bulunduğu sekonder foliküller gözlemlendi. Bu yapılara ek olarak geniş bir antruma sahip, kumulus ooforus ve oositin çevresindeki zona pellusida'yı çevreleyen korona radiata yapısı bulunan tersiyer foliküllerin varlığı da saptanmıştır.

Kesitlerde farklı gelişim aşamasında olan foliküllere ek olarak birçok sayıda korpus luteum yapıları da bulunmaktadır. Foliküller ve korpus luteum yapıları bağ

dokusu karakterinde olan stroma ile çevrelenmişti. Ovaryumun medullasında kortekse göre daha az sayıda hücre olmasına karşın damarlanmanın fazla olduğu belirgindi (**Şekil 4.5.1.1**).

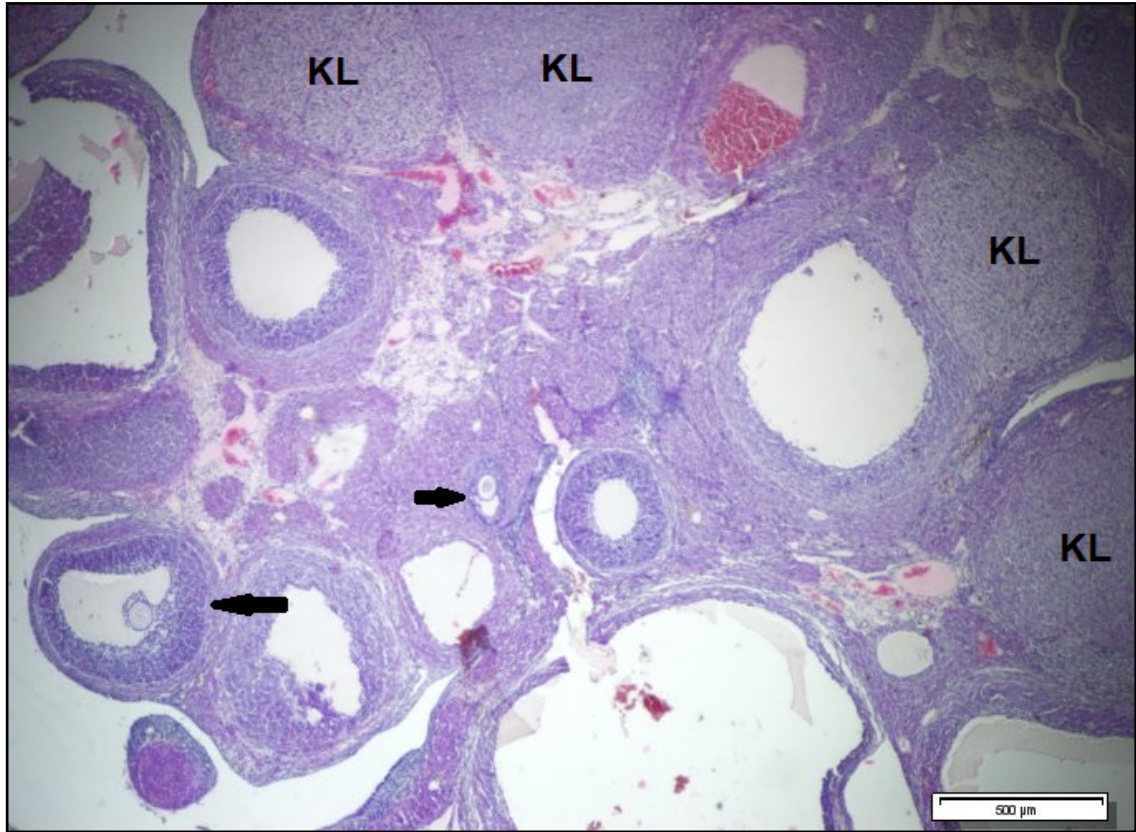


Şekil 4.5.1.1. Kontrol grubuna ait over kesiti, **A**; Ovaryum korteksinde bulunan sekonder folikül (\leftarrow), ovaryumun dış kısmında bulunan germinal epitelyum (GE) H&E, Bar 100 μ m, **B**; Kortekste bulunan primordial folikül (\rightarrow) H&E, Bar 50 μ m, **C**; Ovaryum korteksinde bulunan sekonder folikül (\rightarrow), Korpus Luteum (KL) H&E, Bar 200 μ m, **D**; Sekonder folikülde bulunan oosit (\leftarrow), kübik özellikte granüloza hücreleri (\rightarrow) H&E, Bar 50 μ m.

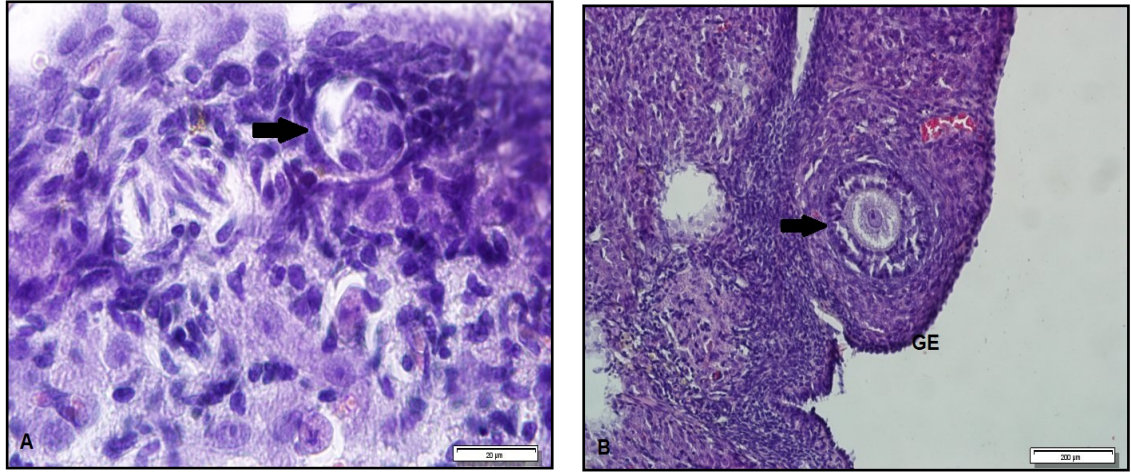
4.5.2. Sham Grubu

İntraperitoneal olarak 14 gün boyunca serum fizyolojik uygulanan sıçanlardan alınan ve H&E ile boyanan ovaryum kesitleri incelendiğinde, primordial, primer, sekonder ve tersiyer foliküllerin overin korteks bölgesinde yer aldığı ve kontrol grubuyla benzer olduğu saptandı (**Şekil 4.5.2.1, 4.5.2.2**). Serum fizyolojik uygulanan grubun over kesitlerinde yer alan korpus luteumun yapı ve sayısal olarak kontrol grubuna benzerdi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında ovaryumda atretik folikül sayısında artış gözlenmedi. Kistik folikül sayısı kontrol grubuyla benzer izlendi (**Şekil 4.5.2.1**).

Over medullasında kortekse göre daha büyük kan damarları ve lif yapıları bulunmaktaydı. Medulla bölgesinde yer alan stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlenmedi (**Şekil 4.5.2.1**).



Şekil 4.5.2.1. Sham grubuna ait over kesiti; kortekste bulunan tersiyer folikül (←), kortekste bulunan sekonder folikül (→) ve korpus luteum (KL) yapıları, H&E, Bar 500µm.



Şekil 4.5.2.2. Sham grubuna ait over kesiti, **A**; kortekste yer alan primordial folikül (→), H&E, Bar 20µm **B**; Ovaryumun dış kısmını saran germinal epitelyum (GE) ve germinal epitelyuma yakın normal sekonder folikül (→), H&E, Bar 200µm.

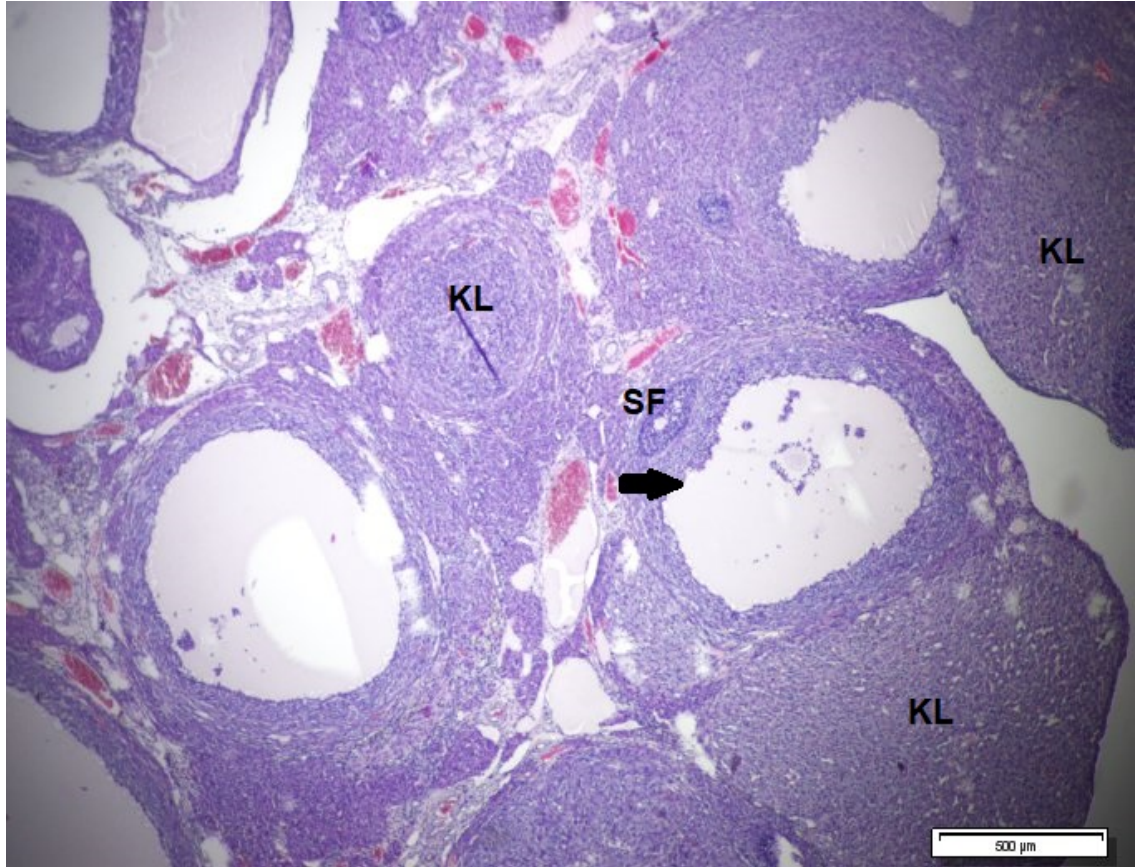
4.5.3. POY Grubu

CTX uygulanarak POY oluşturulan gruptan alınan H&E ile boyanan over kesitleri incelendiğinde, overi dıştan saran germinal epitelyum tek katlı kübik hücrelerden oluşmaktaydı. Germinal epitelin alt kısmında ise tunika albuginea yer almaktaydı. Over medullasında kortekse göre büyük kan damarları gözlemlendi.

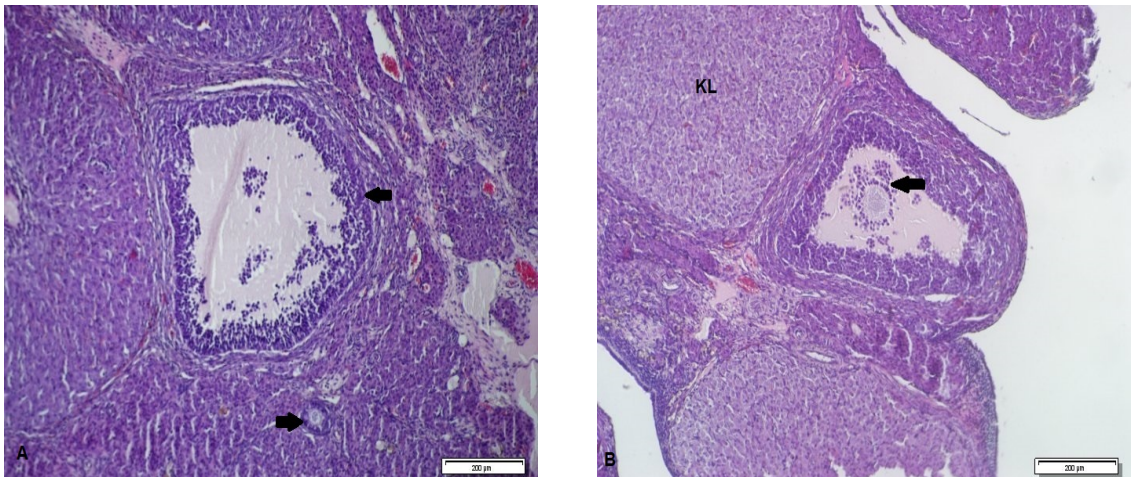
Kesitlerdeki over korteksi incelendiğinde primordial foliküllerin sayıca azalmış olduğu ve çoğunlukla atreziye uğradığı görüldü. Normal primordial foliküller ise az sayıda izlendi. Primer foliküllerin ise CTX toksisitesinden etkilenerek sayılarının azaldığı görüldü.

POY grubunda sekonder ve tersiyer foliküller kontrol grubuna göre daha az sayıda olduğu gözlemlendi. Kortekste yer alan graaf foliküllerin çoğunlukla atreziye uğradığı görüldü. Atreziye uğramış foliküllerde oositin çevresini saran granüloza hücrelerinde hücre içeriği dağılmış olarak gözlemlendi (**Şekil 4.5.3.2**).

POY grubunda korpus luteumda ise nadir olarak şekilleri ve sınırları düzensiz olan luteal hücreler gözlemlendi (**Şekil 4.5.3.1**). Korpus luteum sayısı bakımından POY grubunda bulunan korpus luteum sayısı kontrol grubuna göre daha düşük görüldü. Kistik foliküllerin sayısı diğer gruplara göre artış göstermekteydi.



Şekil 4.5.3.1. POY grubuna ait over kesiti; kortekste bulunan atretik folikül (→), sekonder folikül (SF) ve korpus luteum (KL) yapıları, H&E, Bar 500µm.



Şekil 4.5.3.2. POY grubuna ait over kesiti, **A**; kortekste bulunan atretik folikül (←), primer folikül (→), **B**; Atreziye uğramış tersiyer folikülde dağılmış halde bulunan granuloza hücreleri (←) ve korpus luteum (KL), H&E, Bar 200µm.

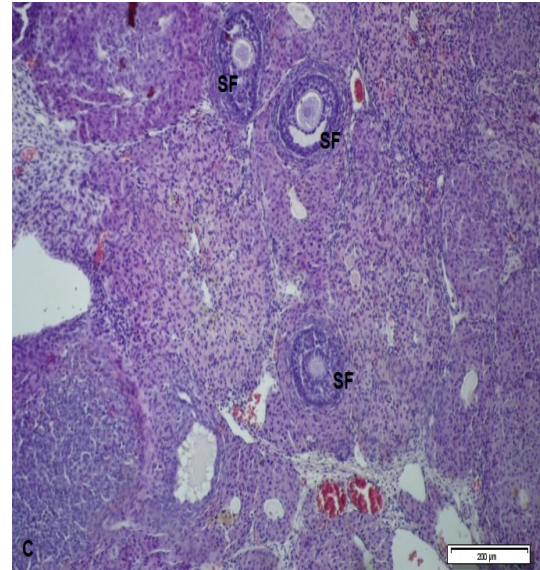
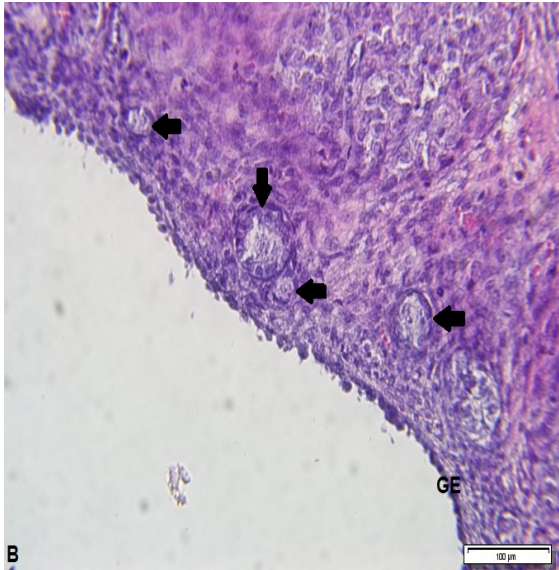
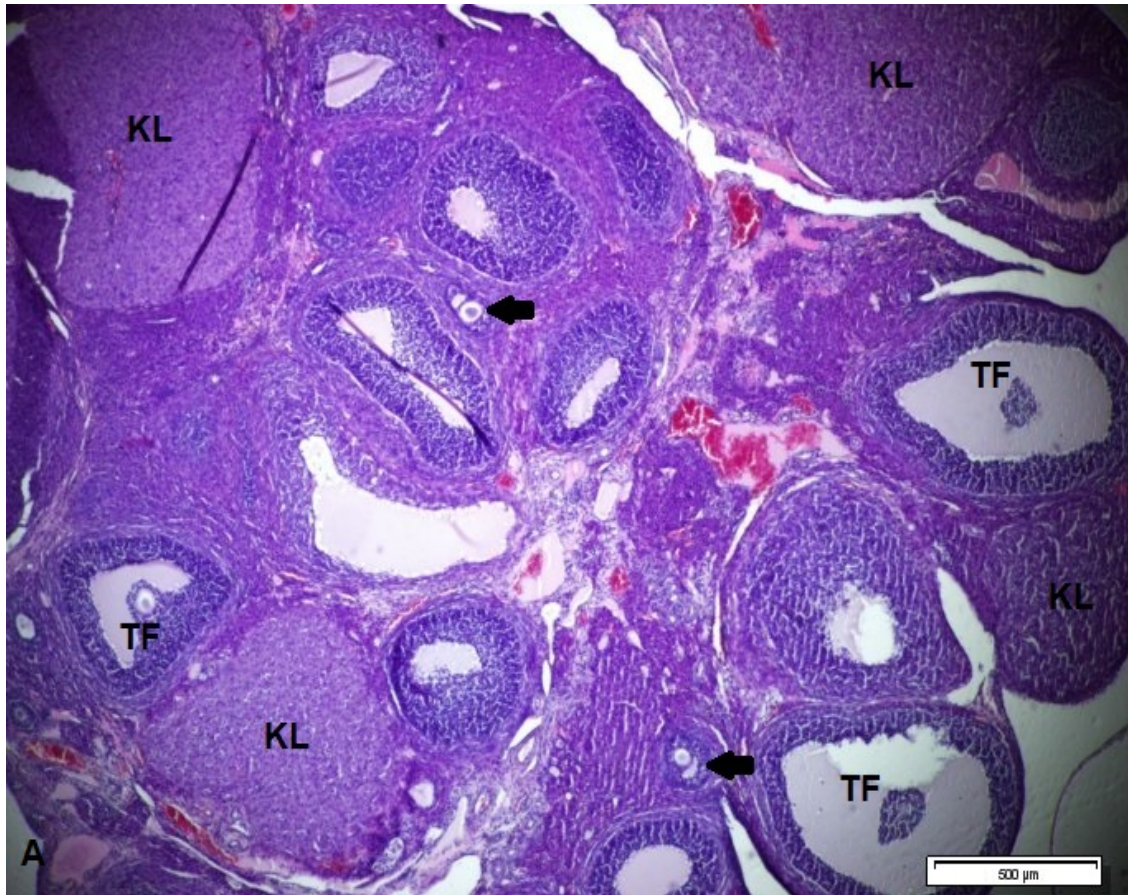
4.5.4. MSC Grubu

POY grubu oluşturulmasını takiben DP-MSC uygulaması yapılan MSC grubundan elde edilen overlerin H&E ile boyanmış kesitleri incelendiğinde, ovaryumu dıştan tek katlı kübik germinal epitelin sardığı gözlemlendi. Germinal epitelin altında tunika albuginea yer almaktaydı.

Over kesitinde primordial foliküllerin CTX toksisitesinden korunduğu görüldü. Overde bulunan normal primordial foliküllerin sayısı POY grubuna göre artarken atretik foliküllerin ise azaldığı gözlemlendi. Primer foliküllerde CTX'in olumsuz etkisi DP-MSC uygulamasıyla düzelerek primer folikül sayısında artış izlendi. Primer ve sekonder foliküller normal yapıda izlendi. Sekonder foliküllerin sayısı ise diğer gruplara göre artış göstermekteydi. Granüloza hücreleri daha POY grubuna göre daha düzgün izlendi.

Tersiyer foliküllerin sayısı MSC grubunda POY grubuna göre artarak kontrol grubuyla benzerdi. Tersiyer foliküllerin yapısı normal olarak izlendi.

MSC uygulanan grupta atretik folikül sayısı POY grubuna göre azalmakla birlikte kontrol ve sham grubuna göre daha çok gözlemlendi. Korpus luteum sayısı POY grubuna göre artış göstermekteydi. Kistik foliküllerin sayısı POY grubuna göre daha azalmış olarak gözlemlendi (**Şekil 4.5.4.1**).

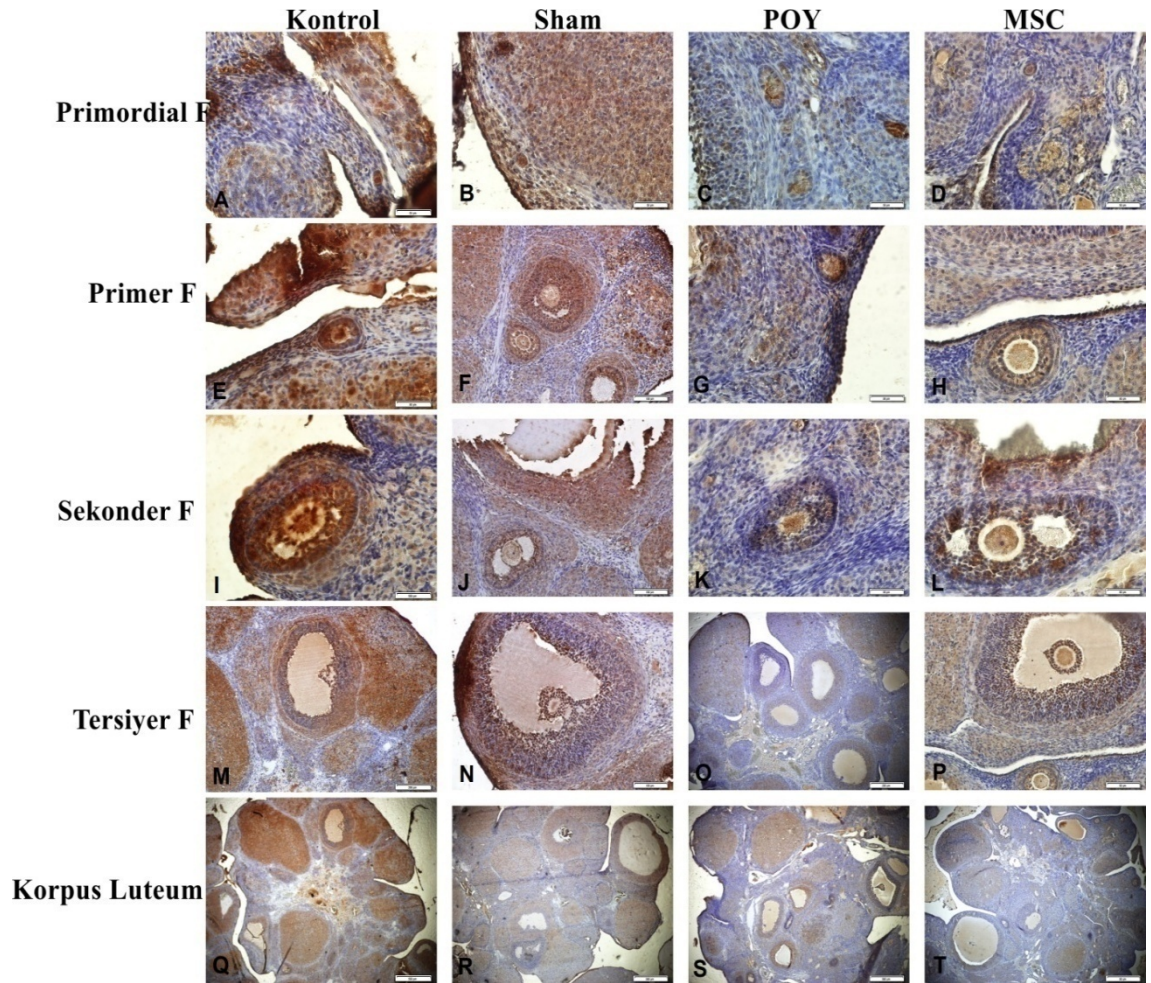


Şekil 4.5.4.1. MSC grubuna ait over kesiti, **A**; kortekste bulunan tersiyer foliküller (TF), sekonder foliküller (\leftarrow), korpus luteum yapıları (KL), H&E, Bar 500µm, **B**; Ovaryumun dış kısmını saran germinal epitelyum (GE), germinal epitelyuma yakın normal primordial foliküller (\leftarrow) ve primer folikül (\downarrow), H&E, Bar 100µm **C**; Kortekste bulunan sekonder foliküller (SF), H&E, Bar 200µm.

4.6. İmmünohistokimyasal Bulgular

4.6.1. Wnt-1 Belirtecinin İmmünohistokimyasal Bulguları

Bu grupta POY dışında tüm gruplarda primordial folliküllerde kuvvetli reaksiyon izlendi. POY grubunda immunreaksiyon zayıf ve orta derecede idi. Primer, sekonder ve tersiyer folliküller tüm gruplarda pozitif. Korpus luteum tüm gruplarda pozitif ancak kontrol grubunda reaksiyonun diğer gruplara oranla daha kuvvetli olduğu dikkati çekti. Wnt-1'in follikül oosit ve granüloza hücrelerinde gruplararası dağılımı **Tablo 4.6.1.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6.1.1. Gruplardaki ovaryum dokusunda Wnt-1 ekspresyonu. Immunoperoksidaze-hematoksilen A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L X20, M, N, O, P X10, Q, R, S, T X4.

		Oosit		Granüloza Hücresi	
		Nükleus	Sitoplazma	Nükleus	Sitoplazma
K	Primordial	+++	+++	-	+++
	Primer	+++	+++	+++	+++
	Sekonder	+++	+++	+++	+++
	Tersiyer	++/+++	++/+++	-	-
S	Primordial	+++	+++	-	+++
	Primer	+++	+++	+++	+++
	Sekonder	+++	+++	+++	+++
	Tersiyer	++/+++	++/+++	-	-/++
POY	Primordial	+	++	-/+	-/+
	Primer	+++	+++	+++	+++
	Sekonder	+++	+++	+++	+++
	Tersiyer	++/+++	++/+++	-	-
MSC	Primordial	+++	+++	-	+
	Primer	+	++	-	++
	Sekonder	+++	+++	+++	+++
	Tersiyer	++/+++	++/+++	-	-/++

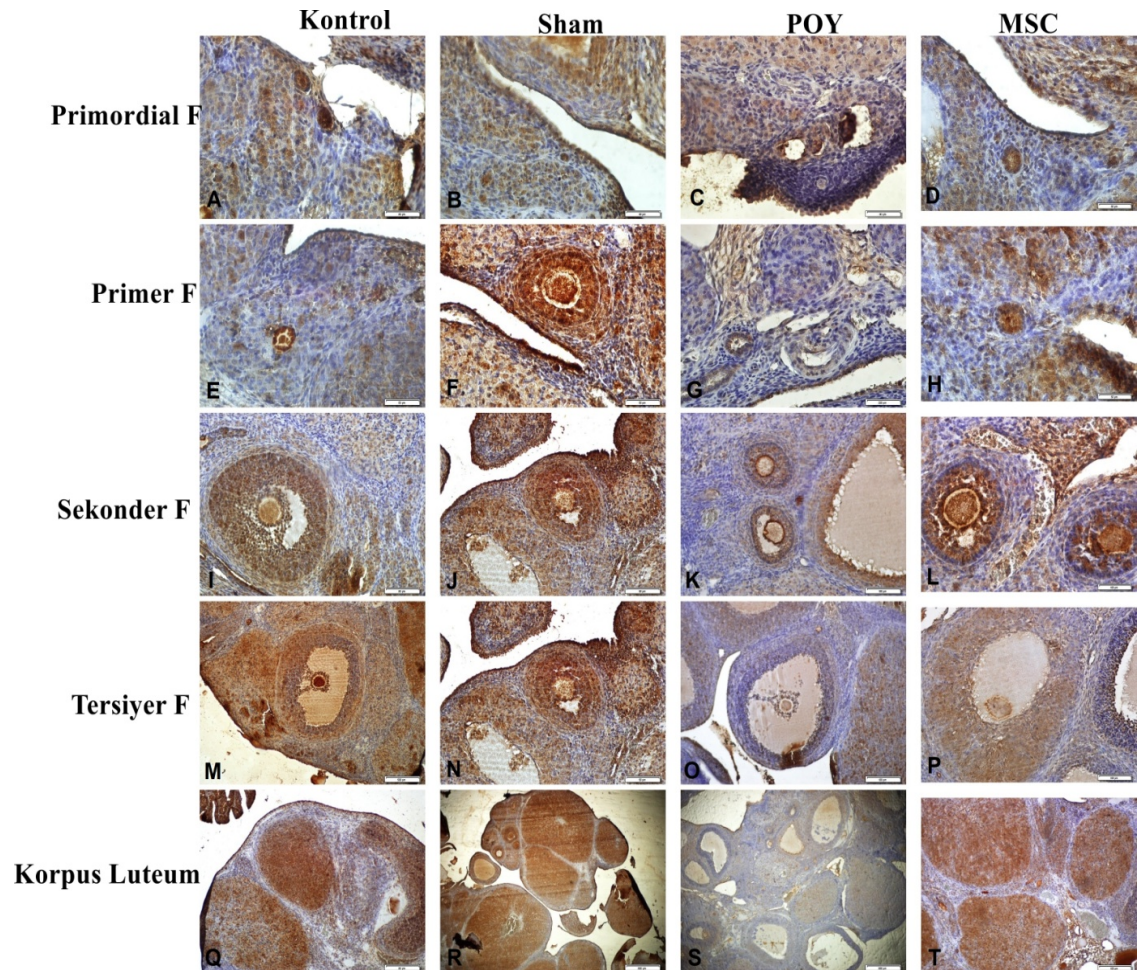
Tablo 4.6.1.1. Wnt-1'in folikül oosit ve granüloza hücrelerinde gruplararası dağılımı

4.6.2. Wnt-4 Belirtecinin İmmünohistokimyasal Bulguları

Wnt-4 ekspresyonu kontrol, sham ve MSC grubunda pozitif izlenirken POY grubunda reaksiyonun negatif olduğu gözlemlendi. Primer folliküllerde reaksiyon kontrol, sham ve MSC grubunda kuvvetli izlenirken POY grubunda reaksiyonun çok zayıf olduğu saptandı. Sekonder folliküllerde tüm gruplarda pozitif reaksiyon izlenirken POY grubunda reaksiyonun biraz daha zayıf olduğu gözlemlendi. Bu grupta hem sekonder folliküllerde hem de gelişen folliküllerde oositlerin çevresinde bir hat şeklindeki kuvvetli reaksiyon ilgi çekiciydi. Tersiyer folliküllerde de reaksiyon tüm gruplarda izlenirken kontrol ve sham grubundaki reaksiyonun diğer iki gruba karşın daha yüksek olduğu dikkati çekti. Korpus luteumların POY grubunda orta derecede diğer gruplarda kuvvetli pozitifliği (**Şekil 4.6.2.1**). Wnt-4'ün folikül oosit ve granüloza hücrelerinde gruplararası dağılımı **Tablo 4.6.2.1**'de gösterilmiştir.

		Oosit		Granüloza Hücresi	
		Nükleus	Sitoplazma	Nükleus	Sitoplazma
K	Primordial	+++	+++	+++	+++
	Primer	+++	+++	+++	+++
	Sekonder	++	+++	+++	+++
	Tersiyer	+++	+++	-/+++	+ /+++
S	Primordial	+++	+++	+++	+++
	Primer	+++	+++	+++	+++
	Sekonder	++	++	+++	+++
	Tersiyer	+++	+++	+++	+ /+++
POY	Primordial	-	-	-	-
	Primer	-/+	-/+	-	+
	Sekonder	++	++	++	++
	Tersiyer	-	++	+++/-	- /+++
MSC	Primordial	+++	+++	+++	+++
	Primer	+++	+++	-	+
	Sekonder	+++	+++	- /+++	+ /+++
	Tersiyer	+++	+++	- /+++	+ /+++

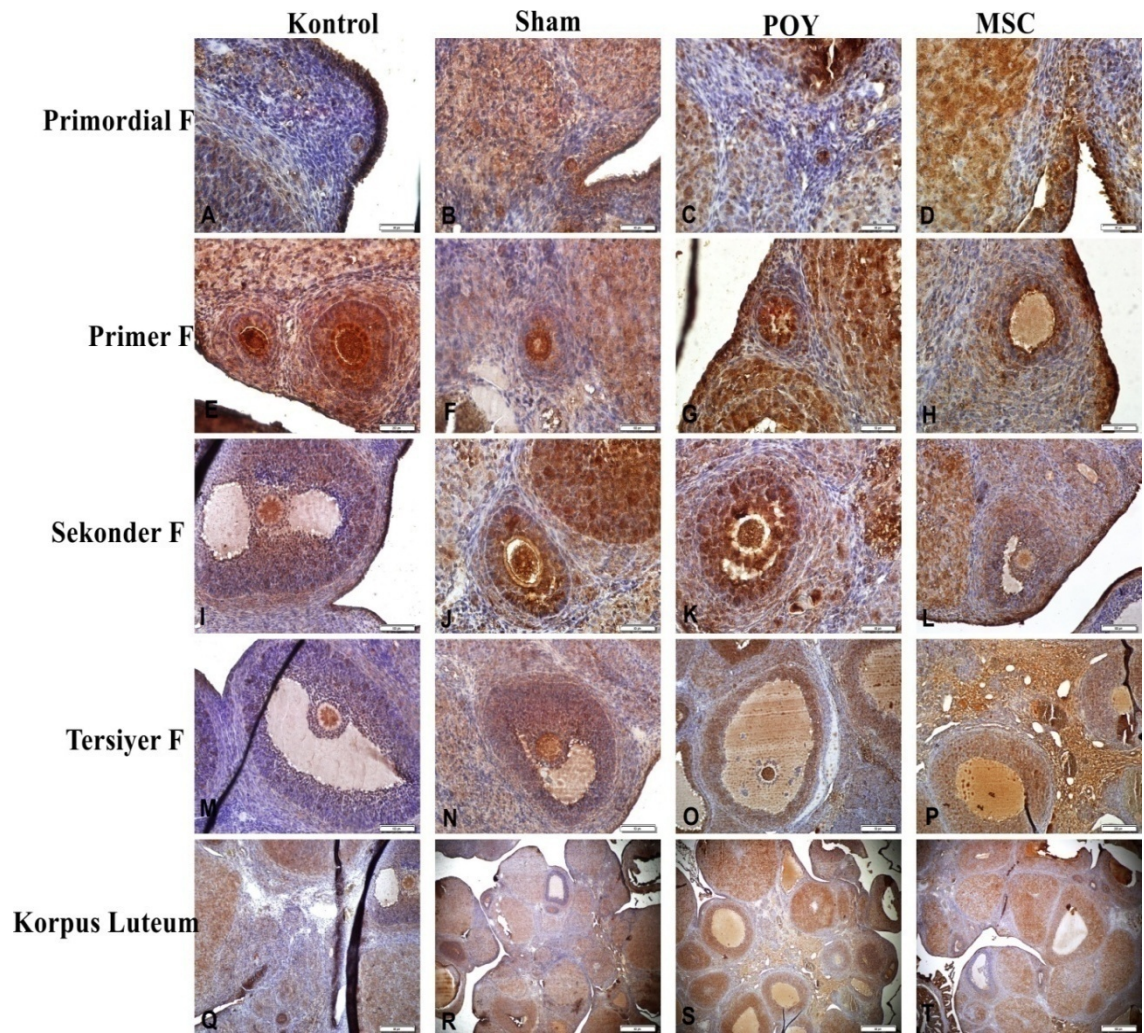
Tablo 4.6.2.1. Wnt-4'in folikül oosit ve granüloza hücrelerinde gruplararası dağılımı



Şekil 4.6.2.1. Gruplardaki ovaryum dokusunda Wnt-4 ekspresyonu. Immunoperoksidaze-hematoksilen A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L X20, M, N, O, P X10, Q, R, S, T X4.

4.6.3. β -katenin Belirtecini İmmünohistokimyasal Bulguları

β -katenin grubunda primordial folliküller tüm gruplarda pozitif reaksiyon gösterdi. Primer ve sekonder foliküllerde oosit kuvvetli reaksiyon gösterirken granuloza hücrelerinde hem nükleusların hem de sitoplazmalarında kuvvetli reaksiyonun yanı sıra negatif reaksiyonda izlendi. Tersiyer foliküllerde oositlerde kuvvetli reaksiyon izlenirken granuloza hücrelerindeki boyanma sekonder foliküllere benzer şekildeydi ancak burada negatif ekspresyonun daha fazla olduğu izlendi. Korpus luteum tüm gruplarda pozitif (**Şekil 4.6.3.1**). β -katenin'in folikül oosit ve granuloza hücrelerinde gruplararası dağılımı **Tablo 4.6.3.1**'de gösterilmiştir.



Şekil 4.6.3.1. Gruplardaki ovaryum dokusunda β -katenin ekspresyonu. Immunoperoksidaze-hematoksilen A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L X20, M, N, O, P X10, Q, R, S, T X4.

		Oosit		Granüloza Hücresi	
		Nükleus	Sitoplazma	Nükleus	Sitoplazma
K	Primordial	+++	+++	+++	+++
	Primer	+++	+++	-/+++	+++
	Sekonder	+++	+++	-/+++	+/+++
	Tersiyer	+++	+++	-/+++	-/+++
S	Primordial	+++	+++	+++	+++
	Primer	+++	+++	-/+++	+++
	Sekonder	+++	+++	-/+++	+/+++
	Tersiyer	+++	+++	-/+++	+/+++
POY	Primordial	+++	+++	+++	+++
	Primer	+++	+++	-/+++	+++
	Sekonder	+++	+++	-/+++	+/+++
	Tersiyer	+++	+++	-/+++	+/+++
MSC	Primordial	+++	+++	+++	+++
	Primer	+++	+++	-/+++	+++
	Sekonder	+++	+++	-/+++	+/+++
	Tersiyer	+++	+++	-/+++	+/+++

Tablo 4.6.3.1. β -katenin'in folikül oosit ve granüloza hücrelerinde gruplararası dağılımı

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kan FSH ve LH düzeyinin en yüksek POY grubunda saptanması overyan yetmezliğin oluştuğunu göstermiştir. Ovaryum korteks folikül havuzunun MSC grubunda K ve S grubuna yakın ve istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanmıştır. Kanonik yolda etkili olan β -katenin bütün gruplarda yüksek ekspresyon gösterirken, Wnt-1 in K, S ve MSC grubunda primordial foliküllerde istatistiksel olarak anlamlı yüksek saptanması dikkat çekmiştir. Non-kanonik yolda etkili olan Wnt-4 POY grubunda ekspresyonu gözlenmezken, MSC grubunda kuvvetli ekspresyon göstermiştir.

POY, doğurganlık çağındaki kadınların üreme sağlığını tehdit eden ciddi bir hastalıktır. POY etiolojisinde, yetersiz bir primordial foliküler sisterna rezervi, hızlanmış foliküler atrezi, foliküler olgunlaşma bozukluklar gibi sebepler ile ilişkili olabilmektedir (Xiang ve ark, 2019). Ovaryum rezervinin kaybı, kadın infertilitesiyle güçlü bir şekilde ilişkilidir. POY, 40 yaşın altındaki kadınlarda FSH yüksekliği ve östrojen (E2) düzeylerinin azalması ile birlikte ovaryum fonksiyonunun kesilmesi olarak tanımlanmaktadır (Sullivan SD, 2016). İnfertilitenin önemli bir nedeni haline gelmiştir. POY etiolojisi, genellikle genetik kusurlar, otoimmünite ve toksiklerin neden olmakla birlikte vakaların bir kısmı idiyopatiktir. Günümüzde genç kadınlar arasında artan kanser insidansı ile uzun süreli gonadotoksisite kemoterapisine maruz kalmak POY'un ana nedeni haline gelmiştir (Simpson JL, 1999; Fu YX, 2021).

POY, menopoz öncesi kadınların yaşam kalitesini önemli ölçüde etkileyen kemoterapinin olası bir komplikasyonudur. Kemoterapiye ihtiyaç duyan üreme çağındaki kadınlar için doğurganlık sorunları sebebiyle büyük bir endişe kaynağı olabilmektedir. Doğurganlığın korunması için ovaryum koruma yöntemi olarak; oosit veya ovaryum dokusu kriyoprezervasyonu ve embriyo dondurma kanser teşhisi koyulan kadınlarda kullanılan stratejilerdir. Ancak bu yöntemlerin kanser hücrelerinin yeniden vücuda girme riski, kanser tedavisinde yaşanacak gecikme ve düşük başarı oranı gibi dezavantajları bulunmaktadır (Bahrehbar K ve ark, 2020). Bu hastalarda kemoterapiye bağlı ovaryum yetmezliğini önlemek için yeni terapötik stratejilere ihtiyaç duyulmaktadır.

Alkilleyici bir ajan olan CTX dışı üreme organları, özellikle ovaryum üzerinde zararlı bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır. Hasarın geri döndürülebilme ihtimali hastanın yaşına, maruziyet derecesine ve ovaryum rezervine bağlıdır. Onkolojik

tedaviden önce veya sonra hastaların doğurganlığını koruması girişimleri her zaman bir endişe kaynağı olmaktadır (Brougham MF, 2005).

Deneysel hayvan modellerinde ovaryan toksisite ve POY oluşturmak için kemoterapotikler kullanılmaktadır. POY modeli oluşturmak için CTX ve Sisplatin sıklıkla kullanılan kemoterapik ajanlardır (Takehara Y, 2013; Fouad H, 2016). Biz bu çalışmamızda sıçanlarda premature over yetmezliğini indüklemek için kemoterapik ajan olan CTX kullandık. CTX ile oluşturduğumuz ovaryum hasarında insan dental pulpasından elde ettiğimiz mezenkimal kök hücrelerin etkisini ve Wnt- β -katenin sinyal yolağı üzerine olan etkisini inceledik.

Sıçanlarda yapılan bir çalışmada; radyoterapiye bağlı POY oluşturulduktan sonra, POY grubundaki sıçanların vücut ağırlığının kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha düşük olduğu görülmüştür. Bu çalışmada sıçanlara radyoterapiye bağlı POY oluşturulmasını takiben Kİ-MSC uygulanan sıçanlarda POY grubuna kıyasla hem vücut ağırlığı hem de ovaryum ağırlığı önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur (El-Derany ve ark, 2021). Bizim çalışmamızda ise gruplar arasında başlangıç ve bitiş ağırlıkları ve ağırlık farkları arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır.

Foliküler büyüme esas olarak gonadotropinler tarafından düzenlenir. FSH, ön hipofiz gonadotrop hücreleri tarafından üretilir ve ovaryum foliküler stimülasyonu ve büyümesinden sorumludur (Gharib SD, 1990). Gonadotropin ve steroid hormon, tüm memeli türlerinde folikülogenezin düzenleyici hormonlarıdır (Fortune JE, 2000). Düzensiz endokrin sistem regülasyonu sonucunda foliküler gelişim, foliküler depolama, menopoz başlangıcı ve POY gibi overin patolojik durumlarına yol açmaktadır (De Koning CH, 2008). Çalışmalar sonucunda, primordial ve erken antral foliküllerin sayısının azalmasının, foliküler depolamayı yansıtan FSH ve östrojen dışında POY'un bir göstergesi olan serum AMH seviyesinde azalmaya neden olabileceğini göstermiştir (Kwee J, 2008; Sükür Y.E., 2014). Hastalarda, ovaryum rezervinin potansiyel bir belirteci olarak glikoprotein yapısında olan AMH büyük ilgi vardır (Lee MM, 1993). AMH, preantral ve antral foliküllerin granüloza hücreleri tarafından üretilir ve serum AMH seviyeleri ovaryum foliküler rezervi ile ilişkilidir (van Rooij IA, 2002).

Kemoterapötik ajanlar tarafından indüklenen granüloza hücrelerinin aşırı apoptozu sıklıkla E2 seviyesinin azalmasına neden olur. Kesintiye uğramış negatif geri bildirim, FSH seviyesinde kontrolsüz bir artışa neden olmaktadır (Song D, 2016). Yaptığımız çalışmada FSH ve LH düzeyi POY grubunda yüksek saptanmıştır ve bu durum overyan yetmezliği oluşturduğumuzu desteklemektedir. Fakat diğer çalışmalardan farklı olarak AMH düzeyi POY grubunda beklenildiği gibi düşük

bulunmadı. İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da POY ve MSC gruplarındaki AMH düzeyleri K ve S grubuna göre bir miktar daha artmıştı. Primer foliküllerin veya erken antral foliküllerdeki granüloza hücreleri tarafından salınan AMH, folikülogenezin erken evrelerinde overde inhibitör bir büyüme faktörü olarak görev yapmaktadır (Song D, 2016).Çalışmamızda POY grubunda folikül sayılarının azalmasına rağmen AMH in yüksek olması dikkat çekiciydi. Bu durum siklofosfomidin AMH in ekstraovaryan salınımını arttırmış olabileceğini düşündürdü.

Hipofiz gonadotropinleri olan FSH ve LH, ovaryum steroidogenezinin ana endokrin düzenleyicileridir ve çok sayıda hücre içi sinyal yolunun aktivitesini doğrudan veya dolaylı olarak modüle ederler. Ovaryum steroidogenezinin düzenlenmesinde önemli katkısı bulunduğu inanılan Wnt/ β -katenin yolu, gonadotropin sinyalleme tarafından modüle edilen yollardan biri olabileceği düşünülmektedir (Lapointe E, 2011). Wnt/ β -katenin yolu, FSH ve LH tarafından ovaryum steroid üretiminin kontrolünde önemli ölçüde yer almaktadır (Fan HY, 2010; Parakh TN, 2006). Parakh TN ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ovaryumdaki β -katenin'in foliküler gelişimi desteklemek ve foliküler granüloza hücre apoptozunu azaltmak için FSH salgısını sürekli olarak arttırdığını göstermişlerdir (2006). Bizim çalışmamızda β -katenin POY grubu da dahil olmak üzere bütün gruplarda oosit ve granüloza hücrelerinde pozitif ekspresyon göstermiştir. Fakat FSH düzeyi ile anlamlı bir korelasyonu saptanmamıştır.

Kemoterapik ilaçlar, hücrelerin yaşamsal süreçlerini engeller, böylece hücre proliferasyonunu durdurur ve ovaryumda foliküllerin anormal aktivasyonuna sebep olur (Kalich-Philosoph L, 2013). Foliküler gelişim çok sayıda, karmaşık aşamalardan oluşur ve bu aşamalardan herhangi birindeki bozulma üreme bozukluklarına ve infertiliteye sebep olabilmektedir. Bu nedenle, bu evreleri kontrol eden mekanizmaları aydınlatmak, kadın hastalarda doğurganlığı korumak ve infertilite tedavisi için kritik öneme sahiptir. Birçok çalışma, kemoterapinin inaktif fazdaki primordial foliküllerin apoptozunu tetikleyerek POY ve infertiliteye sebep olabileceğini öne sürmüştür (Jang H, 2016). Bununla birlikte yapılan çalışmalarda, kemoterapötik ajan olan siklofosfamidin primordial foliküllerin apoptozunu indüklediği bildirilmiştir (Kalich-Philosoph L, 2013). Bunun yerine, siklofosfamid tedavisi, aktif olarak büyüyen foliküllerin apoptozunu indükler ve primordial folikülleri primer foliküllere aktive eder. Bunun sonucunda primordial folikül havuzunun "tükenmesine (burn-out)" sebep olmaktadır (Jang H, 2016; Kalich-Philosoph L, 2013; Chang EM, 2015). Kemoterapik ilaçlar dinamik olarak bölünen hücreleri hedeflemesinden dolayı bu mekanizma daha muhtemeldir ve bu da kemoterapinin uykudaki foliküllere karşı daha az toksik etki oluşturabileceğini düşündürmektedir (Jang H, 2016).Bizim çalışmamızda CTX uyguladığımız POY

grubunda primordial, primer, sekonder ve tersiyer folikül sayısı ve korpus luteum sayısı istatistiksel olarak anlamlı düşük saptandı. Kistik ve atretik folikül sayısı da anlamlı olarak POY grubunda yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

Chen ve arkadaşları, 120 mg/kg CTX ve 30 mg/kg busulfan ile POY modeli oluşturulan farelerde kontrol grubuna kıyasla folikül sayılarında belirgin derecede azalma ve atretik folikül sayısında önemli artış olduğunu tespit edilerek POY modelinin başarıyla kurulduğunu belirtmiştir (2020). El-Derany ve ark. yaptığı çalışmada radyoterapi ile POY oluşturulan sıçanlarda, kontrol grubuna kıyasla atretik folikül sayısı önemli ölçüde artarken, primordial, primer ve sekonder folikül sayılarında önemli bir azalma ile kendini gösteren folikül rezervinde belirgin bir azalma olduğu saptanmıştır (2021). Bizim çalışmamızda da bu çalışmalarla uyumlu bir şekilde POY grubunda ovaryum normal folikül sayısı azalmıştır. POY indüklenen sıçanların ovaryumun atrofiye uğradığı ve ovaryum stromasının bozulduğu saptanmıştır. Ovaryumlarda, atretik folikül, kistik folikül ve hasarlı oositleri olan ve bunun yanında az sayıda sağlıklı folikül bulunduğu gözlemlenmiştir. Ayrıca El-Derany ve ark. yaptığı çalışmada atretik foliküllerde granüloza tabakasının genel olarak gevşediği ve over stromasında damar tıkanıklığı ve kanama olduğu tespit edilmiştir (El-Derany ve ark, 2021). Sıçanlarda yapılan bir çalışmada, ilk gün 200 mg/kg ve ardından ardışık 15 gün boyunca 8 mg/kg/gün CTX intraperitoneal olarak enjekte edilerek POY grubu oluşturulan grupta kontrol grubuna kıyasla, over boyutunun önemli ölçüde azaldığı görülmüştür. Kemoterapinin POY sıçan modelinde granüloza hücrelerinin apoptozunu ciddi şekilde indüklediğini ortaya koymuştur. Ayrıca, yapılan çalışmada ovaryum patolojik analizi, CTX uygulamasının sekonder folikül sayısını önemli ölçüde azalttığını, diğer aşamalarda foliküller üzerinde fazla bir etkisi olmadığı görülmüştür (Song D. ve ark, 2016). Bizim çalışmamızda ise sadece sekonder folikül değil bütün overyan foliküllerde azalma saptanmıştır.

Kök hücreler, kendini yenileme kapasitesine sahip olan ve doku hasarı varlığında doku onarımına katkıda bulunmak için farklılaşarak rejeneratif özellik gösteren hücrelerdir (Berika M, 2014, Stoltz JF, 2015, Dennis JE, 2002). Mezenkimal kök hücreler, doku iyileşmesinde ve rejeneratif tıpta kilit rol oynayan çeşitli hücre tiplerine farklılaşma ve kendini yenileme yeteneğine sahip çok soylu hücrelerdir (Fu X, 2019). MSC'ler antiapoptotik, antifibrotik, anti-inflamatuardır, anjiyogenezi artırır ve oksidatif stresi azaltır, böylece hasarlı dokunun iyileşmesini teşvik etmek için mikro çevreyi iyileştirir. MSC'ler çok sayıda kaynaktan izole edilebilir. Kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler, en iyi bilinen ve en yaygın kullanılan MSC kaynağıdır (El-Derany MO, 2021). MSC'ler; iskelet kası dokusu, yağ dokusu, diş pulpası,

periodontal ligament, göbek kordonu, amniyotik sıvı, plasenta, akciğer dokusu ve karaciğer dokusu olmak üzere çeşitli dokulardan izole edilebilmektedir (Squillaro T, 2016). Kemik iliği, yağ dokusu, göbek kordonu, menstrüel kan, deri ve amniyotik sıvıdan elde edilen MSC'ler, hayvan modelleri kullanılarak kemoterapötik ajan kaynaklı POY'da doğurganlığı yeniden sağlamak için uygulanmıştır. Bu MSC'nin transplantasyonu, ovaryum fonksiyonunun ve folikülojenezin restorasyonu, granüloza hücre apoptozunun azalması ve ovaryum yapısının iyileşmesi için potansiyel göstermektedir (Fazeli Z, 2018).

Kİ-MSK, over ve merkezi sinir sistemi dahil olmak üzere organ onarımını desteklemek için önemli bir potansiyel göstermiştir. Kİ-MSK tedavisinin, yaralanmış dokunun tedavisinde faydalı etki göstermiştir. Bunun yanında hücre içi sinyalleşme üzerindeki etkisi araştırıldığında, dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF- β) ve Wnt aracılı β -katenin etkileşime girebilir ve hücre kaderini kontrol eden genlerin ekspresyonunu işbirliği içinde indükleyebildiği görülmüştür (El-Derany MO, 2021).

Uluslararası Hücreyel Tedavi Derneği (ISCT)'nin Mezenkimal ve Doku Kök Hücre Komitesi, insan MSC'sini tanımlamak için kriterler önermiştir. Bu kriterler; standart kültür koşullarında plastiğe yapışabilmesi, immünofenotipik olarak MSC yüzey moleküllerini ifade etmesi ve in-vitro olarak osteoblastlara, adipositlere ve kondroblastlara farklılaşması olarak tanımlamıştır (Dominici, 2006). Yapılan çalışmalar dental pulpa kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin uzun süre saklanabiliyor olması, elde edilmesinde etik sorunların bulunmaması, kolay erişilebilirliği ve multipotensi özelliğinden dolayı değerli bir seçenek haline geldiğini vurgulamaktadır (Cordeiro MM, 2008; Huang GT, 2009; Ohazama A, 2004; Woods EJ, 2009). DP-MSK'leri, Kİ-MSK'ler ile karşılaştırıldığında, çekilmiş dişlerden DP-MSK'lerin elde edilmesi daha az invaziv ve daha uygulanabilir (Shi X, 2020). Çalışmamızda, DP-MSK'leri kullanılmıştır ve flow sitometri ile karakterizasyonu sonucunda CD73 ve CD90 belirteçleri pozitif bulunurken CD34 belirteci negatif bulunarak hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğu gösterilmiştir. Flow sitometri bulgularına ek olarak farklılaşma deneyleri ile adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma sağlanarak mezenkimal kök hücre olduklarına dair kanıt desteklenmiştir.

Ovaryum foliküler gelişiminin hem hormonlar tarafından sistemik regülasyonu hem de çeşitli sitokinler, büyüme faktörleri ve hücre içi proteinler tarafından ovaryum içi regülasyon gerektirdiği iyi bilinmektedir. Özellikle ovaryum stromal hücreleri ve granüloza hücreleri, foliküler büyümede önemli rol oynamaktadır. Farelerde 10 gün boyunca günlük 2 mg/kg sisplatin intraperitoneal enjeksiyonu ile POY modeli

oluşturulmasını takiben kuyruk veninden uygulanan insan embriyonik mezenkimal kök hücrelerinin (hE-MSK); vücut ağırlığı, ovaryum boyutunu ve işlevini eski haline getirebildiğini, bu sayede POY oluşturulan farelerde gebelik kapasitesini artırabildiğini göstermiştir. hESC-MSK'ler, stromal hücrelerde apoptotik sinyali azaltmış ve granüloza hücrelerinin proliferasyonunu arttırdığı görülmüştür. Ayrıca, ovaryum foliküllerinin sayısını eski haline getirdiği ve foliküldeki apoptotik işaret azalttığı saptanmıştır. İn-vitro fertilizasyon ile doğurganlık testi sonucunda canlı yavruların doğumuyla birlikte yumurtlama, dölleme ve embriyonik gelişim dahil olmak üzere folikülogenezin kurtarıldığı gösterilmiştir (Yoon ve ark, 2020).

Yapılan başka bir çalışmada sıçanlara radyoterapiye bağlı POY oluşturulmasını takiben intravenöz olarak uygulanan Kİ-MSK ovaryum folikül havuzunu güçlendirdiğini, serum estradiol ve FSH seviyelerini düzenleyerek ortaya çıkan ovaryum fonksiyonunu koruduğunu belirlemişlerdir. Kİ-MSK uygulanan grupta, kontrol ve POY grubuna göre ovaryumda folikül gelişimi ve olgunlaşmasındaki rolünü destekleyen sekonder foliküllerde önemli artış olduğu tespit edilmiştir (El-Derany, 2021).

Ling ve ark. (2019) sıçanlarda CTX'in (ilk gün 50 mg/kg/gün ve takip eden 14 ardışık gün için 8 mg/kg/gün) intraperitoneal enjeksiyonu ile POY modeli oluşturulmuş. POY üzerindeki insan amniyon türevli mezenkimal kök hücrelerin (hAD-MSK) transplantasyonunun mekanizmasının parakrin yoldan olup olmadığını incelemek için bilateral overe lokal olarak uygulama yapılarak, hAD-MSK'nin sıçanlarda kemoterapinin neden olduğu POY üzerindeki etkileri araştırılmıştır. hAD-MSK transplantasyonunun hormon salgılama yeteneklerini önemli ölçüde geri kazandırabileceğini, foliküler büyümeyi ve granüloza hücrelerinin sağkalımını iyileştirebileceğini ve POY farelerini oluşturmak için kullanılan kemoterapi tarafından tahrip edilen ovaryum fonksiyonunu iyileştirebileceğini saptamışlardır (Ling, 2019).

Song D. ve ark. (2016) sıçanlarda ilk gün 200 mg/kg ve ardından ardışık 15 gün boyunca 8 mg/kg/gün CTX intraperitoneal olarak enjeksiyonu ile POY modeli oluşturmuşlardır. POY sıçan modellerinde Umblikal kord-MSK transplantasyonundan sonra endokrin sekresyon sisteminde iyileşme, hücre apoptozunda önemli bir azalma ve folikülogenezde iyileşme olduğu bildirilmiştir.

Bizim çalışmamızda DP-MSK'ler istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kan FSH düzeylerini düzeltmiştir. Yapılan histolojik inceleme sonucunda kök hücre tedavisinin over histolojik görüntüsünü düzelttiğini göstermiştir. Bütün gelişen folikül sayısında POY grubuna göre artış görülmesi ve atretik folikül sayısının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalması diğer çalışmalarını destekler niteliktedir.

POY hayvan modellerinde yapılan birçok çalışma, çeşitli hücre tiplerinden elde edilen MSC'lerin uygulanmasıyla ovaryumun korunmasını göstermiştir. Ayrıca MSC'ler, T ve B hücre proliferasyonunun baskılanması ve doğal öldürücü hücrelerin ve makrofajın modülasyonu dahil olmak üzere bağışıklık tepkilerini düzenleme konusunda güçlü bir yetenek sergilemektedir (Yi T, 2012). Yağ kaynaklı kök hücreler (ADSC'ler), insan amniyotik sıvı kaynaklı kök hücreler (hAFC'ler) ve deriden türetilen mezenkimal kök hücreler (SMSC'ler) gibi POY tedavisinde çeşitli kök hücre türleri araştırılmıştır. POY için ideal ve umut verici bir tedavi olmasına rağmen, kök hücre transplantasyonu da kesin mekanizması hakkında bazı tartışmalara sahiptir. Bazı raporlar, nakledilen kök hücrelerin ovaryum dokusu benzeri hücrelere farklılaşmaya teşvik edilebileceğini desteklerken, diğerleri kök hücrelerin hasarlı ovaryum nişlerini iyileştirmeye yardımcı olabileceğini desteklemektedir (Song D, 2016).

β -katenin, hücre kaderi, çoğalma, farklılaşma, büyüme ve hayatta kalma gibi çeşitli süreçlerde çok önemli olan çok işlevli bir proteindir. Gelişimsel kararların yanı sıra yetişkin doku homeostazında da önemli roller üstlenen Wnt sinyal yolunun bir ana kolundaki merkezi oyuncudur. Wnt uyarısının yokluğunda, glikojen sentaz kinaz 3b (GSK3b)/Axin/adenomatosis polipozis koli (APC) kompleksi, proteazom tarafından yıkımını hedefleyen β -katenin fosforilasyonunu indüklemektedir. Wnt-3 ve Wnt-1 gibi belirli WNT ailesi üyelerinin kıvrılmış (FZD) ailesi reseptörüne ve düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü ile ilişkili protein (LRP) 5 veya LRP6 koreseptörlerine bağlanması, β -katenin fosforilasyonunun inhibisyonuna yol açan bir dizi hücresel olayı tetiklemektedir ("kanonik" yol). Böylece stabilize edilmiş β -katenin, hedef genlerin transkripsiyonunu aktive etmek için transkripsiyon faktörleriyle etkileştiği çekirdekte birikir. Wnt-4, Wnt-5A ve Wnt-11 gibi bazı Wnt molekülleri, β -katenin'i stabilize edemez. Bunun yerine, reseptöre ve hücresel bağlama bağlı olarak hücre polaritesi ve göçü ile ilişkili sinyal yollarını düzenlerler ("kanonik olmayan" yol). Antral foliküllerden izole edilen fare granüloza hücrelerinde, FSH ve Wnt sinyal yollarının, FSH etkisini arttırmak ve preovulatar foliküler büyümeyi teşvik etmek için β -katenin'i aktive etmek üzere etkileşime girdiği gösterilmiştir. Buna karşılık, β -katenin'in aşırı aktivasyonu, LH ile indüklenen ovulasyonu ve luteinizasyonu olumsuz etkiler, bu da Wnt/ β -katenin yolunun ovaryumda hücre içeriğine bağlı ve gelişimsel aşamaya özgü etkisini vurgulamaktadır. Bu yolun insan ovaryum folikül fizyolojisindeki rolü çok daha az araştırılmıştır (Sanchez AM, 2014).

Boerboom D. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan foliküler granüloza hücrelerinde β -katenin bileşeninin pozitif ekspresyonunu göstermiştir (2005). POY sıçanlarından alınan ovaryum kesitleri, tüm folikül evrelerinin oosit ve granüloza

hücrelerinde çok düşük β -katenin ekspresyonu göstermiştir. Kİ-MSK'lerle tedavi, β -katenin'in primordial foliküllerin oositinde, preantral ve antral foliküllerin granüloza hücrelerinde ekspresyonu görülmüştür. İmmünohistokimyasal boyama, görüntü analiz yazılımı kullanılarak boyanmış bölgelerin optik yoğunluğu (OD) hesaplandığında, Kİ-MSK'lerin POY oluşturulan gruba kıyasla β -katenin immüno-ekspresyonunun yoğunluğunu önemli ölçüde up-regüle ettiği saptanmıştır. Öte yandan, Kİ-MSK tedavisi, Wnt-2, Wnt-3a ve β -katenin ekspresyonunu artırarak ovaryum Wnt/ β -katenin yolunu aktive ettiği görülmüştür (El-Derany ve ark, 2021). Chen ve arkadaşlarının (2020) POY grubunda kontrol grubuna göre β -katenin ekspresyonunun daha düşük olduğunu saptamışlardır. Bunun sonucunda Wnt/ β -katenin yolunun POY modelinde down-regüle edildiğini ve ovaryum fonksiyonu üzerinde belirli bir etkiye sahip olabileceğini göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise β -katenin ekspresyonu tüm gruplarda hem oosit hem de granüloza hücrelerinin nükleus ve sitoplazmalarında pozitif reaksiyon göstermiştir. Kanonik yolda yer alan Wnt-1 in β -katenin ekspresyonundan farklı olarak POY grubu dışındaki primordial foliküllerde kuvvetli pozitif ekspresyon göstermesi dikkat çekti.

Ovaryumda Wnt sinyalinin öneminin ilk göstergesi, Vainio ve ark. tarafından yapılan çalışmada Wnt-4 bulunmayan farelerde postnatal dönemde oosit rezervlerinin çoğunu kaybettiğini göstermiştir (Vainio ,1999). Sonraki çalışmalar, Wnt-4 ekspresyonunun dişi gonadların embriyonik gelişimi sırasında, erkeğe özgü sölomik kan damarının oluşumunu baskılamak ve ayrıca steroidojenik bir hücre popülasyonunun mezonefrozdaki gelişmekte olan ovaryuma göçünü önlemek için gerekli olduğunu göstermiştir (Jeays-Ward K, 2003). Bu ilk çalışmaların ardından, doğum sonrası ovaryumda Wnt'lerin ve sinyal yolu bileşenlerinin ekspresyonunu tanımlayan birçok rapor bildirilmiştir. Bunların birçoğunun folikül gelişimi boyunca farklı şekilde ifade edildiği bulunmuştur (Boyer A, 2010a). Wnt sinyali, dişi gelişimi için kritik öneme sahiptir (Vainio S, 1999). Özellikle Wnt-4 yokluğunda, tipik kadın özellikleri bozulması ve testosteron üretimi gibi bazı erkek özelliklerinin görülmesi sebebiyle Wnt 4'ün kadın gelişimini destekleyen önemli bir sinyal olarak tanımlanmaktadır. Bu fenotipik değişikliklerle uyumlu olarak, Wnt-4 eksikliği olan overin somatik hücrelerinde, testosteron biyosentez enzimlerini kodlayan genleri ektopik olarak eksprese ettiği saptanmıştır (Heikkilä M, 2005). Kadın hastalarda, Wnt-4 genindeki heterozigot yanlış anlamlı mutasyonları sonucunda, uterus ve fallop tüplerinin yokluğu ve yüksek androjen belirtileri ile karakterize sendroma yol açmaktadır. Bunun sonucunda Wnt-4'ün kadın üreme sistemi gelişimi için gerekli olduğunu gösterilmiştir (Biaison-Lauber ve ark. 2004).

Farelerde yapılan çalışmalarda Wnt-4'ün böbrek, adrenal ve meme bezlerinin oluşumunda, endotelial ve steroidojenik hücre migrasyonunun regüle ettiği üreme sisteminde (Jeays-Ward ve ark. 2003), cinsiyet belirlemede (Kim ve diğerleri 2006) ve kadın gelişimi(Vainio ve diğerleri 1999) dahil olmak üzere çoklu morfojenetik süreçler için gerekli olduğu gösterilmiştir.

Wnt-4 ekspresyonu, folikül gelişimi boyunca sıçan ve murin granuloza hücrelerinde (Hsieh, 2002) ve farelerde kümülüs oosit kompleksinde (Hernandez-Gonzalez ve diğerleri 2006) ekspresyonu saptanmıştır. Bunun aksine, in vitro fertilizasyondan önce oositlerden elde edilen insan kümülüs granuloza hücrelerinde Wnt-4 saptanmamıştır (Wang ve ark. 2009). Yetişkin kemirgen granuloza hücrelerinde Wnt4, hCG stimülasyonuna yanıt olarak corpora lutea'da yüksek seviyede ekspresyon göstermektedir (Hsieh ve ark. 2002). Yapılan bir çalışmada sağlıklı ve endometriozis hastalarından alınan insan ovaryumlarında luteinize granuloza hücreleri incelenmiştir. Endometriozis hastalarından elde edilen luteinize granuloza hücreleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, β -katenin bağımsız olan molekül Wnt-4'ün ve Wnt-5a'nın transkript seviyeleri anlamlı derecede yüksek ve β -katenin bağımlı molekül Wnt-1'in daha düşük seviyeleri saptanmıştır (Sanchez ve ark, 2014). Boyer A. ve arkadaşlarının transgenik fare modelini kullandığı çalışmada; normal folikülogenez, luteogenez ve steroidogenez için Wnt yolunun bileşenleri olan Wnt-4, Fzd4 ve Ctnnb1'in gerekliliğini göstermiştir (2010a).

Fare granuloza hücrelerinde Wnt-4 ekspresyonunun yıkılması, kontrol farelerine kıyasla daha küçük ovaryumlara ve antral foliküllerin sayısının azalmasına bağlı infertilite ile sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar, granuloza hücrelerinden kaynaklanan Wnt-4'ün folikül olgunlaşması için gerekli olduğunu göstermektedir. Veriler, β -katenin'in, antral folikül olgunlaşmasının ve steroidogenezin düzenlenmesinde önemli olan Wnt-4 olaylarına aracılık edebileceğini göstermektedir (Boyer ve ark . 2010b). Bu sonuçlar, granuloza hücrelerinden kaynaklanan Wnt-4'ün folikül olgunlaşması için gerekli olduğunu göstermektedir. Bizim çalışmamızda POY grubunda, hem oosit hem de granuloza hücrelerinde Wnt-4 ekspresyonu saptanmamıştır. DP-MSK uygulanan grupta ekspresyonun tekrar görülmesi kök hücrelerin non-kanonik yolu kullanarak folikül olgunlaşmasında etkili olabileceğini göstermektedir.

Wnt ligandları, Wnt genlerinin hormonal regülasyonu, frizzled reseptörleri, overde eksprese edilen sinyal bileşenleri ve Wnt sinyali üyelerinin ekspresyonu ovaryum fonksiyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir (HernandezGifford JA, 2015). Bununla birlikte Wnt sinyal yolunun aktivasyonu, fibroblast proliferasyonunu

uyarabildiğini ve fibroblastın, kollajen tip I ve III gibi yüksek seviyelerde ECM sentezleme kabiliyetine sahip olan miyofibroblast soyuna farklılaşmasını sağlayabildiğini ve bunun sonucunda fibrozis oluşumuna yol açabileceğini göstermiştir (Huang ve diğerleri, 2018). An R. ve arkadaşları (2021) tarafından yapılan çalışmada sıçanlarda farklı dozlarda mikroplastikler verilmiş ve ovaryum üzerindeki etkileri incelenmiştir. Mikroplastiklerin AMH seviyesini düşürdüğü, gelişen folikül sayısını azalttığı saptanmıştır. Yapılan western-blot analizinde mikroplastik maruziyetinin Wnt/ β -katenin sinyal yollarıyla ilgili proteinlerin (Wnt, β -katenin, p- β -katenin) ve ana fibroz belirteçlerinin (dönüştürücü büyüme faktörü) ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını göstermiştir. Wnt/ β -katenin sinyal yolağını aktifleyerek fibrozise neden olduğu, oksidatif hasarı artırarak ovaryumda granüloza hücre apoptozu yaptığı ve sonuç olarak ovaryum rezerv kapasitesini azalttığını savunmuştur. Bizim çalışmamızda β -katenin ekspresyonunun gruplar içinde farklılık göstermemesi POY grubunda bile ekspresyonunun yüksek olması hem folikül gelişimini hemde fibrozisi tetikleyebileceğini göstermiştir.

6. SONUÇ

Deneysel POY modelinde İnsan DP-MSC'ler ovaryumda folikül sayısını korumuş ve ovaryum fonksiyonlarını Wnt/ β -katenin sinyal yolu üzerinden düzenlemiştir. Bizim çalışmamız DP-MSC'lerin POY hastalarında over yapısının ve işlevlerinin korunduğunu gösteren ilk çalışmadır. Bununla birlikte bu deneysel çalışmanın devamı olarak deneysel ve klinik çalışmalarla gebelik geliştirme potansiyellerine bakmak çalışmanın etkinliğini arttıracaktır.

7. KAYNAKÇA

Agung M, Ochi M, Yanada S, Adachi N, Izuta Y, Yamasaki T, Toda K. Mobilization of bone marrow-derived mesenchymal stem cells into the injured tissues after intraarticular injection and their contribution to tissue regeneration. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 2006;14:1307–1314. doi: 10.1007/s00167-006-0124-8.

Albright, F.; Smith, P.; Fraser, R. A., Syndrome characterized by primary ovarianin sufficiency and decreased stature. *Am J MedSci* 1942, 204, 625–648.

An R, Wang X, Yang L, Zhang J, Wang N, Xu F, Hou Y, Zhang H, Zhang L. Polystyrene microplastics cause granulosa cells apoptosis and fibrosis in ovary through oxidative stress in rats. *Toxicology.* 2021 Feb 15;449:152665. doi: 10.1016/j.tox.2020.152665. Epub 2020 Dec 24. PMID: 33359712.

Ansari S, Seagroves JT, Chen C, Shah K, Aghaloo T, Wu BM, Bencharit S, Moshaverinia A. Dental and orofacial mesenchymal stem cells in craniofacial regeneration: The prosthodontist's point of view. *J Prosthet Dent.* 2017 Oct;118(4):455-461. doi: 10.1016/j.prosdent.2016.11.021. Epub 2017 Apr 3. PMID: 28385446; PMCID: PMC5623090.

Antoine C, Ameye L, Paesmans M, Rozenberg S. Systematic review about breast cancer incidence in relation to hormone replacement therapy use. *Climacteric.* 2014;17:116–132. doi: 10.3109/13697137.2013.829812.

Apperley JF, Reddy N. Mechanism and management of treatment-related gonadal failure in recipients of high dose chemoradiotherapy. *Blood Rev.* 1995 Jun;9(2):93-116. doi: 10.1016/s0268-960x(95)90030-6. PMID: 7580395.

Assumpção CR. Falência ovariana precoce [Premature ovarian failure]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014 Mar;58(2):132-43. Portuguese. doi: 10.1590/0004-2730000002991. PMID: 24830590.

Aydin S, Şahin F. Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1144:123-132. doi: 10.1007/5584_2018_333. PMID: 30635857.

Aydin S, Şahin F. Stem Cells Derived from Dental Tissues. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1144:123-132. doi: 10.1007/5584_2018_333. PMID: 30635857.

Bahrehbar K, Rezazadeh Valojerdi M, Esfandiari F, Fathi R, Hassani SN, Baharvand H. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells improved premature ovarian failure. *World J Stem Cells.* 2020 Aug 26;12(8):857-878. doi: 10.4252/wjsc.v12.i8.857. PMID: 32952863; PMCID: PMC7477659.

Balachandar S, Dunkel IJ, Khakoo Y, Wolden S, Allen J, Sklar CA. Ovarian function in survivors of childhood medulloblastoma: Impact of reduced dose craniospinal irradiation and high-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue. *Pediatr Blood Cancer.* 2015;62:317–321. doi: 10.1002/pbc.25291.

Baltaci AK, Mogulkoc R, Kul A, Bediz CS, Ugur A. Opposite effects of zinc and melatonin on thyroid hormones in rats. *Toxicology.* 2004 Jan 15;195(1):69-75. doi: 10.1016/j.tox.2003.09.001. PMID: 14698569.

Berika M, Elgayyar ME, El-Hashash AH. Asymmetric cell division of stem cells in the lung and other systems. *Front Cell Dev Biol.* 2014 Jul 31;2:33. doi: 10.3389/fcell.2014.00033. PMID: 25364740; PMCID: PMC4206988.

Besikcioglu HE, Sarıbas GS, Ozogul C, Tiryaki M, Kilic S, Pınarlı FA, Gulbahar O. Determination of the effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells and ovarian stromal stem cells on follicular maturation in cyclophosphamide induced ovarian failure in rats. *Taiwan J Obstet Gynecol.* 2019 Jan;58(1):53-59. doi: 10.1016/j.tjog.2018.11.010. PMID: 30638481.

Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med.* 2004 Aug 19;351(8):792-8. doi: 10.1056/NEJMoa040533. PMID: 15317892.

Blumenfeld Z, Patel B, Leiba R, Zuckerman T. Gonadotropin-releasing hormone agonist may minimize premature ovarian failure in young women undergoing autologous stem cell transplantation. *Fertil Steril.* 2012 Nov;98(5):1266-70.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.07.1144. Epub 2012 Aug 27. PMID: 22935556.

Boerboom D, Paquet M, Hsieh M, Liu J, Jamin SP, Behringer RR, Sirois J, Taketo MM, Richards JS. Misregulated Wnt/beta-catenin signaling leads to ovarian granulosa cell tumor development. *Cancer Res.* 2005 Oct 15;65(20):9206-15. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1024. PMID: 16230381.

Bongso A, Lee EH. Stem Cells: Their definition, Classification and Sources, in *Stem cells from bench to bedside.* World Scientific Publishing Co. Singapore. 2005; 1-13.

Boyer A, Goff AK, Boerboom D. WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2010a. Jan;21(1):25-32. doi: 10.1016/j.tem.2009.08.005. Epub 2009 Oct 28. PMID: 19875303.

Boyer A, Goff AK, Boerboom D. WNT signaling in ovarian follicle biology and tumorigenesis. *Trends Endocrinol Metab.* 2010 Jan;21(1):25-32. doi: 10.1016/j.tem.2009.08.005. Epub 2009 Oct 28. PMID: 19875303.

Boyer A, Lapointe E, Zheng X, Cowan RG, Li H, Quirk SM, DeMayo FJ, Richards JS, Boerboom D. WNT4 is required for normal ovarian follicle development and female fertility. *FASEB J.* 2010b. Aug;24(8):3010-25. doi: 10.1096/fj.09-145789. Epub 2010 Apr 6. PMID: 20371632; PMCID: PMC2909279.

Britannica E., *Encyclopaedia Britannica.* London: Encyclopaedia Britannica (UK) Ltd.(2013).

Brougham MF, Wallace WH. Subfertility in children and young people treated for solid and haematological malignancies. *Br J Haematol.* 2005 Oct;131(2):143-55. doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05740.x. PMID: 16197443.

Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, Svinarich D, Dodds R, Govind CK, Chaudhry GR. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med.* 2019 Sep;13(9):1738-1755. doi: 10.1002/term.2914. Epub 2019 Jul 25. PMID: 31216380.

Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev.* 1997 Dec 15;11(24):3286-305. doi: 10.1101/gad.11.24.3286. PMID: 9407023.

Cartwright B, Robinson J, Seed PT, Fogelman I, Rymer J. Hormone Replacement Therapy Versus the Combined Oral Contraceptive Pill in Premature Ovarian Failure: A Randomized Controlled Trial of the Effects on Bone Mineral Density. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Sep;101(9):3497-505. doi: 10.1210/jc.2015-4063. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27340881.

Castagnoli L, Tagliabue E, Pupa SM. Inhibition of the Wnt Signalling Pathway: An Avenuto Control Breast Cancer Aggressiveness. *Int J MolSci.* 2020 Nov 28;21(23):9069. doi: 10.3390/ijms21239069. PMID: 33260642; PMCID: PMC7730964.

Chang EM, Lim E, Yoon S, Jeong K, Bae S, Lee DR, Yoon TK, Choi Y, Lee WS. Cisplatin Induces Over activation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/AKT/FOXO3a Pathway which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice. *PLoS One*. 2015 Dec 14;10(12):e0144245. doi: 10.1371/journal.pone.0144245. PMID: 26656301; PMCID: PMC4699462.

Chen C, Li S, Hu C, Cao W, Fu Q, Li J, Zheng L, Huang J. Protective Effects of Puerarin on Premature Ovarian Failure via Regulation of Wnt/ β -catenin Signaling Pathway and Oxidative Stress. *Reprod Sci*. 2021 Apr;28(4):982-990. doi: 10.1007/s43032-020-00325-0. Epub 2020 Sep 29. PMID: 32996063.

Chen L, Guo S, Wei C, Li H, Wang H, Xu Y. Effect of stem cell transplantation of premature ovarian failure in animal models and patients: A meta-analysis and case report. *Exp Ther Med*. 2018 May;15(5):4105-4118. doi: 10.3892/etm.2018.5970. Epub 2018 Mar 20. PMID: 29755593; PMCID: PMC5943678.

Clevers H. Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006 Nov 3;127(3):469-80. doi: 10.1016/j.cell.2006.10.018. PMID: 17081971.

Colter DC, Sekiya I, Prockop DJ. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 3;98(14):7841-5. doi: 10.1073/pnas.141221698. Epub 2001 Jun 26. PMID: 11427725; PMCID: PMC35429.

Cordeiro MM, Dong Z, Kaneko T, Zhang Z, Miyazawa M, Shi S, Smith AJ, Nör JE. Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):962-9. doi: 10.1016/j.joen.2008.04.009. PMID: 18634928.

Çil N, Mete GA. The effect of adipose-derived mesenchymal stem cell treatment on mTOR and p-mTOR expression in ovarian damage due to cyclophosphamide. *Reprod Toxicol*. 2021 Aug;103:71-78. doi: 10.1016/j.reprotox.2021.06.003. Epub 2021 Jun 10. PMID: 34098046.

Danner S, Kajahn J, Geismann C, Klink E, Kruse C. Derivation of oocyte-like cells from a clonal pancreatic stem cell line. *Mol Hum Reprod*. 2007;13:11-20.

De Koning CH, McDonnell J, Themmen AP, de Jong FH, Homburg R, Lambalk CB. The endocrine and follicular growth dynamics throughout the menstrual cycle in women with consistently or variably elevated early follicular phase FSH compared with controls. *Hum Reprod*. 2008 Jun;23(6):1416-23. doi: 10.1093/humrep/den092. Epub 2008 Mar 28. PMID: 18375407.

Dennis JE, Carbillet JP, Caplan AI, Charbord P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs*. 2002;170(2-3):73-82. doi: 10.1159/000046182. PMID: 11731697.

Di Prospero F, Luzi S, Iacopini Z. Cigarette smoking damages women's reproductive life. *Reprod Biomed Online*. 2004 Feb;8(2):246-7. doi: 10.1016/s1472-6483(10)60525-1. PMID: 14989811.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-7. doi: 10.1080/14653240600855905. PMID: 16923606.

Edessy M, Hosni HN, Shady Y, Waf Y, Bakr S, Kamel M. Autologous stem cells therapy, the first baby of idiopathic premature ovarian failure. *Acta Med Int.* 2016;3:19–23. doi: 10.5530/ami.2016.1.7.

El-Derany MO, Said RS, El-Demerdash E. Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Reverse Radiotherapy-Induced Premature Ovarian Failure: Emphasis on Signal Integration of TGF- β , Wnt/ β -Catenin and Hippo Pathways. *Stem Cell Rev Rep.* 2021 Aug;17(4):1429-1445. doi: 10.1007/s12015-021-10135-9. Epub 2021 Feb 16. PMID: 33594662.

Eşrefoğlu, M., Genel ve özel histoloji, Pelikan Tıp Ve Teknik Kitapçılık, Ankara, 356 s., 2004.

European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI, Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, Cartwright B, Cifkova R, de Muinck Keizer-Schrama S, Hogervorst E, Janse F, Liao L, Vlaisavljevic V, Zillikens C, Vermeulen N. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2016 May;31(5):926-37. doi: 10.1093/humrep/dew027. Epub 2016 Mar 22. PMID: 27008889.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981; 292 (5819): 154-6.

Fan HY, O'Connor A, Shitanaka M, Shimada M, Liu Z, Richards JS. Beta-catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediated ovulation and luteinization. *Mol Endocrinol.* 2010 Aug;24(8):1529-42. doi: 10.1210/me.2010-0141. Epub 2010 Jul 7. PMID: 20610534; PMCID: PMC2940463.

Fazeli Z, Abedindo A, Omrani MD, Ghaderian SMH. Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Therapy for Recovery of Fertility: a Systematic Review. *Stem Cell Rev Rep.* 2018 Feb;14(1):1-12. doi: 10.1007/s12015-017-9765-x. PMID: 28884412.

Forges T, Monnier-Barbarino P, Faure GC, Béné MC. Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology. *Hum Reprod Update.* 2004 Mar-Apr;10(2):163-75. doi: 10.1093/humup/dmh014. PMID: 15073145.

Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 2000 May 25;163(1-2):53-60. doi: 10.1016/s0303-7207(99)00240-3. PMID: 10963874.

Fouad H, Sabry D, Elsetohy K, Fathy N. Therapeutic efficacy of amniotic membrane stem cells and adipose tissue stem cells in rats with chemically induced ovarian failure. *J Adv Res.* 2016 Mar;7(2):233-41. doi: 10.1016/j.jare.2015.05.002. Epub 2015 May 30. PMID: 26966564; PMCID: PMC4767794.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976 Sep;4(5):267-74. PMID: 976387.

Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song AG. Mesenchymal Stem Cell Migration and Tissue Repair. *Cells.* 2019 Jul 28;8(8):784. doi: 10.3390/cells8080784. PMID: 31357692; PMCID: PMC6721499.

Fu YX, Ji J, Shan F, Li J, Hu R. Human mesenchymal stem cell treatment of premature ovarian failure: new challenges and opportunities. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Mar

3;12(1):161. doi: 10.1186/s13287-021-02212-0. PMID: 33658073; PMCID: PMC7931610.

Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell*. 2004 Mar 19;116(6):769-78. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00255-7. PMID: 15035980.

Gao M, Yu Z, Yao D, Qian Y, Wang Q, Jia R. Mesenchymal stem cells therapy: A promising method for the treatment of uterine scars and premature ovarian failure. *Tissue Cell*, 2022.

Gartner, L. P. and J. L. Hiatt, *Color textbook of histology*. Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier, 2007.

Gharib SD, Wierman ME, Shupnik MA, Chin WW. Molecular biology of pituitary gonadotropins. *Endocr Rev*. 1990;11:177-99.

Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Horm Res*. 2007;68(4):196-202. doi: 10.1159/000102537. Epub 2007 May 9. PMID: 17495481.

Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure. *Hum Reprod Update*. 2005 Jul-Aug;11(4):391-410. doi: 10.1093/humupd/dmi012. Epub 2005 May 26. PMID: 15919682.

Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Dec 5;97(25):13625-30. doi: 10.1073/pnas.240309797. PMID: 11087820; PMCID: PMC17626.

Gunsilius E, Gastl G, Petzer AL. Hematopoietic stem cells. *Biomed Pharmacother*. 2001 May;55(4):186-94. doi: 10.1016/s0753-3322(01)00051-8. PMID: 11393804.

Hagen T, Di Daniel E, Culbert AA, Reith AD. Expression and characterization of GSK-3 mutants and their effect on beta-catenin phosphorylation in intact cells. *J Biol Chem*. 2002 Jun 28;277(26):23330-5. doi: 10.1074/jbc.M201364200. Epub 2002 Apr 19. PMID: 11967263.

Heikkilä M, Prunskaitė R, Naillat F, Itäranta P, Vuoristo J, Leppäluoto J, Peltoketo H, Vainio S. The partial female to male sex reversal in Wnt-4-deficient females involves induced expression of testosterone biosynthetic genes and testosterone production, and depends on androgen action. *Endocrinology*. 2005 Sep;146(9):4016-23. doi: 10.1210/en.2005-0463. Epub 2005 Jun 2. PMID: 15932923.

Hernandez Gifford JA. The role of WNT signaling in adult ovarian folliculogenesis. *Reproduction*. 2015 Oct;150(4):R137-48. doi: 10.1530/REP-14-0685. Epub 2015 Jun 30. PMID: 26130815; PMCID: PMC4560668.

Hernandez-Gonzalez I, Gonzalez-Robayna I, Shimada M, Wayne CM, Ochsner SA, White L, Richards JS. Gene expression profiles of cumulus cell oocyte complexes during ovulation reveal cumulus cells express neuronal and immune-related genes: does this expand their role in the ovulation process? *Mol Endocrinol*. 2006 Jun;20(6):1300-21. doi: 10.1210/me.2005-0420. Epub 2006 Feb 2. PMID: 16455817.

Hoffman BL, Schorge JO, Bradshaw KD, Halvorson LM, Schaffer JI, Corton MM. *Williams Gynecology*. 3th Edition. 2016: MC GRAW HILL.

Hsieh M, Johnson MA, Greenberg NM, Richards JS. Regulated expression of Wnts and Frizzleds at specific stages of follicular development in the rodent ovary. *Endocrinology*. 2002 Mar;143(3):898-908. doi: 10.1210/endo.143.3.8684. PMID: 11861511.

Huang GR, Wei SJ, Huang YQ, Xing W, Wang LY, Liang LL. Mechanism of combined use of vitamin D and puerarin in anti-hepatic fibrosis by regulating the Wnt/ β -catenin signalling pathway. *World J Gastroenterol*. 2018 Sep 28;24(36):4178-4185. doi: 10.3748/wjg.v24.i36.4178. PMID: 30271082; PMCID: PMC6158481.

Huang GT. Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress. *Regen Med*. 2009 Sep;4(5):697-707. doi: 10.2217/rme.09.45. PMID: 19761395; PMCID: PMC2785543.

Huang J, Shan W, Li N, Zhou B, Guo E, Xia M, Lu H, Wu Y, Chen J, Wang B, Xi L, Ma D, Chen G, Li K, Sun C. Melatonin provides protection against cisplatin-induced ovarian damage and loss of fertility in mice. *Reprod Biomed Online*. 2021 Mar;42(3):505-519. doi: 10.1016/j.rbmo.2020.10.001. Epub 2020 Oct 8. PMID: 33388265.

Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, Liu SP, Jong GP, Chiu YW, Wu HS, Tsou YA, Cheng CW, Lin SZ. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cell Transplant*. 2013;22(4):701-9. doi: 10.3727/096368912X655127. Epub 2012 Oct 12. PMID: 23068312.

Huang X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal. *Cell Death Differ*. 2007 Nov;14(11):1851-9. doi: 10.1038/sj.cdd.4402225. Epub 2007 Sep 7. PMID: 17823616.

Huelsken J, Behrens J. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 2002 Nov 1;115(Pt 21):3977-8. doi: 10.1242/jcs.00089. PMID: 12356903.

Huhtaniemi, I., Hovatta, O., La Marca, A., Livera, G., Monniaux, D., Persani, L., et al. (2018). Advances in the Molecular Pathophysiology, Genetics, and Treatment of Primary Ovarian Insufficiency. *Trends Endocrinol. Metab.* 29, 400–419. doi:10.1016/j.tem.2018.03.010.

Hurwitz SN, Jung SK, Kurre P. Hematopoietic stem and progenitor cell signaling in the niche. *Leukemia*. 2020 Dec;34(12):3136-3148. doi: 10.1038/s41375-020-01062-8. Epub 2020 Oct 19. PMID: 33077865.

Inoue A, Akiyama T, Nagata M, Aoki F. The perivitelline space-forming capacity of mouse oocytes is associated with meiotic competence. *Journal of Reproduction and Development*, 2007; 53(5):1043-1052.

Jang H, Lee OH, Lee Y, Yoon H, Chang EM, Park M, Lee JW, Hong K, Kim JO, Kim NK, Ko JJ, Lee DR, Yoon TK, Lee WS, Choi Y. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. *J Pineal Res*. 2016 Apr;60(3):336-47. doi: 10.1111/jpi.12316. Epub 2016 Mar 2. PMID: 26882203.

Jankowska K. Premature ovarian failure. *Prz Menopauzalny*. 2017 Jun;16(2):51-56. doi: 10.5114/pm.2017.68592. Epub 2017 Jun 30. PMID: 28721130; PMCID: PMC5509972.

Jeays-Ward K, Hoyle C, Brennan J, Dandonneau M, Alldus G, Capel B, Swain A. Endothelial and steroidogenic cell migration are regulated by WNT4 in

thedevelopingmammalian gonad. *Development*. 2003 Aug;130(16):3663-70. doi: 10.1242/dev.00591. PMID: 12835383.

Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002 Jul 4;418(6893):41-9. doi: 10.1038/nature00870. Epub 2002 Jun 20. Erratum in: *Nature*. 2007 Jun 14;447(7146):879-80. PMID: 12077603.

Jin M, Yu Y, Huang H. An update on primary ovarian insufficiency. *Sci China Life Sci*. 2012 Aug;55(8):677-86. doi: 10.1007/s11427-012-4355-2.

Junqueira LC., Carneiro J. (Çev.: Aytekin2009), *Basic Histology-Text & Atlas*, Nobel Tıp kitabevi; 2003.

Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S, Wolf I, Kanety H, Sredni B, Meirou D. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burnout"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. *Sci Transl Med*. 2013 May 15;5(185):185ra62. doi: 10.1126/scitranslmed.3005402. PMID: 23677591.

Karakoç L., Fındıklı N., Ünsal E., Enginsu E., Balaban B., Özkavukçu S., Ergin E., Üremeye Yardımcı Tekniklerde Laboratuvar- Teknik Konular ve Pratik Uygulama, Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara. S:14-15, 2019.

Karaöz E. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu. Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma Merkezi, Kocaeli, 2010.

Kato M, Kato M. WNT signaling pathway and stem cell signaling network. *Clin Cancer Res*. 2007 Jul 15;13(14):4042-5. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2316. PMID: 17634527.

Kierszenbaum A. L. (Çeviri Edt.; Demir R.) *Histology and Cell Biology An Introduction to Pathology*. Palme Yayıncılık, 2006.

Kierszenbaum A.L., Tres LL. *Histology and Cell Biology*. 4th Edition 2016: Saunders.

Kikuchi A, Yamamoto H, Sato A, Matsumoto S. New insights into the mechanism of Wnt signaling pathway activation. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2011;291:21-71. doi: 10.1016/B978-0-12-386035-4.00002-1. PMID: 22017973.

Kim Y, Kobayashi A, Sekido R, DiNapoli L, Brennan J, Chaboissier MC, Poulat F, Behringer RR, Lovell-Badge R, Capel B. Fgf9 and Wnt4 act as antagonistic signals to regulate mammalian sex determination. *PLoS Biol*. 2006 Jun;4(6):e187. doi: 10.1371/journal.pbio.0040187. Epub 2006 May 23. PMID: 16700629; PMCID: PMC1463023.

Kitamura C, Kimura K, Nakayama T, Terashita M. Temporal and spatial expression of c-jun and jun-B proto-oncogenes in pulp cells involved with reparative dentinogenesis after cavity preparation of rat molars. *J Dent Res*. 1999 Feb;78(2):673-80. doi: 10.1177/00220345990780020701. PMID: 10029466.

Koçyiğit I, Kaynar L, Çetin M. Hematopoietic stem cell Biology. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics*. 2008; 1(2): 16-22.

Kohn AD, Moon RT. Wnt and calcium signaling: beta-catenin-in dependent pathways. *Cell Calcium*. 2005 Sep-Oct;38(3-4):439-46. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.022. PMID: 16099039.

Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*. 2013;85(1):3-10. doi: 10.1159/000345615. Epub 2012 Dec 13. PMID: 23257690.

Kwee J, Schats R, McDonnell J, Themmen A, de Jong F, Lambalk C. Evaluation of anti-Müllerian hormone as a test for the prediction of ovarian reserve. *Fertil Steril*. 2008 Sep;90(3):737-43. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.07.1293. Epub 2007 Oct 17. PMID: 17923131.

Lai AY, Kondo M. T and B lymphocyte differentiation from hematopoietic stem cell. *Semin Immunol*. 2008 Aug;20(4):207-12. doi: 10.1016/j.smim.2008.05.002. Epub 2008 Jun 25. PMID: 18583148; PMCID: PMC2570370.

Lapointe E, Boerboom D. WNT signaling and the regulation of ovarian steroidogenesis. *Front Biosci (Schol Ed)*. 2011 Jan 1;3(1):276-85. doi: 10.2741/s151. PMID: 21196376.

Lee MM, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance: a gonadal hormone with multiple functions. *Endocr Rev*. 1993 Apr;14(2):152-64. doi: 10.1210/edrv-14-2-152. PMID: 8325249.

Ling L, Feng X, Wei T, Wang Y, Wang Y, Wang Z, Tang D, Luo Y, Xiong Z. Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism. *Stem Cell Res Ther*. 2019 Jan 25;10(1):46. doi: 10.1186/s13287-019-1136-x. PMID: 30683144; PMCID: PMC6347748.

Ling L, Feng X, Wei T, Wang Y, Wang Y, Zhang W, He L, Wang Z, Zeng Q, Xiong Z. Effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS)-pretreated human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation on primary ovarian insufficiency in rats. *Stem Cell Res Ther*. 2017 Dec 19;8(1):283. doi: 10.1186/s13287-017-0739-3. PMID: 29258619; PMCID: PMC5735876.

Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, Xu GT, Liang A, Liu S. Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2015 Mar;33(3):627-38. doi: 10.1002/stem.1909. PMID: 25447379.

Liu T, Li Q, Wang S, Chen C, Zheng J. Transplantation of ovarian granulosa-like cells derived from human induced pluripotent stem cells for the treatment of murine premature ovarian failure. *Mol Med Rep*. 2016;13:5053–5058. doi: 10.3892/mmr.2016.5191.

Lorzadeh N., Kazemirad N., Application of Stem Cells to Infertility Treatment with Emphasis on Mesenchymal Stem Cells and Ovarian Stem Cells, 2018.

Mahajan N. Fertility preservation in female cancer patients: An overview. *J Hum Reprod Sci*. 2015 Jan-Mar;8(1):3-13. doi: 10.4103/0974-1208.153119. PMID: 25838742; PMCID: PMC4381379.

Mamas L, Mamas E. Premature ovarian failure and dehydroepiandrosterone. *Fertil Steril*. 2009 Feb;91(2):644-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.11.055. Epub 2008 Mar 5. PMID: 18321501.

Martinez-Agosto JA, Mikkola HK, Hartenstein V, Banerjee U. The hematopoietic stem cell and its niche: a comparative view. *Genes Dev*. 2007 Dec 1;21(23):3044-60. doi: 10.1101/gad.1602607. PMID: 18056420.

Mattison DR, Thorgeirsson SS. Smoking and industrial pollution, and their effects on menopause and ovarian cancer. *Lancet*. 1978 Jan 28;1(8057):187-8. doi: 10.1016/s0140-6736(78)90617-7. PMID: 74610.

Mayer LP, Pearsall NA, Christian PJ, Devine PJ, Payne CM, McCuskey MK, Marion SL, Sipes IG, Hoyer PB. Long-term effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol*. 2002 Nov-Dec;16(6):775-81. doi: 10.1016/s0890-6238(02)00048-5. PMID: 12401505.

Metcalfe C, Mendoza-Topaz C, Mieszczanek J, Bienz M. Stability elements in the LRP6 cytoplasmic tail confer efficient signalling upon DIX-dependent polymerization. *J Cell Sci*. 2010 May 1;123(Pt 9):1588-99. doi: 10.1242/jcs.067546. Epub 2010 Apr 13. PMID: 20388731; PMCID: PMC2858023.

Moore KL, Persaud TVN: Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. M. Yıldırım, I. Okar, H. Dalçık (Çev). 6. baskıdan çeviri. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.

Morgani SM, Canham MA, Nichols J, Sharov AA, Migueles RP, Ko MS, Brickman JM. Totipotent embryonic stem cells arise in ground-state culture conditions. *Cell Rep*. 2013 Jun 27;3(6):1945-57. doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.034. Epub 2013 Jun 6. PMID: 23746443; PMCID: PMC3701323.

Myers M, Britt KL, Wreford NG, Ebling FJ, Kerr JB. Methods for quantifying follicular numbers with in the Mouse ovary. *Reproduction*. 2004 May;127(5):569-80. doi: 10.1530/rep.1.00095. PMID: 15129012.

Nadig RR. Stem cell therapy - Hype or hope? A review. *J Conserv Dent*. 2009 Oct;12(4):131-8. doi: 10.4103/0972-0707.58329. PMID: 20543921; PMCID: PMC2879724.

Naillat F, Yan W, Karjalainen R, Liakhovitskaia A, Samoylenko A, Xu Q, Sun Z, Shen B, Medvinsky A, Quaggin S, Vainio SJ. Identification of the genes regulated by Wnt-4, a critical signal for commitment of the ovary. *Exp Cell Res*. 2015 Mar 15;332(2):163-78. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.01.010. Epub 2015 Jan 30. PMID: 25645944.

Niimura S, Kawakami S, Takano H. Changes in the amount of cytoplasmic inclusions in mouse oocytes during meiotic maturation in vivo and in vitro. *Reproductive Medicine and Biology*, 2004; 3:231-236.

Noyan A. Yasamda ve Hekimlikte fizyoloji. 13. basım. Ankara: Meteksan Anonim Sirketi, 2003.

Ohazama A, Modino SA, Miletich I, Sharpe PT. Stem-cell-based tissue engineering of murine teeth. *J Dent Res*. 2004 Jul;83(7):518-22. doi: 10.1177/154405910408300702. PMID: 15218039.

Osaki J, Yamazaki S, Hikita A, Hoshi K. Hematopoietic progenitor cells specifically induce a unique immune response in dental pulp under conditions of systemic inflammation. *Heliyon*. 2022 Feb 5;8(2):e08904. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e08904. PMID: 35198771; PMCID: PMC8842015.

Özcan T, Seyis S, Akçay B. Hücresel Kardiyomiyoblasti ve Kök Hücre Tedavisi, Türkiye Klinikleri. *J Cardiovasc Sci*. 2007; 19: 68-76.

Parakh TN, Hernandez JA, Grammer JC, Weck J, Hunzicker-Dunn M, Zeleznik AJ, Nilson JH. Follicle-stimulating hormone/cAMP regulation of aromatase gene expression requires beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Aug 15;103(33):12435-40. doi:

10.1073/pnas.0603006103. Epub 2006 Aug 8. PMID: 16895991; PMCID: PMC1533882.

Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. Human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* 2000; 113(1): 5–10.

Prentice D. Adult stem cells in: *Monitoring stem cell research: a report of the President's Council on Bioethics.* Washington (DC), Government Printing Office. 2004; 309-46.

Qin JC, Fan L, Qin AP. The effect of dehydroepiandrosterone (DHEA) supplementation on women with diminished ovarian reserve (DOR) in IVF cycle: Evidence from a meta-analysis. *J Gynecol Obstet Hum Reprod.* 2017 Jan;46(1):1-7. doi: 10.1016/j.jgyn.2016.01.002. Epub 2016 May 19. PMID: 28403950.

Ratajczak MZ. Phenotypic and functional characterization of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol.* 2008 Jul;15(4):293-300. doi: 10.1097/MOH.0b013e328302c7ca. PMID: 18536565.

Rebar RW, Connolly HV. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertil Steril.* 1990 May;53(5):804-10. PMID: 2110072.

Reynaud, K.;Cortvrindt, R.; Verlinde, F.; De Schepper, J.; Bourgain, C.; Smitz, J., Number of ovarian follicles in human fetuses with the 45, X karyotype. *Fertil Steril* 2004, 81,(4), 1112– 1119.

Ross, M. H. and W. Pawlina, *Histology: a text and atlas: with correlated cell and molecular biology.* Philadelphia, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins Health, 2011.

Routledge D, Scholpp S. Mechanisms of intercellular Wnt transport. *Development.* 2019 May 15;146(10):dev176073. doi: 10.1242/dev.176073. PMID: 31092504.

Sanchez AM, Viganò P, Quattrone F, Pagliardini L, Papaleo E, Candiani M, Panina-Bordignon P. The WNT/ β -catenin signaling pathway and expression of survival promoting genes in luteinized granulosa cells: endometriosis as a paradigm for a dysregulated apoptosis pathway. *Fertil Steril.* 2014 Jun;101(6):1688-96. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.02.040. Epub 2014 Mar 21. PMID: 24661731.

Shareghi-Oskoue O, Aghebati-Maleki L, Yousefi M. Transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells to treat premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther.* 2021 Aug 11;12(1):454. doi: 10.1186/s13287-021-02529-w. PMID: 34380572; PMCID: PMC8359553.

Sheikhansari G, Aghebati-Maleki L, Nouri M, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M. Current approaches for the treatment of premature ovarian failure with stem cell therapy. *Biomed Pharmacother.* 2018 Jun;102:254-262. doi: 10.1016/j.biopha.2018.03.056. Epub 2018 Mar 22. PMID: 29567538.

Sheldahl LC, Slusarski DC, Pandur P, Miller JR, Kühl M, Moon RT. Dishevelled activates Ca²⁺ flux, PKC, and Cam KII in vertebrate embryos. *J Cell Biol.* 2003 May 26;161(4):769-77. doi: 10.1083/jcb.200211094. PMID: 12771126; PMCID: PMC2199364.

Shi X, Mao J, Liu Y. Pulp stem cells derived from human permanent and deciduous teeth: Biological characteristics and therapeutic applications. *Stem Cells Transl Med.*

2020 Apr;9(4):445-464. doi: 10.1002/sctm.19-0398. Epub 2020 Jan 14. PMID: 31943813; PMCID: PMC7103623.

Shyu WC, Lin SZ, Yang HI, Tzeng YS, Pang CY, Yen PS, Li H. Functional recovery of stroke rats induced by granulocyte colony-stimulating factor-stimulated stem cells. *Circulation*. 2004 Sep 28;110(13):1847-54. doi: 10.1161/01.CIR.0000142616.07367.66. Epub 2004 Sep 20. PMID: 15381647.

Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, Santos AR, Zago MA. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2003;21(6):661-9. doi: 10.1634/stemcells.21-6-661. PMID: 14595126.

Simpson JL, Rajkovic A. Ovarian differentiation and gonadal failure. *Am J Med Genet*. 1999 Dec 29;89(4):186-200. doi: 10.1002/(sici)1096-8628(19991229)89:4<186::aid-ajmg3>3.0.co;2-5. PMID: 10727994.

Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y, Gao L, Wang G, Liu Z, Li H, Ding H, Wu H, Wang F, Wang J, Li H. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *Biomed Res Int*. 2016;2016:2517514. doi: 10.1155/2016/2517514. Epub 2016 Mar 7. PMID: 27047962; PMCID: PMC4800076.

Spangrude GJ. When is a stem cell really a stem cell? *Bone Marrow Transplant*. 2003 Aug;32 Suppl 1:S7-11. doi: 10.1038/sj.bmt.1703936. PMID: 12931232.

Speroff, L., Glass, R.H. and Kase, N.G., *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999:487-522 and 1013-1132.

Springer LN, McAsey ME, Flaws JA, Tilly JL, Sipes IG, Hoyer PB. Involvement of apoptosis in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ova toxicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1996 Aug;139(2):394-401. doi: 10.1006/taap.1996.0180. PMID: 8806857.

Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant*. 2016;25(5):829-48. doi: 10.3727/096368915X689622. Epub 2015 Sep 29. PMID: 26423725.

Stamos JL, Weis WI. The β -catenin destruction complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013 Jan 1;5(1):a007898. doi: 10.1101/cshperspect.a007898. PMID: 23169527; PMCID: PMC3579403.

Sternberg SS. *Histology for Pathologist*, Lippincott-Raven, New York, 1997:297-305.

Stoltz JF, de Isla N, Li YP, Bensoussan D, Zhang L, Huselstein C, et al. Stem cells and regenerative medicine: Myth or reality of the 21st century. *Stem cells international* 2015.

Sullivan SD, Sarrel PM, Nelson LM. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause. *Fertil Steril*. 2016 Dec;106(7):1588-1599. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.09.046. PMID: 27912889; PMCID: PMC5137796.

Sükür YE, Kıvançlı IB, Özmen B. Ovarian aging and premature ovarian failure. *J Turk Ger Gynecol Assoc*. 2014;15(3):190-196. Published 2014 Aug 8. doi:10.5152/jtgg.2014.0022.

Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, Kuroda T, Yamadera R, Sano C, Murata N, Aida T, Nakama K, Aono F, Aoyama N, Kato K, Kato O. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Lab Invest.* 2013 Feb;93(2):181-93. doi: 10.1038/labinvest.2012.167. Epub 2012 Nov 19. PMID: 23212100; PMCID: PMC3561594.

Tekelioglu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelisme, Antıp Yayınları, Ankara, 2002:251-229.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 1998; 282:1145-1147.

Todorovic V, Markovic D, Milosevic-Jovcic N, Petakov M, Balint B, Colic M, Milenkovic A, Colak I, Jokanovic V, Nikolic N. Dental pulp stem cells - potential significance in regenerative medicine. *Stom Glas S.* 2008;55: 170-8.

Trounson A. The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev.* 2006; 27 :208-219. doi: 10.1210/er.2005-0016. Epub 2006 Jan 24. PMID: 16434509.

Tsutsui TW. Dental Pulp Stem Cells: Advances to Applications. *Stem Cells Cloning.* 2020 Feb 13;13:33-42. doi: 10.2147/SCCAA.S166759. PMID: 32104005; PMCID: PMC7025818.

Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling. *Nature.* 1999 Feb 4;397(6718):405-9. doi: 10.1038/17068. PMID: 9989404.

van Rooij IA, Broekmans FJ, te Velde ER, Fauser BC, Bancsi LF, de Jong FH, Themmen AP. Serum anti-Müllerian hormone levels: a novel measure of ovarian reserve. *Hum Reprod.* 2002 Dec;17(12):3065-71. doi: 10.1093/humrep/17.12.3065. PMID: 12456604.

Vanecek J, Klein DC. Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca²⁺ in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology.* 1992 Feb;130(2):701-7. doi: 10.1210/endo.130.2.1733718. PMID: 1733718.

Volponi AA, Pang Y, Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* 2010 Dec;20(12):715-22. doi: 10.1016/j.tcb.2010.09.012. Epub 2010 Oct 28. PMID: 21035344; PMCID: PMC3000521.

Wang HX, Tekpetey FR, Kidder GM. Identification of WNT/beta-CATENIN signaling pathway components in human cumulus cells. *Mol Hum Reprod.* 2009 Jan;15(1):11-7. doi: 10.1093/molehr/gan070. Epub 2008 Nov 26. PMID: 19038973.

Wang J, Liu W, Yu D, Yang Z, Li S, Sun X. ResearchProgress on theTreatment of PrematureOvarianFailure Using MesenchymalStemCells: A LiteratureReview. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Dec 13;9:749822. doi: 10.3389/fcell.2021.749822. PMID: 34966738; PMCID: PMC8710809.

Wesevich V, Kellen AN, Pal L. Recent advances in understanding primary ovarian insufficiency. *F1000Res.* 2020 Sep 7;9:F1000 Faculty Rev-1101. doi: 10.12688/f1000research.26423.1. PMID: 32934798; PMCID: PMC7477642.

Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of

origin for banking and clinical use. *Cryobiology*. 2009 Oct;59(2):150-7. doi: 10.1016/j.cryobiol.2009.06.005. Epub 2009 Jun 16. PMID: 19538953; PMCID: PMC2757034.

Xiang, J., Jiang, T., Zhang, W., Xie, W., Tang, X., and Zhang, J. (2019). Human Umbilical Cord – Derived Mesenchymal Stem Cells Enhanced HK-2 Cell Autophagy through Micro RNA-145 by Inhibiting the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Exp. Cel. Res.* 378, 198–205. doi:10.1016/j.yexcr.2019.03.019.

Yamada Y, Nakamura-Yamada S, Konoki R, Baba S. Promising advances in clinical trials of dental tissue-derived cell-based regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2020 May 12;11(1):175. doi: 10.1186/s13287-020-01683-x. PMID: 32398041; PMCID: PMC7218566.

Yamamoto S, Nishimura O, Misaki K, Nishita M, Minami Y, Yonemura S, Tarui H, Sasaki H. Cthrc1 selectively activates the planar cell polarity pathway of Wnt signaling by stabilizing the Wnt-receptor complex. *Dev Cell.* 2008 Jul;15(1):23-36. doi: 10.1016/j.devcel.2008.05.007. PMID: 18606138.

Yang Y, Cheung HH, Zhang C, Wu J, Chan WY. Melatonin as Potential Targets for Delaying Ovarian Aging. *Curr Drug Targets.* 2019;20(1):16-28. doi: 10.2174/1389450119666180828144843. PMID: 30156157.

Yi T, Song SU. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Arch Pharm Res.* 2012 Feb;35(2):213-21. doi: 10.1007/s12272-012-0202-z. Epub 2012 Feb 28. PMID: 22370776.

Yoon SY, Yoon JA, Park M, Shin EY, Jung S, Lee JE, Eum JH, Song H, Lee DR, Lee WS, Lyu SW. Recovery of ovarian function by human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in cisplatin-induced premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Jun 26;11(1):255. doi: 10.1186/s13287-020-01769-6. PMID: 32586410; PMCID: PMC7318510.

Yürüker S., Çakar N., “Kadın Genital Sistemi Gelişmesi”, JİNEKOLOJİ: Üreme Embriyolojisi & İnfertilite ve Jinekolojik Onkoloji, Ankara: Medical Network, 2006:26-35.

Zhang C. The Roles of Different Stem Cells in Premature Ovarian Failure. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2020;15(6):473-481. doi: 10.2174/1574888X14666190314123006. PMID: 30868961.

EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 25.08.2021-E.93120



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-93120
Konu : Başvurunuz Hk.

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Nazlı ÇİL

İlgi : 20/08/2021 tarihli dilekçeniz. *24.133.157.237*
2457
25.08.2021

"Siklofosamid İle İndüklenen Sıçan Prematüre Ovaryan Yetmezlik Modelinde Dental Pulpa Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İn-Vitro Fertilizasyona Etkisi" (PAUHDEK-2021/38) konulu çalışmanız 24.08.2021 tarih ve 2021/07 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, çalışmanın **Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna** ve **36 adet sıçan kullanılarak yapılmasına** oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Gülçin METE
Başkan



Evrak Tarih ve Sayısı: 11.05.2022-E.203888



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-203888
Konu : Başvurunuz Hk.

Sayın Doç. Dr. Nazlı ÇİL

İlgi : 09/05/2022 tarihli dilekçeniz. *192.168.90.66*
2457
12.05.2022

"Siklofosamid ile İndüklenen Sıçan Prematüre Ovaryan Yetmezlik Modelinde Dental Pulpa Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin İn-Vitro Fertilizasyona Etkisi (PAUHDEK-2021/38)" konulu çalışmanız 10.05.2022 tarih ve 2022/04 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın adının "**Siklofosamid ile İndüklenen Sıçan Prematüre Ovaryan Yetmezlik Modelinde Dental Pulpa Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücrelerin Etkisi**" olarak değiştirilmesinin Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Gülçin METE
Başkan

