



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**YAŞLI FARE OVARYUMUNDA MELATONİNİN  
PTEN/PI3K/AKT YOLAĞINA ETKİSİ**

**İlay BOZ**

**Ocak 2024  
DENİZLİ**

T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YAŞLI FARE OVARYUMUNDA MELATONİNİN PTEN/PI3K/AKT  
YOLAĞINA ETKİSİ

HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İlay BOZ

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Denizli, 2024

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının 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.

Öğrenci Adı Soyadı : İlay BOZ

İmza :

## ÖZET

### YAŞLI FARE OVARYUMUNDA MELATONİNİN PTEN/PI3K/AKT YOLAĞINA ETKİSİ

İlay BOZ

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji ABD

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE

Ocak 2024 Sayfa 65

Günümüzde, modern yaşam ile birlikte hayatımıza giren mevcut alışkanlıklar; kötü beslenme, uykusuzluk, stres ve daha birçok durum dolaylı olarak infertiliteye sebep olabilmektedir. Mevcut yaşam şartları, üreme yaşını ileriye taşımıştır. Kadın üreme sorunlarına bakıldığında, ilerleyen yaşın vücutta biriktirdiği mutasyonlar ve menstrual sikluslarla vücuttan düzenli olarak atılan oositler nedeniyle, over rezervi giderek azalmaktadır. Canlıların sirkadiyen ritimlerinin hücrel faaliyetler üzerindeki etkisi incelendiğinde, üretimi karanlık ve aydınlığa göre belirlenen endojen melatonin hormonunun etkisi bilinmektedir. Bu çalışmada; literatürde yaşlanma karşıtı özellikleri ve antioksidan özelliği bilinen eksojen melatonin hormonunun, yaşlı fare ovaryumunda PTEN/PI3K/AKT yolağına etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, 12 haftalık 24 adet, 20 aylık 24 adet olmak üzere toplamda 48 adet Balb/c cinsi sağlıklı dişi fare kullanıldı. Deney için kullanılan erişkin ve yaşlı fareler; Erişkin Kontrol (EK) Grubu, Erişkin Melatonin (EM) Grubu, Erişkin Sham (ES) Grubu, Yaşlı Kontrol (YK) Grubu, Yaşlı Melatonin (YM) Grubu, Yaşlı Sham (YS) Grubu olmak üzere toplamda 6 gruba ayrıldı. Grup EK ve YK'ya ait farelere, 7 gün boyunca hiçbir uygulama yapılmamıştır. Grup EM ve YM'ye ait farelere, 7 gün boyunca (10mg/kg intraperitoneal) melatonin verilmiştir. Grup ES ve YS'ye ait farelere, 7 gün boyunca %10'a seyreltilmiş etil alkol intraperitoneal olarak uygulandı. 8. Gün itibariyle ketamin/ksilazin 200/10mg/kg intraperitoneal olarak farelere verildikten sonra ovaryum dokuları çıkarıldı. Hayvanlar servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edilerek deney sonlandırıldı. Histokimyasal ve immünohistokimyasal analizler için ovaryum dokuları muhafaza edilerek, doku takip ve blokama prosedürleri izlendi. Yaşlı kontrol grubu ile yaşlı melatonin grubu karşılaştırıldığında, folikül sayılarındaki artış dikkat çekiciydi. Çalışmamızda melatoninin çözücüsü olarak kullanılan etil alkolün uygulandığı, sham gruplarına ait dokularda, atretik haldeki foliküllerin sayısındaki artış belirgindi. Sonuç olarak; folikül sayısı bakımından erişkin gruplarda, melatonin uygulanan gruba kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlılık bulunamadı. PTEN/PI3K/AKT ekspresyonu erişkin gruplarda kontrol ve sham arasında farklılık göstermezken yaşlı deneklerde melatonin uygulanan grupta diğer iki gruba karşı artmıştı. Melatoninin, ovaryum dokusundaki etkilerinin daha iyi anlaşılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

**Anahtar Kelimeler:** Fare; Melatonin; Ovaryum; PTEN/PI3K/AKT

## ABSTRACT

### EFFECT OF MELATONIN ON PTEN/PI3K/AKT PATHWAY IN AGED MOUSE OVARIUM

BOZ, Ilay

Master Thesis, Department of Histology and Embryology

Thesis Advisor: Prof. Gulcin ABBAN METE

January 2024, Page 65

The habits that have entered our lives with modern living today, such as poor nutrition, insomnia, stress, and many other conditions, can indirectly lead to infertility. The current living conditions have delayed the age of reproduction. When looking at women's reproductive issues, the accumulated mutations in the body with advancing age and the regular expulsion of oocytes through menstrual cycles cause a gradual decrease in ovarian reserve. When the impact of circadian rhythms in living organisms on cellular activities is examined, it is known that the effect of the endogenous melatonin hormone, whose production is determined by darkness and light, plays a role. In this study, the aim was to investigate the effect of exogenous melatonin hormone, known for its anti-aging and antioxidant properties in the literature, on the PTEN/PI3K/AKT pathway in the ovaries of elderly mice. A total of 48 healthy female Balb/c mice were used in the study, with 24 mice aged 12 weeks and 24 mice aged 20 months. The mice used for the experiment were divided into six groups: Adult Control (AC) Group, Adult Melatonin (AM) Group, YS Adult Sham (AS) Group, Aged Control (AG Control) Group, Aged Melatonin (AG Melatonin) Group, and Aged Sham (AG S) Group. Mice from groups AC and AGC received no treatment for 7 days. Mice from groups AM and AGM were administered melatonin (10mg/kg intraperitoneally) for 7 days. Mice from groups AS and AGS were intraperitoneally administered 10% diluted ethyl alcohol for 7 days. On day 8, mice were administered 200/10 mg/kg ketamine/xylazine intraperitoneally, and then, ovarian tissues were removed. The experiment was terminated by sacrificing the animals using the cervical dislocation method. Histological and immunohistochemical analyses were followed by tissue preservation and blocking procedures. When comparing the AG control group with the AG melatonin group, there was a noticeable increase in the number of follicles. In tissues belonging to sham groups where ethyl alcohol, used as a solvent for melatonin, was applied, there was a significant increase in the number of atretic follicles. In terms of the number of follicles, there was no statistically significant difference between the adult group treated with melatonin and the control group. While PTEN/PI3K/AKT expression did not differ between control and sham in adult groups, it was increased in the melatonin-administered group versus the other two groups in aged ovaries. Further studies are needed to better understand the effects of melatonin on ovarian tissue.

**Keywords:** Melatonin; Mice; Ovary; PTEN/PI3K/AKT

## TEŞEKKÜR

Başta Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmamın yürütülmesi süreçlerinde; bilgi birikimi ve deneyimleri ile bana yol gösteren, deney aşamalarının planlanması, tez içeriğinin düzenlenmesi, sonuçlarının yorumlanması gibi kısaca tezimin her aşamasında emeğini ve desteğini esirgemeyen değerli hocam “Pamukkale Üniversitesi” Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE’ye

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi Murat Serkant ÜNAL, Sayın Doç. Dr. Nazlı ÇİL, Sayın Prof. Dr. Hülya ÇETİN, Sayın Doç. Dr. Nazan KESKİN ve Sayın Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR’ a,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım ve deneylerim sırasında yardımlarını esirgemeyen “Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi” Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı asistanlarına, Sayın Öğr. Gör. Barbaros ŞAHİN ve Veteriner Hekim Abdullah COĞUPLUGİL’e,

Deneylerimin yürütülmesinde, laboratuvar çalışmalarında, tezimin yazılmasında her zaman yanımda olan değerli Yüksek Lisans arkadaşım Zülal YEŞİL’e “Pamukkale Üniversitesi” Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında Yüksek lisans yapan diğer arkadaşlarıma ve manevi desteğini hep hissettiğim canım arkadaşlarıma,

Ve bütün hayatım boyunca bugünlere gelmemi sağlayan, karşılıksız sevgileriyle her koşulda yanımda olan, bana gösterdikleri sabır için başta canım annem ve canım babam olmak üzere, tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>ÖZET.....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR .....</b>	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER .....</b>	<b>vii</b>
<b>ŞEKİLLER .....</b>	<b>ix</b>
<b>TABLolar .....</b>	<b>xi</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR .....</b>	<b>xii</b>
<b>1. GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1. Amaç .....	4
<b>2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR İNCELEMESİ.....</b>	<b>5</b>
2.1. Dişi Üreme Sistemi Genel Yapısı .....	5
2.2. Ovaryumun Embriyolojik Gelişimi.....	5
2.3. Ovaryumun Histolojisi .....	7
2.4. Ovaryum Folikülleri ve Folikülogenezin Histolojisi.....	9
2.5. Ovulasyon.....	12
2.6. Korpus Luteum (Sarı Cisim) .....	13
2.7. Folikül Atrezisi.....	14
2.8. Menstrual Siklus.....	15
2.9. Over Rezervi.....	16
2.10. Melatonin.....	17
2.11. Melatoninin Fonksiyonları .....	19
2.12. PTEN/PI3K/AKT Yolağı .....	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....</b>	<b>24</b>
3.1. DeneY Gruplarının Oluşturulması .....	24
3.2. DeneY Gruplarına Yapılan Uygulamalar.....	25
3.3. DeneY Hayvanlarına 7 Gün Boyunca Uygulanan Maddelerin Hazırlanması.....	26
3.3.1. Melatoninin hazırlanması ve uygulanması .....	26
3.3.2. %10'luk Etanolün hazırlanması ve uygulanması.....	28
3.3.3. Gruplara yapılan uygulamalar .....	28
3.4. DeneYin Sonlandırılması .....	30
3.5. Doku Takibi.....	32
3.5.1. Fiksasyon işlemi .....	32
3.5.2. Dehidratasyon işlemi .....	32
3.5.3. Şeffaflaştırma.....	33
3.5.4. Parafinizasyon.....	33
3.5.5. Dokuların bloklanması.....	33
3.5.6. Mikrotom ile dokulardan kesit alınarak lam üzerine aktarılması .....	34
3.5.7. Deparafinizasyon İşlemi .....	34
3.6. Hematoksilen & Eozin Boyama .....	35
3.6.1. Folikül sayımı yöntemi .....	36
3.7. İmmünohistokimyasal Boyamalar.....	36
3.8. İstatistiksel Analiz .....	39
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>40</b>
4.1. Folikül Sayımı Bulguları .....	40
4.1.1. Erişkin grupların ovaryum folikül sayıları.....	41
4.1.2. Yaşlı grupların ovaryum folikül sayıları.....	41
4.2. Histokimyasal Boyamalar .....	41
4.2.2. Erişkin grupların Hematoksilen & Eozin boyama sonuçları .....	41

4.2.3. Yaşlı grupların Hematoksilen & Eozin boyama sonuçları .....	42
4.3. İmmünohistokimyasal Boyamalar .....	43
4.3.1. Erişkin grupların PI3K ekspresyonu .....	43
4.3.2. Yaşlı grupların PI3K ekspresyonu .....	44
4.3.3. Erişkin grupların PTEN ekspresyonu .....	45
4.3.4. Yaşlı grupların PTEN ekspresyonu .....	45
4.3.5. Erişkin grupların AKT ekspresyonu .....	46
4.3.6. Yaşlı grupların AKT ekspresyonu .....	47
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>48</b>
<b>6. SONUÇ .....</b>	<b>55</b>
<b>7. KAYNAKÇA .....</b>	<b>56</b>
<b>EKLER .....</b>	
Ek-1. Etik kurul izin belgesi .....	
Ek-2. Etik kurul izin belgesi .....	
Ek-3. Etik kurul izin belgesi .....	
Ek-4. İntihal raporu .....	



## ŞEKİLLER

### Sayfa

<b>Şekil 2.1.</b> A: gonadlar ve mezonefroz arasındaki ilişkiyi gösteren çizim B: Mezonefrik kanal ve gonadal kabartıları gösteren çizim (Sadler, 2017).....	7
<b>Şekil 2.2.</b> Ovaryum dokusuna ait bir kesitin Hematoksilen-Eozin ile boyanmış fotomikrografı.A: antrum, GEp: germinal epitel, TA: Tunika albuginea, TI: teka interna ZP: zona pellusida, PF: primordiyal foliküller, SF: sekonder foliküller (Ross ve Pawlina, 2011). ....	8
<b>Şekil 2.3.</b> Kedi ovaryum dokusunun Mollory-Azan ile boyanmış uzunlamasına kesiti (Eroschenko, 2016). ....	9
<b>Şekil 2.4.</b> a: Primer folikül gelişimini gösteren şematize edilmiş çizimi. b: Primer folikülü gösteren bir fotomikrograf. FC: Folikül Hücreleri (Ross ve Pawlina, 2011). ...	10
<b>Şekil 2.5.</b> Antral folikülün fotomikrografı. GH: Granüloza hücrelerinden oluşan stratum granüloza tabakası, A: Antrum, Tİ: Teka interna, TE: Teka eksterna (Ross ve Pawlina, 2011). ....	11
<b>Şekil 2.6.</b> Graaf folikülün fotomikrografı. KO: Kumulus ooforus, A: antrum, SG: stratum granülozum, Tİ: Teka interna tabakası (Ross ve Pawlina, 2011). ....	12
<b>Şekil 2.7.</b> Korpus luteum yapısını gösteren bir fotomikrograf. Hemotoksilen-Eozin boyaması (Eroschenko, 2016).....	14
<b>Şekil 2.8.</b> Menstural siklusta gerçekleşen olayların hipofiz bezi, folikül gelişim evreleri, kandaki hormon düzeyleri ve ovaryumun yapısında meydana gelen değişikliklerin gösterildiği diyagram. (Ross ve Pawlina, 2011). ....	16
<b>Şekil 2.9.</b> Melatonin (N-asetil 5-metoksitriptamin) (Atasoy, 2019).....	17
<b>Şekil 2.10.</b> Melatonin sentezinin aşamaları (Özçelik ve ark., 2013). ....	18
<b>Şekil 2.11.</b> PI3K proteinin aktivasyonu (Hemmings ve Restuccia, 2012).....	22
<b>Şekil 3.1.</b> Deney hayvanlarının farklı kafeslerde gruplandırılması.....	25
<b>Şekil 3.2.</b> İntraperitoneal enjeksiyon uygulaması.....	26
<b>Şekil 3.3.</b> Hassas terazide melatoninin tartılması. ....	27
<b>Şekil 3.4.</b> Melatoninin etanol içinde çözündürülmesi.....	27
<b>Şekil 3.5.</b> Absolü etanolün %10'a seyreltilmesi. ....	28
<b>Şekil 3.6.</b> Refleks Kontrolünün sağlanması.....	30
<b>Şekil 3.7.</b> Servikal dislokasyon uygulaması. ....	31
<b>Şekil 3.8.</b> Batın ön duvarından insizyon ile organların çıkarılması. ....	31
<b>Şekil 4.1.</b> Kontrol, sham ve melatonin uygulanan erişkin gruplardan alınan ovaryum dokusu. Ovaryum stromasındaki boşluklar;(Ok) Hematoksilen & Eozin, Bar: 100 µm. ....	42
<b>Şekil 4.2.</b> Kontrol, sham ve melatonin uygulanan yaşlı gruplardan alınan ovaryum dokusu. Ovaryum stromasındaki boşluklar;(Ok), granüloza hücreleri arasında ayrılmalar;(yıldız), kanama alanları;(içi boş ok). Hematoksilen & Eozin, Bar: 500µm, 100 µm. ....	43
<b>Şekil 4.3.</b> Erişkin deneklerden alınan ovaryum dokusunda PI3K ekspresyonu ve yerleşimi. Primordiyal folikül; (prf), primer folikül; (pf), sekonder folikül (sf), tersiyer folikül (tf) İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, Bar: 50µm, 100 µm.....	44
<b>Şekil 4.4.</b> Yaşlı deneklerden alınan ovaryum dokusunda PI3K ekspresyonu ve yerleşimi. İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, X50.....	44
<b>Şekil 4.5.</b> Erişkin deneklerden alınan ovaryum dokusunda PTEN ekspresyonu ve yerleşimi. Primordiyal folikül; (prf), primer folikül; (pf), sekonder folikül (sf), tersiyer folikül (tf) İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, Bar: 50µm, 100 µm.....	45

- Şekil 4.6.** Yaşlı deneklerden alınan ovaryum dokusunda PTEN ekspresyonu ve yerleşimi. İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, X50.....46
- Şekil 4.7.** Erişkin deneklerden alınan ovaryum dokusunda AKT ekspresyonu ve yerleşimi. Primordiyal folikül (prf), primer folikül; (pf), sekonder folikül (sf), tersiyer folikül (tf) İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, Bar: 50µm, 100 µm.....46
- Şekil 4.8.** Yaşlı deneklerden alınan ovaryum dokusunda AKT ekspresyonu ve yerleşimi. İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, X50. ....47

**TABLULAR**

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 3.1.</b> Deney gruplarına yapılan uygulamalar. ....	29
<b>Tablo 4.1.</b> Erişkin Grupların Folikül Sayılarının İstatistik Sonuçları. ....	41
<b>Tablo 4.2.</b> Yaşlı Grupların Folikül Sayılarının İstatistik Sonuçları. ....	41
<b>Tablo 4.3.</b> Erişkin Grupların H-Skoru Analiz Sonuçları. ....	47
<b>Tablo 4.4.</b> Yaşlı Grupların H-Skoru Analiz Sonuçları. ....	47

## SİMGELER VE KISALTMALAR

µl	Mikro Litre
µm	Mikro Metre
A	Antrum
AKT	Protein Kinaz B
AMH	Anti-Müllerian Hormon
AMPK	Adenozin Monofosfat Protein Kinaz
BAD	Bcl2 Associated Agonist of Cell Death
BAX	Bcl-2-Associated X Protein
BCL2	B-cell Lymphoma Gene-2
cAMP	Siklik Adenozin Monofosfat
CL	Korpus Luteum
DAB	3,3' Diaminobenzidine
DNA	Deoksiriboz Nükleik Asit
E2	Östradiol
FC	Folikül Hücreleri
FF	Foliküler Sıvı
FOX	Forkhead Box Transkripsiyon Faktörleri
FSH	Folikül Uyarıcı Hormon
GC	Granüloza Hücresi
GEp	Germinal Epitel
EK	Erişkin Kontrol Grubu
EM	Erişkin Melatonin Grubu
GnRH	Gonadotropin Salgılayıcı Hormon
GS	Genç Sham Grubu
GSH-Px	Glutasyon Peroksidaz
GV	Germinal Vezikül
GVBD	Germinal vezikül Bozulması
H&M	Hematoksilen & Ezoin
H2O2	Hidrojen Peroksit
hCG	Human Chorionic Gonadotropin
IFN-γ	İnterferon Gama
IGF-I	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IP	İntraperitoneal Enjeksiyon
IU	İnternational Unit
IVF	In Vitro Fertilizasyon
KGN	Steroidojenik Ovaryan Granüloza Hücreleri
KO	Kumulus Ooforus
LH	Luteinleştirici Hormon
LPS	Lipopolisakkaritler
MT1	Melatonin Reseptörü Tip 1
MT1-KO	MT1 Knockout
MT2	Melatonin Reseptörü Tip 2
MT3	Melatonin Reseptörü Tip 3
mTOR	Rapamisinin Memelilerdeki Hedefi
mTORC1	Rapamisin Hedefi Protein Kompleksi 1
mTORC2	Rapamisin Hedefi Protein Kompleksi 2
NO	Nitrik Oksit
OH	Hidroksil

OMI	Oosit Maturasyon İnhibitörü
ONOO	Peroksinitrit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PDGF	Trombosit Türevli Büyüme Faktörleri
PDK1	Fosfatidilinositole Bağımlı Kinaz 1
PH	Plekstrin Homoloji
PI3K	Fosfatidilinositol-3 Kinazlar
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5 Bifosfat
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5 Trifosfat
PKOS	Polikistik Over Sendromu
p-NF-kB	Nükleer Faktör Kappa B
PTEN	Fosfataz ve Tensin Homoloğu
RTK	Tirozin Kinaz Reseptörleri
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SCN	Suprakiazmatik Çekirdek
SH	Steroid Hormon
SH2	Src Homoloji 2
SF	Sekonder Folikül
SG	Stratum Granülozum
SRY	Y Kromozomunun Cinsiyet Belirleyici Bölgesi
TA	Tunika Albuginea
TBF	Testis Belirleyici Faktör
TE	Teka Eksterna
Tİ	Teka İnterna
TRP53	P53
TSC	Tuberöz Skleroz Kompleksi
USP25	Ubiquitin Specific Peptidase 25
YK	Yaşlı Kontrol Grubu
YM	Yaşlı Melatonin Grubu
ZP	Zona Pellusida

## 1. GİRİŞ

Varoluşunu devam ettirmek isteyen sağlıklı her tür, yaşam döngüsü içerisinde üremek zorundadır. Gelişmiş çok hücreli canlılara bakıldığında, eşeyli üremenin kompleks bir süreç olduğu gözlemlenmiştir (Crow, 1994). Spermatogenez ve Oogenez; erkek ve dişi bireylerin eşey ana hücrelerini üretme süreci olarak tanımlanmaktadır. Temelde benzer aşamalar içermelerine rağmen, dişilerde üreme hücrelerinin üretimi belli dönemlerde gerçekleşmektedir. Oositin büyük, hareketsiz ve az sayıda olmasından kaynaklı korunumu için birçok özel hormon, protein ve yolak süreçte görev almaktadır (Öktem ve Urman, 2011).

Puberteyle birlikte gerçekleşen, germ hücrelerinin olgun gametleri oluşturabilir hale gelmesi ile başlayan üreme yeteneği; insanlarda(dişi) ve balinalarda(dişi) menopoza kadar devam eder (Brent ve ark., 2015). Kadınlar, erkeklerden farklı olarak, belirli ve sınırlı sayıda germ hücresi ile doğarlar. Mevcut olan yumurta rezervi, sağlıklı her dişide puberteyle birlikte menstrual sikluslarla düzenli olarak vücuttan atıldığından, yaş aldıkça bu rezerv giderek azalır. Dolayısıyla ilerleyen yaşın, doğurganlık üzerinde kritik bir etkisi vardır (Demir, 2013).

Günümüzde; artan stres, sigara alkol kullanımı, aşırı kafein tüketimi, kötü beslenme, uterus miyomları, mesleki maruziyetlerden kaynaklı birçok etken oosit kalitesinin bozulmasına, dolaylı olarak da bu durum infertiliteye sebep olabilmektedir (Amanak ve ark., 2014). Oosit kalitesinin bozulmasına sebep olan etmenler kesin olarak belirlenememiş olsa da reaktif oksijen türlerinin hücrelerde sebep olduğu oksidatif stresin, oositin mitokondri ve çekirdeğindeki fonksiyon bozukluklarına katkıda bulunduğu genel olarak kabul edilmektedir (Öztürk ve ark., 2019).

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine bakıldığında, infertilite tüm dünyada ortalama olarak 50-80 milyon kadını etkilemekte ve infertilite oranının %8-12 arasında olduğu düşünülmektedir (Bayer ve ark., 2008). İnfertilite tedavisinde yaygın olarak

kullanılan birçok teknik, var olan yumurta ve spermin in vitro koşullarda en kalitelisinin seçilip birleştirilmesine dayandığından ovaryum yaşlanması; yardımcı üreme tekniklerinde karşılaşılan en önemli zorluklardan biridir (Alviggi ve ark., 2009).

Çevre koşullarının da etkisiyle canlı organizmalarda hücrelerin işlevinin bozulması ve ilerleyen yaşın bir sonucu olarak biriken mutasyonlar, belirli bir ritimde gerçekleşen fizyolojik olayların dengesini bozar (Can ve Aslan, 2014). Sirkadiyen ritim olarak bilinen bu iç denge halinin organizasyonu, birçok organda bulunan biyolojik saat ile karanlık aydınlık periyotlarına göre vücudun metabolik faaliyetlerinin düzenlenmesini sağlar (Akıncı ve ark., 2016). Hipotalamusta yer alan suprakiazmatik çekirdek (SCN) omurgalılarda 20.000 nörondan oluşan ve retina ile doğrudan ilişkili, organlardaki biyolojik saatlerin de kontrol edilmesini sağlayan merkezi bir saattir. Retina hücrelerine gelen ışık, SCN’de yer alan nöronlar tarafından algılanır, uyku-uyanıklık periyotlarını düzenleyerek dolaylı olarak periferik saate etki eder ve hormon salınımı, immün yanıt gibi iç aktiviteler kontrol edilir. Suprakiazmatik çekirdekle ilişkili bir diğer yapı olan pineal bezin görevlerinden en önemlisi, karanlık periyotlarda triptofan amino asitinden melatonin sentezlenmesini sağlamaktır (Yücel ve ark., 2018).

Melatoninin; Lerner tarafından balık ve kurbağa derisindeki melanositlerde keşfedildiği ilk yıllarda, cilt aydınlatıcı olarak görev yapan bir molekül olduğu düşünülse de sonraları, bütün omurgalılarda pineal bez tarafından salgılanan ve sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde etkili olduğu saptanmıştır. (Hardeland ve ark., 2006). Melatonin hormonunun sekresyonu; omurgalılarda triptofanın bir dizi biyokimyasal reaksiyonu ile gerçekleşir. (Günhan, 2021). Fotoreseptörlerle algılanan ortamdaki ışık yokluğu, pineal beze iletdikten sonra besinlerle dışarıdan alınan triptofan aminoasiti, plazmadan alınarak hidroksilaz enzimi sayesinde, ilk olarak 5-hidroksitriptofan’a, 5-hidroksitriptofan dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu kaybederek 5-hidroksitriptamine yani serotonine dönüştürülür. Serotonin N-asetil transferaz enzimi ile asetillenir ve N-asetilserotonine dönüştürülür. N-asetilserotonin ise Hidroksiindol-oMetiltransferaz ile N-asetil 5-metoksitriptamin’e yani melatonine dönüştürülür. (Atasoy ve Erbaş, 2017). Melatonin, sahip olduğu bu kimyasal yapı dolayısıyla lipofiliktir ve dokular ile hücrelere kolaylıkla geçiş yapabilir. (Şener, 2010).

Embriyonik hayatın 3. Haftası itibariyle vitellus kesesi duvar endoderminden köken alan primitif germ hücreleri, oluşmaya başlayarak 5. haftadan 7. haftaya kadar gonad taslağına doğru ilerler. Dişi bireylerin gonad taslağında yer alan primordiyal germ

hücreleri, mitoz bölünmeyle çoğalarak intrauterin dönemin 5. ayında sayılarını yaklaşık 7.000.000 oogonyuma kadar ulaştırır. Primordiyal foliküllerden birçoğu, doğuma kadar apoptoza uğrayarak atrezik hale gelir ve sayıları yaklaşık 700.000 ile 2.000.000'a kadar düşer (Tap ve Kuyucu, 2009). Hücre apoptozu ve otofaji gibi süreçlerde etkinliği bilinen yollardan biri de PTEN/PI3K/AKT'dir (Carnero ve ark., 2008). Bu yolağın, primordiyal foliküllerin aktivasyonu ve oosit büyümesini düzenlemedeki etkinliği son 30 yıldan beri kabul edilmektedir (Felici ve Klinger, 2021).

PTEN/PI3K/AKT yolağının temel mekanizmasına bakıldığında; Fosfatidilinositol-3 kinazlar (PI3K) otofaji, apoptoz, hücre döngüsü, büyümesi, farklılaşması gibi hücrel aktivite düzenlenmesinde rol oynayan tirozin kinaz reseptörleri (RTK) ve G proteinlerine bağlı reseptörler, sitokinler, büyüme faktörleri tarafından aktive edilirler (Küpeli, 2022). Ökaryotlarda, fosfataz ve kinaz enzimleri tarafından kontrol edilen fosforilasyon ve defosforilasyon ile proteinler morfolojik değişimlere uğrayarak hücrel faaliyetlerini durdurur veya aktive eder (Johnson, 2009).

Bir sitokin, büyüme faktörü, G proteine bağlı reseptörler veya tirozin kinaz reseptörleri tarafından aktive edilen PI3K proteini; Fosfatidilinositol-4,5 bifosfatı (PIP<sub>2</sub>)'yi Fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfata (PIP<sub>3</sub>)'e dönüştürür (Hemmings ve Restuccia, 2012). Yolağın negatif düzenleyicisi olarak görev alan PTEN; Fosfataz ve Tensin homoloğu PIP<sub>3</sub>'ün PIP<sub>2</sub>'ye dönüştürerek sürecin ters yönlü kontrolünü sağlar (Hollander ve ark., 2011).

PIP<sub>3</sub>'ün aktif formu, serin/treonin protein kinaz enzimi olarak bilinen protein kinaz B yani Akt'nin, plekstrin homoloji (PH) bölgesine bağlanarak etkinleştirilmiş olur (Manning ve Toker, 2017). Akt'nin aşırı üretimi hücre büyümesi, çoğalması ve apoptoza gösterilen direnç gibi süreçlerle doğrudan ilişkili olduğundan, Akt'nin kontrol edilmesini sağlayan mTOR sinyal yolağının da anlaşılması büyük önem taşımaktadır (Janku ve Polivka, 2014).

mTOR protein kinazı; organ ve doku nakillerinden sonra, vücudun bağışıklık sistemini baskılamak için kullanılan rapamisin antibiyotiklerinin memelilerdeki hedefidir. mTOR farklı proteinlerle bağlanarak, mTORC1 ve mTORC2 komplekslerini meydana getirmektedir. Akt'nin tam olarak aktive olabilmesi için mTORC2 tarafından ek bir fosforilasyona uğraması gerekmektedir. mTORC2 kompleksinin de sürece katılmasıyla



aktiflenen Akt, hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan farklı protein kinazları tetikler (Felici ve Klinger, 2021).

Akt'nin bir diğer hedefi de FOXO transkripsiyon faktörleridir. Forkhead box (FOX) transkripsiyon faktörleri, insanda 100'den fazla çeşidi bulunan ve sekans dizilimlerindeki benzerliklerine göre FOXA'dan FOXS'ye kadar 19 alt üyeye ayrılmış bir protein grubudur. Forkheadbox O transkripsiyon faktörleri, trombosit türevli büyüme faktörleri (PDGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) gibi büyüme faktörlerine cevap olarak; Akt tarafından FOXO fosforilasyonu ile sitoplazmik şaperonlar tarafından bağlanır ve nükleusa geçemez. Gen ekspresyonu sağlanamadığından, hücre büyümesi durur ve apoptozun uyarılması sağlanır (Vuranok, 2022). Hücresel süreçlerin düzenlenmesinde anabolik ve katabolik olayların dengede gerçekleşmesi yaşamsal faaliyetlerin sağlıklı devamlılığı açısından önemlidir. PTEN/PI3K/AKT gibi, hücrelerde özellikle katabolik aktiviteleri düzenleyen yollarda meydana gelen mutasyonların, kalıtsal kanserlerde büyük etkiye sahip olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (Küçüköner ve Işıkoğan, 2013).

## 1.1. Amaç

Canlıların sirkadiyen ritimlerinin, hücresel faaliyetler üzerinde etkisine bakıldığında, üretimi karanlık ve aydınlığa göre belirlenen endojen melatonin hormonunun etkisi bilinmektedir. Bu çalışmada; literatürde yaşlanma karşıtı özellikleri de belirtilen eksojen melatonin hormonunun, yaşlı farelerin ovaryum dokusunda PTEN/PI3K/AKT yolağına etkisinin immünohistokimyasal olarak, ovaryum folikül sayısına etkisinin ise histokimyasal olarak araştırılması amaçlanmıştır.

## **2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR İNCELEMESİ**

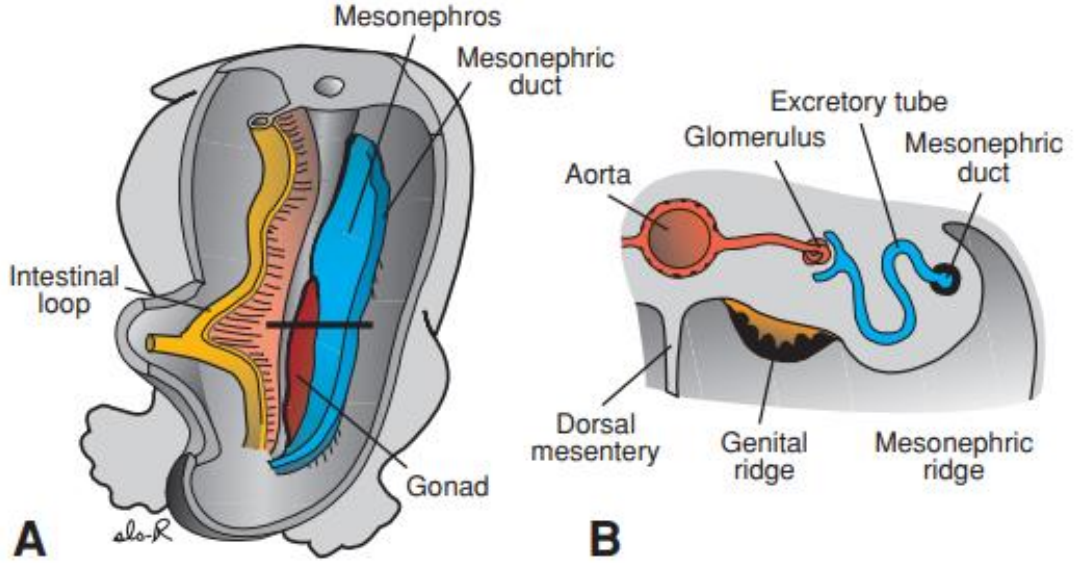
### **2.1. Dişi Üreme Sistemi Genel Yapısı**

İnsan dişilerinin üreme sistemi, pelvik kavitenin iç kısmında bilateral yerleşimli ovaryum ve tuba uterina (ovidukt), uterus, serviks ile vajinayı içeren internal ve vulvadan meydana gelen eksternal bölümlerden oluşur. Sistemde yer alan organların temel görevi; dişilerin eşey hücresi olan oositlerin üretimi ve gelişimini sağlamak için cinsiyet hormonlarının sekresyonu ile bir oositin oluşumundan fertilizasyona uğrayıp, fetüs halini almasına ve doğuma kadar ki karmaşık aşamaların kontrolünü desteklemektir (Eroschenko, 2016).

### **2.2. Ovaryumun Embriyolojik Gelişimi**

Embriyonun cinsiyetinin belirlenmesi aşamasında çok sayıda gen sürece dahil olsa da kritik rolü, Y kromozomunun kısa kolu (Yp11) üzerinde yer alan SRY (Sex determining region on Y) geninin kodladığı TBF (Testis Belirleyici Faktör) proteini üstlenir. TBF; cinsiyet organlarının farklılaşması için diğer genleri tetikleyen bir transkripsiyon faktörüdür ve varlığında fetüsün gelişimi erkek, eksikliğinde fetüsün gelişimi dişi olarak meydana gelir. Bir spermin X veya Y kromozomu taşımasına göre, X kromozomu taşıyan bir ovumun fertilizasyonu ile cinsiyet belirlense de gelişimin 7. haftasına kadar gonadal farklılaşma görülmediği için, bu erken safha farklılaşmamış dönem olarak isimlendirilir (Sadler, 2017). Gonadların gelişimi memeli canlılarda, boşaltım organı olarak görev yapan mezonefrozun iç bölgesinde yer alan sölom epitelinin, yoğunlaşması ve mezenşim hücrelerinin proliferasyonu ile bir çift uzunlamasına çıkıntılar

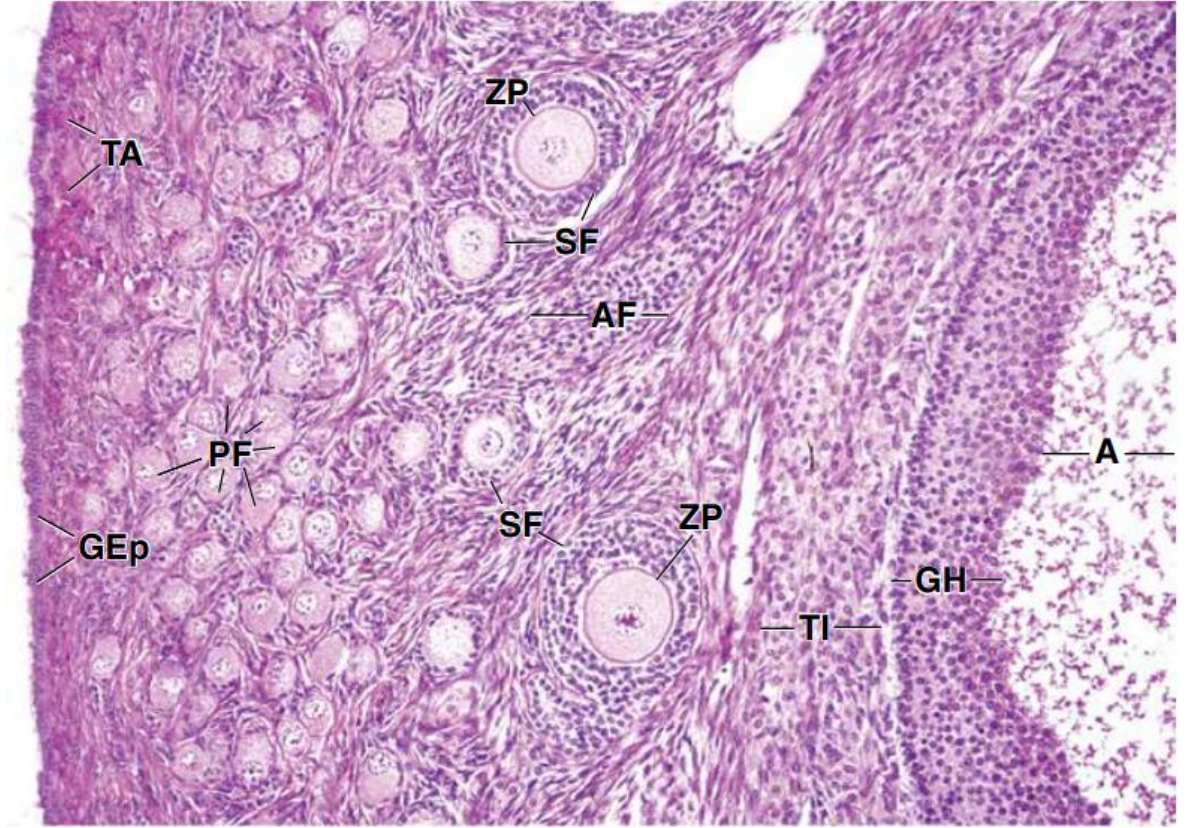
olarak, peritonun arka duvarında belirirler ve bu uzunlamasına çıkıntılar gonadal kabartılar olarak isimlendirilir (Pansky, 1987) Vitellus kesesinin, allantoise yakın tarafındaki duvar endodermi arasında beliren ve gelişimin 3. Haftası itibariyle, epiblastlardan köken alarak ilk kez ortaya çıkan primordiyal germ hücreleri, arka bağırsağın dorsal mezenteri boyunca ilerleyerek, gelişimin 5. Haftasında gonadal kabartılara ulaşır. Primordiyal germ hücreleri, bu göçü tamamlayamaz ve gonadal kabartılara ulaşamazsa, gonadlar gelişimini tamamlayamaz (Sadler, 2017). Germ hücrelerinin gonadal kabartılara göçü sırasında çoğalan sölom epitelindeki hücreler, alttaki mezenşim içerisine çıkıntı yaparak, ilkel cinsiyet kordonları adı verilen düzensiz yapıları oluşturur ve primordiyal germ hücreleri, bu kordonların arasına konumlanır (Moore, 2016). İlkel cinsiyet kordonları olarak bilinen bu yapılar, gelişim ilerledikçe mezenşim içerisinde proliferasyona uğramaya devam eder ve pek çok hücre kordonu oluşturacak şekilde partlanır. Dişi primordiyal germ hücrelerine sahip bir embriyoda, bu kordonlar düzensiz hücre kümelerine dönüşerek, kordon özelliklerini kaybederler (Sadler, 2017). Ovaryumun iç kısmında yoğunlaşan bu hücre grupları, bir süre sonra kaybolarak yerini, ovaryumun medullasını meydana getiren vasküler bir bağ dokusuna bırakır. Sölom epiteli hücreleri, XX cinsiyet kromozomuna sahip embriyolarda; mezenşim içine gömülerek yeni germ kordonlarını meydana getirir ve bu kordonlar organın korteksine uzanır. Embriyonun sahip olduğu cinsiyet kromozomuna göre, medulla ve korteksin gelişimi farklılık gösterir. Testisin gelişimi; medulla bölgesinin farklanmasıyla oluşurken, ovaryum korteksten oluşur (Moore, 2016). Gelişimin 12. haftasına gelindiğinde, primordiyal germ hücreleri, yavaş yavaş oogonyumlara dönüşmeye başlar ve germ kordonları tarafından çevrelenerek, korteks içerisine yerleşmiş halde bulunan primordiyal folikülleri oluşturur. Primordiyal germ hücrelerinin, oogonyumlara dönüşmeye başlaması ile oogonyumlar; mitoz bölünmeler ile sayısını arttırarak over rezervini meydana getiren folikül havuzunu oluşturur (Sadler, 2017).



**Şekil 2.1.** A: gonadlar ve mezonefroz arasındaki ilişkiyi gösteren çizim B: Mezonefrik kanal ve gonadal kabartıları gösteren çizim (Sadler, 2017).

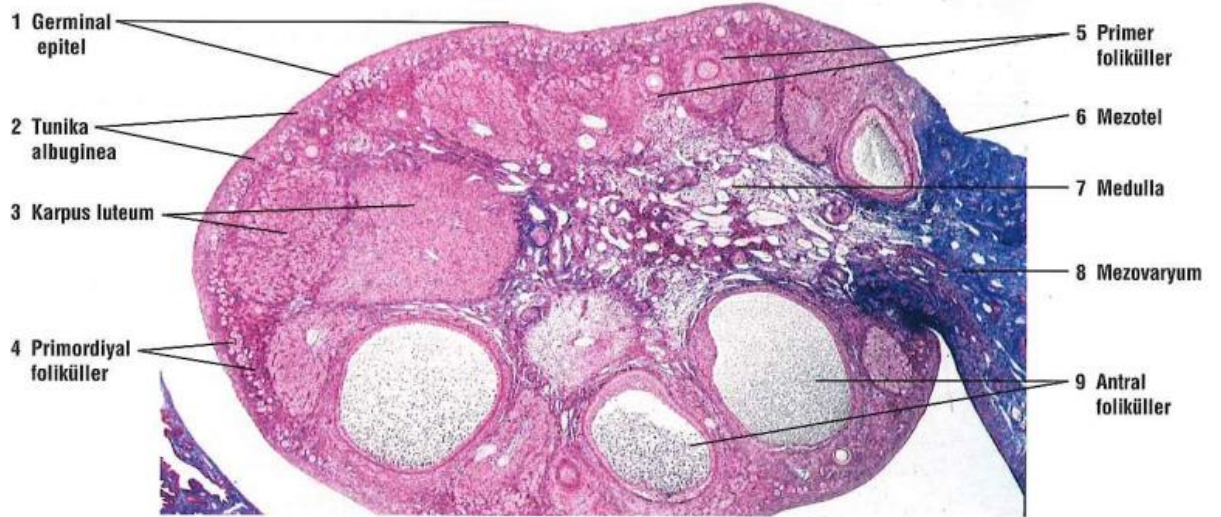
### 2.3. Ovaryumun Histolojisi

Henüz doğum yapmamış kadınların ovaryumlarının görünümü, badem benzeri bir şekilde ve açık pembe-beyaz renktedir. Ovaryumlar üç boyutlu bir şekilde incelendiğinde; yaklaşık 3 cm uzunluğunda, 1 cm kalınlığında ve 1,5 cm genişliğinde olduğu görülmektedir. Lenfatik damar ağları ve sinirler ile örülü iç kısımda yer alan medulla bölgesi ve medulla periferini saran primordiyal foliküllerin gömülü olduğu, zengin bağ dokusu içeren korteks kısmından oluşan organın yüzeyi; tek katlı kübik epitel ve bazı kısımlardaki bölgelerde yassı epitele dönebilen germinatif epitel ile kaplıdır. Germinatif epitelin hemen altında, yoğun bağ dokudan oluşan tunika albuginea yer alır ve ovaryumun beyazımsı rengi bu tabakadan kaynaklanır. Tunika albuginea tabakasının altında yer alan, korteks kısmının stromasında dağınık fibroblastlar bulunur. Korteks ve medulla bölgeleri, birbirlerinden kesin bir hat ile ayrılmazlar (Junqueira ve ark., 2003).



**Şekil 2.2.** Ovaryum dokusuna ait bir kesitin Hematoksilen-Eozin ile boyanmış fotomikrografı. A: antrum, GEp: germinal epitel, TA: Tunika albuginea, TI: teka interna ZP: zona pellusida, PF: primordiyal foliküller, SF: sekonder foliküller (Ross ve Pawlina, 2011).

Korteks kısmında yer alan primordiyal foliküller, embriyonik hayatın ilk kez 3. ayında ortaya çıkar ve yoğun bir bağ dokusunun içine gömülü halde, puberteden sonraki süreçlerde ovaryumda görülebilen diğer tiplerdeki folikülleri oluşturur. Foliküller gelişim evrelerine göre; primordiyal foliküller, primer ve sekonder olarak adlandırılan büyümekte olan foliküller, maturasyonunu tamamlamış olgun (graaf) folikül olarak temelde üç alt grupta incelenebilirler. Reprodüktif dönemindeki bir kadının ovaryumunun korteks kısmında, ovulasyonla birlikte oluşturulan korpus luteum ve atretik haldeki foliküllerde görülebilir (Ross ve Pawlina, 2011).

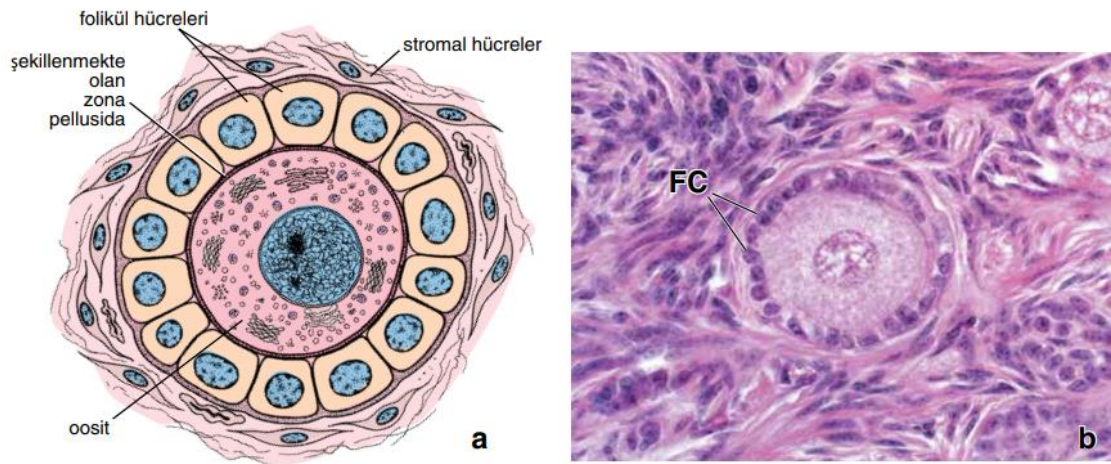


**Şekil 2.3.** Kedi ovaryum dokusunun Mollory-Azan ile boyanmış uzunlamasına kesiti (Eroschenko, 2016).

#### 2.4. Ovaryum Folikülleri ve Folikülogenezin Histolojisi

Embriyonik hayatın 12. haftasında ortaya çıkan primordiyal foliküller; oogenezin prenatal aşamasında görülen, mitoz bölünmelerle sayılarını arttıran oogonyumların, primer oosite dönüşmesi ve bu oositlerin tek sıra halinde etrafını saran folikül hücreleriyle birlikte oluşturdukları yapılardır. Çapı yaklaşık 30 µm, küre biçiminde olan oositin büyük bir çekirdek ve çekirdekçiği bulunur ve ooplazma denen sitoplazmasında yer alan golgi cisimcikleri, endoplazmik retikulum, mitokondri, lizozom gibi organeller nükleusa yakın konumlanırlar ve bu yığın Balbiani cisimciği olarak adlandırılır (Ross ve Pawlina, 2011). Ovaryumda yer alan foliküller, puberteye kadar primordiyal folikül olarak kalır ve puberteden sonraki dönemde hipofiz bezinden; GnRH (Gonadotropin Salgılayıcı Hormon) salınımı ile FSH (Folikül Uyarıcı Hormon) ve LH (Luteinleştirici Hormon) hormonlarının salgılanması tetiklenerek, foliküllerin büyümesi ve gelişmesi başlatılır. Primordiyal folikülün içerisindeki oositin çapı büyümeye başladığında, etrafındaki tek katlı yassı folikül hücreleri de proliferasyona uğrayarak, tek katlı kübik görünüm kazanır ve yapı artık gelişimin ilk evresi olan primer folikül olarak isimlendirilir. Tek katlı kübik epitel hücreleri, bir dizi mitoz bölünmeler geçirir ve çok katlı bir epitel halini alarak membrana granuloza adı verilen bir tabaka ile oositin etrafını sarar (Eroschenko, 2016). Bu süreçte oositin etrafındaki folikül hücreleri artık granuloza hücreleri olarak

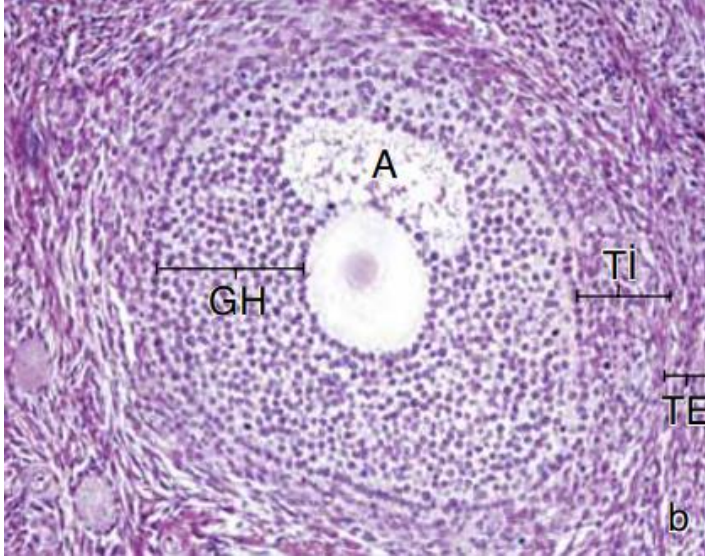
isimlendirilirken, hücrelerin birbirleriyle haberleşmeleri gap junctionlar aracılığıyla gerçekleşir (Junqueira ve ark., 2003). Oositin büyümesi devam ederken, spesifik proteinler salgınır ve folikül hücreleri ile oosit arasında glikoprotein yapıda bir örtü olan zona pellusida meydana gelir. Granüloza hücrelerinden çıkan ince ipliksi yapılar (filopod), zona pellusidanın içine doğru girerek oositin mikrovilluslarına dokunur ve aralık bağlantıları aracılığıyla haberleşirler (Ross ve Pawlina, 2011).



**Şekil 2.4.** a: Primer folikül gelişimini gösteren şematize edilmiş çizimi. b: Primer folikülü gösteren bir fotomikrograf. FC: Folikül Hücreleri (Ross ve Pawlina, 2011).

Granüloza hücreleri çoğalmaya devam ettikçe, folikülün etrafındaki stromal hücreler, iki tabakadan oluşan bir bağ dokusu kılıfı oluşturur ve bu kılıfa teka folikülü denir. İç tarafta yer alan teka interna tabakası; küçük damar ağları, fibroblastlar ve kübik salgı hücreleri ile karakterizedir. Bu tabakada yer alan hücreler ayrıca, luteinizan hormon (LH) reseptörlerini barındırır ve LH uyarılmalarında androjen sentezlenip salgılanmasını sağlarlar (Ross ve Pawlina, 2011). Dış kısımda yer alan teka eksterna katmanı; kollajen fiber demetleri ve düz kas hücrelerinden oluşur. Folikül gelişimi ve büyümesini tetikleyici Folikül stimulan hormon (FSH), kalsiyum iyonları, büyüme faktörleri gibi etmenler ortamda arttıkça granüloza hücreleri, 6-12 katmanlı bir tabaka haline gelerek hücrelerin arasında sıvı dolu boşluklar oluşmaya başlar. Hiyalüronik asitten zengin likör folikülü denen bu sıvı çoğaldıkça, boşluklar birleşerek yarım ay şeklindeki bütün bir boşluk olan antrum oluşturur (Junqueira ve ark., 2003). Yapı artık, sekonder folikül veya antral folikül olarak isimlendirilmeye başlarken oositin büyümesi, yaklaşık 125 µm çapa ulaştığında, granüloza hücreleri tarafından antruma salınan oosit maturasyon inhibitörü

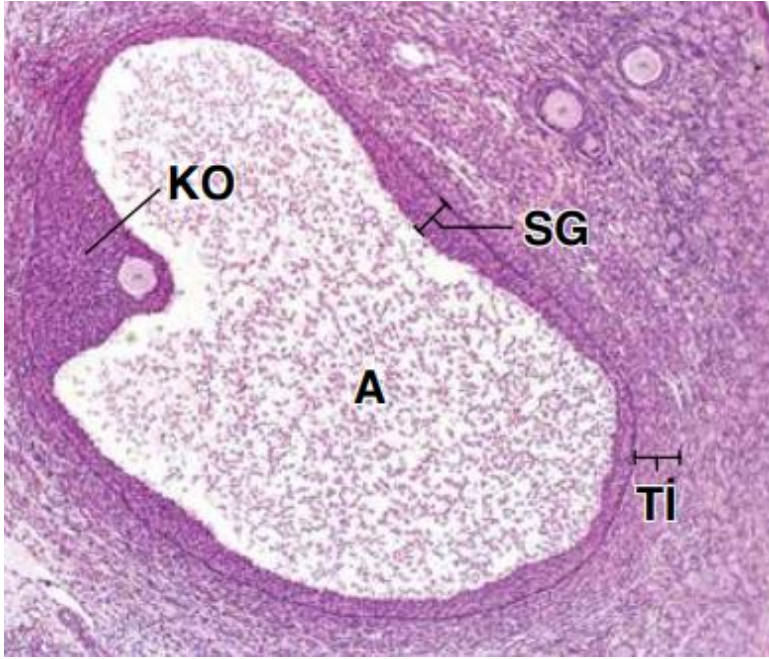
(OMI) ile baskılanır. Antral folikülü çevreleyen, membrana granuloza tabakasının oosite yakın kısmındaki granuloza hücreleri, antruma doğru kumulus ooforus denen bir kabartı oluştururken, zona pellusidanın etrafını çevreleyen hücre tabakası, korona radiata olarak isimlendirilir (Ross ve Pawlina, 2011).



**Şekil 2.5.** Antral folikülün fotomikrografi. GH: Granuloza hücrelerinden oluşan stratum granuloza tabakası, A: Antrum, TI: Teka interna, TE: Teka eksterna (Ross ve Pawlina, 2011).

Baskın olan sekonder folikül, 10 mm çapa ulaştığında granuloza hücrelerindeki mitoz bölünmeler yavaşlayarak, antrumun genişliği artar ve membrana granuloza tabakası, oositin büyümesiyle aynı oranda çoğalmadığından incelir. Geniş bir antrum ve kalın bir teka tabakası ile karakterize bu foliküle artık graaf folikül denir. Granuloza hücrelerinin arasındaki boşluklar arttıkça, oosit ve etrafındaki korona radiata tabakası kumulus ooforustan uzaklaşarak, folikülün içerisindeki sıvıda yüzmeye başlar. Ovulasyondan birkaç saat önce tamamlanan, I. mayoz ile sekonder oosit ve birinci polar cisimcik meydana gelir (Junqueira ve ark., 2003).





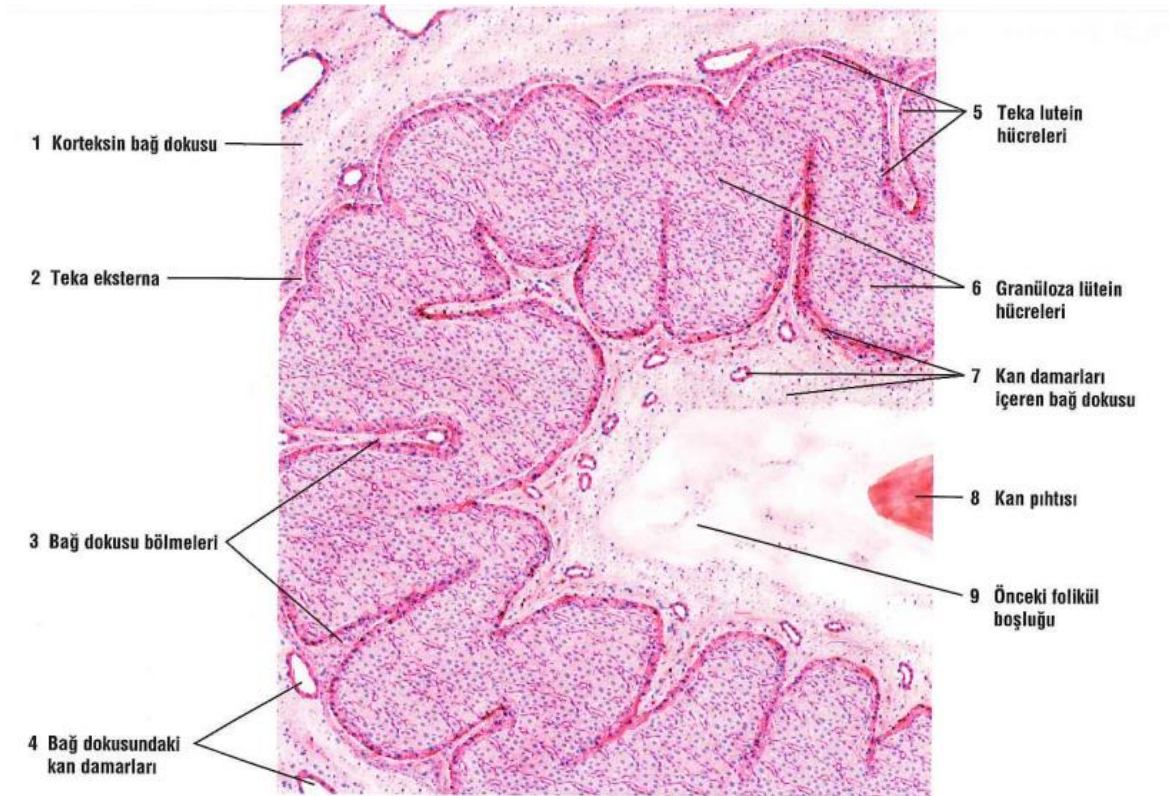
**Şekil 2.6.** Graaf folikülün fotomikrografı. KO: Kumulus ooforus, A: antrum, SG: stratum granülozum, Tİ: Teka interna tabakası (Ross ve Pawlina, 2011).

## 2.5. Ovulasyon

Ovulasyon; 28 günlük menstrual siklusun ortalarında, yaklaşık 14. gününde ovule olacak primer oositler arasından, dominant olanının büyüüp gelişerek enzimatik reaksiyonlar ve hormonal bir dizi değişikliklerle, sekonder oosit halini alması ve graaf folikül içerisinden salınması sürecidir (Junqueira ve ark., 2003). Graaf folikülün yüzeyinde, ovulasyondan hemen önce kan akımının durmasından kaynaklı, stigma adı verilen bir tümsek görülür. Büyümekte olan folikül tarafından üretilen östrojenlerin etkisiyle, ön hipofizden LH salınımı tetiklenir ve ovaryumdaki kan akışı hızlanır (Öktem ve Urman, 2011). Artan LH etkisi ile prostaglandin ve kollajenaz enzimleri salınarak, folikülün tunika albuginea tabakasında yer alan, kollajen liflerinin sindirilmesine neden olurken, prostaglandin ise teka eksternada yer alan düz kas liflerinin kasılmasını tetikler. Salınan hormonlar, folikülün içerisindeki sıvı basıncındaki artış ve eriyen kollojen lifler nedeniyle zayıflayan folikül duvarı, yırtılarak sekonder oosit dışarıya atılır (Ross ve Pawlina, 2011).

## 2.6. Korpus Luteum (Sarı Cisim)

Sekonder folikül ve birinci kutup cisimciği, ovulasyonla graaf folikülden serbest bırakıldıktan sonra, folikülün geriye kalan teka interna ve granüloza hücreleri LH varlığında, luteinizasyon denen bir süreçle morfolojik değişimlere uğrayarak, yağ damlacıkları ile kaplanırlar (Ross ve Pawlina, 2011). Luteal hücrelerin sitoplazmasında, lipokrom adı verilen sarı renkli bir pigment birikmeye başlar ve folikül sıvısının boşalması nedeniyle, kıvrımlı görünüm kazanan yapı ovaryumun korteksinde bulunur (Eroschenko, 2016). Korpus luteum ya da luteal bez olarak isimlendirilmeye başlayan bu yapının, teka interna tabakasında yer alan lenfatik ve kan damarları, granüloza katmanına doğru genişleyerek, vaskülerize bir merkez oluşturur. Progesteron ve östrojenlerin salgılanmasını sağlayan korpus luteum, fertilizasyon gerçekleşmezse insan koryonik gonadotropini (hCG) olmadığından, progesteron ve östrojenlerin salgılanması azalarak dejenerasyona uğrar. Ovulasyon gerçekleştikten 10-12 gün sonrasında, apoptozla kaybolur. Eğer fertilizasyon gerçekleşirse, salgılanan hormonların etkisiyle uterusun kaplı olduğu endometriyum, büyüyüp gelişir ve zigotun yerleşmesi için gerekli ortamın hazırlanmasını sağlar (Ross ve Pawlina, 2011).



**Şekil 2.7.** Korpus luteum yapısını gösteren bir fotomikrograf. Hemotoksilen-Eozin boyaması (Eroschenko, 2016).

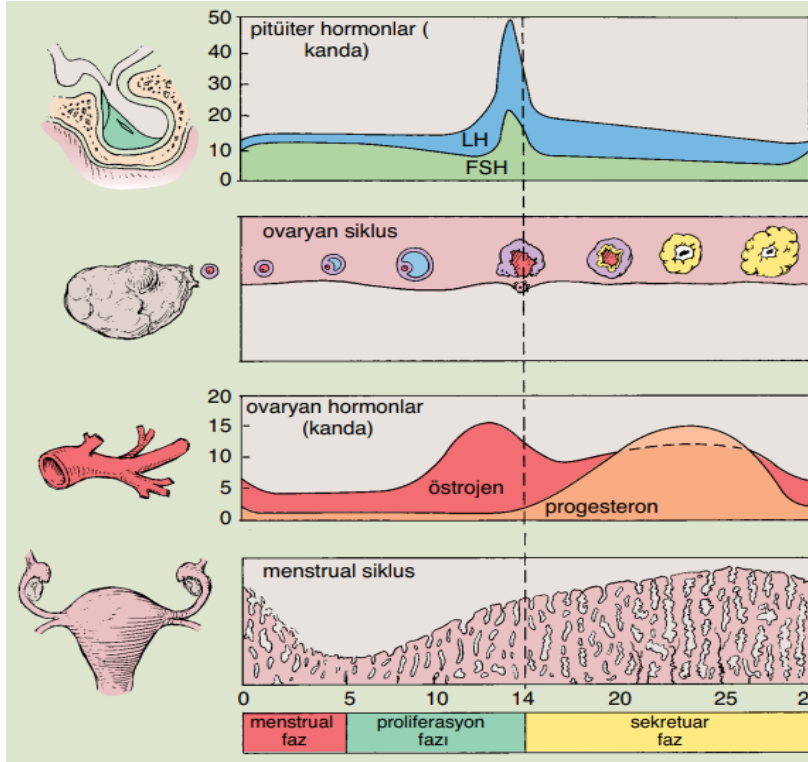
## 2.7. Folikül Atrezisi

Ovaryumda yer alan, farklı gelişime sahip foliküllerden sadece 400 kadarı olgunluğa ulaşabilir. Geriye kalan foliküller, granuloza hücrelerinin aracılık ettiği bir apoptoz süreci ile dejenerasyona uğrayarak, ovaryumun stroması içinde kaybolurlar (Junqueira ve ark., 2003). Gelişimin herhangi bir aşamasındaki her folikül, atreziye uğrayabildiği için fetal hayatta, pubertede ve puberteyle birlikte görülmeye başlayan menstrual sikluslarda, hatta menopozdan sonraki ilk yıllarda bile, otolizle ilgili tipik değişimlere uğrayan oositin, etrafındaki kalıntılar makrofajlar aracılığıyla fagosite edilir. Sürecin işleyişi, granuloza hücrelerindeki mitoz bölünmeler durduktan sonra apoptozun başlamasını takiben, granuloza tabakasının makrofajlar ve nötrofiller tarafından kuşatılarak, folikülde yer alan antrum içerisine dökülmesi şeklinde ilerler. Teka hücrelerinin, aşırı büyümesi sonucu lipid depolanır ve zona pellusida dejenerasyona uğrarken katlanarak kollabe bir hal alır ve bağ dokusundaki makrofajlar tarafından

fagosite edilir. Folikülün yer aldığı boşluğa, stromal hücrelerin migrasyonu sonucu kalan boşluk kapatılır (Ross ve Pawlina, 2011).

## 2.8. Menstrual Siklus

Puberteyle birlikte başlayan ve menopoza kadar devam eden bu süreç, östrojen ve progesteron hormonlarının etkisiyle, endometriyumun yapısında değişimlere sebep olarak farklı fazlarda gerçekleşmektedir. Her kadının sahip olduğu, bu siklik döngülerdeki tekrar sayısı kendi içerisinde bile farklılık göstermekle birlikte, ortalama olarak 28 gün kabul edilen genel sayıdır (Junqueira ve ark., 2003). Endometriyumun yapısındaki kan damarlarının, yırtılması ve dejenere olan hücrelerin kanla birlikte atılması, menstrual döngünün başlangıcı olarak kabul edilir. Bu kanamanın görüldüğü ilk günden itibaren menstrual faz yaklaşık 3-4 gün sürer. FSH ve LH hormonlarının etkisiyle, 10-20 kadar primordiyal folikül, gelişim göstermeye başlayarak aralarından genellikle bir tanesi, dominant olarak seçilir ve menstrual siklusun 5-7. günlerine denk gelen bu aşama, foliküler faz olarak isimlendirilir. FSH hormonu, granüloza ve teka hücrelerini stimüle ederek, östrojen salgılanmasını tetikler ve folikülün lümeninde östrojen miktarı arttıkça, hipofiz bezi dolaylı olarak uyarılır FSH salınımı durdurulur (Moore, 2016). Ovulasyon gerçekleşmeden hemen önce, LH'nin tetiklemesiyle progesteron hormonu artmaya başlar. LH hormonunun kandaki seviyelerinin, ani bir şekilde pik yapmasından yaklaşık 10-12 saat kadar sonra ovulasyon gerçekleşir. Graaf folikülden sekonder oosit salınımı gerçekleştikten yani ovulasyondan sonra, geriye kalan yırtık folikülün teka ve granüloza hücreleri morfolojik değişimlere uğrayarak, korpus luteumu oluşturmaya başlar ve bu evre luteal faz olarak isimlendirilir. Korpus luteum, östrojen ve fazla miktarda progesteron salgılar ve eğer ovulasyonla salınan oositin fertilizasyonu gerçekleşirse, özellikle progesteron hormonu, endometriyumun yapısında değişikliklere sebep olarak, implantasyon için sekretuar fazı başlatır. Oosit fertilize olmazsa, hormon düzeyleri düşmeye başlar ve korpus luteumun birkaç gün içerisinde de dejenerasyonu gerçekleşir (Ross ve Pawlina, 2011).



**Şekil 2.8.** Menstrual siklusta gerçekleşen olayların hipofiz bezi, folikül gelişim evreleri, kandaki hormon düzeyleri ve ovaryumun yapısında meydana gelen değişikliklerin gösterildiği diyagram. (Ross ve Pawlina, 2011).

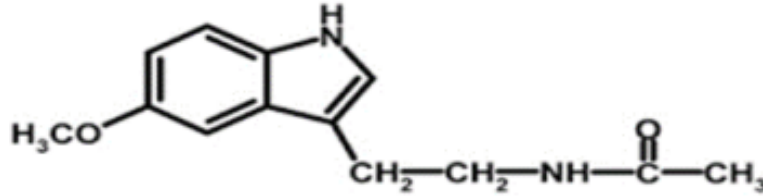
## 2.9. Over Rezervi

Over rezervi; fetal hayatın ortalama 12. haftasında primitif germ hücrelerinin, gonadal kabartılara yerleşmeye başlayarak, burada bir dizi mitoz ile sayısını çoğaltıp, primordiyal foliküllerin oluşmaya başlaması ile devam eden, bir kadının yumurtalıklarındaki sahip olduğu, primordiyal foliküllerin sayısı ve kalitesini, hormonal aktivitedeki etkinliklerinin değerlendirilmesi olarak tanımlanmaktadır (Seçkin ve ark., 2008) Over rezervindeki azalmanın başlıca sebebi, yaşa bağlı olarak primordiyal foliküllerin uğradığı apoptotik süreçlerdir. XX kromozomuna sahip bir embriyonun ovaryumlarında, yaklaşık 7 milyon oogonyum bulunur ve doğuma kadar oluşan foliküller, atreziye uğrayarak sayıları 1-2 milyona kadar düşer. Puberteyle birlikte, zaten 300-400 bine gerilemiş olan primordiyal folikül sayısı, her ay görülen menstrual siklusun farklı fazlarında, ortalama 1000 kadarı daha atrezik hale gelerek kaybedilir. (Doğan Durdağ ve Berker, 2008). Anti-müllerian hormon (AMH), gelişmekte olan foliküllerin

granüloza hücreleri tarafından üretilmektedir (Demir, 2013). Ovaryumdaki primordiyal foliküllerin varlığı azaldıkça, anti-müllerian hormon salınımı da azaldığından dolayı, over rezervini oluşturan primordiyal folikül havuzuyla ilgili dolaylı bir ilişki kurulabilmektedir. (Dewailly ve ark., 2014). Over rezervinin belirlenmesinde, ayrıca folikül uyarıcı hormon (FSH), anti-müllerian hormon (AMH) ve inhibin-B gibi hormonların ölçümlerini içeren birçok test geliştirilmiştir. Aynı zamanda ultrasonografi ile yumurtalık hacminin değerlendirilmesi için, antral folikül sayısına da bakılabilmektedir. (Yeniçeri ve ark., 2017).

## 2.10. Melatonin

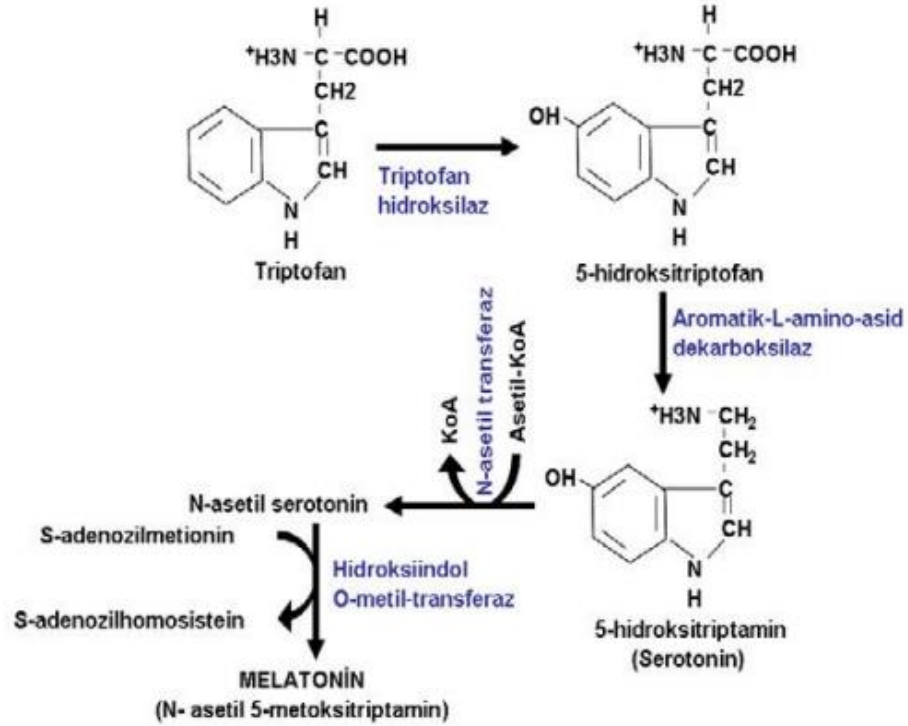
Dermatolog Lerner tarafından, 1958 yılında ilk kez kurbağa ve balıkların derilerindeki melanosit hücrelerinde, cilt aydınlatıcı etkisi üzerine keşfi yapılan melatoninin, sonraları bütün omurgalılarda pineal bez ile çeşitli organlar aracılığıyla salgılanan ve sirkadiyen ritmi düzenlemede etkili bir hormon olduğu saptanmıştır (Lerner ve ark., 1960).



**Şekil 2.9.** Melatonin (N-asetil 5-metoksitriptamin) (Atasoy, 2019).

Melatonin hormonunun sekresyonu omurgalılarda, triptofanın bir dizi biyokimyasal reaksiyonu ile gerçekleşir (Günhan, 2021). Bütün canlılar için melatonin sentezi ve salgısı ışık yokluğunda gerçekleşir ve insanlarda sekresyonun baskılanmasına sebep olacak doz, 2500 lux olarak belirlenmiş yeşil ışıktır (Çam ve Erdoğan, 2003). Fotoreseptörlerle algılanan ortamdaki ışık yokluğu, pineal beze iletildikten sonra besinlerle dışarıdan alınan triptofan aminoasiti, plazmadan alınarak hidroksilaz enzimi sayesinde ilk olarak 5-hidroksitriptofan'a, 5-hidroksitriptofan dekarboksilaz enzimi ile karboksil grubunu kaybederek, 5-hidroksitriptamine yani serotonine dönüştürülür.

Serotonin N-asetil transferaz enzimi ile asetillenir ve N-asetilserotonine dönüştürülür. N-asetilserotonin ise Hidroksiindol-o-Metiltransferaz ile N-asetil 5-metoksitriptamin'e yani melatonine dönüştürülür. (Atasoy ve Erbaş, 2017)



Şekil 2.10. Melatonin sentezinin aşamaları (Özçelik ve ark., 2013).

Melatonin, sahip olduğu bu kimyasal yapı dolayısıyla hem lipofilik hem de hidrofiliktir ve dokular ile hücrelere kolaylıkla geçiş yapabilir. İntra selüler alanlara rahatlıkla geçiş yapabilme yeteneğinden dolayı; hücre zarını, çekirdeği ve organelleri serbest radikallerin neden olduğu hasardan koruyarak, antioksidan özellik gösterir. (Günhan, 2021) Melatonin; E vitamini C vitamini, Beta karoten gibi bilinen diğer antioksidanların aksine, oksidan maddeleri süpürücü etki gösterirken ürettikleri ara ve yan ürünler, antioksidan olma özelliği taşımaya devam eder ve bu sebeple terminal antioksidan olarak isimlendirilir (Atasoy ve Erbaş, 2017).

## 2.11. Melatoninin Fonksiyonları

Melatonin sekresyonu, memelilerde sadece pineal bez aracılığıyla gerçekleşmez aynı zamanda safra, gastrointestinal sistem, ovaryum, testis ve deride yer alan pigment granüllerinden salınıp sentezlenebilir, fakat kan dolaşımında bulunan melatoninin yaklaşık %80'i albümine bağlı olarak bulunur ve pineal bez tarafından sentezlenmektedir (Özçelik ve ark., 2013).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, pineal bezin sirkadiyen ritmi düzenlemede oldukça etkili işleve sahip olduğunu, bununda başlıca salgı ürünü olan melatonin hormonuyla bağlantılı olarak gerçekleştirildiği saptanmıştır (Kleszczyński ve Böhm, 2020). Melatonin hormonu, antioksidan özelliğinin yanı sıra antiinflamatuvar, tümör gelişimini engelleyici, bağışıklık sistemini güçlendirici etkilere, aynı zamanda deride yer alan melanositlerde pigment granüllerinin değişimini düzenleyerek, güneşin zararına karşı koruyucu özellikte, uyku problemi olan kişilerde eksojen melatonin uygulamasının, uyku süresini ve kalitesini artırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir (Şener, 2010).

Viral enfeksiyonların oluşturduğu nitrik oksit ve türevleri (O<sub>2</sub>,NO), hidroksil (OH), peroksinitrit (ONOO) gibi serbest radikaller; hücrelerde yüksek oksidatif strese neden olarak DNA, protein, lipid gibi temel yapılarda hasarlara sebep olabilmektedir. Hücrelerin esansiyal bölgelerinde meydana gelen hasarlar, viral enfeksiyonların neden olduğu bazı hastalıkların temelini oluşturur. Serbest radikallerin neden olduğu bu olumsuz etkiler, melatonin gibi antioksidanlar aracılığıyla giderilebilir (Gümüşova ve Memiş, 2014). Melatoninin, hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) radikalini E vitamininden iki kat, hidroksil (OH) radikalini glutatyondan beş kat daha güçlü etkisiz hale getirdiği saptanmıştır. Hücre zarının dış yüzeyine tutunarak, orada bir bariyer görevi üstlenen melatonin, radikalleri membrana ulaşmadan detoksifiye ederek zararlı etkilerinden arındırır (Atasoy ve Erbaş, 2017). Melatonin serbest radikaller üzerindeki direkt etkisinin yanı sıra, dolaylı olarak glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzim aktivasyonunu tetikleyerek, hidroperoksitlerin metabolize edilmesini sağlar (Şener, 2010). Melatonin hormonu, etki ettiği dokulara reseptörleri aracılığıyla bağlanır ve MT1, MT2, MT3 olmak üzere üç tip reseptörü tanımlanmıştır. MT1 reseptörü; memelilerde daha çok renal fonksiyonlar, reproduktif işlevler, sirkadiyen ritim, uyku ve retina Ca<sup>+2</sup>-bağımlı dopamin salıverilmesi gibi ışığa bağımlı gerçekleşen olayların yürütülmesinden sorumludur. MT2



reseptörü; MT1 reseptörüne %60 homoloji gösterir ve retina, beyinde hipotalamusta, testislerde, böbrek, meme bezleri, deri, immün sistemde yer alır. MT3 reseptörünün varlığı ise kuşlarda ve bazı amfibi türlerinde tespit edilmiştir (Dubocovich ve Markowska, 2005). Melatoninin sahip olduğu reseptörlerle, ovaryumda granüloza hücrelerine tutunarak progesteron salgılanmasını arttırdığı tespit edilmiştir (Kuş ve Sarsılmaz, 2002). Mevcut olan kanıtlar, folikülogenez sırasında folikül sıvısında plazmada bulunandan on kat daha fazla konsantrasyona sahip melatonin varlığını göstermiş ve akabinde foliküllerin, geliştikçe melatonin ihtiyacının arttığı tespit edilmiştir. Melatoninin, foliküllerde antioksidan etki gösterdiği ve progesteron salınımını arttırdığı bulunmuştur (Salt ve ark., 2017).

Canlılar yaş aldıkça, organ ve dokularında çeşitli işlev kayıpları ve anatomik bozukluklar meydana gelmektedir. Antioksidan kapasitesinin azalması ile birlikte serbest radikallerin oluşturduğu oksidatif stres, hücrelerde tolere edilemeyecek seviyelere ulaştığında, bu durum doku ve organların dejenerasyonu ile sonuçlanır.  $\beta$ -adrenerjik reseptörler, pineal bezin membranı üzerinde bulunan ve geceleri sempatik nöronlardan, norepinefrin salgılanmasını tetikleyerek melatonin sentezinin artmasını sağlayan, bir dizi biyokimyasal reaksiyonun aracılığını üstlenmektedir. Yaşlanma ile birlikte,  $\beta$ -adrenerjik reseptörlerin sayısındaki azalma; önemli bir radikal süpürücüsü olan melatonin sentezinin de azalmasına sebep olarak, öncelikle beyin dokusunu oksidatif hasara açık hale getirmektedir (Mollaoğlu ve Özgüner, 2005). Nörodejeneratif hasarların sebepleri incelendiğinde, melatonin seviyelerindeki azalmaya bağlı olarak artan serbest radikaller gösterilmektedir ve eksojen melatonin uygulamasının, bu durumu engelleyebilecek özellikte olduğu bildirilmiştir (Şener, 2010).

Yaşlı farelere melatonin uygulanarak sonuçların incelendiği bir çalışmada, hem erkek hemde dişi farelerin cinsiyet organlarında rejenerasyon gözlemlenmiş, ayrıca genç farelerde olduğu gibi seksüel ilgi ve performanslarında artış olduğu tespit edilmiştir (Ölmez ve ark., 2000).

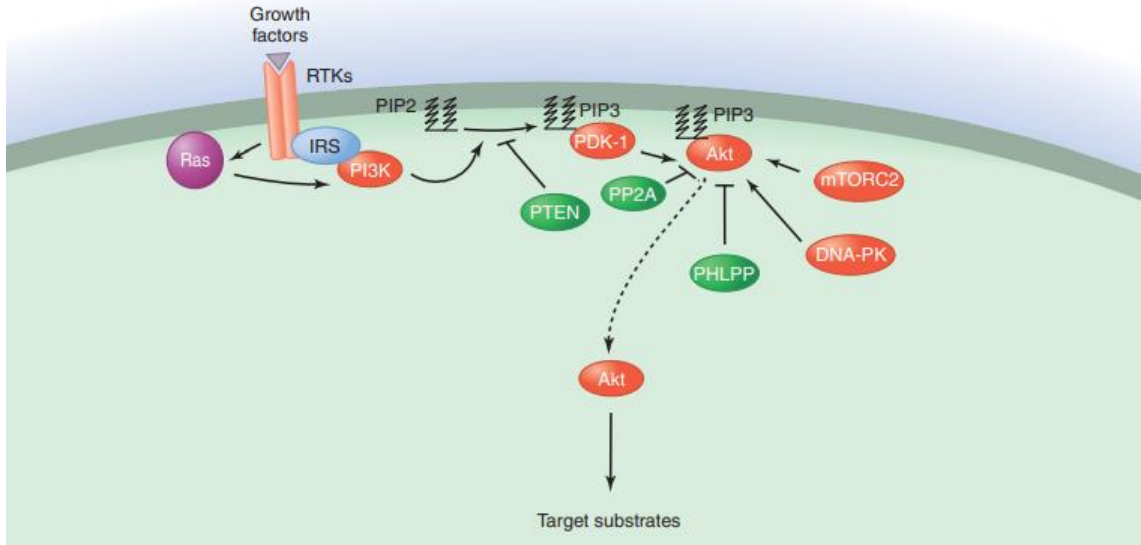
Yapılan çalışmalardan görüldüğü gibi hem endojen hem de eksojen melatonin hormonu vücutta birçok fizyolojik, biyolojik aktiviteyi gerçekleştirmekte sahip olduğu lipofilik kimyasal yapı dolayısıyla, intraselüler bölgelerde radikal süpürücü olarak görev yapmaktadır. Bugüne kadar melatoninin, in vitro fertilizasyon (IVF) çalışmalarında medyumlar içerisine eklenerek, tedaviye olumlu katkıları olduğu gösterilmektedir (Yücel ve ark., 2018).

## 2.12. PTEN/PI3K/AKT Yolağı

Ökaryotlarda, fosfataz ve kinaz enzimleri tarafından kontrol edilen fosforilasyon ve defosforilasyon ile proteinler morfolojik değişimlere uğrayarak, hücrenel faaliyetlerini durdurur veya aktifleştirir (Johnson, 2009). Hücrelerin fizyolojileri bozulduğunda veya onarılması mümkün olmayan hasara uğradıklarında, daha büyük komplikasyonlara sebep olmadan programlı bir şekilde ortadan kaldırılması gerekmektedir. Apoptoz olarak adlandırılan bu süreçlerde, çeşitli proteinler birbirlerinin aktifleşip inaktifleşmesini tetikleyerek sinyaller üretir ve hücrelerin nihai sonuna karar verici etkiler oluşturur (Kaya ve ark., 2012). Onkogenez de olduğu gibi istenmeyen ve kontrolsüz bölünme yeteneği kazanmış hücreler, apoptoz gibi süreçlerden mahrum olduğundan hasarlı hücreler birikip bölünmeye devam ederek malign tümörler invazyon gösterir (Yokuş ve Çakır, 2012). Kanser oluşumunda etkili, yaklaşık 250 gen tanımlansa da mekanizmalar henüz tam olarak anlaşılmış değildir. Yine de bilinen onkoproteinlerin dahil edildiği yolak sistemleri, kanser yolakları olarak isimlendirilmeye devam edilmekte ve birçok kanserde bir veya birkaçı aktif görev almaktadır (Pazarbaşı ve ark., 2011).

PTEN/PI3K/AKT yolağının temel mekanizmasına bakıldığında; Fosfatidilinositol-3 kinazlar (PI3K) otofaji, apoptoz, hücre döngüsü, büyümesi, farklılaşması gibi hücrenel aktivitelerin düzenlenmesinde rol oynayan tirozin kinaz reseptörleri (RTK) ve G proteinlerine bağlı reseptörler, sitokinler, büyüme faktörleri tarafından aktive edilirler (Küpeli, 2022).

Bir sitokin, büyüme faktörü, G proteine bağlı reseptörler veya tirozin kinaz reseptörleri tarafından aktifleşen PI3K proteini; Fosfatidilinositol-4,5 bifosfatı (PIP2)'yi Fosfatidilinositol-3,4,5 trifosfata (PIP3)'e dönüştürür (Hemmings ve Restuccia, 2012). Yolağın negatif düzenleyicisi olarak görev alan PTEN; Fosfataz ve Tensin homoloğu PIP3'ün PIP2'ye dönüştürerek sürecin ters yönlü kontrolünü sağlar (Hollander ve ark., 2011).



Şekil 2.11. PI3K proteininin aktivasyonu (Hemmings ve Restuccia, 2012).

PTEN tümör baskılayıcı geni; 10q23 kromozom bölgesinde konumlanmış ve hücre büyümesi, göçü, apoptozu, proliferasyonu gibi faaliyetlerin düzenlenmesinde görev alır. Ekspresyonunun azalması, lipid fosfataz aktivitesinin bozulmasını neden olarak endometriyum, meme, over, prostat kanserlerin de sık gözlenmiştir (Akdeniz ve ark., 2018). Ayrıca yapılan bir çalışmada, PTEN geninin yokluğunda farelerin ovaryumlarında yer alan primordiyal foliküllerin tamamının, çok erken yaşlarda hızla olgunlaşarak olması gerekenden daha kısa sürede tükendiğini ve primordiyal folikül olgunlaşmasında kilit bir öneme sahip olduğu bulunmuştur (Reddy ve ark., 2009).

PIP3'ün aktif formu, serin/treonin protein kinaz enzimi olarak bilinen protein kinaz B, yani Akt'nin plekstrin homoloji (PH) bölgesine bağlanarak etkinleştirilmiş olur (Manning ve Toker, 2017). Akt'nin aşırı üretimi; hücre büyümesi, çoğalması ve apoptozu gösterilen direnç gibi süreçlerle doğrudan ilişkili olduğundan, Akt'nin kontrol edilmesini sağlayan mTOR sinyal yolağının da anlaşılması büyük önem taşımaktadır (Janku ve Polivka., 2014).

mTOR protein kinazı, organ ve doku nakillerinden sonra vücudun bağışıklık sistemini baskılamak için kullanılan, rapamisin antibiyotiğinin memelilerdeki hedefidir. mTOR farklı proteinlerle bağlanarak, mTORC1 ve mTORC2 komplekslerini meydana getirmektedir. Akt'nin tam olarak aktifleşebilmesi için mTORC2 tarafından ek bir fosforilasyona uğraması gerekmektedir. mTORC2 kompleksinin de sürece katılmasıyla

aktiflenen Akt, hücre döngüsünün düzenlenmesinde görev alan farklı protein kinazları tetikler (Felici ve Klinger, 2021).

Akt'nin bir diğer hedefi de FOXO transkripsiyon faktörleridir. Forkhead box (FOX) transkripsiyon faktörleri, insanda 100'den fazla çeşidi bulunan ve sekans dizilimlerindeki benzerliklerine göre FOXA'dan FOXS'ye kadar 19 alt üyeye ayrılmış bir protein grubudur. Forkheadbox O transkripsiyon faktörleri, trombosit türevli büyüme faktörleri (PDGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I) gibi büyüme faktörlerine cevap olarak, Akt tarafından FOXO fosforilasyonu ile sitoplazmik şaperonlar tarafından bağlanır ve nükleusa geçemez. Gen ekspresyonu sağlanamadığından, hücre büyümesi durur ve apoptozun uyarılması sağlanır (Vuranok, 2022). Mevcut olan bir çalışmada, farelere verilen melatoninin PTEN/AKT/FOXO3 yolağının aktivasyonunun baskılanmasını sağladığını ve sisplatinle indüklenmiş over rezervi üzerine koruyucu etkisi olduğu bulunmuştur (Jang ve ark., 2016). Hücresel süreçlerin düzenlenmesinde, anabolik ve katabolik olayların dengede gerçekleşmesi, yaşamsal faaliyetlerin sağlıklı devamlılığı açısından önemlidir. PTEN/PI3K/AKT gibi, hücrelerde özellikle katabolik aktiviteleri düzenleyen yolaklarda meydana gelen mutasyonların, kalıtsal kanserlerde büyük etkiye sahip olduğu son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (Küçüköner ve Işıkdöğün, 2013).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 14.07.2023 tarihinde PAUHADYEK-2021/39 numarasıyla onay alınarak gerçekleştirilen bu çalışmada kullanılan hayvanlar, Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama Merkezinden tedarik edildi. Ağırlıkları ortalama olarak, 25-30 gram arasında ve 12 haftalık 24 adet, 20 aylık 24 adet olmak üzere Balb/c cinsi sağlıklı dişi fare ve toplamda 48 adet Balb/c cinsi sağlıklı fare kullanıldı. Standart fare yemi (8mm'lik pellet yem) ile şehir şebeke suyu hayvanlara beslenme sınırlandırılması getirilmeden (ad libitum) verildi. Deney protokolü boyunca, fareler sıcaklığı ( $21 \pm 1$  ° C) ve nem oranı (65-70%) kontrol edilen, 12 saat ışık-karanlık periyotlu, sessiz bir oda içerisinde veteriner hekim gözetiminde bakılarak barındırıldı. Yaşlı ve erişkin olarak kendi içlerinde 3 gruba ayrılan fareler, sessiz bir odada ayrı kafeslerde tutularak kuyrukları işaretlendi. Çalışma kapsamında yapılan doku takibi, histokimyasal ve immünohistokimyasal analizler, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

#### 3.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde, istatistiksel analizlerin doğruluğu ve güvenilirliği için gruplar n=8 olmak üzere, toplamda 6 grup oluşturulacak şekilde hayvanların tartımı yapılarak not edildi. Yaşlı erişkin ayrımı gözetilerek, rastgele gruplandırılan fareler, standart şartlar altındaki odaya kuyrukları boyanıp işaretlenerek ayrı kafeslerde yerleştirildi. Oluşturulan gruplar; Erişkin Kontrol (EK, n=8), Erişkin Sham (ES n=8), Erişkin Melatonin (EM n=8), Yaşlı Kontrol (YK n=8), Yaşlı Sham (YS

n=8), Yaşlı Melatonin (YM n=8) olmak üzere, toplam 6 gruba ayrıldı ve grup isimlendirmelerinin etiketlerin de baş harfler kısaltma olarak kullanıldı.



Şekil 3.1. Deney hayvanlarının farklı kafeslerde gruplandırılması.

### 3.2. Deney Gruplarına Yapılan Uygulamalar

Deney süresince, kontrol olarak belirlenen hem yaşlı hem de erişkin farelerin hiçbirine yem ve su dışında farklı bir gıda takviyesi verilmedi ve 7 günlük süreç boyunca herhangi bir uygulama yapılmadı. Sham grubu olarak belirlenen yaşlı ve erişkin farelere; %10'a seyreltilmiş etanol periton içine (intraperitoneal:IP) olarak verildi. Melatonin gruplarının, her birindeki hayvanların gramları baz alınarak hesaplamalar yapıldı ve 10 mg/kg dozda %10'a seyreltilmiş etanol ile hazırlanmış melatonin çözeltisi, intraperitoneal olarak 7 gün boyunca uygulandı.



**Şekil 3.2.** İntraperitoneal enjeksiyon uygulaması.

### **3.3. Deney Hayvanlarına 7 Gün Boyunca Uygulanan Maddelerin Hazırlanması**

#### **3.3.1. Melatoninin hazırlanması ve uygulanması**

Yaşlı ve erişkin sağlıklı dişi olarak gruplandırılmış, toplamda 16 adet farenin tartımları yapıldı ve not edildi. Melatoninin, 10mg/kg dozda olabilmesi için hayvanların gramları dikkate alınarak hesaplamalar yapıldı. Günlük taze olarak hazırlanan uygulama dozu için 4,8 mg melatonin, hassas terazide tartılarak 15ml'lik falkon tüpe konuldu, üzerine 480  $\mu$ L absöü etanol mikropipet ile çekilerek falkon içerisine aktarıldı. Melatonin, etanol içerisinde çözününceye kadar vorteks ile karıştırıldı. Çözelti üzerine, 4,32 ml distile su eklenerek vortekslendi. Aşağıdaki tabloda belirtilen oranlarda, intraperitoneal olarak 7 gün boyunca (20:00-21:00 saatleri aralığında), blu marka insülin enjektörü kullanılarak uygulama yapıldı.



Şekil 3.3. Hassas terazide melatoninin tartılması.



Şekil 3.4. Melatoninin etanol içinde çözdürülmesi.



### 3.3.2. %10'luk Etanolün hazırlanması ve uygulanması

Sham grubundaki fareler için isolab marka absolü etanolden, 480 µL mikropipet ile alınarak falkon içerisine aktarıldı. 4,32 ml distile su, falkona eklenerek vortekste karıştırıldı ve 16 fare için 7 gün boyunca, taze olarak her gün yeniden hazırlandı. Tabloda belirtilen oranlarda, 7 gün boyunca (20:00-21:00 saatleri aralığında) blu marka insülin enjektörü kullanılarak intraperitoneal olarak farelere verildi.



Şekil 3.5. Absolü etanolün %10'a seyreltilmesi.

### 3.3.3. Gruplara yapılan uygulamalar

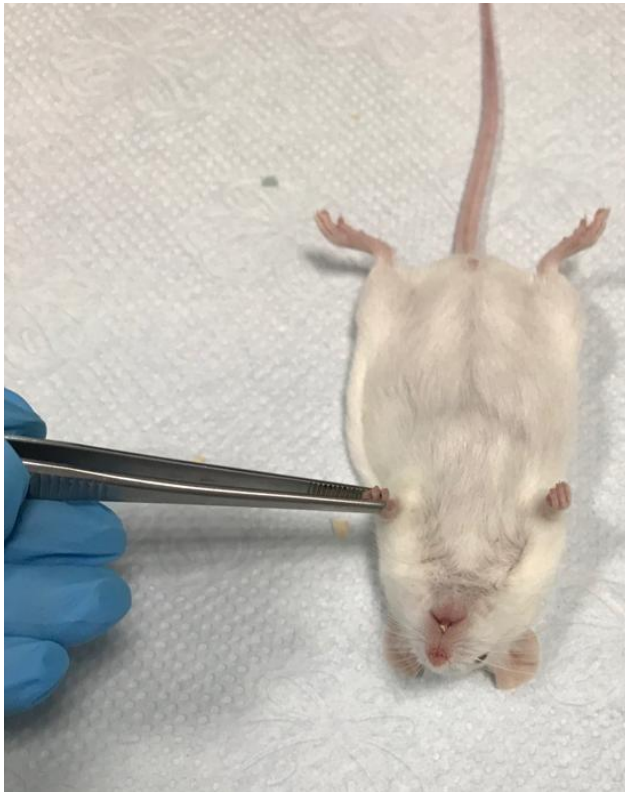
Çalışma için kullanılan deney hayvanlarının bulunduğu gruplar, ağırlıkları ve 7 gün boyunca uygulanan maddelerin miktarları tabloda gösterilmektedir.

**Tablo 3.1.** Deneysel gruplarına yapılan uygulamalar.

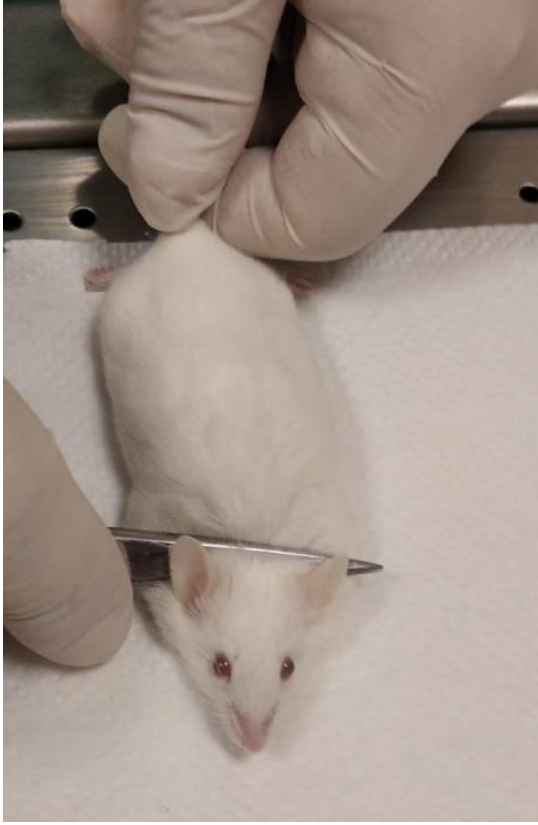
Grup	Numara	Uygulanan Madde	Doz	Ağırlık (g)	Uygulanan miktar (mL)
Erişkin Sham	1	Etanol	% 10	26	0,260
	2	Etanol	% 10	29	0,290
	3	Etanol	% 10	27	0,270
	4	Etanol	% 10	26	0,260
	5	Etanol	% 10	31	0,310
	6	Etanol	% 10	28	0,280
	7	Etanol	% 10	27	0,270
	8	Etanol	% 10	30	0,300
Yaşlı Sham	1	Etanol	% 10	33	0,330
	2	Etanol	% 10	30	0,300
	3	Etanol	% 10	29	0,290
	4	Etanol	% 10	31	0,310
	5	Etanol	% 10	30	0,300
	6	Etanol	% 10	28	0,280
	7	Etanol	% 10	29	0,290
	8	Etanol	% 10	32	0,320
Erişkin Melatonin	1	Melatonin	10mg/kg	28	0,280
	2	Melatonin	10mg/kg	27	0,270
	3	Melatonin	10mg/kg	29	0,290
	4	Melatonin	10mg/kg	31	0,310
	5	Melatonin	10mg/kg	28	0,280
	6	Melatonin	10mg/kg	26	0,260
	7	Melatonin	10mg/kg	29	0,290
	8	Melatonin	10mg/kg	25	0,250
Yaşlı Melatonin	1	Melatonin	10mg/kg	31	0,310
	2	Melatonin	10mg/kg	29	0,290
	3	Melatonin	10mg/kg	33	0,330
	4	Melatonin	10mg/kg	28	0,280
	5	Melatonin	10mg/kg	29	0,290
	6	Melatonin	10mg/kg	30	0,300
	7	Melatonin	10mg/kg	28	0,280
	8	Melatonin	10mg/kg	27	0,270
Erişkin Kontrol	1	-	-	29	-
	2	-	-	31	-
	3	-	-	30	-
	4	-	-	26	-
	5	-	-	31	-
	6	-	-	28	-
	7	-	-	27	-
	8	-	-	29	-
Yaşlı Kontrol	1	-	-	33	-
	2	-	-	31	-
	3	-	-	29	-
	4	-	-	28	-
	5	-	-	32	-
	6	-	-	30	-
	7	-	-	28	-
	8	-	-	31	-

### 3.4. Deneyin Sonlandırılması

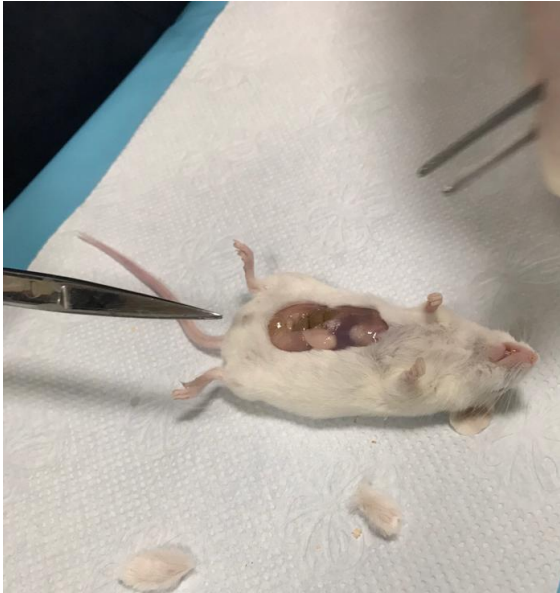
7. Gün boyunca (20:00-21:00 saatleri aralığında), melatonin ve etanol uygulanan bütün hayvanlar, kontrol gruplarıyla birlikte 8. Günde ketamin/ksilazin 200/10 mg/kg intraperitoneal olarak farelere verildikten sonra, servikal dislokasyon yöntemi ile sakrifiye edildi. Penset ile refleks kontrolü yapıldıktan sonra, anesteziye girdiğinden emin olunan hayvanların batın ön duvarı, insizyonla açılarak tuba uterina ve ovaryumları tamamen çıkarılarak, içerisinde serum fizyolojik bulunan petri dişe alındı. Farelerin beyin ve omurilik bağlantısı kesici alet yardımıyla birbirinden ayrıldı ve deney sonlandırıldı. Ovaryumlar, histokimyasal ve immünohistokimyasal analiz için %10'luk formaldehit içerisinde etiketli kasetlerde 48 saat bekletilip, sırasıyla doku takibi, bloklama işlemleri gerçekleştirilerek boyama prosedürleri izlendi.



Şekil 3.6. Refleks Kontrolünün sağlanması.



Şekil 3.7. Servikal dislokasyon uygulaması.



Şekil 3.8. Batın ön duvarından insizyon ile organların çıkarılması.

### **3.5. Doku Takibi**

#### **3.5.1. Fiksasyon işlemi**

Deney hayvanlarının kesimi ile petrilerin içerisine alınan dişi üreme organları, mikroskop altında uterus ve tuba uterinalarından bistüri ile ovaryumları ayrıldıktan sonra, %10'luk formaldehit içerisinde grup isimlerine göre etiketlenerek, doku kasetlerine aktarıldı ve idrar kaplarında saklandı. Dokular, %10'luk formaldehit içerisinde 48 saat bekletildi.

#### **3.5.2. Dehidratasyon işlemi**

%10'luk formaldehitte, sertleşmesi için 48 saat boyunca bekletilen ovaryum dokularının kasetleri, tekrar kontrol edildi. Etiketleri ve açılmadığından emin olunan bütün kasetlerde yer alan ovaryum dokuları; sıralaması aşağıda belirtilen alkol serilerinden geçirildi. Bu işlemler sayesinde, dokuların içerisindeki su ve yağın uzaklaştırılması sağlanarak, bloklama işleminde kullanılacak parafininin dokuların içerisine rahatça yerleşmesi sağlandı.

1. %50'lik etil alkol içerisinde 60 dakika bekletildi.
2. %70'lik etil alkol içerisinde 60 dakika bekletildi.
3. %80'lik etil alkol içerisinde 60 dakika bekletildi.
4. %90'luk etil alkol içerisinde 60 dakika bekletildi.
5. %95'lik etil alkol içerisinde 60 dakika bekletildi.
6. %100'lük etil alkol içerisinde 60 dakika bekletildi.
7. %100'lük etil alkol içerisinde 60 dakika bekletildi.

### 3.5.3. Şeffaflaştırma

Alkol serilerinden sırasıyla geçirilerek, doku içerisindeki su uzaklaştırıldıktan sonra ovaryum dokuları, alkolden temizlenmesi amacıyla ksilen 1 ve ksilen 2’de sırasıyla 1’er saat bekletilerek, alkolden arındırıldı ve şeffaflaştırma işlemi tamamlandı.

### 3.5.4. Parafinizasyon

Dokunun bütünlüğünü koruyarak sertleşmesinin sağlanması amacıyla alkolden ve sudan arındırılmış ovaryum dokuları, sıcaklığı 58-60 °C etüv içerisinde önceden eritilmiş parafin 1 içerisinde, 1 saat inkübasyona bırakıldı ve ksilen kalıntılarından arındırıldı. 1 saatlik bekleme süresinin sonunda, 58-60 °C etüv içerisinde önceden eritilmiş haldeki parafin 2 içerisinde, 1 gece boyunca inkübasyona bırakılarak dokular, bloklamaya hazır hale getirildi.

### 3.5.5. Dokuların bloklanması

Her hayvanda, iki adet ovaryum dokusu olduğu için 96 adet uzun ince şeritler halinde kağıtlar kesilerek, grup isimlerine göre etiketler hazırlandı. Bloklama işleminin yapılacağı masanın üzeri temizlenerek, bloklama kalıp demirleri (L demirleri) kare oluşturacak şekilde masaya yerleştirildi. İçerisine sıvı parafin döküleceğinden dolayı, aralarında hiç boşluk kalmadığı kontrol edildi. Bir gece boyunca, parafin 2’de etüv içinde bekletilen dokular, çıkartılarak gruplarına göre ayrıldı. Tasnifinin kolay olması için her grup için farklı renkli doku kasetleri kullanıldı. Temiz önceden eritilmiş sıvı haldeki parafin, hazırlanan bloklama kalıp demirlerinin içerisine döküldü. Ovaryum dokuları, eğri penset yardımı ile parafinin içerisine yerleştirildi ve şerit halindeki dokunun ait olduğu grubu gösteren etiket, dokuya değmeyecek şekilde konumlandırıldı. İşlemler, bütün dokular için tekrar edildi ve bloklar, parafinin donması için soğumaya bırakıldı. Parafinin donduğundan emin olunduktan sonra, bloklama demirleri çıkartıldı ve temizlendi. Doku blokları, etiketli olarak bir kutu içerisinde muhafaza edildi.

### 3.5.6. Mikrotom ile dokulardan kesit alınarak lam üzerine aktarılması

Daha önceden hazırlanan doku blokları, kesit alma işleminden 30 dakika önce buzuğa kaldırıldı. Dokular buzlukta beklerken, su banyosunun içerisine saf su konuldu ve sıcaklığı 45-50 °C'ye ulaşınca kadar beklendi. Kesit kalınlığının 4-5 µm olması için, mikrotomun gerekli ayarları yapılarak kesit alınacak blok, mikrotoma yerleştirildi ve sabitlendi. Şeritler halinde seri kesitler alınarak, önceden ısıtılmış su banyosuna aktarıldı. Kesitlerdeki kırışıklıklar giderilinceye kadar suda yüzen şeritler, histokimyasal boyama için ekonomik kalitedeki lama, immünohistokimyasal boyama için polilizin kaplı lama aktarıldı ve lamlar kurşun kalem ile etiketlendi. Bütün bu işlemler, mevcut dokuların tamamı için tekrar edildi.

### 3.5.7. Deparafinizasyon işlemi

Dokuların lam üzerine sabitlenmesi ve parafinin sıcaklığın etkisiyle, bir miktarda olsa uzaklaştırılması amacıyla boyama aşamasına geçilmeden önce kesitler, zembillere dizilerek 58-60 °C etüv içerisinde 3-4 saat bekletildi. Dokuların içerisine giren parafinden arındırılması için lam üzerindeki kesitler, ksilen serilerinden geçirildi.

1. Giriş ksilen 1'de 30 dakika bekletildi.
2. Giriş ksilen 2'de 30 dakika bekletildi.

Ksilen serilerinden geçirilerek parafinden arındırılan dokular, ksilenden temizlenmesi için azalan alkol serilerinden aşağıda belirtilen sırayla geçirildi.

- a) %100'lük etil alkol (giriş) içerisinde 5 dakika bekletildi.
- b) %95'lik etil alkol (giriş) içerisinde 5 dakika bekletildi.
- c) %90'lık etil alkol (giriş) içerisinde 5 dakika bekletildi.
- d) %80'lik etil alkol (giriş) içerisinde 5 dakika bekletildi.
- e) %70'lik etil alkol (giriş) içerisinde 5 dakika bekletildi.
- f) %50'lik etil alkol (giriş) içerisinde 5 dakika bekletildi.

Alkol serilerinden sırasıyla geçirilen dokuların, su kayıplarının giderilmesi için hidrasyon aşamasına geçildi ve kesitler distile su içerisinde 10 dakika bekletildi. Deparafinizasyon işlemi sonlandırılan dokular, boyama işlemi için hazır hale geldi.

### 3.6. Hematoksilen & Eozin boyama

Hidrasyon işlemi tamamlanan ve tekrar su kazanması sağlanan kesitler, aşağıda belirtilen H&M Boyama prosedürü takip edilerek boyandı ve kapatıldı.

1. Distile su içerisinde 10 dakika bekletilen kesitler, suyu süzdürülerek hematoksilen (Merk Harris' hematoksilen) boyasında kontrollü olarak 5-7 dakika bekletildi.
2. Akan su içerisine daldırılıp kurulan kesitler, ışık mikroskopunda boya yoğunluğu kontrol edildikten sonra boyayı almayan kesitler, farklı bir zembile ayrılarak kontrollü olarak hematoksilende bekletildi.
3. Boyayı istenenden fazla yoğun alan kesitler, 10 saniye boyunca asit alkol karışımına daldırılıp çıkartılarak fazla boya kesitlerden uzaklaştırıldı.
4. Asit-alkol çözeltisinden alınan kesitler, tekrar akan suya batırılıp amonyaklı suda 10 saniye bekletildi.
5. Amonyaklı su içerisinden alınan kesitler, akan suya batırılıp kurulandıktan sonra eozin (Merk Eozin Y-solüsyonu) içerisinde kontrollü olarak 3-4 dakika bekletildi.
6. Kesitler eozinden alınıp, akan suya daldırılıp çıkartıldıktan sonra kurutma kağıdına süzdürülüp, ışık mikroskopunda boya yoğunluğu kontrol edildi.
7. Sırasıyla %50, %70, %80, %90, %95'lik etil alkol (çıkış) serilerinde 1'er dakika, %100'lük etil alkolde (çıkış) 10 dakika bekletildi.
8. Son %100'lük etil alkolünden (çıkış) alınan kesitler sırasıyla ksilen 1 ve ksilen 2'de 5'er dakika bekletildi.
9. Boyama işlemi tamamlanan kesitler, kurutma kağıdına dizilerek üzerine 1 damla entellan, pastör pipeti yardımıyla damlatıldı.
10. Kesitler, içerisinde hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek lameller ile kapatıldı ve preparat haline getirilerek kuruması için bırakıldı.

Preparatlar; Olympus BX51 ve Olympus DP72 marka/model cihazlar aracılığıyla incelenip, oosit sayımı yapıp fotoğraflandı. Her grup için bütün işlemler tekrar edildi.



### 3.6.1. Folikül sayımı yöntemi

Parafin bloklardan mikrotom cihazıyla 5 mikronluk seri kesitler alındı. Farelerin ovaryum dokularından 1., 5. ve 10. kesitleri lamlara alındı ve Hematoksilen-Eozin boyama uygulandıktan sonra ışık mikroskopunda folikül sayımı yapıldı.

Folikül sayımında; primordiyal, primer, sekonder, tersiyer ve atretik foliküllerin sayımı yapıldı. Foliküller şu şekilde tanımlandı:

Primordiyal Folikül: Oosit etrafında tek katlı yassı granüloza hücreleri ile çevrili,

Primer Folikül: Oosit etrafında tek katlı kübik granüloza hücreleri ile çevrili,

Sekonder Folikül: Oosit çok tabakalı kübik granüloza hücreleri ile çevrili ve antral boşluğu çok az olan foliküller,

Tersiyer (Graaf) Folikül: Oositin etrafı çok katlı kübik granüloza hücreleriyle çevrili, antum boşluğu genişlemiş, kumulus ooforusu tabakası bulunan foliküller,

Atretik Folikül: Ovulasyon olmadan dejenerasyon sürecine girmiş folikül, oosit nükleusu küçülüp büzülmüş, normal şeklini kaybetmiş piknotik nükleuslu, granüloza hücrelerine sahip foliküller.

### 3.7. İmmünohistokimyasal Boyamalar

Mikrotom cihazı ile 5 µm'luk kesitler alınan ovaryum dokuları, immünohistokimyasal boyama prosedürlerinin uygulanması için kurşun kalem ile etiketlenmiş, polilizin kaplı lamlara alındı. Lamlar, 1 gece etüvde bekletildi ve immünohistokimyasal boyama protokolü kullanılarak, bütün gruplar için işlemler aşağıda belirtilen sıra ile gerçekleştirildi. Çalışmamızda yer alan üç farklı yolak belirteci olarak; FNab00271 (AKT antibody), FNab06416 (PIK3R5 antibody), Sab5600075 (PTEN antibody) primer antikoları kullanılarak, datasheette belirtilen oranlarda dilüe edildi.

- 1) Polilizin kaplı lamlara alınan dokular, taşıma sepeti içerisinde 60 °C etüvde 1 gece bekletildi.

- 2) Ksilen içerisine taşıma sepeti ile birlikte yerleştirilen dokular, 1 saat boyunca bekletilerek deparafinizasyon sağlandı.
- 3) 1 saat sonunda ksilenden çıkartılan dokular kurutuldu ve PAP pen ile dokuların etrafı sınırlandırıldı.
- 4) Dokular, sırasıyla %100, %96, %80, %70, %50'lik etil alkol serilerinin her birinde iki dakika bekletildi.
- 5) Etil alkol serilerinden geçirilen doku kesitleri, 5 dakika distile su içerisinde bekletildi.
- 6) Daha önceden 1X'e seyreltilmiş fosfat tamponu (PBS) ile kesitler 3 kez 5'er dakika yıkandı. Bu işlem sırasında, 10:1 oranında %30'luk H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile 10:9 oranında absolü metanol karıştırılarak, hidrojen peroksit solüsyonu hazırlandı.
- 7) Endojen peroksidadz aktivitesini engellemek için hazırlanmış hidrojen peroksit solüsyonu, dokuların üzerine damlatılarak 15 dakika boyunca bekletildi.
- 8) Dokuların üzerindeki hidrojen peroksit solüsyonu döküldü ve 3 kez 5'er dakika 1X'lik derişimdeki PBS ile yıkandı.
- 9) Son PBS ile yıkama yapıldıktan sonra lamlar, buzdolabı içerisine kaldırılacağından uygun kaplara yerleştirildi.
- 10) İmmün boyamanın sekonder kitinde (Thermo Scientific) yer alan A solüsyonu (blok solüsyonu) ile dokuların yüzeyleri kaplandı ve 10 dakika bekletildi. Bekleme süresi boyunca, tüm primer antikorlar tek kullanımlık ampul içerisindeki steril distile su ile datasheetindeki belirtilen oranlara uygun olarak dilüe edildi.
- 11) A solüsyonu, kesitlerin üzerinden döküldükten sonra önceden dilüe edilen primer antikorlar, dokuların üzeri tamamen kaplanacak şekilde damlatılarak buzdolabının +4°C kısmına uygun kaplarda yerleştirilerek, 1 gece inkübasyona bırakıldı.
- 12) Diğer günün sabahında, kesitler 1X'lik PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkandı.
- 13) İmmün boyamanın sekonder kitinde yer alan B solüsyonu, Biotinlenmiş afiniteye sahip primer antikorla reaksiyon veren sekonder antikor; bütün kesitlere damlatılarak 40 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- 14) Bekleme süresinin sonunda, kesitlerin üzerindeki B solüsyonu dökülerek 1X'lik PBS ile 3 kez 5 dakika yıkama işlemi yapıldı.
- 15) Sekonder kitte yer alan solüsyon C, immün boyamanın sekonder antikorlarıyla reaksiyon veren enzimleri içerir ve kesitlerin üzerine damlatılarak, oda sıcaklığında 20 dakika inkübasyona bırakıldı.

- 16) Kesitlerden C solüsyonu uzaklaştırıldıktan sonra 1X'lik PBS ile 3 kez 5'er dakika yıkama yapıldı.
  - 17) PBS ile yıkama işlemi yapılırken, eş zamanlı olarak DAB kromojen kiti (Thermo Scientific) kullanılarak hazırlanan enzimatik DAB boyası, ışığa duyarlı olduğundan alüminyum folyo ile sarılmış falkon tüp içerisinde DAB solüsyonundan konuldu ve üzerine DAB boyası damlatılarak hazırlandı.
  - 18) Kesitlerin üzerine DAB solüsyonu, laboratuvarın ışıkları kapatılarak damlatıldı ve boş bir dolap içerisine kaldırılarak, karanlık ortamda 3-8 dakika aralığında kontrollü inkübasyona bırakıldı.
  - 19) Bekleme süresi sonunda, kesitlerin üzerindeki DAB solüsyonu uzaklaştırılarak 3 kez 5'er dakika 1X PBS ile yıkandı.
  - 20) Yıkama işlemi gerçekleştirilirken, hematoksilen boyası ve distile su ayrı ayrı kaplar içerisine konularak hazırda bekletildi.
  - 21) Kesitlerin zemin boyaması için hematoksilen boyası (Merk Harris' hematoksilen) kullanıldı ve 2-5 dakika kontrollü olarak boya içerisinde bekletilerek zıt boyama yapıldı.
  - 22) Işık mikroskopunda kontrol edilen kesitler, distile su içerisinde yıkandıktan sonra sırasıyla %50, %70, %80, %90 ve %100'lük artan çıkış etil alkollerinde 2 dakika bekletilerek geçirildi.
  - 23) Çıkış ksilen 1 ve çıkış ksilen 2'de sırasıyla 2 dakika bekletildikten sonra kesitler, üzerlerine pastör pipeti ile entellan damlatılarak lameller ile kapatıldı ve preperat haline getirildi.
  - 24) Lam ve lamel arasında hava kabarcığı kalmamasına dikkat edilerek kapatma işlemi gerçekleştirildi.
  - 25) Kapatılan preperatlar, kuruması için kurutma kağıdının üzerine yerleştirildi.
  - 26) Ertesi gün kapatma sırasında taşan entellan kalıntıları, gazlı beze ksilen damlatılarak temizlendi.
  - 27) Olympus BX51 ve Olympus DP72 marka/model cihazlar aracılığıyla incelenerek fotoğraflandı ve aşağıdaki skala kullanılarak değerlendirildi.
- (+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok.
- İmmünohistokimyasal boyanma semi-kantitatif H skoru ile değerlendirildi.

(I x PC), (I: boyanmanın derecesi, PC: her derecede boyanan hücrelerin yüzdesi)

### 3.8. İstatistiksel Analiz

Veriler SPSS 25.0 (IBM SPSS Statistics 25 software (Armonk, NY: IBM Corp.) paket programıyla analiz edilmiştir. Bağımsız grup farklılıklarının karşılaştırılmasında; Kruskal Wallis Varyans Analizi ile ikili grupların karşılaştırılması; Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Tüm analizlerde  $p \leq 0,05$  anlamlı kabul edilmiştir.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Folikül Sayımı Bulguları

Bütün gruplar için hematoksilin eozin ile boyanan preparatlar, ışık mikroskopunda incelendi. Erişkin gruplarda primordiyal folikül sayıları, primer folikül sayıları, sekonder folikül sayıları kontrol ve melatonin uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı değilken, sham grubuna karşı anlamlı idi ( $p \leq 0,05$ ). Tersiyer folikül sayıları değerlendirildiğinde ise kontrol ve melatonin uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da melatonin uygulanan grupta biraz daha az olduğu tespit edildi. Atretik foliküller ise sham grubunda her iki gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ( $p \leq 0,05$ ).

Yaşlı gruplarda ise primordiyal folikül sayılarının her üç grupta da istatistiksel olarak anlamlılığı az bulundu. Primer, sekonder ve tersiyer foliküller kontrol ve sham grubunda birbirine yakın olarak izlenirken atretik folikül sayısının sham grubunda daha fazla olduğu saptandı ( $p \leq 0,05$ ). Kontrol ve melatonin uygulanan gruplarda primer ve sekonder folikül sayıları melatonin grubunda daha yüksek bulunurken atretik folikül ve tersiyer folikül açısından anlamlılık yoktu ( $p \leq 0,05$ ). Bununla birlikte melatonin uygulanan grupla sham grubu karşılaştırıldığında primer, sekonder, tersiyer ve atretik folikül sayımı açısından anlamlılık vardı ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.1. Erişkin grupların ovaryum folikül sayıları

**Tablo 4.1.**Erişkin Grupların Folikül Sayılarının İstatistik Sonuçları.

	EK-ES	EK-EM	ES-EM
	P değerleri	P değerleri	P değerleri
Primordiyal	0,019	1	0,036
Primer	0,005	0,867	0,007
Sekonder	0,027	0,718	0,071
Tersiyer	0,021	0,058	0,002
Atretik	0,003	0,317	0,002

#### 4.1.2. Yaşlı grupların ovaryum folikül sayıları

**Tablo 4.2.** Yaşlı Grupların Folikül Sayılarının İstatistik Sonuçları.

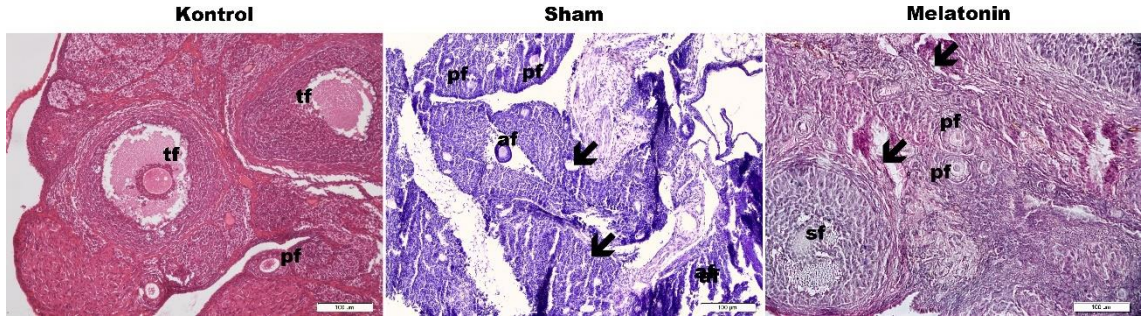
	YK-YS	YK-YM	YS-YM
	P değerleri	P değerleri	P değerleri
Primordiyal	1	1	1
Primer	0,138	0,041	0,007
Sekonder	0,138	0,041	0,007
Tersiyer	1	0,052	0,019
Atretik	0,012	0,165	0,003

## 4.2. Histokimyasal Boyamalar

#### 4.2.2. Erişkin grupların Hematoksilen & Eozin boyama sonuçları

Hematoksilen ile boyanmış erişkin farelerden alınan kesitlerde, kontrol grubu ovaryum dokusu normal görünümdeydi. Gelişim aşamasındaki tüm foliküller, korteks bölgesinde olup normal yapıdaydılar.

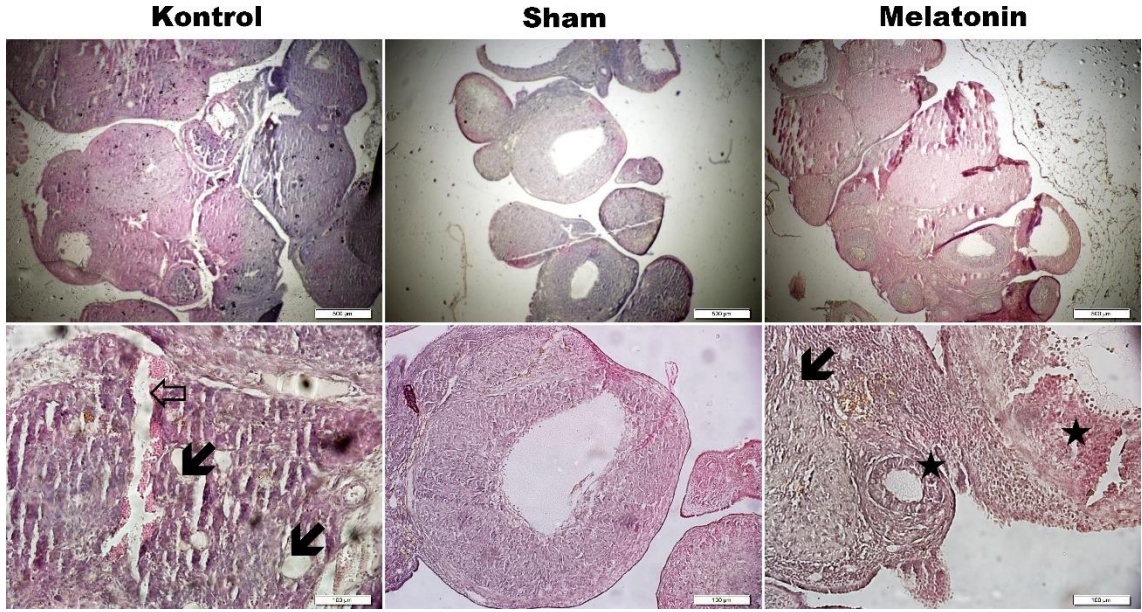
Sham grubunda; ovaryum stromasında boşluklar, oositlerde dejenerasyon granüloza hücrelerinde ayrılma belirgindi. Melatonin uygulanan grupta ovaryum dokusu, normale yakın izlendi. Bazı foliküllerde, dejenerasyon ve granüloza hücrelerinde ayrılmalar izlenmekle birlikte foliküllerin çoğu normal yapısını korumuştur. (Şekil 4.1, Tablo 4.1)



**Şekil 4.1.** Kontrol, sham ve melatonin uygulanan erişkin gruplardan alınan ovaryum dokusu. Ovaryum stromasındaki boşluklar;(Ok) Hematoksilen & Eozin, Bar: 100 µm.

#### 4.2.3.Yaşlı grupların Hematoksilen & Eozin boyama sonuçları

Kontrol ve sham gruplarında, gelişim sürecindeki foliküllerin sayılarının çok azaldığı izlendi. Kontrol grubunda; ovaryum dokusundaki bütünlüğün kaybolduğu yer yer boşlukların olduğu izlendi. Bu grupta atretik foliküllerde artış belgindi. Melatonin uygulanan grupta ise gelişim sürecinde foliküllerin, diğer gruplara karşın arttığı izlendi. Bu grupta yer yer dejeneratif alanlar, stromada boşluklar ve granüloza hücrelerinde ayrılmalar izlenmesine karşın, ovaryum dokusu; diğer gruplara göre normale yakın bir yapı sergiledi. Etil alkol uygulanan sham grubunda ise dokunun bütünlüğünün bozulduğu, birbirinden ayrıldığı ve normal görünümünü tamamen kaybettiği izlendi. (Şekil 4.2, Tablo 4.2).



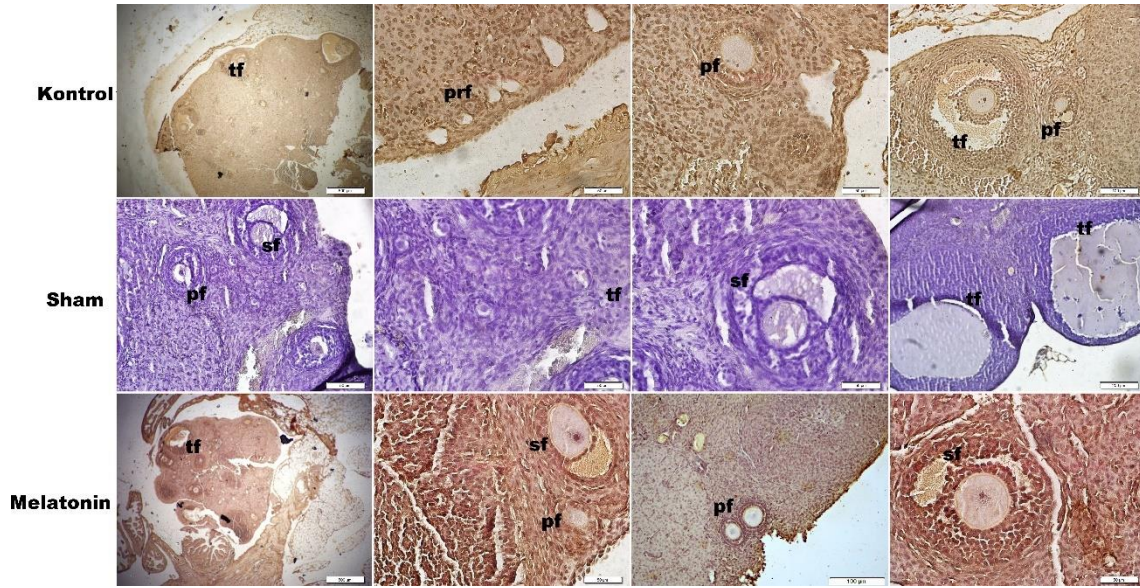
**Şekil 4.2.** Kontrol, sham ve melatonin uygulanan yaşlı gruplardan alınan ovaryum dokusu. Ovaryum stromasındaki boşluklar;(↙), granüloza hücreleri arasında ayrılmalar;(★), kanama alanları;(◻). Hematoksilen & Eozin, Bar: 500µm, 100 µm.

### 4.3. İmmünohistokimyasal Boyamalar

#### 4.3.1. Erişkin grupların PI3K ekspresyonu

Erişkin farelerden alınan ovaryumlarda PI3K ekspresyonu; kontrol, melatonin uygulanan gruplarda yoğun pozitif olmasına karşın, sham grubunda negatifti. (Şekil 4.3)

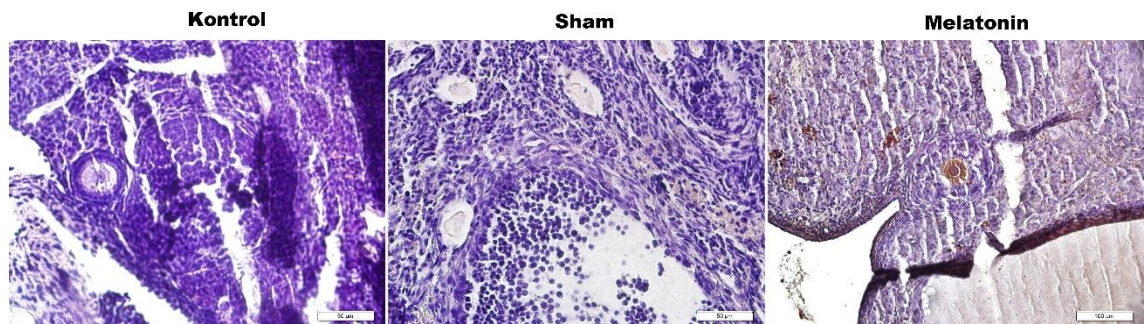




**Şekil 4.3.** Erişkin deneklerden alınan ovaryum dokusunda PI3K ekspresyonu ve yerleşimi. Primordiyal folikül; (prf), primer folikül; (pf), sekonder folikül (sf), tersiyer folikül (tf) İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, Bar: 50µm, 100 µm.

#### 4.3.2. Yaşlı grupların PI3K ekspresyonu

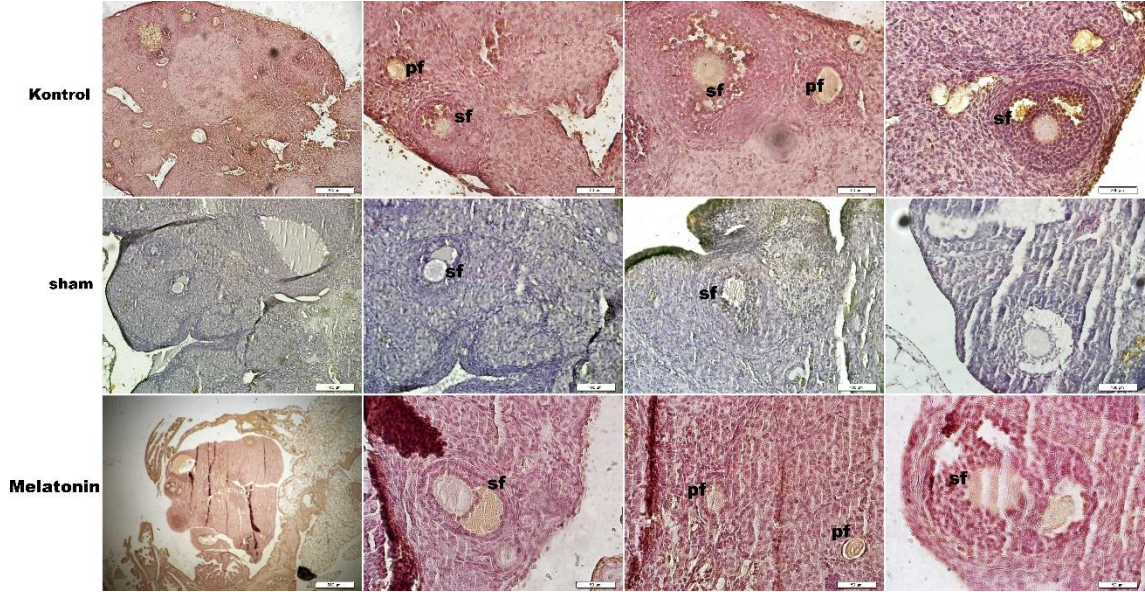
Yaşlı farelerden alınan ovaryum dokusunda ise PI3K ekspresyonu kontrol grubunda orta ve sham grubunda negatif olarak izlenirken melatonin uygulanan grupta pozitif reaksiyon gösteren foliküller dikkati çaktı. Reaksiyon oositlerinde yoğun granüloza hücrelerinde negatifti.



**Şekil 4.4.** Yaşlı deneklerden alınan ovaryum dokusunda PI3K ekspresyonu ve yerleşimi. İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, X50.

### 4.3.3. Erişkin grupların PTEN ekspresyonu

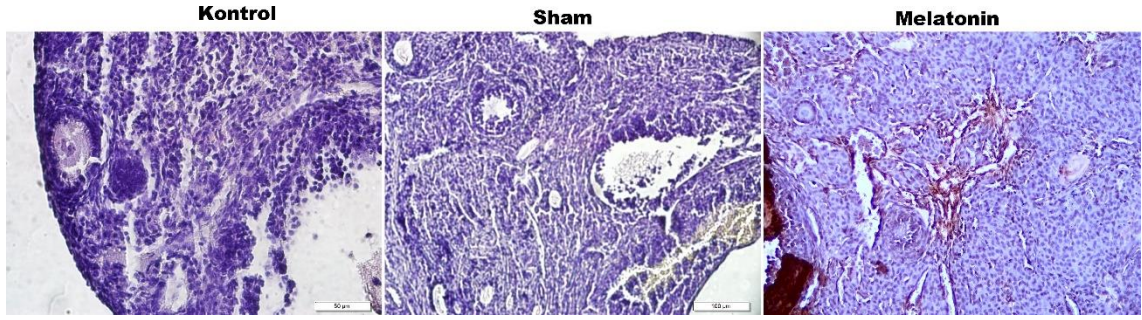
Erişkin farelerden alınan ovaryumlarda PTEN ekspresyonu; kontrol ve melatonin uygulanan gruplarda yoğun pozitif olmasına karşın, sham grubunda reaksiyonun negatif olduğu dikkati çekti (Şekil 4.5.).



**Şekil 4.5.** Erişkin deneklerden alınan ovaryum dokusunda PTEN ekspresyonu ve yerleşimi. Primordiyal folikül; (prf), primer folikül; (pf), sekonder folikül (sf), tersiyer folikül (tf) İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, Bar: 50µm, 100 µm.

### 4.3.4. Yaşlı grupların PTEN ekspresyonu

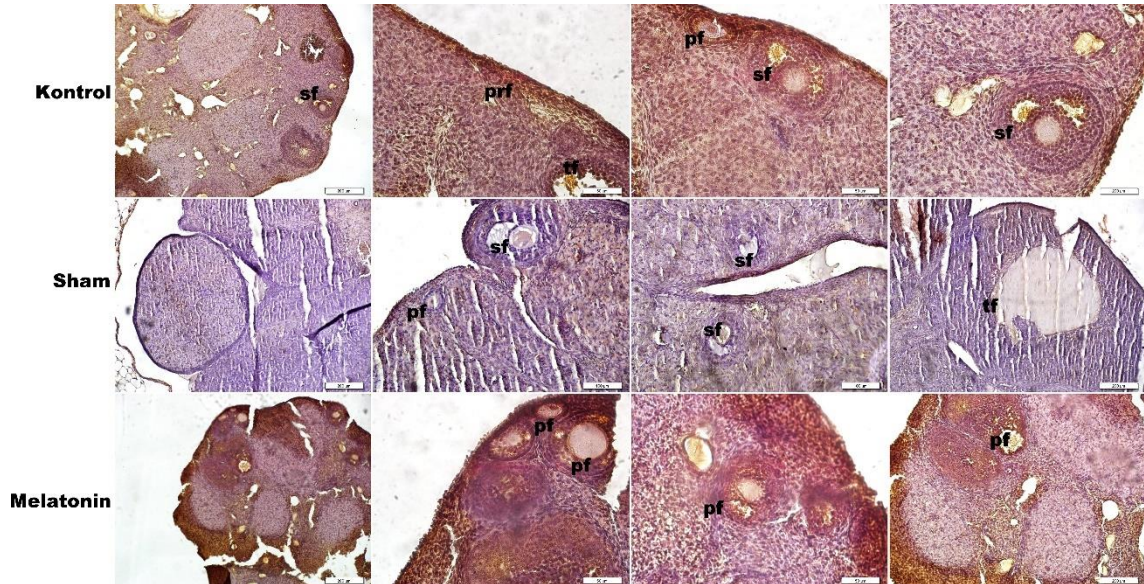
Yaşlı farelerden alınan ovaryumlarda PTEN ekspresyonu; kontrol, sham ve melatonin uygulanan gruplarda negatif olarak izlendi (Şekil 4.6.).



**Şekil 4.6.** Yaşlı deneklerden alınan ovaryum dokusunda PTEN ekspresyonu ve yerleşimi. İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, X50.

#### 4.3.5. Erişkin grupların AKT ekspresyonu

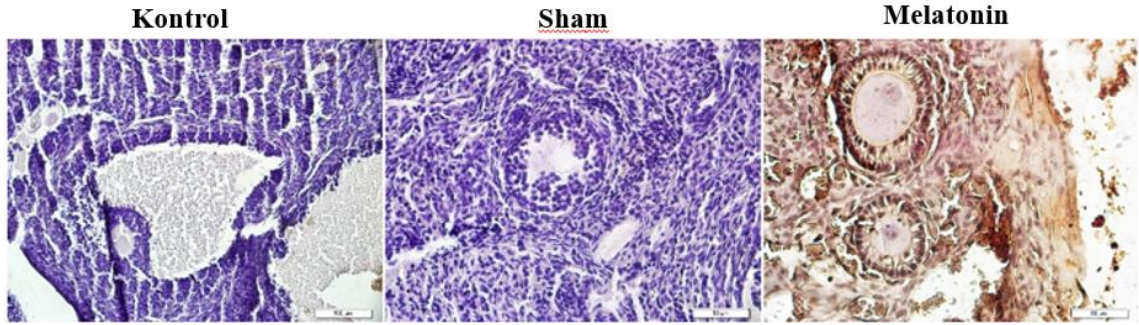
Erişkin farelerden alınan ovaryumlarda AKT ekspresyonu açısından, en yoğun boyanma melatonin uygulanan gruba kontrol grubunda olduğu, en düşük ekspresyonun ise sham grubunda olduğu saptandı. Reaksiyon melatonin uygulanan grupta oositlerde yoğun iken kontrol grubunda granüloza hücrelerinde yoğunu. (Şekil 4.7.).



**Şekil 4.7.** Erişkin deneklerden alınan ovaryum dokusunda AKT ekspresyonu ve yerleşimi. Primordiyal folikül (prf), primer folikül; (pf), sekonder folikül (sf), tersiyer folikül (tf) İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, Bar: 50µm, 100 µm.

#### 4.3.6. Yaşlı grupların AKT ekspresyonu

Yaşlı farelerden alınan ovaryumlarda ise AKT ekspresyonunun, yaşlı kontrol ve sham gruplarında zayıf pozitif/negatif, melatonin uygulanan grupta ise ekspresyon yoğun pozitif. Melatonin uygulanan grupta reaksiyonun, granüloza hücrelerinde yoğun olduğu gözlemlendi (Şekil 4.8.).



**Şekil 4.8.** Yaşlı deneklerden alınan ovaryum dokusunda AKT ekspresyonu ve yerleşimi. İmmünoperoksidaz %Hematoksilen, X50.

**Tablo 4.3.** Erişkin Grupların H-Skoru Analiz Sonuçları.

	EK-ES	EK-EM	ES-EM
	P değerleri	P değerleri	P değerleri
PTEN	0,015	1	0,004
PI3K	0,031	0,105	0,00
AKT	0,003	1	0,003

**Tablo 4.4.** Yaşlı Grupların H-Skoru Analiz Sonuçları.

	YK-YS	YK-YM	YS-YM
	P değerleri	P değerleri	P değerleri
PTEN	1	1	1
PI3K	1	0,002	0,002
AKT	0,003	0,002	0,002

## 5. TARTIŞMA

Ovaryum yaşlanması, oosit veya foliküler havuzun nitelik ve nicelik kaybıyla karakterize edilen doğal ve fizyolojik bir yaşlanma sürecidir. Kadınların oosit kalitesi, 30'lu yaşların başında azalmaya başlar ve 35 yaşından sonra dramatik bir şekilde düşer (Eijkemans ve ark., 2014; Magnus ve ark., 2019). İnsan dışı üreme sistemindeki yaşlanmaya bağlı hasar, diğer organ sistemlerinde gözlenenenden daha kritiktir (Miao ve ark., 2020). Ovaryum yaşlanması sırasında, oksidatif hasarın neden olduğu ovaryumun fonksiyonel düşüşü ve oosit kalitesindeki bozulma, kadın doğurganlığını önemli ölçüde etkiler (Yang ve ark., 2020; Wang ve ark., 2020). Genel olarak kabul edildiği üzere kadınların, yenilenmeden sürekli olarak azalan, sınırlı bir folikül havuzuyla doğduğu, bu durumun, azalan oosit kalitesiyle birlikte ileri yaştaki sağlıklı bir bebek sahibi olmak isteyen kadınlar için ciddi bir durum oluşturduğudur.

Kadın üreme sisteminin rutin faaliyetleri, ovaryumun kontrolü altında gerçekleştirilir. Eğer ovaryumda işlev bozukluğu veya hastalık ortaya çıkarsa, bu durum diğer sistemlerde de sorunlara yol açar. Kadınların üreme organları ve hatta sistemik fiziksel veya psikolojik bozukluklar, ovaryumun normal işlevini önemli oranda etkiler. Bu gibi durumlarda ovaryum yaşlanması, daha erken gerçekleşir (Amanvermez ve ark., 2016).

Ovaryum yaşlanmasına yol açan mekanizmalar hem hipotalamik-hipofiz-ovaryum ekseninin ovaryum dışı değişimi hem de ovaryumun kendisinin ovaryum içi değişimine neden olur. Serbest radikaller teorisi, apoptoz, telomer kısalması, mitokondriyal işlev bozukluğu ve enflamasyon günümüzde, ovaryum yaşlanmasının mekanizmalarına ilişkin mevcut anlayışlardır (Pampliega ve ark., 2020; Yang ve ark., 2020). Serbest radikal teorisine göre; yüksek ROS seviyelerinin neden olduğu oksidatif stresin, memeli hücrelerinin yaşlanmasına yol açan en önemli faktör olduğu bilinmektedir. Telomerler, en çok oksidatif hasara karşı savunmasızdır ve oksidatif stres

telomer kısalmasının ana nedenidir. Mitokondriyal DNA hasarı ve mutajenez, solunum zinciri işlevinin kademeli olarak bozulmasından ve dolayısıyla elektron sızıntısının artmasından doğrudan sorumludur. ROS, enflamatuar yanıtların önemli bir aracısı olan nükleer faktör kapp B'nin aktivasyonunu ve enflamatuar ajanlar interferon (IFN)- $\gamma$  ve lipopolisakkaritler (LPS), sinerjik olarak ROS üretimini artırır. Ovaryum yaşlanmasını iyileştirmek için, ovaryumdaki oksidatif stresin azaltılması büyük önem taşımaktadır. Oksidatif strese karşı, yaşlanmayı geciktirmek için melatonin büyük bir potansiyele sahiptir.

Ovaryum yaşlanmasını önlemede melatoninin rolü önceki çalışmalarda rapor edilmiştir. Epifizden salgılanan melatonin, birçok türün üreme fonksiyonunu etkiler. Bu çalışmada; yaşlanmada etkili olduğu düşünülen melatoninin, yaşlı farelerde ovaryum dokusuna etkisi ve folikülogenez de önemli sinyal yolağı olan PI3K/AKT/ PTEN ilişkisi araştırılmıştır.

Melatoninin düzenleyici etkisi, üreme işlevi farklı türler arasında büyük değişiklikler gösterir ve yaş, ışık döngüsü, adet döngüsü gibi faktörlerle ilişkilidir. Bazı hayvanlarda melatonin salgısındaki değişiklik, üreme işlevlerini düzenlemede anahtar rol oynar. Örneğin; üremesi mevsimsel olarak değişkenlik gösteren hayvanlardan biri olan hamsterlarla yapılan bir çalışmada, karanlık periyotlarının uzaması yani melatonin salgısının artmasının; üreme fonksiyonunu inhibe ettiği, böylece erkek hamsterların testislerinin dejenere olduğu ve dişi hamsterların da otistik fazda olmasına neden olduğu görülmüştür (Hoffmann, 1972). İnsanlar, mevsimsel olarak çoğalmasa da insanın üremesinde de mevsimsel farklılıklar vardır. Fotoperiyot ve sıcaklığın da dahil olduğu çevresel faktörler, üreme işlevinde etkilidir. Diğer memelilerde olduğu gibi melatonin, insan üremesini etkiler ve gebe kalmanın belirlenmesinde önemli bir rol oynar. Oldukça düzensiz adet döngülerine sahip kadınların ışığa maruz kalması, beklenen yumurtlama dönemini ve yumurtlama döngüsünü etkileyebilir. Melatonin hipofiz, gonadal hormonlar, gonadotropinler ve gonadal steroid hormonları sentezini etkileme yeteneğine sahip olduğu için adet döngüsü sırasında önemli ölçüde değişir (Brzezinski ve ark., 1987; Nakamura ve ark., 2003). Melatoninin üreme sürecindeki rolü üzerine çalışmalar; esas olarak ovaryumdaki doğrudan rolüne odaklanmıştır. Melatonin, lipofilik doğası nedeniyle tüm hücre zarlarına ve tüm dokulara girer, ancak sisteme girdikten sonra melatonin özellikle ovaryumda yoğunlaşır (Tamura ve ark., 2012; Wurtman ve ark., 1964). Ovaryumdaki melatonin konsantrasyonlarının, sabahki foliküler sıvıda (FF) (58,9

$\pm 3,8$  pmol/L) gündüzdekine ( $23,2 \pm 0,8$  pmol/L) kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu gözlenmiştir. (P 0,005'ten az). Ancak sabah konsantrasyonları, yılın aydınlık ve karanlık mevsimleri arasında farklı değilken, gündüz değerleri karanlık mevsimde ( $27,1 \pm 2,1$  pmol/L) aydınlık mevsime ( $21,1 \pm 2,1$  pmol/L) göre daha yüksektir (P 0,005'ten az), bu da melatoninin insanlarda üreme fonksiyonlarının foliküler düzeyde düzenlenmesine müdahale ettiğini göstermektedir (Ronnberg ve ark., 1990). Çalışmalar göstermiştir ki melatoninin oositler üzerindeki yararlı etkilerine, MT1 reseptörü ve AMPK (Adenozin Monofosfat Protein Kinaz) yolağı aracılık eder. MT1 nakavt farelerde oosit sayısı ve yavru büyüklüğünün önemli ölçüde azaldığı belirtilmektedir. SIRT 1 (Sirtuin geni), C-myc ve CHOP ekspresyonu MT1-KO farelerin ovaryumlarında aşağı regüle edilirken, protein seviyeleri SIRT 1 ve p-NF-kB'nin redoks dengesindeki bozukluk nedeniyle arttığı gösterilmiştir. Tüm bunlar melatoninin, ovaryum yaşlanmasını geciktirebileceğini düşündürmektedir. MT1/AMPK yolağı doğurganlığı artırır (Barberino ve ark., 2017; Zhang ve ark., 2019).

Oosit olgunlaşması, çok faktörlü düzenlenmiş bir süreçtir ve her zaman kadın üreme gelişimi araştırmalarında odak noktası olmuştur. Oositlerin döllenme yeteneğine sahip, olgun yumurtalara dönüşmesi bir süreçle gerçekleşir. Oositler ilk olarak, mayoz bölünmeye girerler ve embriyonik dönemin ilk mayoz evresinde bloke edilirler. İkinci olarak; folikül aktive olduktan sonra, oosit büyür. Üçüncü olarak, oosit tam boyutuna ulaştığında mayoz bölünme geçirir, yumurtlamadan önce ve sonra toparlanma ve yeniden arrest dönemi geçirir ve döllenerek bir zigot oluşur. Primordiyal foliküller, ilk mayoz bölünmenin profazında bloke olur ve primer oosit oluşur.

Oosit belirli bir boyuta ulaştığında, mayoz bölünmeyi yeniden gerçekleştirme yeteneği kazanır. Bu dönemde; oosit büyük bir çekirdeğe sahiptir, oldukça gevşek kromatin ve germinal vezikül (GV) olarak adlandırılan tam nükleer membranla karakterizedir. Tamamen büyümüş oositler kontrolden çıkarsa, foliküllerinde germinal vezikül bozulması (GVBD) olarak adlandırılan, spontan mayotik iyileşme meydana gelebilir. GVBD'nin ortaya çıkmasından sonra oosit ilk mayozu tamamlar, homolog kromozomlar ayrılır ve ardından ve ardından ovulasyon. Daha sonra iğ tekrar toplanır ve oosit döllenmeye kadar mayozun ikinci metafazına girer (Eppig ve ark., 2001; He ve ark., 2021; Pan ve ark., 2019; Sole ve ark., 2010; Sun ve ark., 2009).

Melatoninin, oosit olgunlaşmasını desteklediğini gösteren birçok çalışma bulunmasına rağmen mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Bununla birlikte

melatoninin, reaktif oksijen türlerini azalttığı ve doğrudan antioksidan işleve sahip olması nedeniyle, oositlerin olgunlaşması ve embriyo gelişimi için önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir (Cajas ve ark., 2020; Lim ve ark., 2011; Yang ve ark., 2020; Zubaidi ve ark., 2021). Başka bir olasılık; melatoninin bazı hücreyel sinyal yollarındaki düzenleyici etkisi, oositlerin maturasyonunda pozitif etkiye sahiptir. Melatonin, MT2 yoluyla cAMP (siklik adenozin monofosfat)'ın hücre içi seviyesini azaltabilir ve luteinizan hormon üretimini teşvik eder. Melatoninin oosit üzerindeki etkisi; aynı zamanda mitokondriyal fonksiyon, antioksidatif enzimler, apoptoz, kumulus hücre genişlemesi, oosit olgunlaşma faktörleri, DNA metilasyonu ve histon asetilasyonu ile ilgili olabilir (Fang ve ark., 2018; Tian ve ark., 2017).

Araştırmacılar, 10 günlük farelere ömür boyu melatonin verdiklerinde bunun ergenliğe ulaşmayı ve üreme sisteminin yaşlanmasını geciktirdiğini, ancak primordiyal folikül havuzu üzerinde hiçbir etkisi olmadığını bildirmişlerdir (Meredith ve ark., 2000). Başka bir çalışma, 2-3 aylık farelere 12 ay boyunca ağızdan melatonin vermenin, farelerde toplam folikül sayısını ve oosit sayısını ve kalitesini artırarak, telomer uzunluğunu uzattığını, doğurganlığını arttırdığını ve ovaryum yaşlanmasını önemli ölçüde geciktirebileceğini gösterdi. Bir çalışmada Yaşlı farelere 2 ay boyunca melatonin verdiklerinde ovaryumlarında ROS oluşumunun azaldığı (Song ve ark.,2016). Ovaryum hacmini artırdığı, östrus döngüsünü iyileştirdiği ve 13 aylık sıçanın (orta yaşlı) östrojen salgısını önemli ölçüde koruyabildiğini göstermiştir (Fernandez ve ark.,2013). Bu çalışma aynı zamanda melatoninin orta yaşlı ve yaşlı sıçanların üreme ömrünü uzatabildiğini de göstermiştir. Klinik bir çalışmada, altı ay boyunca melatonin tedavisi verilen, 42-62 yaşlarındaki perimenopozal ve postmenopozal kadınlarda tedaviden sonra serum LH seviyeleri önemli ölçüde daha yüksek olduğu ve hipofiz ve tiroid fonksiyonları normale döndüğü belirlendi (Bellipanni ve ark., 2001). Son olarak, son çalışmalar melatoninin primordiyal folikül havuz boyutunu artırabildiğini, antioksidan kapasiteyi artırarak, telomeraz aktivitesini koruyarak, SIRT1 ekspresyonunu ve ribozomal fonksiyonu uyararak farelerde ovaryum yaşlanmasını geciktirebildiğini göstermiştir (Tamura ve ark., 2017). Bu sonuçlar melatoninin ovaryum döngüsünün iyileşmesini destekleyebileceğini ve yaşlı kadınlarda doğurganlığı iyileştirebileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda erişkin dönem farelerde, melatonin uygulan gruptaki folikül sayısının, kontrol gruplarıyla farklı



olmadığını saptadık. Bununla birlikte yaşlı gruplarda, kontrol grubuna oranla melatonin verilen grupta folikül sayısında artış saptandı.

Ovaryum, sadece kadınların ikincil cinsel özelliklerini desteklemek ve sürdürmek için seks hormonları salgılamakla kalmaz, aynı zamanda gamet üretimi ve üremeye ilgilidir. Ovaryumlar, hipotalamus ve hipofiz tarafından doğrudan kontrol edilerek karşılıklı kısıtlayıcı bir yapı oluşturur. Hipotalamik-hipofiz-yumurtalık eksenini; uterus, vajina, fallop tüpleri ve ovaryumların fizyolojik döngülerindeki değişiklikleri düzenlemek için seks hormonları salgılar.

Ovaryum fonksiyonları, siklik hipofiz gonadotropik hormonları (esas olarak folikül uyarıcı hormon (FSH) ve luteinizan hormon (LH) tarafından kontrol edilir. Bunlar da hipotalamik peptid gonadotropin salgılatıcı hormon tarafından uyarılarak, aktivin ve inhibin gibi diğer ovaryan faktörleri tarafından modüle edilir. FSH esas olarak; foliküller büyüme, hücre proliferasyonu ve östrojen üretiminde (aromataz aktivitesi) rol oynarken, LH; androjen biyosentezini, oositlerin son olgunlaşmasını, ovulasyonu ve ovule foliküllerin korpus luteuma (CL) terminal farklılaşmasını indükler (Bhartiya ve ark., 2012). İşlevlerini yerine getirmek için FSH ve LH, folikülogenez ile oogenezin sürdürülmesi amacıyla, gerekli olan çok sayıda aşağı akışlı intra ovaryan yol basamaklarını tetikler. Literatürde açıklanan kanıtların birikmesi, fosfatidilinositol 3-kinaz (PI3K) /PTEN/AKT ve TSC/mTOR sinyal yollarının, primordiyal foliküllerin uyku hali ve aktivasyonu, oosit sağ kalımı ve aktivasyonu ve granüloza hücresi (GH) proliferasyonu ve farklılaşması dahil olmak üzere ovaryum fonksiyonunun, kritik düzenleyicileri olduğunu göstermiştir. (Adhikari ve ark., 2010; 2012).

PTEN/ PI3K/AKT yolu; hücre çoğalması, hayatta kalma, büyüme, hareketlilik, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi ve metabolizma dahil olmak üzere birçok normal hücre sürecin, birden fazla aşağı akış hedefi aracılığıyla önemli bir düzenleyicisidir. P85 düzenleyici alt birimi ve p110 katalitik alt biriminden oluşan bir heterodimer olan PI3K'nın aktivasyonu, büyüme faktörü reseptör tirozin kinazlarına (RTK'lar), G proteinine bağlı reseptörlere (GPCR'ler), küçük GTPaz Ras'a yanıt olarak veya steroid hormonlarının (SH'ler) doğrudan etkileşim veya adaptör moleküller yoluyla nongenomik etkileri yoluyla gerçekleşebilir. PI3K'yı aktive etmek için çeşitli RTK'lar önerilmiş olsa da KIT reseptörü, en yaygın kabul gören adaydır (Thomas ve Vanderhyden, 2006). KIT, PI3K'nın p85 düzenleyici alt birimi üzerindeki bir SH2 alanı ile doğrudan etkileşim yoluyla PI3K'yı aktive eder.

Membranda, PI3K fosfatidilinositol-4,5-bisfosfatın (PIP2) fosforilasyonunu katalize eder ve onu fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfata (PIP3) dönüştürür, bu da plekstrin homoloji alanlarına sahip aşağı akış moleküllerini, özellikle de serin-treonin kinazlar Akt (protein kinaz B olarak da bilinir) ve fosfatidilinositide bağımlı kinaz 1'i (PDK1) membrana toplar. Fosfataz ve tensin homologu (PTEN), PI3K'nın negatif düzenleyicisidir ve PIP3'ü tekrar PIP2'ye dönüştürür. PDK1, Akt'ı fosforile eder ve aktive eder, bu da bir dizi aşağı akış hedefini düzenler. Akt, BAX, BAD, forkhead ve p53 (TRP53) gibi proapoptotik proteinleri inhibe ederek ve BCL2 gibi prosurvival proteinleri aktive ederek, hücre sağkalımını destekler (Brown ve ark., 2010, McLaughlin ve ark., 2014). Hücre döngüsü ilerlemesi, siklin D1 ve Myc'nin dolaylı stabilizasyonu yoluyla AKT tarafından düzenlenir. AKT ayrıca tüberoz skleroz 1 veya hamartin (TSC1) ve tüberoz skleroz 2 veya tüberinden (TSC2) oluşan heterotrimerik kompleksin inhibisyonu yoluyla, rapamisinini memeli hedefini (mTOR) aktive ederek, protein sentezini ve hücre büyümesini uyarır (Manning ve Cantley, 2007; Vadlakonda ve ark., 2013). Fosfoinozotid-3-kinaz (PI3K) enzimi, hücre gelişimi ve hayatta kalması için gereklidir. Bu molekül membran PI'sini ikinci haberci lipid (PIP3) olan PI-3,4,5-trifosfata dönüştürür. PIP3 membrana bağlanır ve fosfatidilinositol bağımlı kinaz 1 (PDK1) ve protein kinaz B'yi (AKT) fosforile eder ve aktifleştirir. (Feng ve ark., 2014). Onuncu kromozomda silinmiş fosfataz ve tensin homologunun (PTEN) PIP3'ü defosforile ettiği, böylece PI3K/AKT yolunu inhibe ettiği ve biyolojik süreci hafiflettiği gösterilmiştir (Hao ve ark., 2011, Moon ve ark., 2013). PI3K/AKT sinyal yolunun, öncelikle ovaryum granüloza hücrelerini (GH) etkileyebileceği yaygın olarak bildirilmiştir. Ovaryum GH'lerinde, PI3K katalitik alt birimi p110 proteinin, hem folikül uyarıcı hormon (FSH) hem de östradiol (E2) ile uyarılan foliküler gelişim için, PI3K yolunun önemli bir bileşeni olduğu keşfedilmiştir (Li ve ark., 2013).

PI3K/AKT sinyal yolağının, ovaryan folikül gelişiminde rol oynadığı yaygın olarak bildirilmiştir (Li ve ark., 2017). AKT'nin proliferasyonu artırma faaliyetlerine, hücre döngüsü düzenleyicileri siklin D1 ve siklin B1 aracılık eder (Liu ve ark., 2020; Jiang ve ark., 2021). PI3K/AKT sinyal yolunun aşağı akış faktörleri olarak, antiapoptotik gen BCL2 ve proapoptotik gen Bax, foliküler gelişim sırasında granüloza hücrelerinin apoptozunun düzenlenmesinde önemli roller oynadığı görülmüştür (Gong ve ark., 2020; Hu ve ark., 2004; John ve ark., 2009).

PI3K/AKT yolağının iyi bilinen bir negatif düzenleyicisi olan PTEN, bir tümör baskılayıcı gen olarak defalarca araştırılmıştır. PTEN'in PKOS'daki önemi son yıllarda giderek daha fazla ortaya çıkmaktadır. GH'lerdeki PTEN seviyelerinin, PKOS hastalarında daha yüksek olduğu ve foliküler sıvıdaki insülin konsantrasyonları ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Iwase ve ark., 2009). Primordiyal folikülde PTEN'in başlangıç, gelişim, apoptoz ve atrezide rolü vardır (Ouyang ve ark., 2013).

Çalışmamızda; erişkin ovaryum dokularında kontrol ve melatonin uygulanan grupta PI3K ve AKT ekspresyonu pozitif olarak izlenmiştir. Etil alkol verilen grupta ise ekspresyonun negatif olduğu dikkati çekti. Kabul edilen genel kanılar, etil alkol tüketiminin kadınlarda üreme sorunlarına sebep olabileceğini göstermektedir. Kronik olarak alkole maruz bırakılan sıçanlarla yapılmış bir çalışmada; ovaryum dokuları histokimyasal olarak incelenmiş ve granüloza hücre seviyelerinde değişiklikler, zona pellusidanın ve korona radiatanın bozulduğu bazı foliküllerin tamamen kaybolduğu görülmüştür. Dış perinükleer aralığın yoğun dilatasyona uğradığı tespit edilmiş ve kronik alkolün, oksidatif stresi arttırarak, ovaryum dokusunda hücre hasara sebep olduğu organel bazlı olarak tespit edilmiştir (Faut ve ark., 2009). Çalışmamızda, paralel olarak bizde toz haldeki melatoninin çözücüsü olarak kullandığımız etil alkolün uygulandığı sham gruplarında, kontrol gruplarına kıyasla erişkin ovaryum dokularında atretik haldeki foliküllerin sayısında artış olduğunu gözlemledik. Yaşlı deneklerde ise etil alkolün, dokuyu tamamen bozduğu izlendi. Aynı zamanda alkol uygulanan gruplarda; PI3K/AKT yolağının inhibe olduğunu ve apoptoz ve otofajinin oluştuğunu düşünmekteyiz. Yaşlı gruplarda ise PI3K ve AKT kontrol ve sham grubunda negatifken, melatonin uygulanan grupta pozitif. Yaşa bağlı olarak folikülogenezin bitmesine bağlı olarak negatifleşen PI3K'nın, melatonin uygulaması ile arttığı izlenmiştir. Uzun dönem melatonin uygulamasının, ovaryan yaşlanmayı geciktirdiği bilinmektedir. Melatonin bu işlevini, PI3K/AKT sinyal yolağı üzerinden gerçekleştiriyor olabilir. Kemoterapetik ilaçlarla yapılan çalışmalarda, kemoterapiden sonra PI3K/AKT yolağının inhibe olduğu, melatonin uygulamasından sonra ise aktifleştiği gösterilmiştir (Al-Shahat ve ark.,2022).

## 6. SONUÇ

Çalışmamızda yaşlı deneklerde; melatonin uygulanan grupta, folikül sayısının arttığı dikkati çekmektedir. Bu artışta melatoninin, yaşlılıkla artan ovaryum içi oksidatif stresi azaltması ve apoptozu engellemesi olabilir. PI3K/ AKT yolağı da buna bağlı olarak artmış olabilir. Ancak melatoninin, yaşlılıkta etkisini daha iyi anlayabilmek için uzun süreli uygulamalara ve ileri analizlere gereksinim vardır.

## 7. KAYNAKÇA

- Adhikari D, Gorre N, Risal S, Zhao Z, Zhang H, Shen Y and Liu K. (2012) The safe use of a PTEN inhibitor for the activation of dormant mouse primordial follicles and generation of fertilizable eggs. *PLoS ONE* 7 e39034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039034>
- Adhikari D, Zheng W, Shen Y, Gorre N, Hamalainen T, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Lan Z-H and Liu K. (2010). Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. *Human Molecular Genetics* 19 397–410. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp483>
- Akdeniz, D., Tunçer, Ş. B., and Yazıcı, H. (2018). Relationship Between PTEN Gene Pathway and Breast Cancer. *Journal of Ankara University Faculty of Medicine*, 71(2), 105–110. <https://doi.org/10.4274/atfm.83997>
- Akıncı, E., and Orhan, F. Ö. (2016). Sirkadiyen Ritim Uyku Bozuklukları. *Psikiyatride Guncel Yaklasimler - Current Approaches in Psychiatry*, 8(2), 179-182. <https://doi.org/10.18863/pgy.81775>
- Alviggi, C., Humaidan, P., Howles, C. M., Tredway, D., and Hillier, S. G. (2009). Biological versus chronological ovarian age: Implications for assisted reproductive technology. In *Reproductive Biology and Endocrinology* (Vol. 7, p. 101). <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-101>
- Al-Zubaidi, U., Adhikari, D., Cinar, O., Zhang, Q. H., Yuen, W. S., Murphy, M. P., ... & Carroll, J. (2021). Mitochondria-targeted therapeutics, MitoQ and BGP-15, reverse aging-associated meiotic spindle defects in mouse and human oocytes. *Human Reproduction*, 36(3), 771-784. <https://doi.org/10.1093/humrep/deaa300>
- Amanak, K., Karaöz, B., and Sevil, Ü. (2014). Modern Yaşamın İnfertilite Üzerine Etkisi. *TAF Preventive Medicine Bulletin*, 13(4).
- Amanvermez, R., & Tosun, M. (2016). An update on ovarian aging and ovarian reserve tests. *International journal of fertility & sterility*, 9(4), 411. <https://doi.org/10.22074/ijfs.2015.4591>
- Atasoy, N. (2019). Melatonin ve Antioksidan Etkileri. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 9(3), 196–201. <https://doi.org/10.33631/duzcesbed.492547>

- Atasoy, Ö. B. (2017). Physiological effects of melatonin hormone. *Istanbul Bilim University Florence Nightingale Journal of Medicine*, 3(1), 52–62. <https://doi.org/10.5606/fng.btd.2017.011>
- Ayris, S., Çenesiz, M., & Çenesiz, S. (2017). Melatonin, Etkileri ve Kullanım Alanları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1), 7-12. <http://vetkontrol.tarim.gov.tr/merkez>
- Barberino, R. S., Menezes, V. G., Ribeiro, A. E., Palheta Jr, R. C., Jiang, X., Smitz, J. E., & Matos, M. H. T. (2017). Melatonin protects against cisplatin-induced ovarian damage in mice via the MT1 receptor and antioxidant activity. *Biology of reproduction*, 96(6), 1244-1255. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox053>.
- Bellipanni, G., Bianchi, P., Pierpaoli, W., Bulian, D., & Ilyia, E. (2001). Effects of melatonin in perimenopausal and menopausal women: a randomized and placebo controlled study. *Experimental gerontology*, 36(2), 297-310.
- Belmonte, J. Qu, F. Tang, G.H. Liu. (2020). Single-cell transcriptomic atlas of primate ovarian aging, e19, *Cell* 180 (3) 585–600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.01.009>.
- Bhartiya D, Sriraman K, Gunjal P and Modak H. (2012). Gonadotropin treatment augments postnatal oogenesis and primordial follicle assembly in adult mouse ovaries? *Journal of Ovarian Research* 5 32. <https://doi:10.1186/1757-2215-5-32>
- Brent L. J., Franks, D. W., Foster, E. A., Balcomb, K. C., Cant, M. A., and Croft, D. P. (2015). Ecological knowledge, leadership, and the evolution of menopause in killer whales. *Current biology*, 25(6), 746-750.
- Brown C, LaRocca J, Pietruska J, Ota M, Anderson L, Smith SD, Weston P, Rasoulpour T and Hixon ML. (2010). Subfertility caused by altered follicular development and oocyte growth in female mice lacking PKBa/Akt1. *Biology of Reproduction* 82 246–256. <https://doi:10.1095/biolreprod.109>.
- Brzezinski, A., Seibel, M. M., Lynch, H. J., Deng, M. H., & Wurtman, R. J. (1987). Melatonin in human preovulatory follicular fluid. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 64(4), 865-867. <https://doi.org/10.1210/jcem-64-4-865>.
- Cajas, Y. N., Cañón-Beltrán, K., Ladrón de Guevara, M., Millán de la Blanca, M. G., Ramos-Ibeas, P., Gutiérrez-Adán, A., ... & González, E. M. (2020). Antioxidant nobiletin enhances oocyte maturation and subsequent embryo development and quality. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5340. <https://doi.org/10.3390/ijms21155340>.
- Can, M. İ., ve Aslan, A. (2014). Yaşlanmanın moleküler temelleri. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Fen Bilimleri Dergisi*, 30(2), 107-112.
- Carnero, A., and Paramio, J. M. (2014). The PTEN/PI3K/AKT Pathway in vivo, cancer mouse models. *Frontiers in Oncology*, 4(SEP). <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00252>

- Chaube, S. K., Shrivastav, T. G., Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A., & Pandey, A. K. (2014). Neem (*Azadirachta indica* L.) leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals. *SpringerPlus*, 3(1), 1-5. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-464>.
- Crow, J. F. (n.d.). Advantages of Sexual Reproduction.
- Çağlar, K., Tezi, Y., Biyoteknoloji, T., ve Dalı, A. (n.d.). fare embriyolarının dondurulmasında melatoninin embriyo canlılığı ve gelişmesi üzerindeki etkilerinin incelenmesi.
- Çam, A., ve Erdoğan, M. F. (2003). Melatonin.
- De Felici, M., and Klinger, F. G. (2021). Pi3k/pten/akt signaling pathways in germ cell development and their involvement in germ cell tumors and ovarian dysfunctions. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 18). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22189838>
- Demir, M. (2013). Over rezerv tayininde en iyi belirteç: anti-mülleriyen hormon (AMH). *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 11(2), 79-85.
- Dewailly, D., Andersen, C. Y., Balen, A., Broekmans, F., Dilaver, N., Fanchin, R., Griesinger, G., Kelsey, T. W., La marca, A., Lambalk, C., Mason, H., Nelson, S. M., Visser, J. A., Wallace, W. H., and Anderson, R. A. (2014). The physiology and clinical utility of anti-Müllerian hormone in women. *Human Reproduction Update*, 20(3), 370–385. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmt062>
- Ding, Y., Jiang, Z., Xia, B., Zhang, L., Zhang, C., and Leng, J. (2019). Mitochondriatargeted antioxidant therapy for an animal model of PCOS-IR. *Int. J. Mol. Med.* 43, 316–324. <https://doi: 10.3892/ijmm.2018.3977>
- Dubocovich, M. L., and Markowska, M. (2005). Functional MT 1 and MT 2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27, 101-110.
- Durdağ, G. D., ve Berker, B. (2008). Over Rezervinin Değerlendirilmesi. *Journal of Clinical Obstetrics and Gynecology*, 18(4), 254-265.
- E Fernandez, B., Díaz, E., Fernández, C., Núñez, P., & Díaz, B. (2013). Ovarian aging: melatonin regulation of the cytometric and endocrine evolutive pattern. *Current Aging Science*, 6(1), 1-7.
- Edrey, Y. H., & Salmon, A. B. (2014). Revisiting an age-old question regarding oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 71, 368-378. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.038>.
- Eppig, J. J. (2001). Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, 122(6), 829-838. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220829>.
- Eroschenko V. P., Di Fiore M. S. DiFiore's atlas of histology with functional correlations: Lippincott Williams and Wilkins, 2013, s. 505-534
- Fang, Y., Deng, S., Zhang, J., Liu, H., Li, Y., Zhang, X., & Liu, Y. (2018). Melatonin-mediated development of ovine cumulus cells, perhaps by regulation of DNA methylation. *Molecules*, 23(2), 494. <https://doi.org/10.3390/molecules23020494>.

- Faut, M., Rodríguez de Castro, C., Bietto, F. M., Castro, J. A., & Castro, G. D. (2009). Metabolism of ethanol to acetaldehyde and increased susceptibility to oxidative stress could play a role in the ovarian tissue cell injury promoted by alcohol drinking. *Toxicology and industrial health*, 25(8), 525-538.
- Feng, X. J., Liu, S. X., Wu, C., Kang, P. P., Liu, Q. J., Hao, J., et al. (2014). The PTEN/PI3K/Akt signaling pathway mediates HMGB1-induced cell proliferation by regulating the NF-kappa B/Cyclin D1 pathway in Mouse mesangial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 306, C1119–C1128. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00385.2013>
- Georgescu, M. M. (2010). Pten tumor suppressor network in PI3K-Akt pathway control. In *Genes and Cancer* (Vol. 1, Issue 12, pp. 1170–1177). <https://doi.org/10.1177/1947601911407325>
- Gong, Y., Luo, S., Fan, P., Zhu, H., Li, Y., and Huang, W. (2020). Growth hormone activates PI3K/Akt signaling and inhibits ROS accumulation and apoptosis in granulosa cells of patients with polycystic ovary syndrome. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 18:121. <https://doi.org/10.1186/s12958-020-00677-x>
- Gümüşova, S., ve Memiş, Y. S. (2014). Bazı Viral Enfeksiyonlarda Melatoninin Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 9(1), 50-54.
- Günhan, R. S. (2021). Melatonin and its importance.343-345
- Hao, J., Liu, S., Zhao, S., Liu, Q., Lv, X., Chen, H., et al. (2011). PI3K/Akt pathway mediates high glucose-induced lipogenesis and extracellular matrix accumulation in HKC cells through regulation of SREBP-1 and TGF-b1. *Histochem. Cell Biol.* 135, 173–181. <https://doi.org/10.1007/s00418-011-0777-3>
- Hardeland, R., Pandi-Perumal, S. R., and Cardinali, D. P. (2006). Melatonin. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 38, Issue 3, pp. 313–316). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2005.08.020>
- He, M., Zhang, T., Yang, Y., & Wang, C. (2021). Mechanisms of oocyte maturation and related epigenetic regulation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 654028. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.654028>.
- Hemmings, B. A., and Restuccia, D. F. (2012). Pi3k-pkb/akt pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4(9), a011189.
- Hoffmann, K. (1972). Melatonin inhibits photoperiodically induced testes development in a dwarf hamster. *Naturwissenschaften*, 59(5), 218-219. <https://doi.org/10.1007/BF00595517>.
- Hollander, M. C., Blumenthal, G. M., and Dennis, P. A. (2011). PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 11, Issue 4, pp. 289–301). <https://doi.org/10.1038/nrc3037>



- Huang, M. L. H., Chiang, S., Kalinowski, D. S., Bae, D. H., Sahni, S., & Richardson, D. R. (2019). The role of the antioxidant response in mitochondrial dysfunction in degenerative diseases: cross-talk between antioxidant defense, autophagy, and apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/6392763>.
- Huang, Y., Hu, C., Ye, H., Luo, R., Fu, X., Li, X., ... & Zheng, Y. (2019). Inflamm-aging: a new mechanism affecting premature ovarian insufficiency. *Journal of immunology research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/8069898>.
- Iwase, A., Goto, M., Harata, T., Takigawa, S., Nakahara, T., Suzuki, K., et al. (2009). Insulin attenuates the insulin-like growth factor-I (IGF-I)-Akt pathway, not IGF-I-extracellularly regulated kinase pathway, in luteinized granulosa cells with an increase in PTEN. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 94, 2184–2191.
- İsmail Can, M., Aslan, A., Üniversitesi, F., Fakültesi, F., Bölümü, B., Biyoloji, M., and Dalı, A. (n.d.). Yaşlanmanın moleküler temelleri. In *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* (Vol. 30, Issue 2).
- Jang, H., Lee, O. H., Lee, Y., Yoon, H., Chang, E. M., Park, M., ...and Choi, Y. (2016). Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO 3a pathway activation in the mouse ovary. *Journal of pineal research*, 60(3), 336-347.
- Jiang, X., Zhi, X., Zhang, P., Zhou, Z., Ye, J., Gao, Y., et al. (2021). Isochromanoidenines suppress triple-negative breast cancer cell proliferation partially via inhibiting Akt activation. *Int. J. Biol. Sci.* 17,986–994. <https://doi:10.7150/ijbs.48170>
- Jiang, Y., Shi, H., Liu, Y., Zhao, S., and Zhao, H. (2021). Applications of Melatonin in Female Reproduction in the Context of Oxidative Stress. In *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (Vol. 2021). Hindawi Limited. <https://doi.org/10.1155/2021/6668365>
- John, G. B., Shidler, M. J., Besmer, P., and Castrillon, D. H. (2009). Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. *Dev. Biol.* 331, 292–299. <https://doi:10.1016/j.ydbio.2009.05.546>
- Johnson, L. N. (2009). The regulation of protein phosphorylation. *Biochemical Society Transactions*, 37(4), 627–641. <https://doi.org/10.1042/BST0370627>
- Junqueira L. Carneiro J (Çeviri: Y. Aytekin, S. Solakoğlu). *Temel Histoloji*, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, 332-344, 2006; s. 449-468.
- Kasapoğlu, I., & Seli, E. (2020). Mitochondrial dysfunction and ovarian aging. *Endocrinology*, 161(2), bqa001. <https://doi.org/10.1210/endocr/bqa001>.
- Kaya, C., Çalışkan, Y., and Yönden, Z. (2012). Apoptozis. *The Medical Journal of Mustafa Kemal University*, 3(11), 26-37.

- Kleszczyński, K., and Böhm, M. (2020). Can melatonin and its metabolites boost the efficacy of targeted therapy in patients with advanced melanoma? *Experimental Dermatology*, 29(9), 860–863. <https://doi.org/10.1111/exd.14144>
- Kus, I., and Sarsılmaz, M. (2002). The morphological structure and functions of the pineal gland. *T Klin J Med Sci*, 22, 221-226.
- Kuyucu, Y., ve Özgül, T. A. P. (2009). Oosit Olgunlaşma Süreci ve Düzenleyici Faktörler. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 18(4), 227-240.
- Küçüköner, M., and Isikdogan, A. (2013). Kanser tedavisinde mTOR sinyal yolu ve mTOR inhibitörleri/mTOR signaling pathway and mTOR inhibitors in the treatment of cancer. *Dicle Tıp Dergisi*, 40(1), 156.
- Küpel, S. (2022). Kanserde Hedefe Yönelik Tedavi: PI3K/Akt/mTOR İnhibitörleri. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 31(1), 15-20.
- Lerner, A. b., Case, J. d., and Takahashi, y. (1960). Isolation of melatonin and 5-methoxyindole-3-acetic acid from bovine pineal glands. *The Journal of Biological Chemistry*, 235, 1992–1997. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)69351-2](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)69351-2)
- Li, Q., He, H., Zhang, Y. L., Li, X. M., Guo, X., Huo, R., et al. (2013). Phosphoinositide 3-kinase p110d mediates estrogen- and FSH-stimulated ovarian follicle growth. *Mol. Endocrinol.* 27, 1468–1482. <https://doi: 10.1210/me.2013- 1082>
- Lim, J., & Luderer, U. (2011). Oxidative damage increases and antioxidant gene expression decreases with aging in the mouse ovary. *Biology of reproduction*, 84(4), 775-782. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088583>.
- Liu, G., Liu, S., Xing, G., and Wang, F. (2020). LncRNA PVT1/MicroRNA-17- 5p/PTEN Axis regulates secretion of E2 and P4, proliferation, and apoptosis of ovarian granulosa cells in PCOS. *Mol. Ther. Nucl. Acids* 20, 205–216. <https://doi: 10.1016/j.omtn.2020.02.007>
- Magnus, M. C., Wilcox, A. J., Morken, N. H., Weinberg, C. R., & Håberg, S. E. (2019). Role of maternal age and pregnancy history in risk of miscarriage: prospective register based study. *bmj*, 364. M.J. Eijkemans, F. Van Poppel, D.F. Habbema, K.R. Smith, H. Leridon, E.R. te Velde. (2014). Too old to have children? Lessons from natural fertility populations, *Hum. Reprod.* 29 (6) 1304–1312.
- Manning, B. D., & Toker, A. (2017). AKT/PKB signaling: navigating the network. *Cell*, 169(3), 381-405. <https://doi:10.1016/j.cell.2007.06.009>
- McLaughlin M, Kinnell HL, Anderson RA and Telfer EE (2014). Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. *Molecular Human Reproduction* 20
- Meredith S, Jackson K, Dudenhoefter G, Graham L, Epple J. Long-term supplementation with melatonin delays reproductive senescence in rats, without an effect on number of primordial follicles. *Exp Gerontol.* 2000; 35:343-52

- Miao, Y., Cui, Z., Gao, Q., Rui, R., & Xiong, B. (2020). Nicotinamide mononucleotide supplementation reverses the declining quality of maternally aged oocytes. *Cell reports*, 32(5).
- Mollaoğlu, H., ve Fehmi Özgüner, M. (2005). Yaşlanma sürecinde melatoninin rolü. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, 12(3), 52-56.
- Moon, S. H., Kim, D. K., Cha, Y., Jeon, I., Song, J., and Park, K. S. (2013). PI3K/Akt and Stat3 signaling regulated by PTEN control of the cancer stem cell population, proliferation and senescence in a glioblastoma cell line. *Int. J. Oncol.* 42, 921–928.  
[https://doi: 10.3892/ijo.2013.1765](https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1765)
- Moore K. L., Persaud T. V. N., Torchia M. G. *Before We are Born E-Book: Essentials of Embryology and Birth Defects with Student Consult Online Access: Elsevier Health Sciences.* 2015, s 12-37
- Nakamura, Y., Tamura, H., Takayama, H., & Kato, H. (2003). Increased endogenous level of melatonin in preovulatory human follicles does not directly influence progesterone production. *Fertility and sterility*, 80(4), 1012-1016.  
[https://doi.org/ 10.1016/s0015-0282\(03\)01008-2](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(03)01008-2).
- Ouyang, J.-X., Luo, T., Sun, H.-Y., Huang, J., Tang, D.-F., Wu, L., et al. (2013). RNA interference mediated pten knock-down inhibit the formation of polycystic ovary. *Mol. Cell Biochem.* 380, 195–202.  
[https://doi: 10.1007/s11010-013-1673-z](https://doi.org/10.1007/s11010-013-1673-z)
- Öktem, Ö., ve Urman, B. (2011). Over hayat döngüsünü anlamak. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, 8(2), 71-82.
- Ölmez, E., Şahna, E., Ağkadir, M., ve Acet, A. (2000). Melatonin: Emeklilik Yaşı 80 Olur mu?
- Özçelik, F., Erdem, M., Bolu, A., ve Gülsün, M. (2013). Melatonin: Genel özellikleri ve psikiyatrik bozukluklardaki rolü. *Psikiyatride Güncel Yaklaşımlar*, 5(2), 179-203.
- Pan, B., & Li, J. (2019). The art of oocyte meiotic arrest regulation. *Reproductive biology and endocrinology*, 17(1), 1-12.  
<https://doi.org/10.1186/s12958-018-0445-8>.
- Pansky B. *Review of Medical Embryology.* Hampshire-UK: Macmiilon ; 1982. Sayfa 256-269.
- Pazarbaşı, A., Kasap, M., ve Kasap, H. (2011). Kanser Yolakları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 20(4), 187-229.
- Pineda-Pampliega, J., Herrera-Dueñas, A., Mulder, E., Aguirre, J. I., Höfle, U., & Verhulst, S. (2020). Antioxidant supplementation slows telomere shortening in free-living white stork chicks. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1918), 20191917.  
[https://doi.org/ 10.1098/rspb.2019.1917](https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1917).
- Polivka, J., and Janku, F. (2014). Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. In *Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 142, Issue 2, pp. 164–175). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.12.004>

- Prasad, K. N., Wu, M., & Bondy, S. C. (2017). Telomere shortening during aging: Attenuation by antioxidants and anti-inflammatory agents. *Mechanisms of ageing and development*, 164, 61-66. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.04.004>.
- Reddy, P., Adhikari, D., Zheng, W., Liang, S., Hämäläinen, T., Tohonen, V., Ogawa, W., Noda, T., Volarevic, S., Huhtaniemi, I., and Liu, K. (2009). PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Human Molecular Genetics*, 18(15), 2813–2824. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp217>
- Regan, S. L., Knight, P. G., Yovich, J. L., Leung, Y., Arfuso, F., & Dharmarajan, A. (2018). Granulosa cell apoptosis in the ovarian follicle—a changing view. *Frontiers in endocrinology*, 9, 61. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00061>.
- Ross M. H., Pawlina W. (2011) *Histology a text and atlas 6th edition*. Lippincott Williams and Wilkins, a Wolters Kluwer business; s. 830-895
- Rönneberg, L., Kauppila, A., Leppäluoto, J., Martikainen, H., & Vakkuri, O. (1990). Circadian and seasonal variation in human preovulatory follicular fluid melatonin concentration. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 71(2), 493-496. <https://doi.org/10.1210/jcem-71-2-493>.
- Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*, Lippincott Williams and Wilkins (Wolters Kluwer), Baltimore, MD, USA, 2012, s. 313-326.
- Sasaki, H., Hamatani, T., Kamijo, S., Iwai, M., Kobanawa, M., Ogawa, S., ... & Tanaka, M. (2019). Impact of oxidative stress on age-associated decline in oocyte developmental competence. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 811.
- Seçkin İ, Ertürkoğlu AŞ, Taşyürekli M, Arda O, Alkan F, Oktar H. *Embriyoloji Ders Kitabı*. İstanbul, İstanbul Üniversitesi yayınları; 2008. Sayfa 229-233.
- Shen, M., Lin, F., Zhang, J., Tang, Y., Chen, W. K., and Liu, H. (2012). Involvement of the up-regulated FoxO1 expression in follicular granulosa cell apoptosis induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 287, 25727–25740. <https://doi:10.1074/jbc.M112.349902>
- Solc, P., Schultz, R. M., & Motlik, J. (2010). Prophase I arrest and progression to metaphase I in mouse oocytes: comparison of resumption of meiosis and recovery from G2-arrest in somatic cells. *Molecular human reproduction*, 16(9), 654-664. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq034>.
- Song C, Peng W, Yin S, Zhao J, Fu B, Zhang J, Mao T, Wu H, Zhang Y. Melatonin improves age-induced fertility decline and attenuates ovarian mitochondrial oxidative stress in mice. *Sci Rep.* 2016; 6:35165. <https://doi.org/10.1038/srep35165>
- Steven R. Bayer, Michael M. Alper, Alan S. Penzias (2008) *Boston IVF İnfertilite El Kitabı*. (2.Baskı) (Çev. Işık Ahmet Zeki, Vicdan Kubilay) İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.) 63-68

- Sun, Q. Y., Miao, Y. L., & Schatten, H. (2009). Towards a new understanding on the regulation of mammalian oocyte meiosis resumption. *Cell Cycle*, 8(17), 2741-2747.  
<https://doi.org/10.4161/cc.8.17.9471>.
- Şener, G. (2010). Karanlığın hormonu: melatonin. *Marmara Pharmaceutical Journal*, 14(3), 112-120.
- Tamura, H., Kawamoto, M., Sato, S., Tamura, I., Maekawa, R., Taketani, T., Aasada, H., Takaki, E., Nakai, A., Reiter, R. J., and Sugino, N. (2017). Long-term melatonin treatment delays ovarian aging. *Journal of Pineal Research*, 62(2).  
<https://doi.org/10.1111/jpi.12381>
- Tamura, H., Takasaki, A., Taketani, T., Tanabe, M., Kizuka, F., Lee, L., ... & Sugino, N. (2012). The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. *Journal of ovarian research*, 5(1), 1-9  
<https://doi.org/10.1186/1757-2215-5-5>.
- Thomas FH and Vanderhyden BC. (2006). Oocyte–granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reproductive Biology and Endocrinology* 4 19.  
<https://doi:10.1186/1477-7827-4-19>
- Tian, X., Wang, F., Zhang, L., He, C., Ji, P., Wang, J., ... & Liu, G. (2017). Beneficial effects of melatonin on the in vitro maturation of sheep oocytes and its relation to melatonin receptors. *International journal of molecular sciences*, 18(4), 834.  
<https://doi.org/10.3390/ijms18040834>.
- Vuranok, N. (2022). Hastalıkların Tedavisinde Umut Vadeden Yeni Hedef: FOXO Transkripsiyon Faktörleri. *Hipokrat Tıp Dergisi*, 2(1), 25-32.
- Wang, S., Zheng, Y., Li, J., Yu, Y., Zhang, W., Song, M., ... & Liu, G. H. (2020). Single-cell transcriptomic atlas of primate ovarian aging. *Cell*, 180(3), 585-600.
- Wurtman, R. J., Axelrod, J., & Potter, L. T. (1964). The uptake of H3-melatonin in endocrine and nervous tissues and the effects of constant light exposure. *Pituitary*, 3, 544.
- Yang, L., Chen, Y., Liu, Y., Xing, Y., Miao, C., Zhao, Y., ... & Zhang, Q. (2021). The role of oxidative stress and natural antioxidants in ovarian aging. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 617843.  
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.617843>.
- Yang, Q., Cong, L., Wang, Y., Luo, X., Li, H., Wang, H., ... & Sun, Y. (2020). Increasing ovarian NAD<sup>+</sup> levels improve mitochondrial functions and reverse ovarian aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 156, 1-10.
- Yeniçeri, H., Ürünsak, İ. F., Sucu, M., Çetin, C., Özsürmeli, M., and Khatib, G. (2017). Anti-müllerian hormonunun in vitro fertilizasyon hastalarında over rezervini belirlemedeki rolü. *Cukurova Medical Journal (Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi)*, 42(1), 19–19.  
<https://doi.org/10.17826/cutf.270412>
- Yokuş, B., ve Çakır, D. Ü. (2012). Kanser biyokimyası. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 7-18.

- Yöcel, S., Kaplanoğlu, G. T., Kaplanoğlu, I., Aral, B. S., ve Seymen, C. M. (2017). Kronik Cep Telefonu Radyasyonu ve Koruma Amaçlı Uygulanan Melatoninin Ovaryuma Etkisi. *Gazi Medical Journal*, 28(3), 184–190. <https://doi.org/10.12996/gmj.2017.55>
- Yücel, G. N., Kaplanoğlu, G. T., ve Seymen, C. M. (2018). Karanlığın Mucizesi: Melatonin ve ovaryum etkileşimi. *Dicle Tıp Dergisi*, 45(1), 85-92.
- Zhang, L., Zhang, Z., Wang, J., Lv, D., Zhu, T., Wang, F., ... & Liu, G. (2019). Melatonin regulates the activities of ovary and delays the fertility decline in female animals via MT1/AMPK pathway. *Journal of pineal research*, 66(3), e12550. <https://doi.org/10.1111/jpi.12550>.
- Zhang, L., Zhang, Z., Wang, J., Lv, D., Zhu, T., Wang, F., Tian, X., Yao, Y., Ji, P., and Liu, G. (2019). Melatonin regulates the activities of ovary and delays the fertility decline in female animals via MT1/AMPK pathway. *Journal of Pineal Research*, 66(3). <https://doi.org/10.1111/jpi.12550>
- Zhu, L., Yuan, H., Guo, C., Lu, Y., Deng, S., Yang, Y., et al. (2012). Zearalenone induces apoptosis and necrosis in porcine granulosa cells via a caspase-3- and caspase-9-dependent mitochondrial signaling pathway. *J. Cell Physiol.* 227, 1814–1820. <https://doi: 10.1002/jcp.22906>

## **EKLER**

**Ek-1. Etik kurul izin belgesi.**

Evrak Tarih ve Sayısı: 25.08.2021-E.93211



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-93211  
Konu : Başvurunuz Hk.

Sayın Prof. Dr. Gülçin METE

İlgi : 18/08/2021 tarihli dilekçeniz. *10.20.1.38*  
*36904*

"Yaşlı Sıçan Ovaryumunda Melatoninin PTEN/P13K/AKT Yolağına ve Embriyo Gelişimine Etkisi" (PAUHADYEK-2021/39) konulu çalışmanız 24.08.2021 tarih ve 2021/07 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup, *25.08.2021*

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanızın Hayvan Deneyleri Etiğı açısından uygun olduğuna ve 52 adet sıçan kullanılarak yapılmasına oy birliğı ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.



**Ek-2. Etik kurul izin belgesi.**

Evrak Tarih ve Sayısı: 11.10.2022-E.2/0621



T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleti Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-270621  
Konu : Başvurunuz Hk.

Sayın Prof. Dr. Gülçin METE

İlgi : 18/08/2021 tarihli dilekçeniz. *172.16.70.109*  
*198*  
*12.10.2022*

"Yaş Fare Ovaryumunda Melatoninin PTEN/P13K/AKT Yolağına ve Embriyo Gelişimine Etkisi" (PAUHADYEK-2021/39) konulu çalışmanız 24.08.2021 tarih ve 2021/07 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanızın Hayvan Deneyleti Etiğı açısından uygun olduğuna ve 52 adet fare kullanılarak yapılmasına oy birliğı ile karar verildi.


Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Gülçin METE  
Başkan



**Ek-3. Etik kurul izin belgesi.**

Evrak Tarih ve Sayısı: 29.08.2023-E.40/938

 T.C.  
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu

Sayı : E-60758568-020-402619 10.08.2023  
Konu : Başvurunuz hk.

Sayın Prof. Dr. Gülçin METE

İlgi : 14/07/2023 tarihli dilekçeniz. 10.201.466  
36904  
27.08.2023

"Yaşlı Fare Ovaryumunda Melatoninin PTEN/P13K/AKT Yolağına ve Embriyo Gelişimine Etkisi" (PAUHDEK-2021/39)" konulu çalışmanızda istenilen değişiklik talebiniz 27.07.2023 tarih ve 2023/05 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın adının "Yaşlı Fare Ovaryumunda Melatoninin PTEN/P13K/AKT Yolağına Etkisi" olarak değiştirilmesinin Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Sayın Prof. Dr. Gülçin METE Doç. Dr. Habip ATALAY  
Kurul Başkanı

İlgi : 14/07/2023 tarihli dilekçeniz. 10.201.466  
36904  
27.08.2023

"Yaşlı Fare Ovaryumunda Melatoninin PTEN/P13K/AKT Yolağına ve Embriyo Gelişimine Etkisi" (PAUHDEK-2021/39)" konulu çalışmanızda istenilen değişiklik talebiniz 27.07.2023 tarih ve 2023/05 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın adının "Yaşlı Fare Ovaryumunda Melatoninin PTEN/P13K/AKT Yolağına Etkisi" olarak değiştirilmesinin Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna oy birliği ile karar verildi.


Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Habip ATALAY  
Kurul Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.  
Belge Doğrulama Kodu :BSRZDV18SR Pin Kodu :80982 Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/pau-ebys>

Adres: Tıp Fakültesi Dekanlığı Kınıklı/Denizli  
Telefon:0 (025) 8 Faks:0 (258) 296 17 65  
e-Posta:hadek@pau.edu.tr Elektronik Ağ:http://www.pau.edu.tr  
Kep Adresi: paurektoriuk@hs01.kep.tr

Bilgi için: Selda ERKİŞİ  
Unvanı: Bilgisayar İşletmeni



**Ek-4.** Tez intihal raporu.



2024-01-04 10:13:08.0

**Benzerlik Raporu**

**ilay** adına yüklenen "**tez**" isimli eserin benzerlik testi yapılmıştır. Test sonucunda benzerlik oranı **%16** bulunmuştur.



Doküman Kodu : 700569\_1704352379525

Doküman Kodu ile bu dokümanın doğruluğu  
<https://app.intihal.net/kontrol.jsp> adresinden kontrol edilebilir.