



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLILAŞTIRILMIŞ KÖK HÜCRE UYGULAMALARININ OVER
HASARINDAKİ YERİ**

FATMA ÖZTÜRK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU**

Manisa, 2013



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**FARKLILAŞTIRILMIŞ KÖK HÜCRE UYGULAMALARININ OVER
HASARINDAKİ YERİ**

FATMA ÖZTÜRK

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
HİSTOLOJİ ve EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU (Tez Danışmanı)
Prof. Dr. Sevinç İNAN (Jüri Üyesi)
Doç. Dr. Tuncay VAROL (Jüri Üyesi)**

MANİSA-2013

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi Fatma ÖZTÜRK'ün Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı “**Farklılaştırılmış kök hücre uygulamalarının over hasarındaki yeri** ” başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretim Yönetmeliğini ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek **KABUL** kararı verilmiştir. 02/ 02/ 2014

Jüri Üyesi:

İmza

Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU (Tez Danışmanı)

Jüri Üyesi:

Prof. Dr. Sevinç İNAN

Jüri Üyesi:

Doç. Dr. Tuncay VAROL

**Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
.../.../2013 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.**

Prof.Dr. M. İbrahim TUĞLU

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Öncelikle Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne yüksek lisans tez projemi desteklediği için, Sağlık Bilimleri Enstitüsü ve Tıp Fakültesi Dekanlığı'na; Yüksek lisans eğitim süresince sevgi ve hoşgörüsüyle, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen, her zaman engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tez danışmanım değerli hocam Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU'ya

Engin bilgi, tecrübe ve deneyimlerini eğitimim boyunca paylaşmaktan çekinmeyen Prof. Dr. Seda VATANSEVER ve Prof Dr. Kemal ÖZBİLGİN, her zaman ilgi ve yardımlarını esirgemeyen bölüm başkanımız sayın Prof Dr. Sevinç İNAN' teşekkürü bir borç bilirim.

Tezimin laboratuvar işlemleri boyunca deney hayvanları cerrahi işlemleri sırasında yardım ve tecrübelerini esirgemeyen Celal Bayar Üniversitesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Yrd. Doç. Dr. Aslı GÖKER TAMAY'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında tecrübelerini benimle paylaşan ve destek veren arkadaşım Mahmud ÖZKUT'a, yardım ve desteğini esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji yüksek lisans öğrenimi gören, çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm yaşamım boyunca aklıma gelebilecek her alanda maddi ve manevi desteğini benden esirgemeyen kardeşlerime, doğduğum ilk günden bu güne arkamı toplamaktan, elimden tutmaktan yılmayan canımın canı Annem'e, yanımda olamasada varlığını bir nefes gibi yanımda her saniye hissettiğim ve beni hep koruduğuna inandığım Babam'a teşekkürü bir borç bilirim.

Önce sevgilim sonra eşim olan, kendimi bildim bileli yanımda olan, tezimi hazırladığım sırada her türlü eziyetime, taframa katlanan, tam yıldım derken beni tekrar tekrar ateşleyen herşeyim Korcan FIRAT'a sonsuz kez teşekkür ederim.

ÖNSÖZ

Kök hücreler, embriyonik dönemden başlayarak fetal ve doğum sonrası yaşamda doku ve organların gelişmeleri ile idamelerinde çok önemli rol oynarlar. Kök hücrelerinin kendini yenileme, farklılaşma ve canlı kaldıkça yaşamlarını sürdürebilme özellikleri, organizmada başka hiçbir hücrede bulunmayan özelliklerdir. Kök hücreler, aldıkları sinyale göre farklı hücre tipine dönüşebilme potansiyeline ve kendisini yenileyebilme gücüne sahiptirler ayrıca vücutta meydana gelen değişikliklere, ölüm ve hasar durumuna göre bu hücreler hangi hücre türüne ihtiyaç var ise o hücreye dönüşmektedirler. Son zamanlarda kök hücreler klinik olarak kullanıma uygun ürünler haline gelmekte olup over hasarı dahil olmak üzere birçok organın yeniden yapılanmasında, yara tamirinde ve rejenerasyon gerektiğinde değerlendirilebilecektir.

Ovaryumlar; pelvis boşluğunun yan duvarına dayalı, sağ ve solda olmak üzere iki adettir. Ovaryumların birbiri ile ilişkili iki işlevi vardır. Dişi cins hücrelerini üretirler (oogenezis) ve steroid hormonları (östrojen ve progesteron) salgırlar (steroidogenezis). Ovaryumlardan salgılanan steroidler, cins hücrelerinin gelişip olgunlaşmasını, sekonder cins organları ve meme bezlerinin gelişme ve büyümesini kontrol ederken gebeliğin kontrolünden de sorumludurlar. Ovaryumlar neslin devamı için mutlaka olması gereken organlar olup kök hücrenin bir ürün olarak kullanılabilmesi en önemli yerlerdir. Son zamanlarda gelişen teknoloji ve besinlerde yer alan mısır şurubu gibi zarar verici maddeler üremeyi engellemektedir. Bu sorun in vitro fertilizasyon ve üremeye yardımcı tedavi yöntemleri ile çözülmeye çalışılmakta ancak germ hücresinin yapılabilmesi hala en önemli sorun olarak çözüm beklemektedir. Yapılan çalışmalarda deneysel olarak somatik hücreden germ hücresi yapılması başarılmış olup sadece insanda gerçekleştirilmesi beklenmektedir.

Farklılaştırılmış kök hücrelerin overdeki davranışlarının araştırılması, ovaryum işlevinin ve fertilitenin daha iyi anlaşılmasına ve büyük oranda PCOS, preovarian yetmezlik ve kanser gibi hastalıkların nedenlerinin ve gelecekteki yeni tedavi yaklaşımlarının oluşmasına büyük katkı sağlayacaktır. Transplantasyon ile hasara uğramış dokunun yönlendirilmiş kök hücre ile tamiri oldukça umut vericidir. Bu çalışma, sıçan overlerinde aspirasyon biyopsisi ile oluşan travmatik etkiye karşı kök hücrelerin iyileştirici etkilerinin araştırılması ve over dışı kök hücrelerin over dokusu içindeki davranışlarını tanımlamak amacıyla gerçekleştirilecektir.

İÇİNDEKİLER

ÖZET

ABSTRACT

1.GİRİŞ

1.1GENEL BİLGİLER

1.1.a. Ovaryum embriyolojisi

1.1.b. Ovaryum anatomisi

1.1.b.1. Ovaryum'un tutunma yapıları

1.1.b.2.Ovaryumun damarlanması

1.1.b.3. Ovaryum'un Sinirleri

1.1.c. Ovaryum histolojisi

1.1.c.1. Epithelium ve Tunika albuginea

1.1.c.2. Ovaryum korteksi

1.1.c.3. Ovaryum medullası

1.1.d. Folikülogenez, hücreler ve faktörler

1.1.d.1.Folikülogenez

1.1.d.2. İlkel foliküller (Primordiyal foliküller)

1.1.d.3. Büyüyen foliküller

1.1.e. Kök hücreler

1.1.f. Kök hücre çeşitleri

1.1.f.1. Embriyonik kök hücreler

1.1.f.2. Erişkin kök hücreler

1.1.f.2.a. MKH izolasyonu ve karakterizasyonu

1.1.f.2.b. MKH tanımlanma yöntemleri

1.1.f.2.c. MKH yüzey belirteçleri

1.1.f.2.d. MKH farklılaşması

1.1.g. NOS

1.1.h. STRO1A

1.2.AMAÇ

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Kemik iliği stromal kök hücre kültürü

2.2. KİSKH'nin farklılaştırılması

2.3. Yara oluşturulması

2.4. Hücre transplantasyonu

2.5. Doku takibi ve Parafin bloklama

2.6. Hematoksilen-eosin boyaması

2.7. İndirekt immünohistokimya boyaması

2.8. TUNEL immünohistokimyası

2.9. Patolojik Değerlendirme

2.10. Folikül Sayılarının Tespiti

3.BULGULAR

3.1. Histokimyasal boyama değerlendirmeleri

3.1.1. Birinci gün örnekleri

3.1.2. Üçüncü gün örnekleri

3.1.3. Yedinci gün grupları

3.1.4. Ondördüncü gün

3.1.5. Yirmisekizinci gün

3.2. STRO 1A immünohistokimya değerlendirmeleri

3.3. e-NOS ve i-NOS immünohistokimya değerlendirmesi

3.4. TUNEL immünohistokimyası değerlendirmeleri

4.TARTIŞMA

5.SONUÇ, YORUM VE ÖNERİLER

KAYNAKLAR

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Ovaryum gelişmesi.

Şekil 1.2. Ovaryum anatomisi.

Şekil 1. 3. Ovaryumda folikül gelişimi.

Şekil 1.4 Primer folikül.

Şekil 1.5. Sekonder (antral) folikül.

Şekil 1.6. Tersiyer (graaf) folikül.

Şekil 1.7. Kök hücrelerin çeşitleri ve evrimi.

Şekil 2.1. Overin patolojik skorlamada kullanılmak üzere örnek histolojik görüntüleri.

Şekil 3.1.1.A. Birinci gün örnekleri KG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.1.B. Birinci gün örnekleri YG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.1.C. Birinci gün örnekleri SG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.1.D. Birinci gün örnekleri KHG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.2.A. Üçüncü gün KG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.2.B. Üçüncü gün YG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.2.C. Üçüncü gün SG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.2.D. Üçüncü gün KHG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.3.A. Yedinci gün KG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.3.B. Yedinci gün YG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.3.C. Yedinci gün SG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.3.D. Yedinci gün KHG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.4.A. Ondördüncü gün KG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.4.B. Ondördüncü gün YG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.4.C. Ondördüncü gün SG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.4.D. Ondördüncü gün KHG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.5.A. Yirmisekizinci gün KG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.5.B. Yirmisekizinci gün YG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.5.C Yirmisekizinci gün SG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.1.5.D. Yirmisekizinci gün KHG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Şekil 3.2.1. Birinci gün STRO 1A tüm grupların immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.2.2. üçüncü gün STRO 1A tüm grupların immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.2.3. Üçüncü gün STRO 1A tüm grupların immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.2.4. Ondördüncü gün STRO 1A tüm grupların immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.1. Birinci gün KG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.2. Birinci gün YG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.3. Birinci gün BYG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.4. Birinci gün KHG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.5. Üçüncü gün KG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.6. Üçüncü gün YG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.7. Üçüncü gün BYG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.8. Üçüncü gün KHG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.9. Yedinci gün KG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.10. Yedinci gün YG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.11. Yedinci gün BYG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.12. Yedinci gün KHG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.13. Ondördüncü gün KG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.14.Ondördüncü gün YG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.15.Ondördüncü gün BYG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.3.16.Ondördüncü gün KHG NOS immünohistokimya boyaması.

Şekil 3.4.1.Birinci gün TUNEL immünohistokimyası boyamaları.

Şekil 3.4.2.Üçüncü gün TUNEL immünohistokimyası boyamaları.

Şekil 3.4.3. Yedinci gün TUNEL immünohistokimyası boyamaları.

Şekil 3.4.4. Ondördüncü gün TUNEL immünohistokimyası boyamaları.



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Erişkin kök hücre kaynakları.

Tablo 1.2. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin temel özellikleri.

Tablo 1.3. Osteojenik indüksiyon sonucu zamana bağlı olarak meydana gelen değişimler.

Tablo 2.1. Deneyde oluşturulan çalışma grupları.

Tablo 2.2. Parafin bloklama protokolü.

Tablo 2.3. Hematoksilen-eosin boyama protokolü.

Tablo 2.4. İmmünohistokimyasal boyama protokolü.

Tablo 2.5. Tunel immünohistokimyası boyama protokolü.

Tablo 3.1. Kök hücrelerin korteks yara iyileşme sürecine etkilerinin istatistiksel değerlendirilmesi.

Tablo 3.2. Kök hücrelerin medulla yara iyileşme sürecine etkilerinin istatistiksel değerlendirilmesi.

Tablo 3.3. Kök hücrelerin over hasarında oksidatif stres parametrelerinden i-NOS'un korteks alanında değerlendirilmesi.

Tablo 3.4. Kök hücrelerin over hasarında oksidatif stres parametrelerinden i-NOS'un medulla alanında değerlendirilmesi.

Tablo 3.5. Kök hücrelerin over hasarında oksidatif stres parametrelerinden e-NOS'un korteks alanında değerlendirilmesi değerlendirilmesi.

Tablo 3.6. Kök hücrelerin over hasarında oksidatif stres parametrelerinden e-NOS'un medulla alanında değerlendirilmesi değerlendirilmesi.

Tablo3.7. kök hücrelerin over hasarına etkisinin apoptatik açıdan tunel immünohistokimyası ile değerlendirilmesi.

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

PCOS	Polikistik over sendromu
IGF1	östradiol ve insülin-benzeri büyüme faktörü 1
IGF1R	Insulin Growth Factor 1 Reseptor- İnsülin Büyüme Faktörü 1 Reseptörü
EGF	Epidermal Growth Factor- Epidermal Büyüme Faktörü
EGFR	Epidermal Growth Factor Reseptor- Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü
FSH	folikül uyarıcı hormon
ZP	Zona pellucida
LH	luteinizan hormon
kDa	Kilo dalton
OMI	Oosit maturasyon inhibitörü-Oocyte Maturation Inhibitor
DNA	Deoksiribonükleik asit
RNA	Ribonükleik asit
EKH	Embriyonik kök hücre
IVF	İn vitro fertilizasyon
MKH	Mezenkimal kök hücre
ATP	Adenozin trifosfat
IL-7	İnterlökin-7
TGF-β	Transforming growth factor Beta
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2
IBMX	İzobütil metil ksantin
HSL	Hormone sensitive lipase
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
NGFR	Nerve growth faktör reseptörü
KİSKH	Kemik iliği stromal kök hücreler
FBS	Fetal buzağı serumu
KM	Kültür medyumuna

KG	Kontrol grubu
YG	Yara grubu
SG	Sham grubu
KHG	Kök hücre grubu



ÖZET

FARKLILAŞTIRILMIŞ KÖK HÜCRE UYGULAMALARININ OVER HASARINDAKİ YERİ

Amaç: Modernleşen dünyada çevresel faktörler üreme hücreleri üzerine gittikçe artan bir şekilde olumsuz etki göstermektedir. Özellikle Avrupanın Kuzey bölgesinde ciddi bir sorun haline gelen bu problem ülkemizde de artmaktadır. Birçok farklı hücrenin etkileşmesi sonrasında gerçekleşen fertilizasyon bu hücrelerden aldığı sinyaller sonrasında embriyonun gelişmesini sağlayan birçok farklı mekanizmayı gerçekleştirmektedir. İnfertilizasyon dediğimiz durum bu hücrelerin etkileşmesindeki eksikliklere bağlı olarak oluşmaktadır. Kök hücre uygulaması ile amaçlanan kök hücrenin kendi oluşturduğu sinyaller ve çevreye gönderdiği uyarılar sonucu bu eksik olan etkileşmelerin yeniden sağlanmasıdır. Bu çalışmada over dokusunda oluşan yara sonrasında iyileşme periyodu ve bu sırada gerçekleşen oogenezin etkileşmesi ve kök hücrenin hem kendi farklılaşması hem de oluşturacağı niş denilen mikroçevre sayesinde katkıları incelencektir.

Metod: Hücre kültüründe in vitro olarak kültüre ettiğimiz kemik iliği stromal kök hücrelerini fare overlerine genel anestezi altında ppd enjektörü yardımıyla enjekte ederek yara modeli oluşturduk. Kurgulanan gün aralıklarını takip ederek hayvanları servikal dislokasyon yöntemi ile öldürerek overlerini çıkardık. %10'luk formalinfiksasyonunu sağladık ve parafin bloklama yöntemi ile blokladık. 5 micron inceliğinde rodajlı ve polilizin kaplı lamlara aldığımız doku kesitlerini bir gece 37 °C' de etüvde beklettikten sonra ertesi gün hematoksilen boyaması ve indirekt immünohistokimyasal boyama protokolünü takip ederek e-NOS, i-NOS ve STRO 1A antikorları ile boyadık ve TUNEL boyaması yaptık.

Sonuç: Bu çalışmada biyopsi modellemesi ile over dokusunda hasar oluşturulup oluşan hasara KİSKH uygulaması yapıp tedavi sürecine katkısı 3. Günde en aktif yara oluşumu gözlenirken 14. Günde iyileşmenin gerçekleştiği saptandı ve kök hücrenin yedinci gün gruplarında anlamlı bir şekilde iyileşmeyi hızlandırdığı ve olumlu katkılar sağladığı saptandı.

Kök hücre varlığı STRO-1 boyaması ile ortaya konulup kemik iliği stromasından alınan mezenkimal kök hücrelerin 4. Pasaja geldiğinde hoöojen bir yapıya kavuştuğu ve klasik kök hücre gibi davrandığı bulundu.

Kök hücrenin over dokusundaki hasara katkısı hem parankimin tamiri hemde oogenez sürecinde folikül oluşumuna katılan hücrelere verdiği destek saptandı. primer oositten graaf folikülüne ve teka ile granüloza hücrelerine olumlu katkılar sağladığı izlendi.

NOS boyamaları ile sürecin oksidatif hasar ile gerçekleştiği e-NOS daha belirgin olmak kaydı ile i-NOS immun boyamalarının bazale göre çok fazla arttığı saptandı.

Oksidatif stresin hücre ölümü üzerine ilişkisi ve etkili olduğuda TUNEL boyamalarındaki artışla belirlendi.

Kök hücrenin serbest radikal oluşumunu azaltıp hasarı engellediği ve buna bağlı olarak apoptozun gerilediği düşünüldü.

Kök hücrenin bu olumlu etkilerinin günümüz kadınının beslenme, teknoloji ve ilgil faktörler nedeniyle bozulan over sağlığının ve buna bağlı azalan üreme yeteneğinin yeniden kazandırılmasında önemli olabileceğini düşündürdü.

Kök hücrenin overdeki olumlu etkilerine niş faktörünün eklenmesi, folikül yapımına ve atılmasına katkısının belirlenmesi, graaf folikülünün oluşuma ve atılmasını sağlayan tüm destek hücrelerle bu hücrelere katkı sağlayan bağ dokusu hücrelerinin kök hücreler ile tekileşimlerinin ortaya konması ve burada kullanılan mekanizmaların ortaya konması çalışmadan çıkarılan sonuçların getirdiği önerilerdir.

Kök hücrenin kullandığı mekanizmalar olan oksidatif stres ve proglanmış hücre ölümü akıllıca kullanıldığı taktirde önleyici ve tedavi edici olarak klinik tıpta yerini alacak önemli bir silah olarak gözükmetedir. Bu ifadenin her geçen gün azalan üreme yeteneğine katkısı gelecekteki fonksiyonu açısından en önemli yorumdur (Stimpfell M. ve ark. 2013).

Anahtar Kelimeler: kemik iliği stromal kök hücreleri, yara iyileşmesi, over, e-NOS, i-NOS, STRO 1A.



ABSTRACT

Amaç: Modernleşen dünyada çevresel faktörler üreme hücreleri üzerine gittikçe artan bir şekilde olumsuz etki göstermektedir. Özellikle Avrupanın Kuzey bölgesinde ciddi bir sorun haline gelen bu problem ülkemizde de artmaktadır. Birçok farklı hücrenin etkileşmesi sonrasında gerçekleşen fertilizasyon bu hücrelerden aldığı sinyaller sonrasında embriyonun gelişmesini sağlayan birçok farklı mekanizmayı gerçekleştirmektedir. İnfertilizasyon dediğimiz durum bu hücrelerin etkileşmesindeki eksikliklere bağlı olarak oluşmaktadır. Kök hücre uygulaması ile amaçlanan kök hücrenin kendi oluşturduğu sinyaller ve çevreye gönderdiği uyarılar sonucu bu eksik olan etkileşmelerin yeniden sağlanmasıdır. Bu çalışmada over dokusunda oluşan yara sonrasında iyileşme periyodu ve bu sırada gerçekleşen oogenezin etkileşmesi ve kök hücrenin hem kendi farklılaşması hem de oluşturacağı niş denilen mikroçevre sayesinde katkıları incelencektir.

Metod: Hücre kültüründe in vitro olarak kültüre ettiğimiz kemik iliği stromal kök hücrelerini fare overlerine genel anestezi altında ppd enjektörü yardımıyla enjekte ederek yara modeli oluşturduk. Kurgulanan gün aralıklarını takip ederek hayvanları servikal dislokasyon yöntemi ile öldürerek overlerini çıkardık. %10'luk formalinfiksasyonunu sağladık ve parafin bloklama yöntemi ile blokladık. 5 micron inceliğinde rodajlı ve polilizin kaplı lamlara aldığımız doku kesitlerini bir gece 37 °C' de etüvde beklettikten sonra ertesi gün hematoksilen boyaması ve indirekt immünohistokimyasal boyama protokolünü takip ederek e-NOS, i-NOS ve STRO 1A antikorları ile boyadık ve TUNEL boyaması yaptık.

Sonuç: Bu çalışmada biyopsi modellemesi ile over dokusunda hasar oluşturulup oluşan hasara KİSKH uygulaması yapıp tedavi sürecine katkısı 3. Günde en aktif yara oluşumu gözlenirken 14. Günde iyileşmenin gerçekleştiği saptandı ve kök hücrenin yedinci gün gruplarında anlamlı bir şekilde iyileşmeyi hızlandırdığı ve olumlu katkılar sağladığı saptandı.

Kök hücre varlığı STRO-1 boyaması ile ortaya konulup kemik iliği stromasından alınan mezenkimal kök hücrelerin 4. Pasaja geldiğinde hoöojen bir yapıya kavuştuğu ve klasik kök hücre gibi davrandığı bulundu.

Kök hücrenin over dokusundaki hasara katkısı hem parankimin tamiri hemde oogenez sürecinde folikül oluşumuna katılan hücrelere verdiği destek saptandı. primer oositten graaf folikülüne ve teka ile granüloza hücrelerine olumlu katkılar sağladığı izlendi.

NOS boyamaları ile sürecin oksidatif hasar ile gerçekleştiği e-NOS daha belirgin olmak kaydı ile i-NOS immun boyamalarının bazale göre çok fazla arttığı saptandı.

Oksidatif stresin hücre ölümü üzerine ilişkisi ve etkili olduğuda TUNEL boyamalarındaki artışla belirlendi.

Kök hücrenin serbest radikal oluşumunu azaltıp hasarı engellediği ve buna bağlı olarak apoptozun gerilediği düşünüldü.

Kök hücrenin bu olumlu etkilerinin günümüz kadınının beslenme, teknoloji ve ilgil faktörler nedeniyle bozulan over sağlığının ve buna bağlı azalan üreme yeteneğinin yeniden kazandırılmasında önemli olabileceğini düşündürdü.

Kök hücrenin overdeki olumlu etkilerine niş faktörünün eklenmesi, folikül yapımına ve atılmasına katkısının belirlenmesi, graaf folikülünün oluşuma ve atılmasını sağlayan tüm destek hücrelerle bu hücrelere katkı sağlayan bağ dokusu hücrelerinin kök hücreler ile tekileşimlerinin ortaya konması ve burada kullanılan mekanizmaların ortaya konması çalışmadan çıkarılan sonuçların getirdiği önerilerdir.

Kök hücrenin kullandığı mekanizmalar olan oksidatif stres ve proglanmış hücre ölümü akıllıca kullanıldığı taktirde önleyici ve tedavi edici olarak klinik tıpta yerini alacak önemli bir silah olarak gözükmetedir. Bu ifadenin her geçen gün azalan üreme yeteneğine katkısı gelecekteki fonksiyonu açısından en önemli yorumdur (Stimpfell M. ve ark. 2013).

Anahtar Kelimeler: kemik iliği stromal kök hücreleri, yara iyileşmesi, over, e-NOS, i-NOS, STRO 1A.



1.GİRİŞ

İnsanların var olduğu ilk anlardan günümüze kadar gelen süreç içerisinde ilk hedeflerinden biri hastalıkları yenme ve yaşlanmanın önüne geçme olmuştur. Bunun en büyük kanıtı olarak M.Ö 1500'lü yıllara ait papirüslerde bitkilerden yapılan ilaçların kullanılması ve eski mısır hiyelogriflerinde hastalıklı organların değiştirildiğinin resmedilmiş olmasıdır (Şenel 2003).

Günümüzde insan genomu projesi ile genetik şifremizin %99.99'unun çözülmesiyle birlikte, kök hücre tedavisi, gen tedavisi, preimplantasyon genetiği, biyoteknoloji ve klonlama konularında yoğun gelişmeler yaşanmıştır. Ayrıca son yıllarda genetik şifrenin aydınlatılması ve hücre davranışlarının daha iyi anlaşılması ile insanın kök hücreleri kullanılarak beyin, deri, kemik, kalp kası gibi çeşitli dokular üretilmeye başlanmıştır (Aydın 2003).

Kök hücreler, embriyonik dönemden başlayarak fetal ve doğum sonrası yaşamda doku ve organların gelişmeleri ile idamelerinde çok önemli rol oynarlar. Kök hücrelerinin kendini yenileme, farklılaşma ve canlı kaldıkça yaşamlarını sürdürebilme özellikleri, organizmada başka hiçbir hücrede bulunmayan özelliklerdir. Kök hücreler, aldıkları sinyale göre farklı hücre tipine dönüşebilme potansiyeline ve kendisini yenileyebilme gücüne sahiptirler ayrıca vücutta meydana gelen değişikliklere, ölüm ve hasar durumuna göre bu hücreler hangi hücre türüne ihtiyaç var ise o hücreye dönüşmektedirler.

Ovaryumlar; pelvis boşluğunun yan duvarına dayalı, sağ ve solda olmak üzere iki adettir. Ovaryumların birbiri ile ilişkili iki işlevi vardır. Dişi cins hücrelerini üretirler (oogenezis) ve steroid hormonları (östrojen ve progesteron) salgırlar (steroidogenezis). Ovaryumlardan salgılanan steroidler, cins hücrelerinin gelişip olgunlaşmasını, sekonder cins organları ve meme bezlerinin gelişme ve büyümesini kontrol ederken gebeliğin kontrolünden de sorumludurlar.

Farklılaştırılmış kök hücrelerin overdeki davranışlarının araştırılması, ovaryum işlevinin ve fertilitenin daha iyi anlaşılmasına ve büyük oranda polikistik over sendromu (PCOS), preovarian yetmezlik ve kanser gibi hastalıkların nedenlerinin ve gelecekteki yeni tedavi yaklaşımlarının oluşmasına büyük katkı sağlayacaktır. Transplantasyon ile hasara uğramış dokunun yönlendirilmiş kök hücre ile tamiri oldukça umut vericidir. Bu

çalışma, sıçan overlerinde aspirasyon biyopsisi ile oluşan travmatik etkiye karşı kök hücrelerin iyileştirici etkilerinin araştırılması ve over dışı kök hücrelerin over dokusu içindeki davranışlarını tanımlamak amacıyla gerçekleştirilecektir.

1.1.GENEL BİLGİLER

1.1.a. Ovaryum embriyolojisi

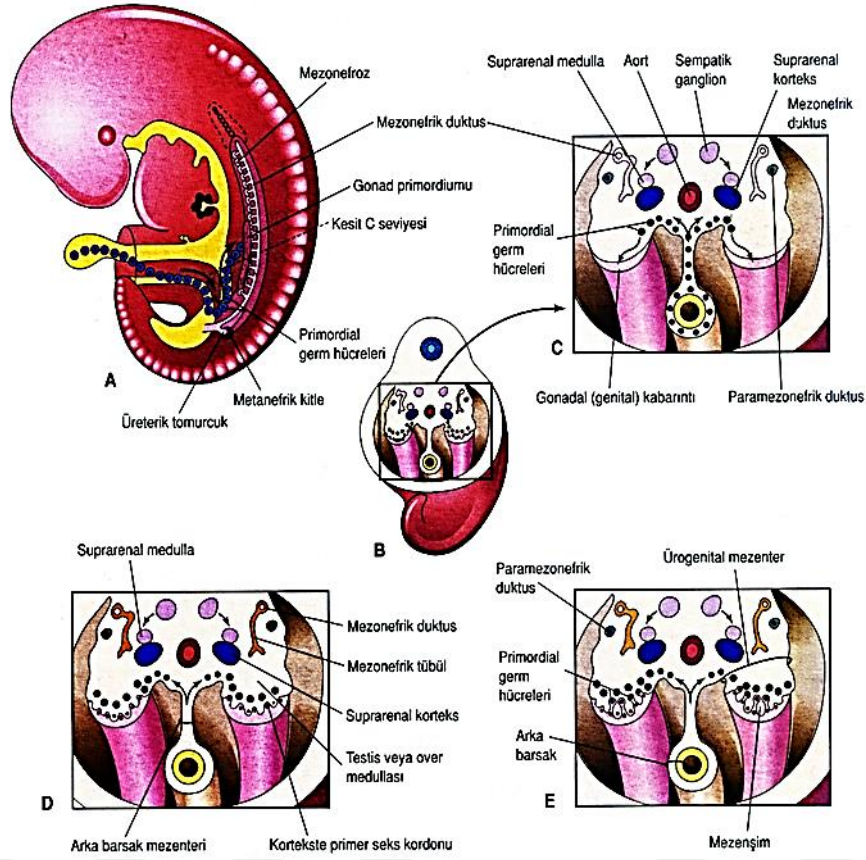
Embriyonun cinsiyeti, genetik olarak döllenme sırasında belirlenmesine rağmen gelişimin 7. haftasına kadar gonadlar, erkek ya da dişi yapısal özelliklere sahip değildir. Gonadlar başlangıçta sölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşmuş, bir çift uzunlamasına düzenlenmiş genital ya da gonadal kabartılar halinde belirirler. Gelişimin 6. Haftasına kadar genital kabartılar içinde germ hücreleri görülmez. (Moore KL, 2002.).

İlk eşey hücreleri, gelişimin 4. haftasında vitellus kesesinin allontois'e yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında görülmeye başlarlar. Sonbağırsağın mezenterinin dorsali boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek, 5. haftanın başında ilkel gonadlara ulaşır, 6. haftada da genital kabartıları işgal ederler. Bu hücreler genital kabartılara ulaşamadıklarında gonadlar gelişemez. Gonadların ovaryum ya da testis'e farkanmasında ilkel germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır. İlkel cins hücrelerinin ilkel gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartıların epiteli çoğalır ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine gömülürler. Bunlar burada ilkel cinsiyet kordonları denilen düzensiz şekilli kolonlar oluştururlar. Erkek ve dişi embriyolarda ilkel cins kordonları yüzey epiteline bağlıdır ve bu evrede, erkek ya da dişi gonadların birbirinden ayırt edilebilmesi olanaksızdır. Bu nedenle bu evreye farkanmamış dönem, gonad'a da farkanmamış gonad denir (Sadler T W, 2005).

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaştır. X kromozomları ovaryum'un gelişimi için genler içerir; ovaryum oluşmasında otozomal bir genin rol oynadığı bilinmektedir. 10. haftaya değin, ovaryumlar histolojik olarak ayırt edilemezler. İlkel seks kordonları dişi embriyolarda erkekteki kadar belirgin değildir. Gonad taslağının medullasına kadar uzanırlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Normalde rete ovarii ve ilkel seks kordonları dejenere olarak ortadan kalkarlar ve yerlerini ovaryum medullasını oluşturan damarlı stromaya bırakırlar. Erken fetal

dönemde kortikal kordonlar denilen ikinci cinsiyet kordonları, gelişmekte olan gonadın yüzey sölom epitelinden başlayarak, alttaki mezenşime doğru gelişmeye başlar. Kortikal kordonlar sölom epitelinin çoğalmasıyla kalınlaşırken, ilkel cins hücreleri kordonların içine karışırlar. Yaklaşık 16. haftada bu kordonlar primordiyal folikül denilen ayrı hücre gruplarına bölünürler. Her grup ortada ilkel cins hücrelerinden köken alan bir oogonyum (oogonium) ve onun çevresinde, kortikal kordon epitelyum kökenli tek sıra yassı folikül hücrelerinden oluşur. Fetal dönemde milyonlarca oogonyum aktif olarak mitozla çoğalır. Doğum öncesi, oogonyumların bir kısmı dejenere olurken geri kalanı büyüyerek primer oositleri yapar.

Doğumdan sonra oogonium oluşmaz. Primer oositlerin çoğu doğumdan önce dejenere olur. Doğumdan sonra iki milyon kadar primer oosit kalır. Doğumdan sonra ovaryum yüzey epiteli düzleşir. Ovaryum hilusunda, periton mezoteli ile devam eder. Ovaryum folikülleri biçimlenirken yüzey epiteliyle olan bağlantılarını yitirirler. Yüzey epiteli ile ovaryum korteks'i arasında tunika albuginea (tunica albuginea) denilen ince fibröz bir kapsül gelişir. Mezonefroz gerilerken, ovaryum ondan ayrılır ve mezovaryum denilen kendi mezoteriyle vücut duvarına asılır (Moore KL, Persaud TVN, 2002.).



Şekil 1.1. Ovaryum gelişmesi (Moore, K.L., 2002)

1.1.b. Ovaryum anatomisi

Ovaryum'lar, erkekteki testis'lerin karşılığı olan, iri badem büyüklüğünde, pelviste sağda ve solda kendilerine ait çukurcuklara (fossa ovarica) yerleşik iki organdır. Embriyonal yaşamın başlangıcında ovaryumlar, intraabdominal yerleşimli iken, gelişimin ikinci ayından başlayarak aşağıya pelvis boşluğuna doğru inmeye (descensus ovarii) başlarlar. Bu süreç testisin inişine göre daha kısa sürede tamamlanır. Ovaryum bu inişle pelvis minor'un duvarında ki fossa ovarica (Krause çukuru) denilen çukurlara yerleşirler (Gövs F, 2003). Fossa ovarica, a. İliaca externa ile a. iliaca interna arasında bulunur. Bu çukuru, alt- ön taraftan lig. latum uteri'nin tabanı; yukarıdan, a. iliaca externa ve arkadan, ureterler sınırlar. Çukurun dibinde ve periton (peritoneum)'un altından a.-v. obturatoria ile n. obturatorius geçer. İlk gebelikte ovaryumlar, uterus ile karın boşluğuna doğru çekilirler ve bir daha aynı yerlerine dönemezler. Çoklu doğumlarda ovaryum'lar biraz daha aşağıda bulunur. Tuba uterina'nın arka ve alt

kismında bulunan ovaryum'lar, lig. latum uteri içinde bulunurlar. Uzun eksenini hemen hemen vertikal yöndedir. Pembemsi-gri renkli olan ovaryum'ların yüzü ergenlik çağına değin periton'la örtülü olup düz ve parlaktır. Pubertadan sonra periton özelliğini yitirir ve matlaşır. Ovulasyon ve doğurmaya koşut olarak da üzeri pürütlü bir görünüm alır. Her bir ovaryum yaklaşık 4 cm uzunluğunda, 2 cm eninde ve 0,8 cm kalınlığındadır. Ağırlığı da 3 - 5 g. kadardır (Arıncı K, Elhan A, 2001).

Ovaryum'un anatomik olarak facies lateralis ve medialis olarak üzere iki yüzü, margo liber ve margo mesoovaricus olarak iki kenarı ve extremitas tubaria ve extremitas uterina olarak iki ucu bulunur.

1.1.b.1. Ovaryum'un tutunma yapıları:

Ligamentum latum uteri'nin arka yaprağı olup ovaryum'un ön kenarına tutunur. Kısa olduğundan ovaryum'un sadece menteşe hareketini yapmasına olanak sağlar.

Ligamentum ovarii proprium:

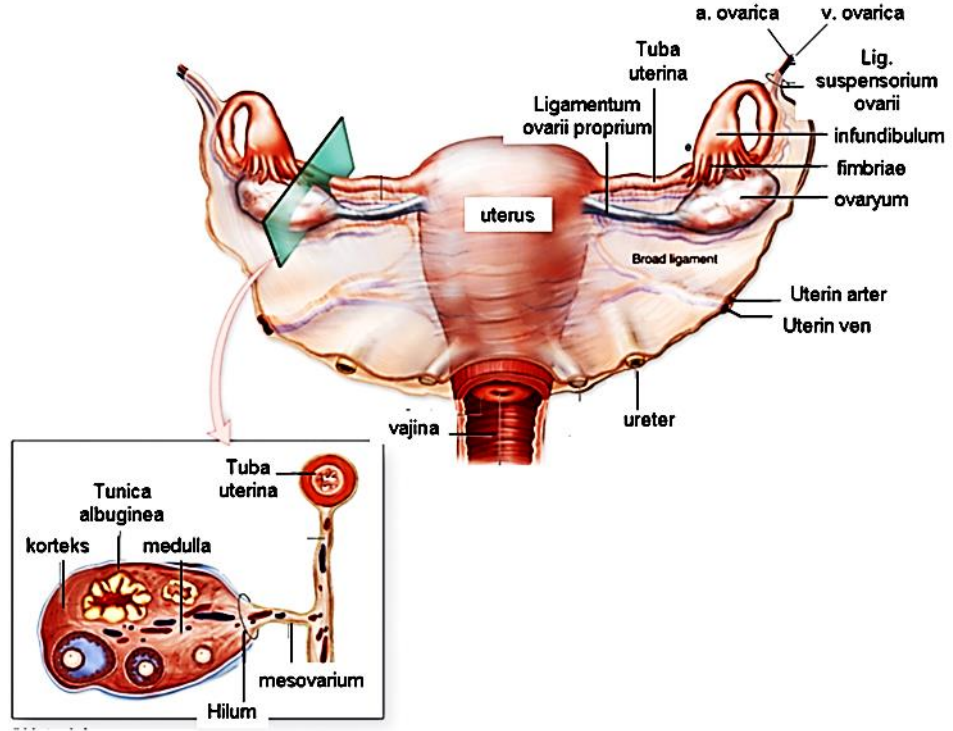
Ovaryum'un alt ucunu, fundus uteri'nin yan köşesine bağlar. Embriyonik yaşamdaki gubernaculum'un üst kısmının kalıntısıdır. Ortalama 2-3 cm uzunluğunda ve 2-3 mm kalınlığındadır. Yapısında düz kas ve elastik lifler bulundurduğundan gerektiğinde uzunluğunu değiştirebilir. Lig. latum uteri'nin arka kıvrımını oluşturması açısından önemli bir bağıdır.

Fimbria ovarica:

Tuba uterina'dan ovaryumlara doğru uzanan saçaksız uzantılardan (fimbriae tubae uterinae) birisine verilen isimdir. Bu uzantı ovaryumun üst ucuna yapışır. Karın boşluğuna atılan ovum'u tutarak tuba uterina'ya taşınmasını sağlar.

Ligamentum suspensorium ovarii:

Ovaryum'u pelvis yan duvarına sabitleyen periton katlantısıdır. Aditus pelvis'ten başlayan bu bağ m. psoas major, a. iliaca externa, v. iliaca externa ve ureter'i önden çaprazlayarak aşağıda ovaryum'un üst ucunda sonlanır. Elastik teller ve düz kas lifleri içeren bu bağ içinde, ovaryum'un damar ve sinirleri bulunur. Bunlar bağı kuvvetlendirirler. Bu bağlardan mesovarium ve lig. suspensorium ovarii, ovaryum'u tutan en önemli bağlardır (Gövs F. 2003).



Şekil 1.2. Ovaryum anatomisi (Moore, K.L., 2002).

1.1.b.2.Ovaryumun damarlanması

Ovaryum'un Arterleri:

Aorta abdominalis'ten çıkan a. ovarica'lardır. 1. Lumbar vertebra denginde aorta abdominalis'ten ayrılan a. ovarica, lig. ovarii suspensorium içerisinde ilerler ve mesovarium'a gelir. Burada a. uterina'nın bir dalı olan ramus ovaricus ile anastomoz yapar. Hilum ovarii'den organa giren arter, medulla-korteks sınırında oluşturduğu pleksustan dağılan dallarıyla, foliküllerin çevresini saran zengin kapiller ağırları oluşturur. Damarların çapı döngü evrelerine göre değişir. Damarlar foliküllerin gelişimi sırasında genişir. Ovulasyondan sonra ise daralır.

Ovaryum'un Venleri:

Arterleri izleyerek hilum ovarii'den çıkarlar. Venler ilk önce plexus ovaricus denen venöz bir ağ yaparlar. Buradan ayrılan venler birleşerek az bölümü plexus uterovaginalis'e, çoğu ise lig. ovarii suspensorium içerisindeki v. ovarica'ya açılırlar. V. ovarica, a. ovarica'larla birlikte uzanırlar. Sol taraftaki v. renalis'e, sağ taraftaki ise v. cava inferior'a açılır.

Ovaryum'un Lenf Damarları:

Kan damarlarıyla birlikte uzanırlar. Nodi lymphatici preaortici ve nodi lymphatici aortici lateralis'lere açılırlar.

1.1.b.3. Ovaryum'un Sinirleri:

Plexus hypogastricus inferior (ya da plexus pelvicus) ve a. ovarica'nın çevresindeki plexusovaricus'dan gelir. Parasempatikleri 10. kafa çifti n. vagus'tan, sempatikleri ise n. splanchnicus minor ve bir kısım torakal medulla spinalis segmentlerinden gelir (Erkoçak A, 1982).

1.1.c. Ovaryum'un histojisi

Ovaryum'da yapısal olarak farklı üç tabaka gözlenir:

1.1.c.1.Epithelium ve Tunika albuginea:

Over yüzeyini örten epitel tek sıra kübik epitel yapılmıştır. Germinal epitel olarak da adlandırılan epitelin peritona bakan tarafında mikrovilluslar ve az sayıda kinosilyalar izlenir. Hücre sitoplazması mitokondriyonlar ve pinositoz veziküllerinden zengindir. Az damarlı, düzensiz sıkı bağ dokusu yapısındadır. Kollajen lifler yüzeye dik uzanan demetler oluştururlar. (Ross HM ve ark., 2003). Altında, oosit içeren foliküllerin bulunduğu korteks bölümü ve en iç kısımda gevşek bağ dokusu içinde zengin bir damar yatağı içeren medulla bölümleri vardır. Yaş ilerledikçe tunika albuginea kalınlaşır ve sertleşir. (Junqueira LC, Carniero J ve ark., 2003, Ovalle WK 2009).

Germinal kök hücreleri germinal epitel içinde yerleşim gösterirler. Bu kök hücreler germ hücrelerine benzer büyük ve oval şekilli hücrelerdir ve mitotik olarak aktiftirler. Germinal kök hücreleri epitelin içinde olmasına karşın epitel ile ilişkili değildir ve bu hücreler ovaryumların içinde korumasız ve çıplak halde bulunurlar. Germinal kök hücrelerden postnatal ovaryumlarda yeni oositler elde edilir. Ayrıca, ovaryum epitelinde bulunan kök hücreler, oosit ve onu çevreleyen granüloza hücrelerinin bipotent kaynağıdır. (Bukovsky, A. ve ark., 2005, Johnson ve ark., 2004, Motta, P.M. ve Makabe, S., 1986). Bizde çalışmamızda kemik iliği stromal kök hücrelerini ovaryumlara transplante ederek gerek bu kök hücrelerin buradaki davranışlarını gerekse burada zaten var olan germinal kök hücreleri üzerine olası etkilerini araştırdık.

1.1.c.2.Ovaryum korteksi:

Organın dış ve işlevsel bölümüdür. Çeşitli gelişim aşamalarındaki ovaryum folikülleri ve korpus luteum yapılarını içerir. Puberteden önce kortekste sadece primordiyal foliküller bulunurken puberteden sonra primer, sekonder ve antral foliküller bulunur. Seksüel olgunluk döneminde bu foliküllerden başka korpus luteum ve atretik foliküller bulunur. Menopoz döneminde ise foliküllerin sayısı oldukça azalır (Kalaycı Ş. 1986, Eşrefoğlu M. 2004, Solomon EP, 2000). Korteks stromasında kollajen, elastik lifler ve lif ağları ile ince uzun mekik şeklinde stroma hücreleri bulunur. Stroma hücreleri fibroblastlardan farklı olarak hormon salgılayan teka interna hücrelerine dönüşebilen hücrelerdir. (Sternberg SS. 1997)

1.1.c.3.Ovaryum medullası:

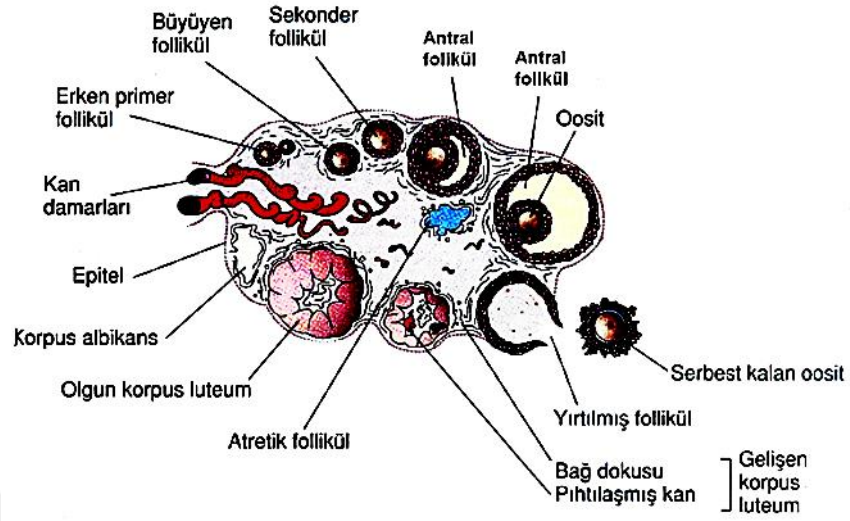
Kan, lenf damarları ve sinirlerden zengin, açık renk iç bölgedir. Korteks ve medullayı yapısal olarak kesin sınırla ayırmak mümkün değildir. Medulla stroması korteks'e benzer. Medulla elastik liflerden zengin, düz kas hücreleri içeren fibroelastik gevşek bağ dokusundan oluşmuştur. Medullada ayrıca oksidasyon enzimlerini ve diğer enzimleri içeren hücreler bulunur; bunların sayıları yaşla artar, menopozda %80 oranında bulunurlar. İntertisiyel hücreler poligonal şekilli, ortada yuvarlak çekirdeği ve belirgin çekirdekçikleri olan epiteloid hücrelerdir. Sitoplazmalarında küçük yağ damlacıkları bulunur. Luteinize hücelere benzedikleri için atreziye giden foliküllerin teka internalarından oluştukları düşünülmektedir. Bunlar ovaryum stromasında tek tek ya da gruplar halinde bulunurlar ve östrojen salgırlar. Bu hücreler, çok doğuran memelilerde fazladır ve intertisiyel bezler olarak adlandırılırlar; insanda ilk adet kanamasından sonra azalır, erişkinde son derece azdırlar. Hilus hücreleri, başka bir diğer iri epiteloid hücre grubudur, küçük adacıklar şeklinde hilusta gözlenirler. Testis'in Leydig hücrelerine (endocrinocytus interstitialis) benzer ve sitoplazmalarında yağ damlacıkları, lipofuksin pigmenti, Reinke kristallerini içerirler ve steroid hormon olarak androjen salgırlar. Kortikomeduller stroma geçişinde arjirofil gösteren nöroendokrin (APUD) hücreler, kadınlarda % 6 oranında gösterilmiştir (Tekelioğlu M. 2002, Esrefoglu, M., 2004, Fawcett, D.W., 1997, Junqueira, L.C., and Carniero, J. 2003, Sternberg, S.S., 1997)

1.1.d.Folikülogenez, hücreler ve faktörler

1.1.d.1.folikülogenez:

Foliküllerin primordial folikül popülasyonundan ayrılıp gelişme ve diferensiasyona (değişime) uğraması olayına ***folikülogenez*** denir. Folikülogenez somatik hücrelerin proliferasyonu, steroidojenik kapasite elde etmesi, oositin büyümesi ve mayotik bölünme ile karakterizedir. Folikülogenezde amaç olgun, kumulus kompleksi ile çevrili, üreme yolunda spermle döllenebilen oositin oluşturulması ve endometriumun gebeliğe hazırlanmasını sağlayacak hormonları salgılayan korpus luteumun gelişmesini sağlamaktır. Ovaryumun temel ünitesi olan foliküller, oositlere mikroçevre yaratmanın yanı sıra gelişim ve sağ kalım için de gereklidir (Sarraj M. A, Drummond A.E. 2012). Başarısız bir folikülogenez sürecinin yeniden düzenlenebilirliği merak konusudur ve bu süreçte kök hücrelerin rolünün varlığı tezimizin temel sorularından birisidir.

Olgunlaşmış ovaryumlarda üç tip folikül gözlenir: İlkel foliküller (primordiyal foliküller), büyüyen foliküller (primer ve sekonder foliküller) ve olgun (Graaf, Tersiyer) foliküller. (Eşrefoğlu M., 2004). Bu foliküller ardışık büyüme ve diferensiasyon sürecine girmeden önceki dönemde sessizdirler. Bütün foliküller ovulatuvar döneme ulaşmazlar. Bir kısım folikül atrezi denilen bir süreçle kaybedilir. Mc Geeve ark. (McGee EA, 2000) folikülogenezde iki dönemden bahsetmişlerdir. Bunlardan birincisi ilk rekrutmentdir. Bu dönemde primordiyal foliküler erken antral döneme doğru yavaş büyüme içerisinde. İkincisi siklik rekrutmentdir. Bu dönemde atreziden kurtulan erken antral foliküller hızlı bir büyüme içerisine girerler. Foliküller siklik rekrutment sürecine girdikten sonra bir ya da daha fazlası, daha ileriye büyüme ve ovulasyon için seçilirler. Bu foliküllere dominant folikül adı verilir. Diğer foliküller atreziye uğrarlar.



Şekil 1. 3. Ovaryumda folikül gelişimi (Moore, K.L., 2002)

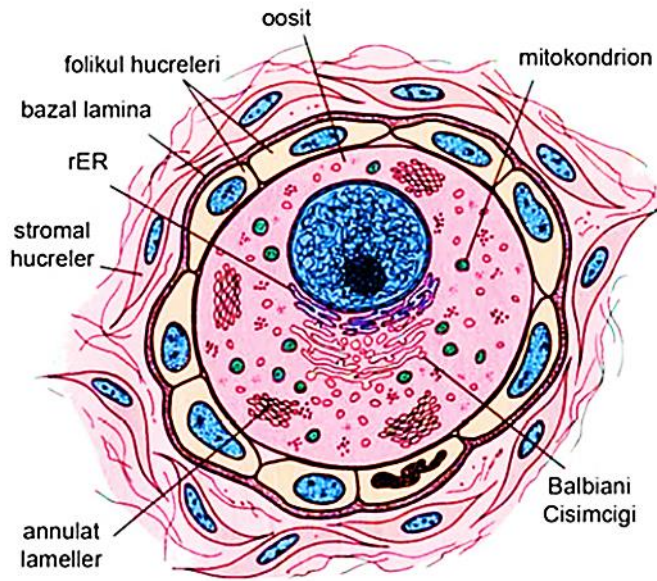
Folikül oluşumunun tamamlanması için çeşitli büyüme faktörleri gerekmektedir. Büyüyen follikülün folliküler sıvısı incelendiğinde, steroidler ve büyüme faktörleri (östradiol ve insülin-benzeri büyüme faktörü 1) içerdiği görülmektedir. İnsan oositleri östrojen reseptör, IGF1, IGF2 ve IGF1R (Insulin Growth Factor 1 Reseptor- İnsülin Büyüme Faktörü1 Reseptörü) mRNA içermekle birlikte gelişimin preantral aşamasındaki oositlerin EGF (Epidermal Growth Factor- Epidermal Büyüme Faktörü) ve EGFR (Epidermal Growth Factor Reseptor- Epidermal Büyüme Faktörü Reseptörü) eksprese ettiği de görülmektedir. Oosit-kümüls komplekslerinin EGF ve IGF1 varlığında kültürü sonucunda, immatür oositlerin nüklear maturasyonun arttığı rapor edilmiştir (Heikinheimo O, Gibbons W. E., 1998). Ovaryum organ kültür çalışmalarında, primordiyal follikül oluşumunda kök hücre faktörü ve diğer birçok faktörün potansiyel rolü gösterilmiştir (Pepling M. E ve Spradling A. C. 2001).

1.1.d.2. İlkel foliküller (Primordiyal foliküller)

İlkel folikül, foliküler gelişimin ilk aşamasıdır ve doğumdan önce gebeligin 20. haftasında 6-7 milyon civarında olup doğumdan sonra sayıları azalarak 300-400 bine kadar düşmektedir. Dişi bireylerde primordiyal germ hücreleri 25. haftada mitozla çoğalarak yaklaşık yedi milyon oogonyum meydana getirir. Mayoz bölünmeye girmiş primer oositlerin büyük çoğunluğu primer folikül oluşturamayıp, atreziye uğrar

(Gandolfi F, ve ark.,2005). Pubertede ise bu rakam 200.000' e kadar inmiştir (Demeestere I ve ark., 2005). Ancak son yıllarda bazı araştırmalar fare türlerinde germ hattı kök hücrelerinden, yaşamın erken yıllarında yeniden eşey hücresi oluşabildiğini göstermiştir (Jamnongjit M ve Hammes SR. 2005). Primer oositin etrafını tek katlı yassı folikül hücreleri çevreleyerek primordiyal folikülleri oluştururlar.

Primordial folikül aşamasında yassı epitel hücreleri oogumyumların çevresini tek tabaka halinde sararlar. Foliküllerin büyük bölümünü oluşturan primordiyal foliküller ovaryumun korteks kısmında ve hemen tunika albuginea tabakasının altında bulunurlar. primordiyal folikülde, ilkin oosit bazal lamina üzerine oturmuş, tek katlı yassı epitelle sarılmıştır ve 1. mayozun profaz evresinde, diploten aşamasında duraklamıştır. Buradaki ilkin oositin çapı yaklaşık 30 mikrometre (μm)' dir. İlkin oositler, geniş veziküler nükleuslu, belirgin bir veya birden çok nükleolus içeren yuvarlak hücrelerdir. Organelden oldukça zengin hücrelerdir. Sitoplazmada bulunan, belirgin bir golgi kompleksi ve endoplazmik retikulumu olan, çok sayıda mitokondri, lizozom, veziküllerden oluşan Balbiani cisimciği denen yapılar içerir (Ross MH ve ark., 1995, Williams ve ark. 2004, Marteil G, ve ark., 2009, de Smedt V ve ark., 2000). Gonadotropinlerin, özellikle folikül uyarıcı hormonun (FSH) uyarılmasıyla ilkel foliküller gelişerek büyüyen folliküllere dönüşür (Yıldırım M., 2000, Hassa H., 2003).



Şekil 1.4 Primer folikül (Moore, K.L., 2002)

1.1.d.3. Büyüyen foliküller

Primer folikül

Primordiyal foliküller büyüyen folikül aşamasına geldiğinde folikülde, oositte ve buna eşlik eden stromada da değişiklikler meydana gelir. Başlangıç olarak oosit büyür ve etrafındaki folikül hücreleri çoğalmaya başlayarak kübikleşirler. Folikül hücreleri kübik hale geldiğinde folikül “*Primer Folikül*” olarak adlandırılır. Oosit büyüdüğü, homojen ve yoğun boyanan, asidofilik ışık kırıcı tabaka olan *Zona Pellusida* (ZP), oosit ve folikül hücreleri arasında belirir. Büyüyen oosit, glikozaminoglikandan ve glikoproteinden zengin ZP’yı salgılar. ZP, ışık mikroskopunda ilk olarak oosit 50–80 µm’ye büyüdüğünde belirir. (Fair, T., 2003). Tek katlı olan foliküler hücreler mitoz geçirerek çoğalırlar ve membrana gronulosum denen, dış kısmında bazal membranla stromadan ayrılmış, çok tabakalı hücre katmanını oluştururlar. Çoğalma sırasında granüloza hücrelerinin arasında oluşan gap junction yapıları, hücreler arası besin ve küçük makromoleküllerin kandan foliküler sıvıya geçmesi açısından, dolayısıyla ovumun ve foliküllerin gelişimi için çok önemlidir. (Himelstein-Braw, R. Ve ark., 1976). Granüloza hücrelerinin çoğalmasıyla folikülü çevreleyen stromal hücreler “*Teka Folikülü*” denen iki tabakaya ayrılan bağ doku yapısını oluştururlar.

Teka Interna: iç kısımda yer alan, damarlanması iyi olan kübik hücrelerdir. Östrojen öncüsü olan androjenleri sentezler ve salgılama görevleri vardır, lüteinizan hormon (LH) reseptörleri bakımından zengindirler. Teka internada salgı yapan hücrelere ek olarak fibroblastlar, kollajen lifler ve zengin bir damar ağı bulunmaktadır

Teka Eksterna: Bağ doku hücrelerinin dış kısmıdır. Esas olarak düz kas hücreleri ve kollajen lif demetlerinden oluşur.

Teka tabakaları arasında ve teka eksterna ile çevre stroma arasındaki sınır belirgin değildir. Bununla birlikte granüloza hücreleri ile teka tabakası arasında bulunan bazal lamina bu iki tabakayı kesin şekilde ayırır. Böylece bazal lamina, foliküler büyüme sırasında damarsız olan granüloza hücre tabakasını, teka interna tabakasından ayırmış olur.

Oosit büyüdüğü ve olgunlaştıkça organellerin de dağılımı değişir. Primordiyal oositte bulunan Balbiani cisimciğinden kaynaklanan Golgi parçaları sitoplazmada dağılmış olarak görülür. Serbest ribozom, mitokondria, küçük veziküller ve granüllü ER

sayıca fazlalaşır. Seyrek olarak yağ damlacıkları ve lipokrom pigmenti de görülebilir (McGee, E.A. ve A.J. Hsueh, 2000). Oositlerde kortikal granüller bulunur. Bunlar plasma membranının (oolemma) altında yerleşmişlerdir. Kortikal granüller proteaz içerirler ve spermin ovumu etkilemesiyle ekzositoz yoluyla oolemma dışına salınırlar. Oosit ile granuloza hücreleri arasında uzantı benzeri yapılarla haberleşme sağlanmaktadır. Bu uzantılar, plasma membranıyla ilişki halindedir fakat sitoplazmik devamlılık sağlamaz.

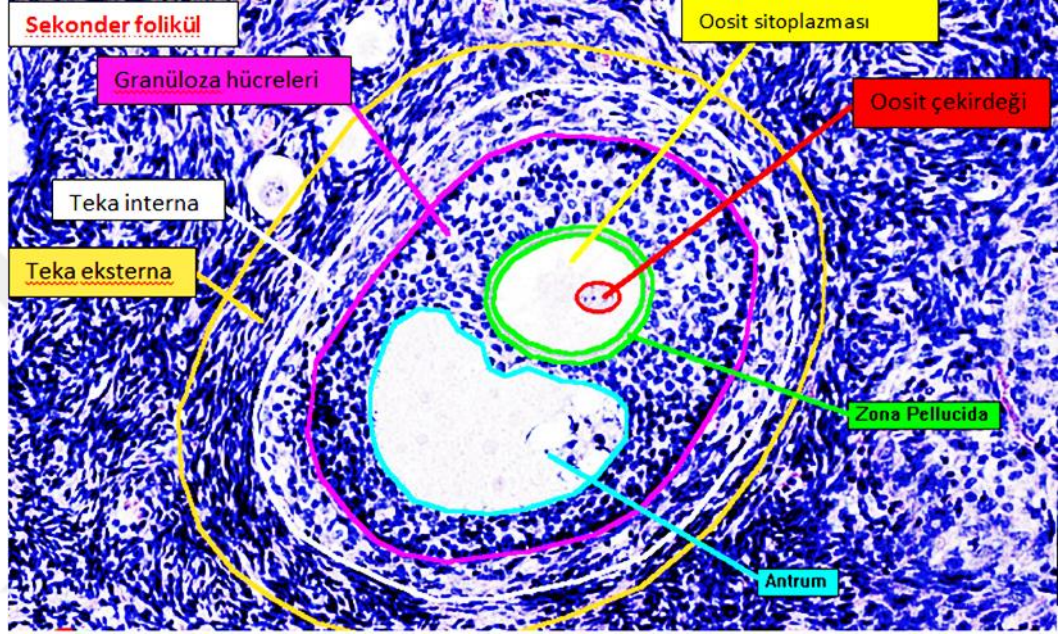
Sekonder folikül (Antral folikül)

Primer folikül büyüklüğü FSH, Büyüme faktörleri (Epidermal Growth Factor, Insuline-like Growth Factor-I), Ca²⁺ iyonlarının etkisinde arttıkça kortikal stroma içinde artar. Granuloza tabakasındaki hücre katman sayısı 6-12 hücre sayısına ulaştığında granuloza hücrelerinin arasında sıvı birikmeye başlar. Bu sıvı hiyaluronik asitten zengin bir yapıdadır ve *antral sıvı* olarak adlandırılır. Bu sıvı birikmeye devam ettikçe boşluklar birleşir ve tek büyük bir boşluk halini alır ki buna da “*Antrum*” denir. Sıvı birikimi başladığında folikül artık *sekonder veya antral folikül* olarak adlandırılır. Antral folikül aşamasından sonra eksantrik olarak yerleşmiş oosit büyüyemez ve en çok 125 µm çapında kalır. Büyüme inhibisyonu ise 2 kDa büyüklüğünde bir peptid olan “*Oocyte Maturation Inhibitor*” (OMI) tarafından sağlanır. OMI, granuloza hücreleri tarafından antral sıvıya salınır. OMI yoğunluğunun antral folikül büyüklüğü ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır. [Syrop, C.H. ve ark., 1995.)

için zayıflamıştır. (Ross MH ve ark., 1995, Williams ve ark., 2006, Delilbaşı L., 2008, Yıldırım M., 2000.) Sekonder oosit, ovulasyondan önce ikinci mayoz bölünmesine başlar, ancak, metafaz evresinde ikinci kez bekleme evresine girer ve bu evredeyken ovaryumdan atılır. Bu aşamada teka hücrelerinde de farklılaşmalar görülür. Teka internanın hücreleri tamamen farklılaştığında steroid üreten hücelere benzer bir yapı gösterirler. Bu özellikler arasında, bol miktarda düz yüzlü endoplazmik retikulum, tübüler kristaya sahip mitokondriyumlar ve çok sayıda lipid damlacıkları yer alır. Bu hücrelerin, bir steroid hormon olan androstenoidini sentezlediği bilinmektedir. Folikül hücreleri, FSH'nın etkisiyle androstenoidini östrojene dönüştüren aromataz enzimini salgırlar. Östrojen, folikülü çevreleyen stromaya döner, kan damarları aracılığıyla tüm vücuda yayılır.

Ovulasyondan sonra, folikülün granüloza ve teka interna hücreleri, korpus luteum (sarı cisim) olarak adlandırılan geçici bir iç salgı bezi oluşturmak üzere yeniden düzenlenir. Korpus luteum, ovaryumun korteks bölgesinde yerleşir. Folikül sıvısının boşalması ile folikül duvarı kıvrımlı bir hal alır. Folikül boşluğuna bir miktar kanama olur; bu kan burada pıhtılaşır (koagülasyon) ve daha sonra yerini bağ dokusu alır. Bu bağ dokusu ile birlikte giderek ortadan kaldırılan kan pıhtısı artıkları, korpus luteumun en iç kısmını oluşturur. Ovulasyondan sonra granüloza hücreleri bölünmezler ancak, boyutlarında büyük bir artış görülür. Bunlar korpus luteum parenkimasının yaklaşık %80'ini oluşturur ve granüloza lutein hücreleri adını alırlar. Teka internadaki hücreler de teka lutein hücrelerini oluşturarak korpus luteumun oluşumuna katkıda bulunurlar. Bu hücrelerin yapısı granüloza lutein hücrelerine benzer, ancak daha küçüktürler ve daha koyu boyanırlar. Oositi atan folikülün hücrelerinin yeniden düzenlenmesi ve korpus luteumun oluşumu, ovulasyon öncesinde salgılanan LH'nın uyarısı sonucu gerçekleşir. Yine LH uyarısıyla, korpus luteum hücrelerinin enzimlerinde değişiklik olur ve korpus luteum progesteron ve östrojenleri salgılamaya başlar(Syrop, C.H., ve ark., 1999). LH uyarısının ardından, korpus luteum 10-12 gün süreyle hormon salgılamak üzere programlanmıştır. Bunun dışında hormonal uyarı olmaz ve gebelik oluşmazsa, korpus luteum hücreleri apoptoz ile dejenere olurlar. Östrojen, hipofizden FSH'nın salgılanmasını baskılar. Korpus luteum bozulduktan sonra, steroid hormonların kandaki konsantrasyonları azalır ve FSH salgılanır. FSH, başka foliküllerin büyümesini

uyararak bir sonraki menstrual siklusu başlatır. Yalnızca menstrual siklusun bir kısmı süresince kalan korpus luteum, menstruasyon korpus luteumu olarak isimlendirilir ve hücre kalıntıları makrofajlar tarafından fagosite edilir. Korpus luteumun bulunduğu yer fibroblastlar tarafından kaplanır ve tıkmaz bağ dokusundan adı oluşan bir yara izi gelişir. Bu dokuya korpus albicans (beyaz cisim) verilir (Ross MH., 1995).



Şekil 1.6. Tersiyer (graaf) folikül. (Moore, K.L., 2002).

1.1.e. KÖK HÜCRELER

Bilim insanları vücutta bulunan hücrelerin bir grubunun diğer hücrelerden farklı olduğunu savunmuşlar ve bu hücreleri tanımlamak için çeitli kriterler kullanmışlardır (Karaöz E., Ovalı E., 2004). Bu kriterleri kullanılarak tanımlanan bu hücreler kök hücre olarak adlandırılmıştır ve kök hücrelerin, kendilerini yenileme özelliğine sahip, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen, vücut içinde veya laboratuvar ortamında uygun şartlar sağlandığında birçok farklı hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücreler olduklarını bildirmişlerdir (Sağsöz ve ark. 2008). Telomerler kromozomların uç kısımlarında bulunan ve hücrelerin bölünme kapasitesini etkileyen DNA zincirleridir. Telomerler doğrusal kromozomların uçlarıdır ve binlerce kez tekrarlanan kısa DNA dizileri (insanda TTAGGG) içerirler. Somatik hücrelerde, her hücre bölünmesinden sonra telomer boyu yaklaşık 100 baz çifti kadar kısalır.

İnsan germ hücreleri, tümör hücreleri ve embriyonik kök hücrelerin telomeraz etkinliğinin bu hücre tiplerinin sınırsız bir şekilde kendini yenileyebilme kapasitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir. Buna dayanarak, sınırsız telomeraz etkinliği kök hücrelerinin bir belirticidir olarak kabul edilebilir (Karaöz E., Ovalı E., 2004). Kök hücrelerimiz diğer somatik hücrelerimiz gibi herhangi bir organın etkinliğini yerine getirme göreviyle yaratılmamışlardır. Bu hücreler özelleşmemiş hücrelerdir. Farklılaşmamış bir kök hücre kalp kasının, kan hücresinin ya da bir sinir hücresinin fonksiyonunu yapamaz fakat özelleşmemiş yani farklılaşmış kök hücreler, kalp kası hücreleri, kan hücreleri ya da sinir hücreleri gibi özelleşmiş hücrelere kaynaklık edebilir.

Günümüzde özellikle de son yıllarda kök hücrelerin kök hücre olarak kalmasını sağlayan şartlarla ilgili yapılan araştırmaların sonucunda pek çok farklı işleve sahip önemli protein ve protein aileleri tanımlanmıştır. Örneğin hematopoietik kök hücrelerin farklılaşmadan çoğalabilmesinde Wnt isimli bir proteinin rol oynamaktadır. Wnt proteini, kök hücrelerin yüzeyinde reseptöre bağlanır ve hücrelerin içinde bir kaskad başlatır. Bu kaskad sonucunda bazı önemli genler aktive olarak kök hücrelerin farklılaşmadan kendilerini yenilemelerini sağlar (Tannishtha Reya ve Hans Clevers, 2005). Kök hücreler özelleşmemiş durumlarından çıkıp farklılaşarak özelleşmiş hücrelere kaynaklık ederler. Birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Zigot kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerine en iyi örnek olarak sunulabilir.

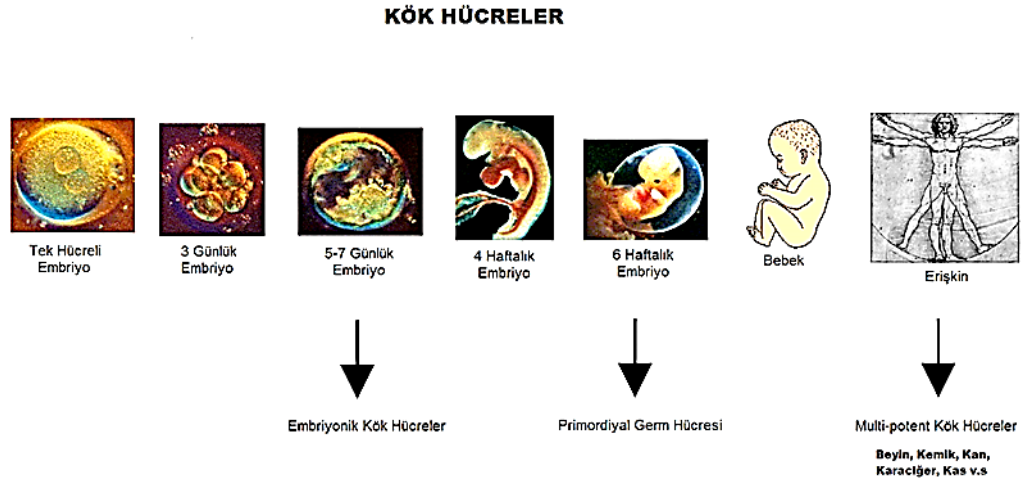
Kök hücreler hasar gören alıcıya nakilden sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak tekrar çoğaltabilir. Örneğin; kemik iliği stromal hücreleri, hasarlı kalp dokusuna enjekte edildikten sonra kardiyomiyositlere dönüşmüştür. Kök hücreler in vivo ortamda doku hasarının olmadığı durumlarda bile, farklı kaynaklardan elde edilmiş kök hücrelerin blastosiste enjekte edildikleri zaman farklı hücre tiplerine kaynaklık etmeleri gibi (kimerizim) farklılaşmış hücrelere katkı sağlar. (Karaöz E., Ovalı E., 2004).

1.1.f. KÖK HÜCRE ÇEŞİTLERİ

Kök hücreler farklılaşma özelliklerine ve elde edildikleri kaynaklara göre iki başlıkta altında incelenir.

1.1.f.1. Embriyonik kök hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH'ler) blastokist evresindeki bir embriyonun iç hücre kütesinden elde edilen kök hücrelerdir. İnsan EKH'leri Thomson ve ark. (1998) tarafından in vitro şartlarda üretilebilmesiyle, embriyonik kök hücre çalışmaları kendi içinde çağ atlamıştır. Embriyonik kök hücreler pluripotent hücreler olup, vücutta bulunan yaklaşık 200 civarındaki farklı hücre tipine dönüşebilme potansiyeline sahiptirler (İnanç ve ark. 2007). Embriyonik kök hücreler klinik olarak henüz kullanılamamaktadır. Bunun nedeni ise hem yeterli çalışmanın var olmaması hem de embriyonik kök hücrelerin kanserleşme sebebi olarak gösterilmesidir. İnsan EKH'leriyle ilgili deneysel çalışmalar in vitro fertilizasyon (IVF) kliniklerinde artan ve bağışlanan embriyolardan türetilmiş hücre dizileriyle yürütülmektedir. İnsan EKH'lerinin kullanımıyla ilgili kimi dinsel inanış ve kültürlerde etik çekinceler mevcut iken kimilerinde ise bu durum herhangi bir sorun teşkil etmemektedir. Bu nedenlerle, araştırma amaçlı kullanımlarıyla ilgili düzenlemeler farklılıklar göstermektedir. Ülkemizde insan embriyonik kök hücreleri ile çalışmalara henüz izin verilmemektedir.



Şekil 1.7. Kök hücrelerin çeşitleri ve evrimi (Betül Çelebi, 2007)

5- ile 9 haftalık fetusların gonadal kıvrım ve mezenter bölgesindeki primordiyal germ hücreleri ile yapılan in vitro çalışmalarla Gearhart ve ark. (1998) embriyonik germ hücreleri elde etmişlerdir. Missed abortus olgularından elde edilen veya çeşitli sakatlıklar nedeniyle gebeliğe son verilip alınan fetuslar bu tür kök hücreler için kaynak olarak kullanılmaktadır. Alınan kök hücreler sınırsız bölünme ve kendilerini yenileme

özelliğine sahip hücrelerdir. “Pluripotent” yani uygun koşullarda her hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir. Embriyonik kök hücrelere benzer özellikler taşımaktadırlar; ancak fetustan elde edilen bu kök hücreler gelişimin daha geç safhasında oldukları için çoğalma potansiyelleri iç hücre kitlesi gibi kaynaklardan elde edilen kök hücrelere göre daha azdır.

Kordon kanı kök hücreleri

Doğum sırasında anne ile bebek arasında iletişimi sağlayan kordon kanından kök hücre elde edilebilmektedir. Elde edilen bu hücreler arasında hematopoietik kök hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler allojenik veya otolog amaçlı olarak kullanılabilirler. Bu kök hücreler, alıcıya kolay uyum sağlamaları, genç hücreler olmaları, kültür ortamında uzun süre canlılıkları bozulmadan kalabilmeleri gibi nedenlerden dolayı kök hücreler arasında avantajlı hücrelerdir.

1.1.f.2. Erişkin kök hücreler

Kök hücre kaynakları arasında farklılaşmış dokular içerisinde yer alan ama farklılaşmamış olarak korunan hücreler sayılabilir. Bu hücreler hem kendi kendini yenileme özelliğinde hemde bulunduğu dokudaki diğer hücre tiplerine dönüşebilme özelliğindeki hücrelerdir. Bu tür hücreler her yaş grubundaki insanlarda bulunabilirler. Günümüzde beyin, kemik iliği, periferik kan, iskelet kası, epidermis, sindirim sistemi, diş pulpası, karaciğer, retina, kornea ve pankreas gibi dokularda erişkin kök hücrelerin varlıkları belirlenmiştir.

Beyin → Nöronal Kök Hücre → Nöron, Astrosit, Oligodendrosit

Kemik İliği → Hemangioblast → Endotelial Hücre

→ Hematopoietik Kök Hücre → Lenfosit, Eritrosit, Trombosit

→ Mezenkimal Kök Hücre → Kemik, Kıkırdak, İskelet kası, Tendon, Ligament, Yağ, Kemik stroması, Kardiyomiyosit

→ Oval Hücre

İç Organlar → Hepatik Kök Hücre (Oval Hücre) → Hepatosit

→ Pankreatik Kök Hücre → Pankreatik Endokrin Hüc.

→ Pankreatik Ekzokrin Hüc.

Tablo 1.1. Erişkin kök hücre kaynakları.(Miguell ve ark. 2001)

Gerçek kök hücre tanımını oluşturan temel prensipler; kendi kendini yenileyebilme yeteneği ya da başlangıçtaki hücrenin karakterlerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği, tek bir hücreden birden fazla soya farklılaşabilme özelliği ve bir dokunun in vivo olarak fonksiyon ve yapısına katılabilme şeklinde sıralanabilir. Bu özellikleri taşıyan hücreler farelerden, insanlarda, insan dışı primatlardan ve birçok hayvan türünden elde edilmişlerdir. Özellikle yakın zaman önce insan blastokistinden elde edilen hücrelerin de bu özellikleri taşıdıkları bilinmektedir. Erişkin kök hücrelerinin kendini yenileme ve farklılaşma potansiyelleri embriyonik kök hücrelerden çok daha düşüktür. Erişkin kök hücre plastisitesinin klinik uygulamalarda faydalı olabilmesi için, iyi şekilde karakterize edilmiş erişkin pluripotent kök hücrelerin kolay elde edilebilir bir kaynağına gerek duyulmaktadır (Elçin, Y.M. 2003). Eğer bu çoğul potansiyel (pluripotens) özelliği, farklılaşmadan geri dönüşe neden olan ex vivo manipülasyonlar sonucunda kazanılıyorsa, bu olayların meydana gelme sıklığının ve doğruluğunun artırılabilmesi için hücre dizisi değişiminin altında yatan moleküler mekanizmaların tanımlanması gerekecektir. Cevaplanması gereken önemli bir nokta da, geri ve ileri yönde farklılaşma süreçlerinin, kontrolsüz

farklılaşmalara hatta onkojenik değişikliklere yol açabilir olup olmadığı sorusudur. Pluripotent kök hücreler gerçekten de in vivo olarak mevcutlarsa, bunların doğal ortamları, çoğalma ve farklılaşma davranışları ve hasar yerinde toplanma yetenekleri klinik kullanılabilirlikleri açısından önemli olacaktır (Elçin, Y.M. 2003).

Erişkin kök hücrelerin en önemli avantajlarından birisi hasta insanların kendilerinden toplanıp immün cevap oluşturmaksızın yine kendisi için kullanılabilmesidir. Ancak, pek çok dejeneratif hastalığın altında yatan mekanizmaların tam olarak bilinmemesi nedeniyle, benzer defektlerin kök hücrelerde de veya onlardan gelişen diğer hücre dizilerinde de bulunup bulunmadığı bilinmemektedir. Hiç şüphesiz kök hücre biyolojisinin anlaşılması ve insanlarda kök hücre tedavisinde ortaya çıkmakta olan soruları cevaplandırabilmek için daha fazla araştırmanın yürütülmesi gerekmektedir. Cevaplanması beklenen çok sayıdaki sorulara rağmen, erişkin kök hücreleri önemli avantajlar taşımaktadır. Şu an için etkili tedavileri bulunmayan hastalıklar kök hücre araştırmalarının cazibe noktasını oluşturmaktadır. “Tedavi edilemez” olarak damgalanan çok sayıdaki hastalık, gelecekte yapılacak olan kök hücre esaslı tedavilerin başlıca hedeflerini oluşturacaktır (Şahin, F. ve ark., 2005).

MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Hematopoietik olan ve olmayan kök hücreler olmak üzere kemik iliği kök hücreleri iki büyük sınıfa ayrılmaktadırlar. Hematopoietik olmayan kök hücreler, Mezenkimal kök hücreler (MKH) (ya da ilik stromal hücreleri) olarak adlandırılırlar. İlk kez Friedenstien ve ark. (1976) tarafından düşük yoğunluklu kültür ortamında gelişen kemik aspiratından fibroblastik kolonilerin oluşabildiği gözlenmiş, daha sonraları ise Pittenger ve ark. (1999), MKH’lerin ilikteki toplam çekirdekli hücrelerin çok küçük bir kısmını (%0.001-0.01’lik) oluşturduklarını bildirmiştir. Bu hücrelerin yüksek verimlilikte izole edilebildikleri ve çoğalabildikleri de bilinmektedir (Tae, S.K. ve ark., 2006). MKH’lerin in vitro ortamda kemik ve kıkırdağa farklılaşabildikleri ve transplante edilebilir oldukları da geçmişte rapor edilmiştir (Keating, A. ve ark., 1982). Ayrıca bu hücrelerin adiposit ve osteosit progenitörlerini oluşturdukları da bilinmektedir (Owen ve ark. 1988). Plastik yüzeylere bağlanabilen insan ilik aspiratının %30’unun ilik stromal hücreleri olduğu düşünülmektedir (Prockop ve ark. 1997). MKH’ler in vitro

ortamda çoğalabilmekte (Colter ve ark. 2000, Azizi ve ark. 1998, Koc ve ark. 2001) ve farklılaşmak üzere indüklenebilmektedirler. Erişkin MKH'ler in vitro ortamda gelişmekte ve kemik, kıkırdak, tendon, kas, yağ hücreleri oluşturmak üzere stimüle edilmektedirler. Bu da onları doku mühendisliği ve gen terapi uygulamalarında çekici hale getirmektedir (Elçin 2003). Bunların dışında MKH'lerin aynı zamanda miyosit ve kardiyomiyosite ve mezodermal olmayan hücrelerden hepatosit ve nöronlara da farklılaşabildikleri de gösterilmiştir (Petersen ve ark. 1999, Reyes 2001, Jiang 2002, Schwartz ve ark. 2002, Wagner ve ark. 2006). Bu nedenle, MKH'lerin çok çeşitli memeli hücre tiplerine farklılaşma özelliğinden dolayı pluripotent ya da multipotent terimleri benzer olarak kullanılmaktadır (Alhadlaq ve ark. 2004).

1.1.f.2.a. MKH İZOLASYONU VE KARAKTERİZASYONU

MKH'lerin en büyük avantajı hastalardan doğrudan alınabilmesi ve dolayısıyla oluşabilecek bir reddin ya da immün reaksiyonun oluşmamasıdır. Temel gelişim alanında ve hücre tedavisi konusunda MKH çalışmaları yapılmasına karşın bu hücrelerin hala kendi kendini yenileme mekanizmaları, çoğalmaları, multilineage farklılaşmaları net olarak bilinmemektedir ve araştırmaya açık halde beklemektedir (Kulterer ve ark. 2007). Yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır ki bu hücrelerin tedavide kullanılabilmesi için belli hücre sayılarına çoğaltılması gerekmektedir. MKH'ler genel olarak kemik iliğinden elde edilirler. Ayrıca, insan pelvis iliak krestin ya da diğer kaynak olarak kullanılan tibia ve femurlardan, ya da torasik ve lumbal omurgasından elde edilirler. İlik haricinde diğer mezenkimal potansiyele sahip kök hücre kaynakları; periosteum (Fukumoto ve ark. 2003, O'Driscoll 2006), trabeküler kemik (Nöth ve ark. 2002, Tuli ve ark. 2003), adipoz doku (De Ugarte ve ark. 2003), sinovyum (De Bari ve ark. 2001), iskelet kası (Wakitani ve ark. 1995), karaciğer (Noort ve ark. 2002) ve dişin desidüöz kısmıdır (Miura ve ark. 2003).

1.1.f.2.b. MKH TANIMLANMA YÖNTEMLERİ

Mezenkimal kök hücrelerin morfolojik açıdan fibroblastlara benzemelerine karşılık fibroblastlardan ayıran en önemli özellikleri simetrik çekirdeğe sahip olmalarıdır. MKH'lerin kültür ortamında ilikte bulunan diğer hücrelerden, makrofaj ve

plazma hücreleri gibi, ayırıcı tanısı kültür kabına yapışabilmeleridir. Bu hücreler kültür kabına tutunabilirler ve pasajlarla çoğaltılabilirler. Aynı zamanda hücre membranlarının adenozeintrifosfat(ATP) iyonları gibi hücre dışı elemanlara duyarlılık göstermemeleri yine diğer hücrelerden ayrılmasını sağlar(Alhadlaq ve ark. 2004). MKH'lerin telomer uzunlukları kısa olmasına rağmen yüksek telomeraz aktivitesine sahiptirler ve in vitro ortamdaki yüksek çoğalma kapasitelerine rağmen normal karyotiplerini ve telomeraz aktivitelerini kaybetmezler(Pittenger ve ark. 1999, Minguell ve ark. 2001). Aynı zamanda kültür ortamındaki MKH'ler yüksek düzeyde sitokin ve büyüme faktörü sentezlerler; bunlar: kök hücre faktörü (c-kit ligand), interlökin-7 (IL-7), IL-8, IL-11, transforming growth factor(TGF- β), cofilin, galectin-1, laminin-reseptörü-1, cyclophilin A, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2)'dir (Silva ve ark. 2003, Ahadlaq ve ark. 2004). MKH'lerin çok küçük bir bölümü aktif olarak çoğalma eğilimindedir, diğer büyük çoğunluğu ise hücre döngüsünün G0/ G1 fazında beklemektedirler (Conget ve ark. 1999). Çok sayıdaki pasajdan sonra, MKH'ler geniş fakat kararsız yayılma göstermektedirler. 30-40 katlanma üzerinde ise yayılma gösteremedikleri rapor edilmiştir (Bruder ve ark. 1997, Phinney ve ark. 1999). Bunun nedeni birçok faktöre bağlıdır: İliğin alınış prosedürü (Blazsek ve ark. 1999, Phinney ve ark. 1999), ilik ürünündeki mezenkimal progenitör hücreler (MPH)'lerin frekansı (1x10⁶ mononükleer hücreye karşın, 2-5 MPH), donörün yaşı ve genetik durumudur (Galotto ve ark. 1999). İleri alt-kültürler sonrasında ise, hücrelerde senesens ve apoptoz gözlenmektedir (Conget ve ark. 1999).

1.1.f.2.c. MKH YÜZEY BELİRTEÇLERİ

MKH'lerin tanımlanmasında çeşitli belirteçler kullanılmaktadır. Bunlardan, hücre yüzey antijenleri ve peptidler: CD105, CD73, CD90, STRO-1, diğer adhezyon molekülleri ve sitokin büyüme faktörü reseptörleri: CD166, CD54, CD102, CD121ab, CD123, CD124, CD49'dur. Buna karşın MKH'ler de endotelial hücre işaretçisi olan CD31, makrofaj/monosit hücre markörü olan CD14, lenfosit hücre markörü olan CD11a/LFA-1, lökosit hücre markörü olan CD45 ve diğer hematopoietik hücre markörü olan CD3, CD14, CD19, CD34, CD38, CD66b'e karşı negatiftirler (Azizi ve ark. 1998, Roche ve ark. 2006).

İşaretçi (Markör) Tipleri

Spesifik antijenler

BelirteçlerSH2, SH3, SH4, STRO-1, α -düz kas aktin, MAB1740

Sitokin ve büyüme faktörleri

Interlökinler: 1 α , 6, 7, 8, 11, 12, 14 ve 15, LIF, SCF, Flt-3 ligand, GM-CSF, G-CSF, M-CSF

Sitokin ve büyüme faktörü reseptörleri

IL-1R, IL-3R, IL-4R, IL-6R, IL-7R, LIFR, SCFR, G-CSFR, IFN γ R, TNFIR, TNFIIR, TGF-IR, TGF- β IIR, bFGFR, PDGFR, EGFR

Adhezyon molekülleri

Integrinler: α v β 3, α v β 5
Integrin zinciri: α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α v, β 1, β 3, β 4
ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1, ALCAM-1, LFA-3, L-selektin, endoglin, CD44

Ekstrasellüler matriks

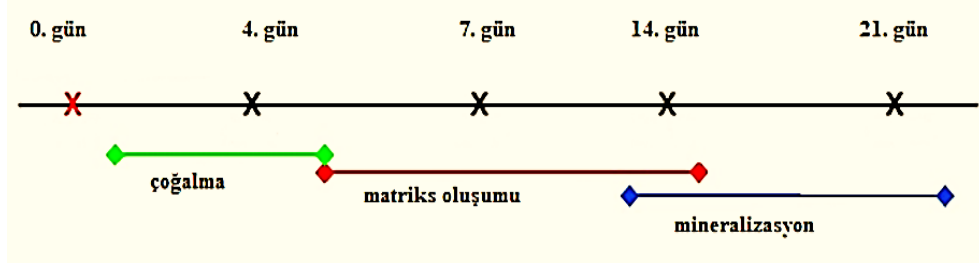
Kollajen tip I, III, IV, V ve VI, Fibronektin, laminin, hiyalüronan, proteoglikan

Tablo 1.2. Kemik iliği mezenkimal kök hücrelerinin temel özellikleri (Minguell ve ark. 2001)

1.1.f.2.d. MKH FARKLILAŞMASI**In vitro Osteojenik Farklılaşma**

MKH'lerin in vitro ortamda osteoblastlara farklılaşması tek tabaka şeklinde yayılma göstermiş hücrelerin yaklaşık olarak 2-3 hafta süreyle askorbik asit, deksametazon ve β -gliserofosfat içeren besi yerinde yaşatılması sonucu gerçekleşmektedir. Osteoblast öncülerine farklılaşan hücreler küboidal morfoloji göstermektedirler ve alkalın fosfataz, osteokalsin ve mineralize nodüller ifade ederler (Jaiswal ve ark. 1997, Dominici ve ark. 2001). Osteojenik farklılaşma için kullanılan diğer indükleyici ajanların başında kemik morfojenik proteinleri (BMP'ler) gelmektedir. Ancak BMP'ler yüksek konsantrasyonda (100 ng/ml gibi) uygulandığında alkalın fosfataz ya da kalsiyum depozisyonu indüksiyonunu engellemekte ve Msx-2 ekspresyonunu arttırmaktadırlar (Diefenderfer ve ark. 2003, Gregory ve ark. 2005). Msx-2, osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasını inhibe eden bir transkripsiyon faktörüdür. Pozitif wingless (Wnt) sinyalinin MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını

inhibe ettiği gösterilmiştir. (Boland ve ark. 2004), ancak alternatif koşullar altında indükleyici bir ajandır (Gregory ve ark. 2005).



Tablo 1.3. Osteojenik indüksiyon sonucu zamana bağlı olarak meydana gelen değişimler (Kulterer ve ark. 2007)

In vitro Kondrojenik Farklılaşma

Farklılaşmanın başlangıç safhalarında kondrositler tip I kollajen sentezlemektedirler. Olgun kondrositler ise, karakteristik olan kollajen tip II ve IX sentezlerler. TGF- β , protein kinazlar aracılığıyla (ki bunlar; hücre-dışı sinyal düzenleyici kinaz 1, p38, protein kinaz A, protein kinaz C, Jun kinaz) kondrojenezi indüklemektedir (Tuli 2003, Li ve ark. 2005). TGF- β aracılı kinaz aktivasyonu, Wnt ifadesini uyarmakta, böylece adhezyon molekülü olan N-cadherin ifadesi artmaktadır (Tuli ve ark. 2003).

In vitro Adipojenik Farklılaşma

In vitro adipojenik farklılaşma, deksametazon, izobütil metil ksantin (IBMX) ve indometasinden oluşan hormon karışımının uyarısıyla gerçekleşmektedir. IBMX protein kinaz A'nın üretiminde artışa (up-regulation) neden olmaktadır. Protein kinaz A aktivitesi, hormona duyarlı lipazın (hormone sensitive lipase, HSL) artan üretimiyle sonuçlanmaktadır. HSL, triaçilgliserolü gliserol ve serbest yağ asidine dönüştürmektedir. Indometasin, peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α/γ 'nın ligandı olarak bilinmekte olup adipogenezis için başlangıç transkripsiyon faktörü anahtarıdır (Sekiya ve ark. 2004). Wnt sinyallerinin baskılanması hücrelerin adipogenezise girmesi için gerekli olup, bu da proteozomda bulunan β -kateninin hızlı bir şekilde yıkımı vasıtasıyla, PPAR γ ile başarılmaktadır (Liu 2004). Adipogenezisin gerçekleşmesi için Wnt sinyallerinin inhibisyonu, MKH'lerce osteojenik yerine

adipojenik regülasyonun gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu durum aktive olmuş PPAR γ ve Wnt sinyali arasında bağlantı olduğunu göstermektedir; MKH'lerin kemiğe mi, yoksa yağa mı farklılaşacağını kontrolünün bu iki olaya bağlı olduğu düşünülmektedir (Khan ve ark. 2003).

In vitro Miyojenik Farklılaşma

MKH kaynaklı miyojenik farklılaşma ilk defa Wakitani et al. tarafından (1995) tanımlanmıştır. Uzun süreli kültürlerde MKH'ler, kas farklılaşma işaretçilerinden α -düz kas aktin, metavinkulin, kalponin ve miyozin ağır zincirini ifade ederler (Galmiche ve ark. 1993). Yapılan araştırmalarda ilik stromal hücreleri 5-aza ve bFGF ile muamele edilmiş, hücrelerin miyotüpler ve miyosin ürettikleri gözlenmiştir. Tomita et al. yaptığı çalışmada, 5-aza ile muamele edilmiş sıçan MKH'lerin miyotüp oluşturma yeteneğinde olduğunu ve miyokardiyal spesifik proteinlerden, kardiyak troponin I ve kardiyak miyosin ağır zincirini ifade ettiğini gözlemişlerdir (1999). Aynı zamanda Amphotericin B uygulanan kültür ortamındaki hücrelerin de aynı etkiyi gösterdikleri saptanmıştır (Prockop ve ark. 1997).

1.1.g. NOS

Nitrik oksit'in keşfedilmesinde Furchgott ve Zawadski tarafından ilk kez 1980'de endotel kökenli vazodilatasyon etkili bir madde (Endothelial Derived Relaxing Faktor, EDRF) tanımlanmıştır. NO üzerine yapılan çalışmalar daha sonraki yıllarda artmış ve organizmada birçok önemli rolü olduğu saptanmıştır. Bu nedenle 1992'de NO yılın molekülü olarak tanımlanmıştır. Bugün artık endotel kaynaklı nitrik oksidin hem deneysel çalışmalarda hem insanlarda sürekli vasküler tonusun fizyolojik düzenleyici olduğu ortaya konmuştur. Yine bugün birçok hücrede NO sentezlendiğini ve vasküler tonusun düzenlenmesinin yanı sıra bir mediatör olarak nörotransmisyon, immün direnç ve hücrel adezyonun düzenlenmesi gibi birçok fizyolojik olayda birincil görevi olduğu bilinmektedir.

Nitrik oksit renksiz bir gaz şeklinde bulunan inorganik serbest bir radikaldır. Yarı ömrü 2–10 saniyedir. Sentezlendikten kısa bir süre sonunda hemoglobinin, metilen

mavisi ve süperoksit anyonu tarafından nötrale edilerek nitrat ve nitrite dönüşür. NO düşük konsantrasyonlarda çok önemli fizyolojik işlevlerde rol almaktadır. Yarı esansiyel bir aminoasit olan L-arjinin'in terminal guanidin grubunun NOS enziminin katalize ettiği bir reaksiyon sonucu nitrik oksite çevrilmesi sonucu sentezlenmektedir. NOS izoenzimleri NOS başlıca yapısal (konstitütif) ve uyarılabilir (indüklenebilir) olmak üzere iki grup altında toplanmaktadır (Marletta MA., 1993). Yapısal NOS (cNOS, NOS1, NOS3) hücre içinde sürekli var olan ve vasküler tonus ayarlanmasında ve nörotransmisyonunda rolü olan, intermittan küçük miktarlarda nitrik oksit üretimini sağlayan enzimlerdir. Esas olarak nöronlarda (nNOS), vasküler endotel hücrelerinde (eNOS), endokard, myokard ve trombositlerde bulunur. Endotel kaynaklı eNOS (NOS-3) arteriyel ve venöz endotel hücrelerinde bulunan membrana bağlı bir enzimdir ve eNOS aktivitesi asetilkolin, bradikinin, adenosin trifosfat (ATP), elektriksel uyarı ve sıvı akımıyla uyarılabilir. Dolaşımın düzenlenmesinde, trombositlerin ve polimorf çekirdekli lökositlerin damar lümeniyle olan etkileşiminde görev alır.). Uyarılabilen NOS (iNOS, NOS-2) fonksiyonel olarak Ca^{+2} bağımsızdır. Endotel hücrelerinden başka, özellikle düz kas hücreleri ve makrofajlarda bulunmaktadır. Makrofajların, nötrofillerin, mast hücrelerinin ve vasküler düz kas hücrelerinin sitokinlerle uyarılmasından sonra NOS'un gen tanımlaması başlayarak belirli bir sürede NOS sentez edilir ve hücrede nanomol gibi büyük miktarda NO sentezi yapabilir. Makrofajların aktivasyonu ile sentezlenen NO'nun başlıca makrofajlarda bulunmasına rağmen, vasküler düz kas hücreleri, renal tübül hücreleri, kupffer hücreleri, endotel hücreleri, monosit ve polimorf nüveli lökositlerde tespit edilmiştir. Makrofajlar dışındaki hücrelerde iNOS aktivitesinin rolü yeterince bilinmemektedir. Ancak endotelde bulunan iNOS konjestif kalp yetmezliği gibi artmış sitokinlerin bulunduğu durumlarda önemli olabilir. Sitotoksik rol oynarak immün cevapta, antimikrobiyal ve antineoplastik aktivitesinde önemlidir (Marletta MA. 1993).

NOS protein ve aktivitesi insan ve ratların overlerinde tesbit edilmiştir (Ding W, 2012. Zick B, 2012). Enfeksiyon ve inflamasyona yanıt olarak NO biyosentezi folikül stabilite ve fonksiyonunda bozulmaya neden olabilmektedir. Nitrik oksitle fertilizasyon

yeteneği arasında bir ilişki olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. NO sperm ile ovum arasındaki ilişkide de rol oynar.

eNOS ve iNOS over temel olarak bulunur ve damar tonusunun fizyolojik düzenlenmesine katkıda bulunmak için intraselüler Ca artışının için aktive edilir. Mononükleer ve polinükleer inflamatuvar hücrelerde de iNOS tanımlaması gözlenmiştir. İnflamatuvar hücreler tarafından üretilen birkaç sitokin NO'ı düşündürür ve germ hücreleri üzerine etki gösterir. (Koji Shiraishi ve ark. 2001). Oksidatif stresin artması durumunda oosit fonksiyonu bozulur. Çünkü folikül hücreleri ve diğer hücre tipleri oosit ile parakrin ilişki içindedirler. Oksidatif stres direk ya da indirek olarak etki gösterir.

1.1.h. STRO1A

Sıçan IgM monoklonal antikor STRO-1, insan kemik iliği stromal kök hücreleri tarafından salgılanan bir hücre yüzey antijenini tanımlar. Stro-1 antikorı MKH' lerinin alt popülasyonu olan CD 34⁺ hücrelere bağlanmaktadır. STRO-1 hematopoetik öncül hücrelere bağlanmaz. Yapılan alışmalarda STRO-1 in T hücreleri, B hücreleri, miyeloid hücreler, makrofajlar ya da megakaryositler gibi hücrelere de bağlanmadığı bildirilmiştir (Paul J. Simmons ve Beverly Torok-Storb, 1991). Kemik iliği kaynaklı STRO-1⁺ mezenkimal kök hücreler adipositlere, kondrositlere ve osteoblastlara farklılaşma yeteneğine sahip hücrelerdir (Yi Shen ve ark. 2012). Mezenkimal kök hücrelerin tamamen saf ilkin soyları STRO-1 i de içeren birçok yüzey antijenini eksprese ederler. Mezenkimal kök hücrelerin fenotipini tanımlarken, STRO-1, CD105/endoglin, integrin alpha 1, nerve growth faktör reseptörü (NGFR) gibi yüzey reseptörlerinin ekspresyonuna bakılmasının yanı sıra hematopoetik olanlardan ayırmak içinse, CD45, CD34, CD14 ya da CD19 ve HLA-DR yüzey moleküllerinin de eksprese edilmemesi gerekmektedir. (Simmons PJ ve Torok-Storb B., 1991, Barry FP. ve ark., 1999, Deschaseaux F ve Charbord P. 2000, Quirici N, ve ark. 2002).

1.2. AMAÇ

Ovaryumlar; Dişi cins hücrelerini üretirler (oogenezis) ve steroid hormonları (östrojen ve progesteron) salgırlarlar (steroidogenezis). Ovaryumlardan salgılanan steroidler, cins hücrelerinin gelişip olgunlaşmasını, sekonder cins organları ve meme bezlerinin gelişme ve büyümesini kontrol ederken gebeliğin kontrolünden de sorumludurlar.

Kök hücreler, kendilerini yenileme, rejenere etme ve fonksiyonel olarak farklılaşmış hücreleri oluşturabilme kapasitesine sahip hücrelerdir (Li L ve Xie T, 2005). İlik stromal kök hücreleri, doku kültür plastiklerine yapışma eğilimleriyle ilikteki diğer hücrelerden ayrılabilirler ve bu hücrelerin, hücre ve gen tedavisi için potansiyel olarak kullanışlı olan bir çok özellikleri vardır. Bu hücreler mezenşimal kökenli olup (Prockop DJ, 1997) osteoblastlara, kondrositlere, adipositlere, myoblastlara (Prockop DJ, 1997; Pittenger MF ve ark., 1999), ve tendon gibi dokulardaki hücrelere farklılaşma potansiyelinde olan multipotent hücrelerdir (Pittenger MF ve ark., 1999). Transplantasyon tedavilerinin etkinliğinin yanı sıra buralarda kök hücre yönlendirilmesi ile verilecek desteğin önemli olduğu bilinmektedir. IVF çalışmalarında kök hücreler germ hücresi üretmek dışında bir uygulama düşünülmemiş kök hücrelerin buluşturuldukları niş ortamının klinik uygulamalar için kullanılmamıştır. Oysaki özellikle erişkin kemik iliğinden kök hücre toplanması, kültüre edilmesi ve çoğaltılması günümüzde var olan teknoloji ile son derece basit bir uygulamadır. Birçok farklı kök hücre elde edilebilmesine karşın erişkin kemik iliği kök hücresi her türlü hücreye dönüşebilen, ideal mikroçevre oluşturabilen ve kültür ortamında hızla çoğalabilen bir hücre grubudur. Over dokusunda yara oluşturularak deneysel bir model yapılması ve hücrelerin bu ortamda deneysel olarak yapacağı davranış değişiklikleri bugüne kadar araştırılmamıştır. Bu çalışmada alınacak sonuçlar ile kök hücrenin germ hücre farklılaşması ve oosit maturasyonu daha iyi anlaşılacak ve eğer fertilizasyona olan başarısı ortaya konursa klinikte rahatlıkla kullanılabilecek bir uygulama olacaktır.

Bu çalışmanın amacı sıçan overlerinde aspirasyon biyopsisi ile oluşan travmatik etkiye karşı kök hücrelerin iyileştirici etkilerinin araştırılmak ve over dışı kök hücrelerin over dokusu içindeki davranışlarını tanımlayarak overyan kanserlerde, PCOS, overyan

yetmezlik gibi durumlarda, gelişmekte olan dünya ile artan infertilite vakalarına kök hücrelerin ışığı altında çözüm üretmeye çalışmaktır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji dalında ve Eskişehir Üniversitesi Deney Hayvanları Etik kuralları çerçevesinde gerçekleştirilmiştir. Araştırmada 200-250 gr ağırlığında, Ege Üniversitesi Deney Hayvanları laboratuvarından alınan erişkin Wistar dişi sıçanlar kullanılmıştır. Denekler optimum şartlarda (21,5 °C de 12 saatlik karanlık-aydınlık döngüde yaşatılmıştır. Optimum şartlarda yaşatılan erişkin dişi sıçanlardan vajinal yayma yöntemiyle östrus siklusunun pro östrus döneminde olan hayvanlar, folikül sayılarının en az olduğu dönemlerinde deneylerde kullanılmıştır. Sıçanlardan vaginal yayma preperatı, yayma fırçaları ile vaginal sürüntü yapılarak alınmıştır. Alınan sürüntü lama düzgün bir şekilde yayılarak metanol ile 5 dk. süreyle tespit edilmiş ardından Giemsa boyası ile 10 dakika boyanmıştır. Musluk suyu ile yıkanan örnekler kurumaya bırakılmış daha sonra, lamel ile kapatılarak, mikroskop altında incelenerek östrus grupların ayrılması sağlanmıştır. Yaymanın parlak renkte olduğu, intermedier hücrelerin yoğun, parabazal hücrelerin ve mukusun nadir olduğu, lökositlerin gözlenmediği preperatlar proöstrus grubu olarak belirlenmiştir.

Yakın akraba olan hayvanlardan alınan kök hücreler farklılaştırılarak PPD enjektör yardımı ile yakın akraba kemik iliği stromal kök hücrelerin (KİSKH) izolasyonu için 10 mg/kg ksilazin+ 50 mg/kg ketamin anestezisi altında, sağ bacağı antiseptik solüsyon ile temizlendikten sonra, sağ tibia eklem yerlerinden ayrılarak çıkarılmıştır. Steril kabin içinde tekrar alkole batırılan tibia epifizlerinden kesilerek basınçla uygulanan medium ile alınan hücreler kültür işlemine alınmıştır. Hücreler farklı medyumlara alınıp falkon tüpleri ile 350 g'de 10 dakika iki defa santrifüjle temizlendikten sonra her bir 35 mm kapta aynı sayıda olmak üzere % 80 alpha mem medyum ve %20 fetal buzağı serumu (FBS) olan karışım içinde %5'lik CO₂'li etüve koyularak inkübasyona bırakılmıştır. KİSKH için 3 günlük beklemenin sonunda yapışmayan hücreler uzaklaştırılarak kapta kalan hücrelerin kültürüne devam edilmiş bir grup hücre farklılaştırma medyumunda farklılaştırılırken bir grup hücre pasajlanarak yaşlanması izlenmiştir. Semikonfluent aşamada faz contrast mikroskop ile en iyi

olgulařan ve en uygun oldukları dűřűnűlen medyumdaki hűcreler hayvanlara transplante edilmiřtir. Bir grup hűcre in vivo yařantısını takip amaçlı iřaretlenerek transplante edilmiř ve in vivo olarak incelenmiřtir. Hayvan gruplarının overleri belirli gűnlerde çıkarılarak parafin doku takibinden sonra imműnohistokimyasal boyamalar yapılarak hűcrelerin akıbeti hakkında bilgi sahibi olmaya çalıřılmıřtır.

Tablo 2.1. Deneyde oluşturulan çalışma grupları.

1. Gűn	3. Gűn	7. gűn	14. gűn	28. gűn
Kontrol grubu	Kontrol grubu	Kontrol grubu	Kontrol grubu	Kontrol grubu
Yara grubu	Yara grubu	Yara grubu	Yara grubu	Yara grubu
Besi yeri grubu (sham grubu)	Besi yeri grubu (sham grubu)	Besi yeri grubu (sham grubu)	Besi yeri grubu (sham grubu)	Besi yeri grubu (sham grubu)
Kűk hűcre grubu	Kűk hűcre grubu	Kűk hűcre grubu	Kűk hűcre grubu	Kűk hűcre grubu

2.1. Kemik ilięi stromal kűk hűcre kűltűrű

Sıçanın tibiasından alınan kemik ilięi hűcreleri ayırđırtmayı takiben 25 cm²' lik hűcre kűltűr kabı içinde kűltűr medyumuna (KM) alınarak 37⁰C' de ve %5 CO₂ kořulunda inkűbe edildi (HeraCell, Kendro Laboratory, Almanya).  gűn sonra, hematopoietik hűcreler ve yűzeye tutunmayan hűcreler besi ortamının alınması ile uzaklařtırıldı ve hűcre kűltűr kabının yűzeyine tutunmuř olan hűcrelerdeki kűltűr kaplarına Kűk hűcre medyumunu ilave edildi. Bu primer kűltűrlerden hűcrelerin űremesi morfolojik olarak faz kontrast atamanlı inverted mikroskopta (CK40-F200, Olympus, Japonya) incelendi ve mikrofotografi ile gűrűntűlendi. Hűcrelerin űremesine gűre 2–3 gűnde bir hűcrelerin kűltűr ortamı deęiřtirildi. Bu ortam deęiřikliklerinden sonra kűltűr kabının yűzeyine yapıřan hűcreler KİSKH' leri olarak kabul edildi. (Gebhart ve Lane 1991, Gerszten ve ark. 2000).

2.2. KİSKH'nin farklılaştırılması

Primer kemik ilięi kűltűrű yapılarak elde edilen hűcreler uygun farklılařtırma medyumunu kullanarak 25 cm²' lik hűcre kűltűr kabı içersinde 37⁰C' de ve %5 CO₂ kořulunda inkűbe edildi. Hűcrelerin űremesine gűre 2–3 gűnde bir hűcrelerin kűltűr

ortamı değiştirildi. Hücrelerin farklılaşmalarını kontrol etmek için uygun yüzey belirteçleri ile boyanarak analiz edildiler.

2.3. Yara oluşturulması

Hayvanların karın bölgeleri cerrahi operasyonla açılarak, overlerine ppt enjektör yardımı ile farklılaşmış ve farklılaşmamış hücre içeren medyumlar ve hiç hücre içermeyen medyum over yüzeyinden girilerek bırakma koşulu ile yara hasarı oluşturuldu, hayvanların karnı dikilerek yaşatıldılar. Deneysel zaman geldiğinde overler çıkarılarak % 10 luk formalin solüsyonu içerisinde fikse edilerek parafin doku takibi yapıldı.

2.4. Hücre transplantasyonu

Sıçanın tibiasından elde edilen kemik iliği stromal kök hücreleri 25 cm²' lik hücre kültür kabında besi vasatı içerisinde 37°C' de ve %5 CO₂ koşulunda inkübe edilerek konfluent hale geldiğinde 4. Pasaja kadar pasajlandı. Son günlerde Karaöz ve ark. yaptıkları çalışmalarda hücre karakterini tam anlamıyla kazanıldığı anın 4. Pasaj olduğunu savunmaktadırlar. Bizde bu çalışmaları baz alarak hücrelerimizi 4. Pasaja kadar beklettik ve 4. Pasaja geldiğinde petri kabından hücrelerimizi toplayarak santrifüj ettik. Santrifüj tüpünde dipte kalan hücrelerimizi 45x10⁶/ ml olacak şekilde dilüe ederek ppt enjektörleri içerisine besi yeriyle birlikte aldık. Hücreli gruplara 200 µl gelecek şekilde overlerine enjeksiyonu gerçekleştirdik. Hayvanlar anestezi altındayken steril koşullarda batın açılmak suretiyle kesildi ve penset yardımıyla overleri bulunarak enjeksiyon gerçekleştirildikten sonra steril ipek ameliyat iplikleriyle dikilmek suretiyle hayvanlar uygun koşullarda planlanan sürelerde yaşatıldı.

2.5. Doku takibi ve Parafin bloklama

Tespit edilen örnekler, bohçalama yöntemiyle etiketlenerek bohçalanmış fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra dehidratasyon amacıyla 30'ar dakika % 60'dan % 95'e artan etil alkol serilerinden geçirilmiştir. %100 lük alkol içerisinde 50 dakika süre ile bekletildikten sonra, ardından 30 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 40'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu ve 60°C'lik etüv içerisinde 30 dakika 1:1

oranında ksilen-parafin uygulanıp 40'ar dakika parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra parafin bloklar içerisine gömüldüler.

Tablo 2.2. Parafin bloklama protokolü.

A. TESPİT	% 10 FORMALİN	24-48 SAAT
	AKAR SU	16 SAAT
B. DEHİDRATASYON	% 60 ALKOL	½ SAAT
	% 70 ALKOL	½ SAAT
	% 80 ALKOL	½ SAAT
	% 95 ALKOL	½ SAAT
	% 100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
	% 100 ABSOLÜ ALKOL	1 SAAT
C. ŞEFFAFLAŞTIRMA	ALKOL:KSİLEN (1:1)	½ SAAT
	KSİLEN I	1 SAAT
	KSİLEN II	1 SAAT
D. İNFİLTRASYON (60°C ETÜVDE)	KSİLEN-PARAFİN (1:1)	½ SAAT
	PARAFİN I	1 SAAT
	PARAFİN II	1 SAAT
E. GÖMME	PARAFİN	

2.6. Hematoksilen-eosin boyaması

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkanadı. 2 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile

boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akar suda yıkanan kesitler 30 saniye eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandılar. Aynı şekilde 5 dakika akarsu altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95’lik alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30’ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatılmıştır.

Tablo 2.3. Hematoksilen-eosin boyama protokolü.

DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN I	30 DAKİKA
	KSİLEN II	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA
	% 60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	% 80 ALKOL	1 DAKİKA
	% 95 ALKOL	1 DAKİKA
KURUTMA	HAVADA	
	KSİLEN	60 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	

2.7. İndirekt immünohistokimya boyaması

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°'lık etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından % 95'ten % 60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dakopen (IM3580, Immunotech, France) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu (TA-125-UB, Lab Vision, Fremont, CA) ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar STRO 1A, E-nos ve İ-nos ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco,USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solusyonu solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyummu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirme incelenerek zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirilmiştir.

Tablo 2.4. İmmünohistokimyasal boyama protokolü.

REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA
	% 60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	FOSFAT TAMPON SOLÜSYONU (PBS)	10 DAKİKA
HAVUZCUK OLUŞTURMA	DAKO PEN	
	TRİPSİN 37°C etüvde	10 DAKİKA

YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
PEROKSİDAZ BLOK	% 3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BLOKLAMA	Non-immün bloklama solüsyonu	1 SAAT
PRİMER ANTİKORLAR	S-TRO A1, e-NOS, i-NOS	18 SAAT (+4°C nemli ortamda)
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
SEKONDER ANTİKOR	BIYOTİNLE İŞARETLİ SEKONDER ANTİKOR	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
	STREPTAVİDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BOYAMA	DAB (Diamino benzidine)	10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	
İNCELEME	OLYMPUS MARKA IŞIK MİKROSKOBU	

2.8. TUNEL immünohistokimyası

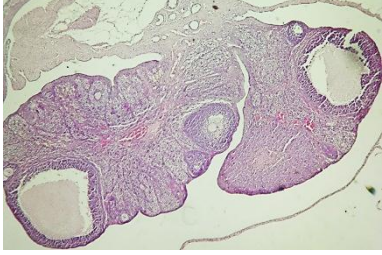
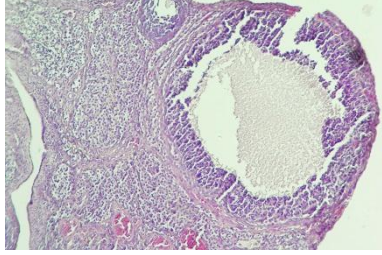
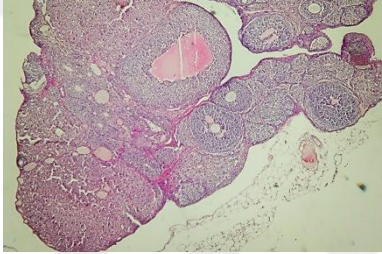
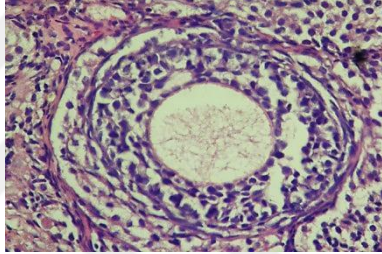
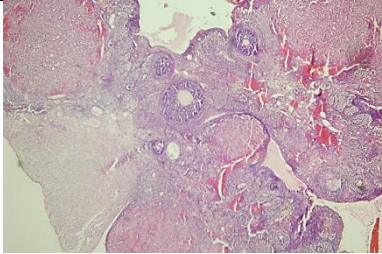
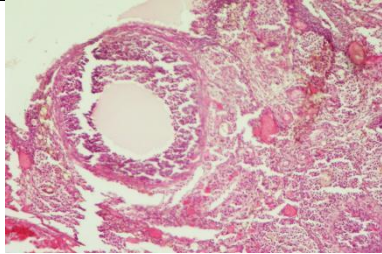
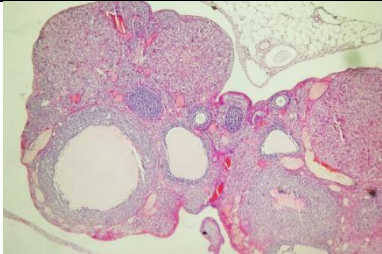
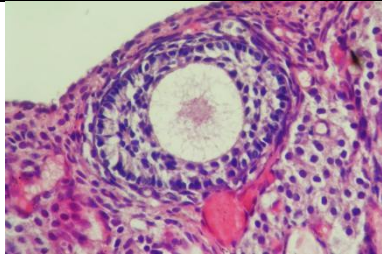
TUNEL Yöntemi İle apoptotik hücre ölümünün belirlenmesinde DeadEnd Colorimetric TUNEL system, Promega G7130 kiti kullanılarak 5 µm kalınlığındaki parafin bloklardan alınmış kesitlere uygulandı. Kesitler 1 gece 60°C'lik etüvde ısı ile deparafinize edildi. Ardından 1 saat ksilen ile kimyasal deparafinize edildi. Azalan alkol serileri ile 2'şer dakika (%95, %80, %70, %60) rehidratasyon uygulandıktan sonra

dokular serum fizyolojik ile oda ısısında 5 dakika (%0.85 NaCl) muamele edildi. Deparafinizasyon işlemi yapılan kesitler önce DNA tespiti için proteinaz K ile 37° nemli ortamda 30 dk. inkübe edildi. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitler DNA kırıklarının analizi için TDt (terminal deoxynucleotidyl transferase)enzimi ile 37° nemli ortamda 60 dk. muamele edildi.kontrol pozitif kesitler üzeri cover slip ile kaplandı. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitler konverter ile ışık mikroskobu ile görülebilir duruma getirildi. Fosfat tamponu (PBS) ile yıkanan kesitler kesitler İmmünoreaktivitenin görünür hale gelebilmesi için DAB (Diaminobenzidine Kromojen, DAB Kit,) uygulanan kesitler, Mayer's hematoksilin ile artalan boyaması yapılarak alkolden geçirilip, ksilen ile şeffaflaştırma yapılarak entellan ile kapatıldı. İmmunohistokimyasal değerlendirmede preperatlara boyanın yoğunluğu ve dağılımına göre + (1), ++ (2), +++ (3) olarak körlemesine semi-kantitatif puanlama yapılacaktır. Ortalamalar istatistiksel olarak değerlendirilecek.

Tablo 2.5. Tunel immünohistokimyası boyama protokolü.

DEPARAFİNİZASYON	60°C etüvde	1 GECE
	KSİLEN I	30 DAKİKA
DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN II	30 DAKİKA
	%80 ALKOL	2 DAKİKA
	%70 ALKOL	2 DAKİKA
	%60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	FOSFAT TAMPON SOLÜSYONU (PBS)	10 DAKİKA
	PROTEİNAZ K	30 DAKİKA
	PBS	3×5 DAKİKA
	TDt ENZİM	60 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BOYAMA	DAB (Diamino benzidine)	10 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA

2.9. Patolojik Degerlendirme

X40	H-E	X400
		
Grade 1 Normal veya minimal Ödem, hafif konjesyon, hemoraji yok, lökosit yok		
		
Grade 2 Orta ödem, orta konjesyon, hemoraji yok, lökosit yok		
		
Grade 3 Ağır ödem, ağır konjesyon, hafif hemoraji, minimal lökosit		
		
Grade 4 Ağır ödem, ağır konjesyon, hemoraji var, lökosit var		



Şekil 2.1. Overin patolojik skorlamada kullanılmak üzere örnek histolojik görüntüleri.

20 adet fareden alınan over ve uterusu ait örnekler %10'luk nötral formalin solusyonunda fikse edildikten sonra parafine gömüldü. Leica RM 2155 marka Mikrotom ile 5 mikrometre kalınlığında alınan over kesitleri hematoxilen ve eozin ile boyandı. Overlerden elde edilen kesitler mikroskop ile histolojik açıdan interstisyel ödem, vasküler dilatasyon, hemoraji ve polimorfnükleer lökosit infiltrasyonu açısından değerlendirildi. İzlenen değişiklikler Tablo 2.1'de gösterildiği şekilde gradelere ayrıldı. Her overe ait en geniş çaplı hematoxilen ve eozin (H&E) boyalı doku kesiti üzerinde mikroskopik inceleme ile matür foliküller sayıldı.

2.10. Folikül Sayılarının Tespiti

Isık mikroskobu ile her hayvana ait en geniş ovaryum kesitinde foliküller sayıldı. Kesitlerde tek katlı yassı folikül hücreleri bulunan foliküller primordiyal folikül, tek katlı kübik folikül hücreleri bulunan foliküller primer folikül, iki veya daha çok katlı folikül hücreleri bulunan ve folikül hücreleri arasında antral boşluk bulunmayan foliküller sekonder folikül, çok katlı folikül hücreleri arasında antral boşluk bulunan foliküller antral folikül olarak değerlendirildi. Ayrıca ovaryumlarda bulunan korpus luteum ve folikül kistlerinin sayımı yapıldı.

2.11. İstatistiksel Analiz

Vücut ağırlığı, uterus, ovaryum ağırlığı ve primordiyal, primer, sekunder foliküller, korpus luteum ve folikül kist sayıları ile TUNEL ile boyanmış primordiyal, primer, sekonder foliküller, korpus luteum ve kistteki apoptoz gösteren hücre sayıları Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırıldı. Gruplar arasında fark belirlendiğinde hangi

gruplar arasında fark olduğunu anlamak içinde Mann-Whitney U testi kullanıldı. Antral folikül sayıları ve antral foliküldeki TUNEL ile boyanmış apoptoz gösteren hücrelerin sayısı tek yönlü varyans analizi kullanılarak karşılaştırıldı. Gruplar arasında fark belirlendiğinde hangi gruplar arasında fark olduğunu anlamak için Tukey HSD testi ile karşılaştırıldı. AMH ve kaspaz-3 yoğunluğu crosstabs testi ile karşılaştırıldı. Tüm testler ESOGÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalında yapıldı.

Verilerin kaydedilmesi ve istatistiksel değerlendirmeler için Graphpad programından yararlanıldı. Gruplar arası farklılığın araştırılmasında Kruskal Wallis varyans analizi kullanıldı. Anlamlı bulunması üzerine post hoc ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmesi yapılarak Mann-Whitney U testi kullanıldı. Ayrıca Ki-kare analizi yapıp, bu analizde likelihood ratio değeri kullanıldı. Değiskenlerin tanımlayıcı istatistikleri için minimum, maksimum ve medyan değeri verildi. Sonuçlar %95 güven aralığında değerlendirdi. Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık sınırı $p < 0.05$ değeri olarak kabul edildi.

3.BULGULAR

3.1. Histokimyasal boyama değerlendirmeleri

KH etkilerini anlamak üzere yapılan deneylerde kontrol grubu (KG), sham grubu (SG), besi yeri grubu (BYG) ve kemik iliği mezenkimal kök hücre grubu (KİMKHG) örneklerinde deney hayvanlarında 1, 3, 7, 14 ve 28 günlerde ağırlık, genel durum ve enfeksiyon açısından herhangi bir farklılık gözlenmedi. Ölen veya başka bir sebepten çalışmadan çıkarılan denek olmadı.

KG ile karşılaştırıldığında SG ve BYG artmış hasar ve damarlanma görüldü. Hasarlı örnekleri incelendiğinde 3 ile 7 günlük denekler arasında belirgin farklar görülmezken, 1-3 ve 14-28 günlük denekler arasında belirgin farklar gözlemlendi. 28 günlük deneklerde over hasarının tamamen gerilediği ve iyileştiği saptandı. Bu nedenle 1, 3, 7 ve 14 günlük denekler arasındaki sonuçlar karşılaştırılmalı olarak incelendi.

KHG veya SG Overlerinde hasar ve sonrasında kök hücre uygulaması sonucu görülen histolojik değişiklikler incelendiğinde kontrol grubundaki overler (n=5) ile karşılaştırıldığında sham grubu SG (n=5) yara grubunda oldukça anlamlı ($p<0,001$) bozulan histopatolojik skorlama kök hücre uygulanan grubunda anlamlı ($p<0,05$) olumlu etkiler gözlemlendi.

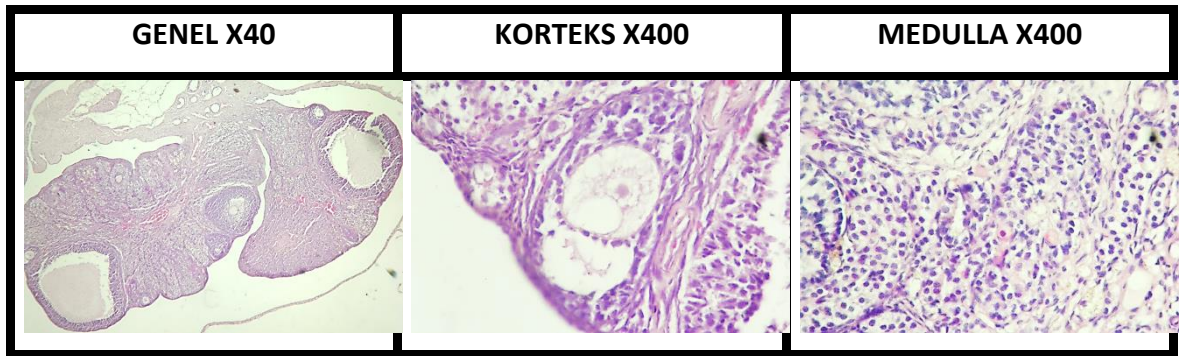
Tüm gruplar ödem, kanama, konjesyon ve kohezyon kaybı açısından bulguların şiddetine göre **Şekil 2.1** üzerine skorlaması yapılarak değerlendirildi.

3.1.1. Birinci gün örnekleri

Kontrol grubu

KG' daki sıçanların ovaryumundan elde edilen ve H-E ile boyanmış kesitleri incelediğimizde organın dışında tek katlı kübik epitel ile epitelin altında ise yoğun olarak bağ dokusu lifleri ve hücrelerinden oluşan tunika albuginea görüldü. Ovaryum kesitlerinde iki bölge ayırt edildi. Ovaryumda tunika albuginea altında yer alan korteks bölgesinde, çeşitli sayı ve tipte foliküllerin olduğu gözlemlendi. Foliküllerin arasında stromada yer alan hücreler gruplar halinde oval şekilli, büyük nükleuslu ve sitoplazmaları bazofilikti. Foliküllerin etrafında ayrıca düz kas demetleri ve bağ dokusu lifleri görüldü. Kortekste damar kesitlerine az sayıda rastlandı. Ovaryum korteksinde

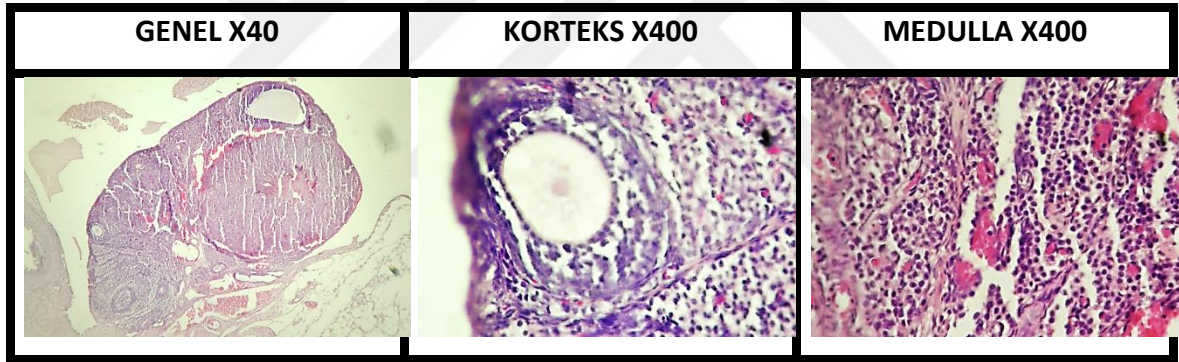
çok sayıda primordiyal folikül gözlemlendi. Primordiyal foliküllerde içte oosit ve oositin çevresinde tek katlı yassı granuloza hücreleri yer almıştı. Oosit büyük ökromatik bir nükleusa sahip olup nükleolusu belirgindi. Primer foliküllerde oosit çevresinde tek katlı kübik şekilli granuloza hücreleri gözlemlendi. Oosit ile granuloza hücreleri arasında zona pellusida oluşmaya başlamıştı. Sekonder foliküllerde oositin etrafında çok katlı epitel görünümündeki granuloza hücreleri ile oosit ve granuloza hücreleri arasında zona pellusida belirgin olarak gözlemlendi. Sekonder foliküllerde granuloza hücreleri dışında teka folikülü oluşmaya başladığı görüldü. Antral foliküllerde çok tabakalı granuloza hücreleri arasında düzensiz boşluklar vardı. Bazı antral foliküllerde boşluklar birleşerek antrum oluşturmuştu. Ayrıca antrumun iç kısımlarına doğru oosit ve granuloza hücrelerinin birlikte kümülüs ooforusu şekillendirmişti(Şekil 3.1.1.A).. Bu foliküllerde zona pellusida oldukça belirgindi. Folikülü dıştan saran teka folikülü iki tabakalı olarak gözlemlendi. Teka internada fibroblastlar, küçük kas demetleri ve kan damarları görüldü. Teka eksternada ise düz kas demetleri ile birlikte kollajen lifleride gözlemlendi. Kortekste ayrıca korpus luteum ve içi sıvı ile dolu bir boşluğu olan iki üç sıralı granuloza hücrelerinin çevrelediği folikül kistleri gözlemlendi. Korpus luteumun orta kısımlarında büyük ökromatik nükleuslu ve sitoplazmaları açık renkte boyanmış hücreler ile kenar kısımlarında ise daha küçük hücreler gözlemlendi. Ayrıca korpus luteumun orta kısımlarında kan damarları da yer almaktaydı. Ovaryumun medullasında kortekse göre daha az sayıda hücre olmasına karşın damarlanmanın fazla olduğu görüldü. Medulladaki hücrelerin nükleusları merkezde olup sitoplazmaları ise bazofilik boyanmıştı. Ayrıca bağ dokusu hücreleri de görüldü. Bununla birlikte medulladaki lif ve kas demetleri de kortekse göre daha belirgin olarak gözlemlendi(Şekil 3.1.1.A).



Şekil 3.1.1.A. Birinci gün örnekleri KG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Yara grubu

Ppd enjektörü yardımı ile yara oluşturulan sıçanlardan elde edilen, bir günlük örneklerden elde edilen, H-E boyası ile boyanan ovaryum kesitlerinin yapısal özellikleri kontrol grubu ile benzerlik gösterdi. Ovaryumun dışında tek katlı kübik germinal epitel ve altında tunika albuginea yara yerinin dışındaki tüm alanlarda yer almıştı. Ovaryum korteksinde bulunan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin yapısı ve sayıları kontrol grubuyla benzerdi. Foliküllerin içerisinde bulunan oosit normal yapıda olup büyük nükleuslu ve nükleolusu belirgin halde gözlendi. Oositin etrafını saran granüloza hücreleri ve teka tabakalarında dejenerasyon gözlenmedi(**Sekil 3.1.1.B**). Ovaryum medullasında kortekse göre daha büyük kan damarları ve artan lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlenmezken hücreler arasında hafif ödem ve kanamanın olduğu gözlemlendi(**Sekil 3.1.1.B**).

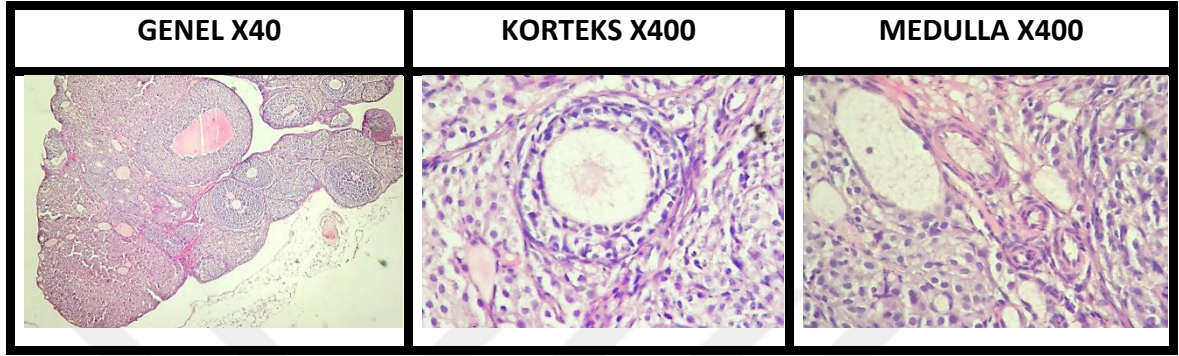


Şekil 3.1.1.B. Birinci gün örnekleri YG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Sham grubu

Besi yeri uygulanmış SG sıçanlardan elde edilen H-E ile boyanan ovaryum kesitlerinin genel yapısal özellikler kontrol grubu ile benzerlik gösterdi. Ovaryumun yüzeyinde tek katlı kübik germinal epitel ve altında tunika albuginea yara alanı dışındaki alanlarda yer almıştı. Ovaryum korteksinde yer alan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin yapısı ve sayıları KG ile benzerdi. Foliküllerin içerisinde bulunan oosit normal yapıda olup büyük nükleuslu ve nükleolusu belirgin halde gözlendi ve zona pellucidası normal yapısındaydı. Oositin etrafını saran granüloza hücreleri ve teka tabakalarında dejenerasyon gözlenmedi. Ovaryum medullasında kortekse kanlanmanın

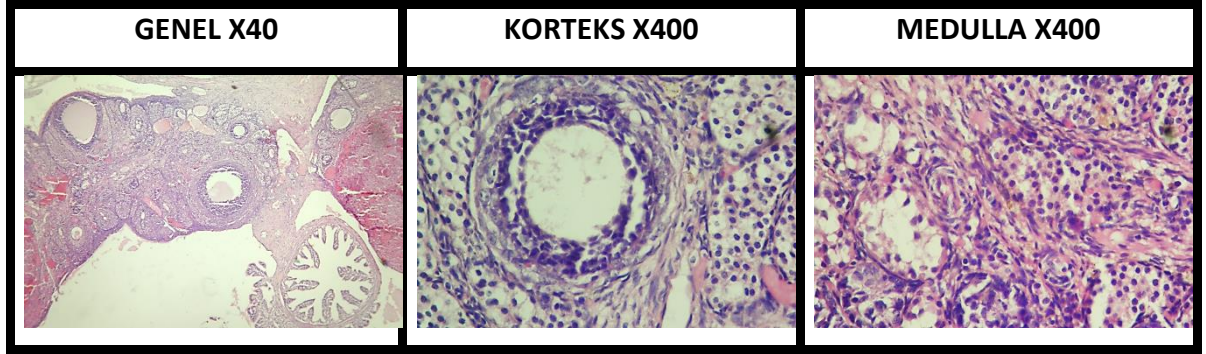
fazlalığı ve genişlemiş kan damarları ve daha çok lif yapıları görülürken, damarlar arasında ödemin olduğu fark edildi. Medullada bulunan stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlenmezken hücreler arasında ödem ve kan hücrelerinin varlığı gözlemlendi (Şekil 3.1.1.C).



Şekil 3.1.1.C. Birinci gün örnekleri SG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Kök hücre grubu

Kök hücre uygulanmış sıçanlardan elde edilen KHG örneklerinin H-E boyası ile boyanan ovaryum kesitlerinin yapısal özellikler kontrol grubu ile benzerlik gösterirdi korteks ve medulla kısımları ayırt edildi. Ovaryumun yüzeyinde tek katlı kübik germinal epitel ve altında tunika albuginea yer almıştı. Korteks kısmında bulunan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin yapısı ve sayıları kontrol grubuyla benzerdi. Foliküllerin içerisinde bulunan oosit normal yapıda olup büyük nükleuslu ve nükleolusu belirgin halde gözlemlendi. Oositin etrafını saran granüloza hücreleri ve teka tabakalarında tespit edildi ve dejenerasyon gözlenmedi. Medullada kortekse göre daha büyük kan damarları ve artmış lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücreler arasında küçük çekirdekli, küçük ve eosinofilik sitoplazmalı hücre gruplarının varlığı gözlemlenirken stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlenmedi fakat stromal hücreler arasında ödem ve kanlanma olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1.1.D).



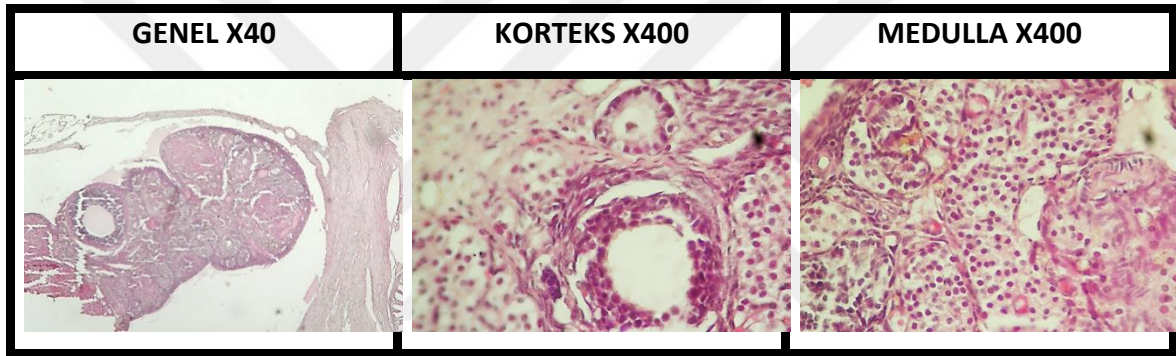
Şekil 3.1.1.D. Birinci gün örnekleri KHG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

3.1.2. Üçüncü gün örnekleri

Kontrol grubu

Üçüncü gün KG'daki sıçanlardan alınan H-E ile boyanan ovaryum kesitleri incelendiğinde, organın yüzeyinde tek katlı kübik epitel ile epitelin altında yoğun olarak bağ dokusu lifleri ve hücrelerinden oluşan tunika albuginea görüldü. Ovaryum kesitlerinin genel görüntüsünde korteks ve medulla ayırt edildi. Tunika albuginea altında yer alan korteks bölgesinde, çeşitli sayı ve tipte foliküllerin olduğu gözlemlendi. Foliküllerin arasında stromada yer alan hücreler gruplar halinde oval şekilli, büyük nükleuslu ve sitoplazmaları bazofilikti. Foliküllerin etrafında ayrıca düz kas demetleri ve bağ dokusu lifleri görüldü. Kortekste damar kesitlerine az sayıda rastlandı. Korteks içerisinde çok sayıda primordiyal folikül gözlemlendi. Primordiyal foliküllerde içte oosit ve oositin çevresinde tek katlı yassı granüloza hücreleri yer almıştı. Oosit büyük ökromatik bir nükleusa sahip olup nükleolusu belirgindi. Primer foliküllerde oosit çevresinde tek katlı kübik şekilli granüloza hücreleri gözlemlendi. Oosit ile granüloza hücreleri arasında zona pellusida oluşmaya başlamıştı. Sekonder foliküllerde oositin etrafında çok katlı epitel görünümündeki granüloza hücreleri ile oosit ve granüloza hücreleri arasında zona pellusida belirgin olarak gözlemlendi. Sekonder foliküllerde granüloza hücreleri dışında teka folikülünün oluşmaya başladığı görüldü. Antral foliküllerde çok tabakalı granüloza hücreleri arasında düzensiz boşluklar vardı ve bazılarında antrum oluşumu tamamlanmıştı. Ayrıca antrumun iç kısımlarına doğru oosit ve granüloza hücrelerinin birlikte kümülüs ooforusu şekillendirmişti. Bu foliküllerde zona pellusida oldukça belirgindi. Folikülü dıştan saran teka folikülü iki tabakası da gözlemlendi. Teka internada

fibroblastlar, küçük kas demetleri ve kan damarları görüldü. Teka eksternada ise düz kas demetleri ile birlikte kollajen lifleride gözlemlendi. Kortekste ayrıca korpus luteum gözlemlendi. Korpus luteumun orta kısımlarında büyük ökromatik nükleuslu ve sitoplazmaları açık renkte boyanmış hücreler ile kenar kısımlarında ise daha küçük hücreler gözlemlendi. Ayrıca korpus luteumun orta kısımlarında kan damarları da yer almaktaydı. Ovaryumun medullasında kortekse göre daha az sayıda hücre olmasına karşın damarlanmanın fazla olduğu görüldü. Medulladaki hücrelerin nükleusları merkezde olup sitoplazmaları ise bazofilik boyanmıştı. Ayrıca bağ dokusu hücreleri ve medulladaki lif ve kas demetleri de kortekse göre daha belirgin olarak gözlemlendi. Medulla içerisinde hafif derecede kanlanmanın da olduğu gözlemlendi.

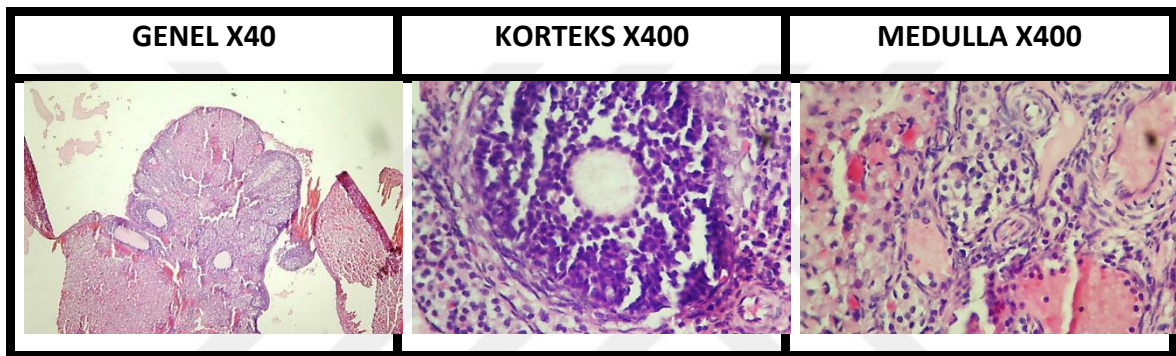


Şekil 3.1.2.A. Üçüncü gün KG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Yara grubu

YG'nda ppd enjektörü yardımı ile yara oluşturulan sıçanlardan elde edilen, H-E boyası ile boyanan ovaryum kesitlerinin korteks ve medulla kısımlarının varlığı görüldü. Organın yüzeyini germinal epitel yara yeri haricinde kaplamaktaydı ve altında bağ doku hücre ve liflerinden oluşan tunika albuginea yer almaktaydı. Fakat ovaryum korteksinde bulunan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin yapısı ve sayıları KG'na göre sayıca azalmıştı. Primordiyal foliküllerin büyük çoğunluğunun atretik olduğu gözlemlendi. Atretik folikülde yer alan oosit ile granuloza hücreleri arasında ilişkinin bozulduğu gözlemlendi. Normal primordiyal foliküller ise oldukça az sayıda görüldü. Sekonder ve antral foliküllerde ise yapısal olarak bir bozulma gözlenmezken teka eksterna tabakasında damar yapılarının genişlediği görüldü. Yara yerinin yakınlarında yer alan folikül ve oositlerde dejenerasyona rastlandı. Sekonder ve antral

foliküller kontrole göre daha az sayıda görüldü. Bu foliküllerdeki oosit yapısı normaldi. Bununla birlikte granüloza ve teka tabakalarında piknotik çekirdekli hücreler görülmekteydi. Korpus luteumda ise nadir olarak şekilleri ve sınırları düzensiz olan dejenere hücreler gözlemlendi. Korpus luteum sayısı bakımından kontrol grubu ile arasında fark yoktu. Kortekste stromal hücreler kontrol grubuna benzerdi. Ovaryum medullasında kortekse göre daha büyük kan damarları ve artmış lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücrelerde dejenerasyon gözlemlenirken hücreler arası alanda ödem oluşumu, kanlanma ve lenfosit infiltrasyonu gözlemlendi (**Şekil 3.1.2.B**).

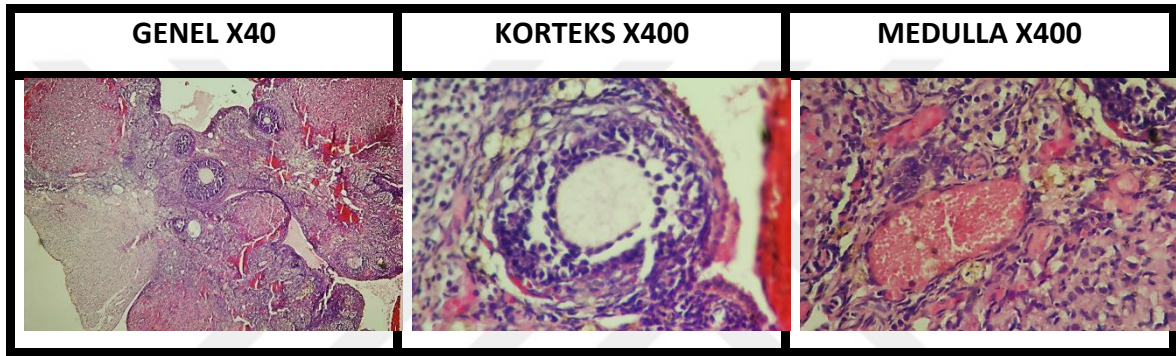


Şekil 3.1.2.B. Üçüncü gün YG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Sham grubu

Besi yeri uygulanmış sıçanlardan elde edilen üçüncü gün SG örneklerinin H-E boyası uygulanan ovaryum kesitlerinin korteks ve medulla kısımları ayırt edildi. Ovaryumun yüzeyinde tek katlı kübik germinal epitel ve altında tunika albuginea yer almıştı enjektörün giriş kısmı hariç yer almıştı. Ovaryum korteksinde bulunan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin sayılarının kontrol grubuna göre azaldığı gözlemlendi. Primordiyal foliküllerin büyük çoğunluğunun atretik olduğu gözlemlendi. Atretik folikülde yer alan oositte ile granüloza hücreleri arasında ilişkinin bozulduğu gözlemlendi. Atretik foliküllerde fragmente olmuş oosit ve granüloza hücrelerinde belirgin şekilde piknotik çekirdekli hücre sayılarının arttığı gözlemlendi ayrıca granüloza hücrelerinin yan yüzeylerinde ayrışmalar saptandı. Sekonder foliküller kontrole göre daha az sayıda görüldü. Bu foliküllerdeki oosit yapısı normaldi. Antral foliküllerin içerisinde oosit olmadığı gözlemlendi. Foliküllerin etrafında teka tabakasının içerisinde

yoğun kan damarlarının varlığı ve teka tabakalarının etrafında kopmaların olduğu bu alanlarda kan hücrelerinin varlığı saptandı. Korpus luteumda şekil ve sınırları düzensiz olan dejenere hücreler gözlemlendi. Korpus luteum sayısı bakımından kontrol grubu ile arasında fark yoktu. Kortekste stromal hücreler kontrol grubuna benzerdi. Ovaryum medullasında kortekse göre daha büyük ve çok sayıda kan damarları ve daha çok lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlenmezken hücreler arasında ağır ödem ve ağır kanamanın olduğu ve çok sayıda lenfosit infiltrasyonunun olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1.2.C).

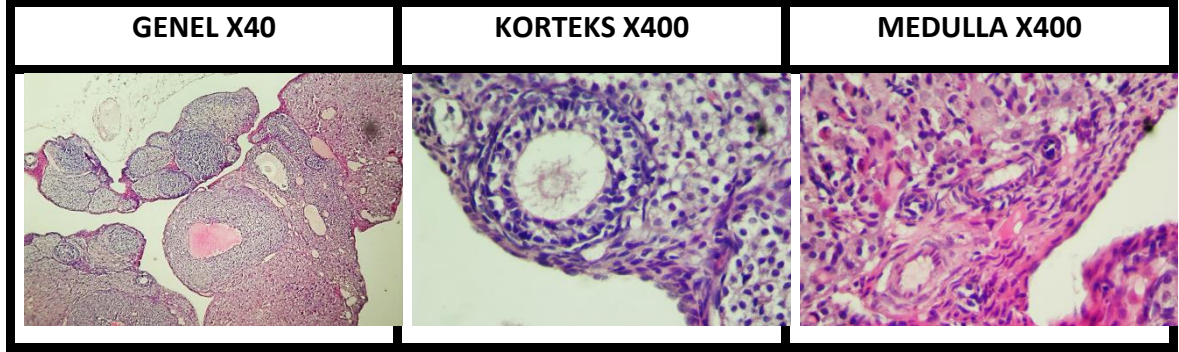


Şekil 3.1.2.C. Üçüncü gün SG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Kök hücre grubu

Kök hücre uygulanan sıçanlardan elde edilen KHG ovaryumların H-E ile boyanmış kesitleri incelendiğinde, organı dıştan tek katlı kübik germinal epitelin sardığı ve altında tunika albugineanın yer aldığı yara yeri dışında gözlemlendi. Ovaryumda bulunan primordiyal foliküllerin normal olanlarının yara ve sham grubuna göre sayıca aynı olduğu, atretik foliküllerde ise azalmaların olduğu gözlemlendi. Foliküllerin içerisinde bulunan oosit normal yapıda olup büyük nükleuslu ve nükleolusu belirgin halde gözlemlendi. Oositin etrafını saran granüloza hücreleri ve teka tabakalarında dejenerasyon gözlenmedi YG ve SG' na zıt olarak bu alanlarda damar yoğunluğunun kontrol grupları ile benzerlik gösterdiği saptandı (Şekil 3.1.2.D). Kortekste foliküller arasında ve korpusluteuma yakın alanlarda küçük damarlanmaların olduğu gözlemlendi. Ovaryum medullasında kortekse göre daha büyük kan damarları bulunmaktaydı ve lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücreler dışında küçük çekirdekli ve az hacimli eosinofilik sitoplazmalı hücre

grupları gözlemlenirken stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlenmedi fakat stromal hücreler arasında ödem ve kanlanma olduğu gözlemlendi(Şekil 3.1.2.D).



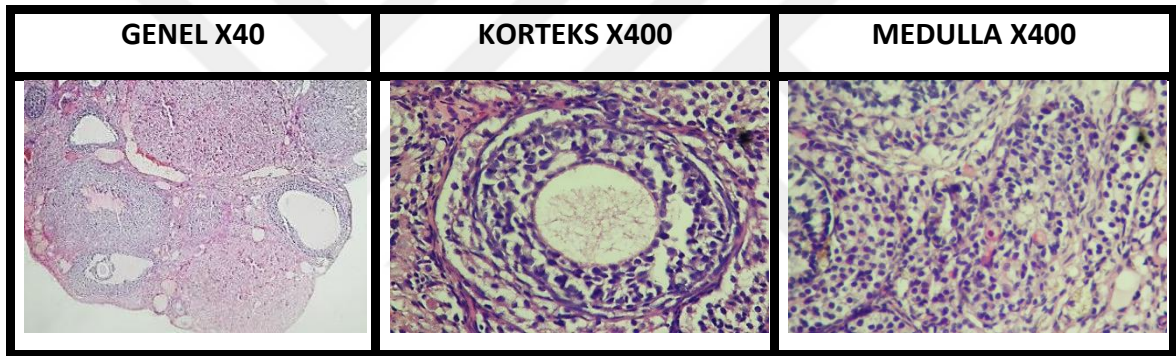
Şekil 3.1.2.D. Üçüncü gün KHG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

3.1.3. Yedinci gün grupları

Kontrol grubu

KG' daki sıçanlarından alınan dokuların H-E ile boyanan kesitleri incelendiğinde, korteks ve medulla kısımlarının varlığı gözlemlendi. Normal seyirli ovaryum yüzey epiteli, epitel altındaki yoğun bağ dokusu liflerinin oluşturduğu düzenli tunika albuginea görüldü. Tunika albuginea altında yer alan korteks bölgesinde, çeşitli sayı ve tipte foliküllerin olduğu gözlemlendi. Kortekste stromada yer alan hücreler gruplar halinde oval şekilli, büyük nükleuslu ve sitoplazmaları bazofilikti. Foliküllerin etrafında ayrıca düz kas demetleri ve bağ dokusu lifleri görüldü. Kortekste damar kesitlerine az sayıda rastlandı. Korteks içerisinde çok sayıda gözlenen primordiyal foliküllerin içinde oosit ve oositin çevresinde tek katlı yassı granüloza hücreleri yer almıyordu. Oosit büyük ökromatik bir nükleusa sahipti. Primer foliküllerde oosit çevresinde tek katlı kübik şekilli granüloza hücreleri gözlemlendi. Oosit ile granüloza hücreleri arasında zona pellusida oluşmaya başlamıştı. Sekonder foliküllerde oositin etrafında çok katlı epitel görünümündeki granüloza hücreleri ile oosit ve granüloza hücreleri arasında zona pellusida belirgin olarak gözlemlendi. Sekonder foliküllerde granüloza hücreleri dışında teka folikülü oluşmaya başladığı görüldü. Antral foliküllerde çok tabakalı granüloza hücreleri arasında düzensiz boşluklar vardı. Bazı antral foliküllerde boşluklar birleşerek antrumu oluşturmuştu. Ayrıca antrumun iç kısımlarına doğru oosit ve granüloza hücrelerinin birlikte kümülüs ooforusu şekillendirmişti. Bu foliküllerde zona pellusida oldukça

belirgindi. Folikülü dıştan saran teka folikülü iki tabakalı olarak gözlemlendi. Teka internada fibroblastlar, küçük kas demetleri ve kan damarları görüldü. Teka eksternada ise düz kas demetleri ile birlikte kollajen lifleride gözlemlendi. Kortekste ayrıca korpus luteum gözlemlendi. Korpus luteumun orta kısımlarında büyük ökromatik nükleuslu ve sitoplazmaları açık renkte boyanmış hücreler ile kenar kısımlarında ise daha küçük hücreler gözlemlendi. Ovaryumun medullasında kortekse göre daha az sayıda hücre olmasına karşın damarlanmanın fazla olduğu görüldü. Medulladaki hücrelerin nükleusları merkezde olup sitoplazmaları ise kortekse göre daha bazofilik boyanmıştı. Ayrıca bağ dokusu hücreleri de medullada yer almıştı. Medulladaki lif ve kas demetleri de kortekse göre daha belirgin olarak gözlemlendi, hafif derecede kanlanma ve ödemin olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1.3.A).

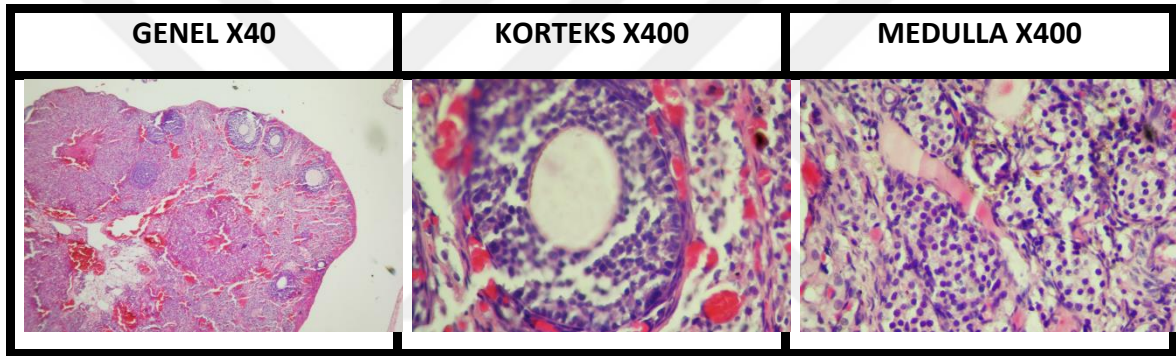


Şekil 3.1.3.A. Yedinci gün KG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Yara grubu

Ppd enjektörünün batırılıp çıkarılması ile oluşturulan yedinci gün YG sıçanlardan elde edilen H-E boyası ile boyanan ovaryum kesitlerinin yapısal özellikleri korteks ve medullanın görülmesi açısından normal bir ovaryum dokusu ile benzerdi. Ovaryumun dışında tek katlı kübik germinal epitel ve altında tunika albuginea yer yara yeri dışındaydı. Fakat ovaryum korteksinde bulunan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin yapısı ve sayıları kontrol grubuna göre azalmıştı. Primordiyal foliküllerin çoğunluğunun atretik olduğu gözlemlendi. Atretik folikülde oosit ile granüloza hücreleri arasında ilişkinin bozulduğu gözlemlendi. Ayrıca oositin çevresini saran granüloza hücrelerinde hücre içeriği dağılmış olarak ve yan yüzeylerde ayrılmalarda gözlemlendi. Normal primordiyal foliküller ise az sayıda görüldü. Sekonder ve antral

foliküller kontrole göre daha az sayıda görüldü. Bu hücrelerin bazılarında kromatini nükleus zarına yaklaşarak yoğunlaşmıştı. Ayrıca foliküller etrafında yoğun kan damarları ve ödem gözlemlendi. Korpus luteumda şekilleri ve sınırları düzensiz olan dejenere hücreler gözlemlendi. Korpus luteum sayısı bakımından kontrol grubu ile arasında fark yoktu. Kortekste stromal hücreler kontrol grubuna göre daha fazlaydı. Ayrıca kortekste kan damarlarının sayıları artmış ve ödem varlığı saptanmıştır. Ovaryum medullasında kortekse göre daha büyük kan damarları ve daha çok lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücrelerde dejenerasyon gözlemlenirken hücreler arası alanda yoğun ödem oluşumu, kanlanma ve yoğun lenfosit infiltrasyonu gözlemlendi. (Şekil 3.1.3.B.)

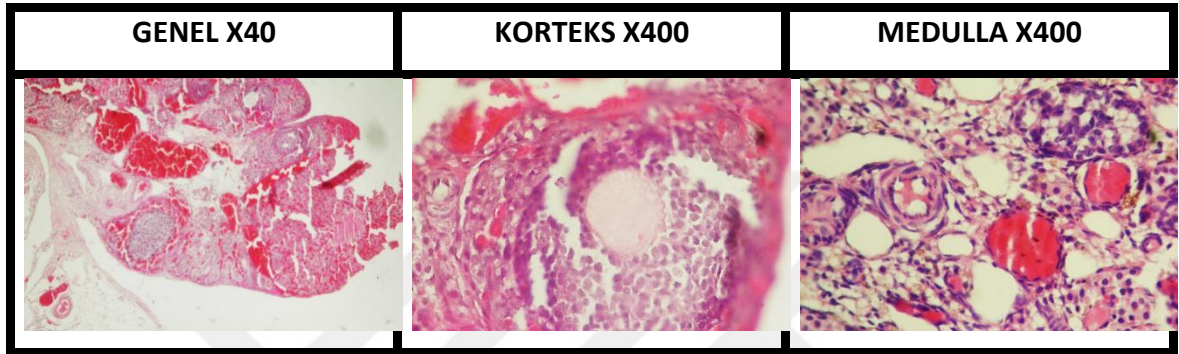


Şekil 3.1.3.B. Yedinci gün YG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Sham grubu

Besi yeri uygulanmış yedinci gün grubu sıçanlardan elde edilen H-E boyası uygulanan ovaryum kesitlerinde korteks ve medulla bölgeleri yara yeri dışında gözlemlendi. Ovaryumun dışında tek katlı kübik germinal epitel ve altında tunika albuginea yer almıştı. Ovaryum korteksinde bulunan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin sayıları kontrol grubuna göre azalmıştı. Primordiyal foliküllerin çoğunluğunun atretik olduğu gözlemlendi. Atretik folikülde oosit ile granuloza hücreleri arasında ilişkinin bozulduğu ve granuloza hücrelerinin kendi içersindeki bütünlüğün kaybolduğu gözlemlendi. Sekonder ve antral foliküller kontrole göre daha az sayıda görüldü. Bu foliküllerdeki oosit yapısı normaldi. Bununla birlikte granuloza ve teka tabakalarında normalden farklı hücreler gözlemlendi. Korpus luteumda ise şekilleri ve sınırları düzensiz olan dejenere hücreler gözlenirken damar yapılarının ve ödemin de arttığı gözlemlendi. Korpus luteum sayısı

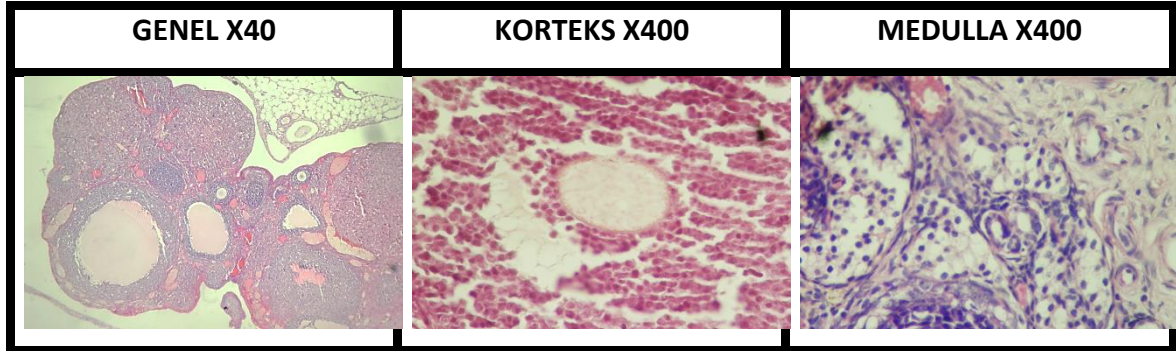
bakımından kontrol grubu ile arasında fark yoktu. Korteksteki stromal hücreler kontrol grubuna benzerlik gösterirken hücreler arasında ağır ödem ve kan damarları gözlemlendi. Ovaryum medullasında da kortekse göre daha büyük ve çok sayıda kan damarları ve daha çok lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal arasında ağır ödem ve ağır kanamanın olduğu ve çok sayıda lenfosit infiltrasyonun olduğu gözlemlendi.(Şekil 3.1.3.C)



Şekil 3.1.3.C. Yedinci gün SG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Kök hücre grubu

Kök hücre uygulanan yedinci grubu sıçanlardan elde edilen ovaryumların H-E ile boyanmış kesitleri incelendiğinde, ovaryumun dışta korteks içte medulla olmak üzere doğal yapısı gözlemlendi. Yara yeri dışında kalan kısımlarda epitel devamlılığı varken yara alanında ilk gün gruplarına göre iyileşme olayının başladığı gözlemlendi. Epitelin altında tunika albugineanın yer aldığı gözlemlendi. Ovaryumda bulunan primordiyal foliküllerin normal olanlarının sayısı yara ve sham grubuna göre sayılarının aynı olduğu, atretik foliküllerde ise azalmaların olduğu gözlemlendi. Foliküllerin içerisinde bulunan oosit normal yapıda olup büyük nükleuslu ve nükleolusu belirgin halde gözlemlendi. Oositin etrafını saran granüloza hücreleri ve teka tabakalarında dejenerasyon gözlemlenmedi. Kortekste foliküller arasında ve korpusluteuma yakın alanlarda küçük damarlanmaların olduğu gözlemlenirken ovaryum medullasında kortekse göre kan damarlarının sayısının fazla olduğu ve yoğun lif yapılarının yer aldığı görüldü. Medullada bulunan stromal hücreler dışında farklı hücre grupları gözlemlenirken stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlemlenmedi fakat stromal hücreler arasında ödem ve kanlanma olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1.3.D)



Şekil 3.1.3.D. Yedinci gün KHG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

3.4. Ondördüncü gün

Kontrol grubu

Kontrol grubun sıçanlardan alınan over kesitlerinin H-E boyamasında dışta korteks içte medulla olmak üzere normal ovaryum yapısı gözlemlendi. Korteks yüzeyden tek katlı kübikten prizmatikçe değişen ovaryum yüzey epiteli ile örtülüydü. Epitelin altında bağ dokusu yapısındaki tunika albugineanın yer aldığı gözlemlendi. Kortekste primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer foliküller gözlemlendi. Foliküller içerisinde yer alan oositler ökromatik çekirdek ve belirgin çekirdekçiğe sahipti. Sekonder foliküllerde granüloza hücreleri dışında teka folikülü görüldü. Antral foliküllerde çok tabakalı granüloza hücreleri arasında düzensiz boşluklar vardı. Bazı antral foliküllerde boşluklar birleşerek antrumu oluşturmuştu. Ayrıca antrumun iç kısımlarına doğru oosit ve granüloza hücrelerinin birlikte kümülüs ooforusu şekillendirmişti. Bu foliküllerde zona pellusida oldukça belirgindi. Folikülü dıştan saran teka folikülü iki tabakalı olarak gözlemlendi. Teka internada fibroblastlar, küçük kas demetleri ve kan damarları görüldü. Teka eksternada ise düz kas demetleri ile birlikte kollajen lifleride gözlemlendi. Ayrıca kortekste dejenera hücreler içermeyen geniş korpus luteum yapıları izlendi. Korpus luteum içerisinde ve foliküllerin arasında az sayıda küçük boyutlu kan damarlarının varlığı saptandı. Korpus luteumun orta kısımlarında büyük ökromatik nükleuslu ve sitoplazmaları açık renkte boyanmış hücreler ile kenar kısımlarında ise daha küçük hücreler gözlemlendi. Kortekste stromada yer alan hücreler gruplar halinde oval şekilli, büyük nükleuslu ve sitoplazmaları bazofilikti. Ovaryumun medullasında kortekse göre daha az sayıda hücre

olmasına karşın damarlanmanın fazla olduğu görüldü. Medulladaki hücrelerin nükleusları merkezde olup sitoplazmaları ise kortekse göre daha bazofilik boyanmıştı. Ayrıca bağ dokusu hücreleri de medullada yer almıştı. Medulladaki lif ve kas demetleri de kortekse göre daha belirgin olarak gözlendi, hafif derecede kanlanma ve ödemin olduğu gözlemlendi (Şekil 3.1.4.A).



Şekil 3.1.4.A. Ondördüncü gün KG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Yara grubu

Yara oluşturulan sıçanlardan elde edilen H-E boyası ile boyanan ovaryum kesitlerinin yapısal özellikleri korteks ve medullanın görülmesi açısından normal bir ovaryum dokusu ile benzerdi. Ovaryumun dışında tek katlı kübik germinal epitel ve altında tunika albuginea yer almıştı. Ovaryum korteksinde bulunan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin yapısı ve sayıları kontrol grubu ile benzerlik göstermekteydi. Primordiyal foliküllerde atretik foliküllerin olduğu gözlendi. Atretik folikülde oosit ile granüloza hücreleri arasında ilişkinin bozulduğu gözlendi. Ayrıca oositin çevresini saran granüloza hücrelerinde yan yüzeylerde ayrılmalar gözlendi. Normal primordiyal foliküller de görüldü. Sekonder ve antral foliküller kontrole göre daha az sayıda görüldü. Ayrıca yedinci günde foliküller etrafında görülen yoğun kan damarları ve ödemin hafiflediği gözlendi. Korpus luteumda yer alan hücreler normal şekilli ve sınırları düzenli olarak gözlendi. Korpus luteum sayısı bakımından kontrol grubu ile arasında fark yoktu. Korteksteki stromal hücreler yara artı kök hücre grubuna göre daha fazlaydı. Ayrıca yedinci günde yara grubunda kortekste görülen ödem ve kanlanmanın azaldığı gözlendi. Ovaryum medullasında kortekse göre daha büyük kan damarları ve daha çok lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücreler geniş

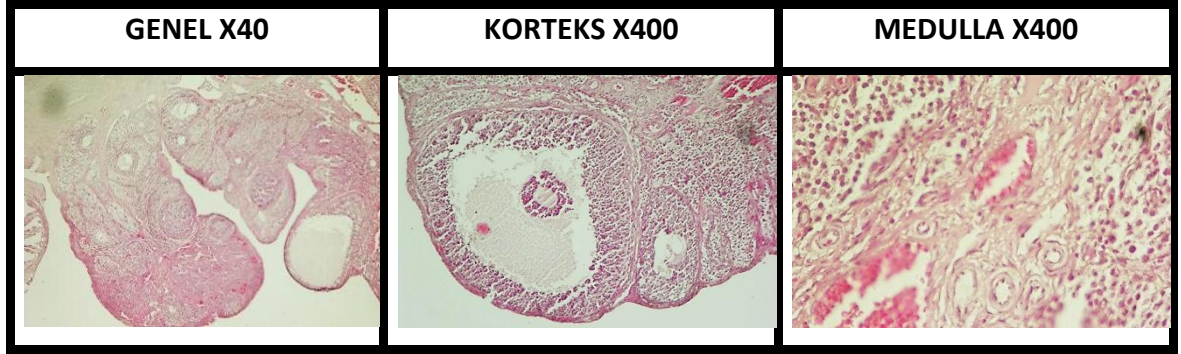
bazofilik sitoplazmalı ve düzenli sınırlara sahiptiler hücreler arası alanda oluşan yoğun ödem ile birlikte, kanlanma ve lenfosit infiltrasyonunun da azaldığı gözlemlendi (**Şekil 3.1.4.B**)



Şekil 3.1.4.B Ondördüncü gün YG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Sham grubu

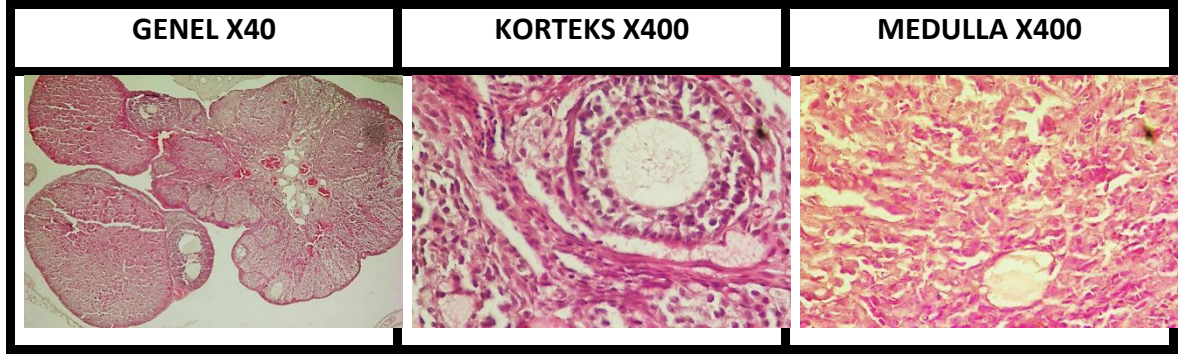
Besi yeri uygulanmış sıçanlardan elde edilen H-E boyası uygulanan ovaryum kesitlerinde korteks ve medulla bölgeleri gözlemlendi. Ovaryumun dışında tek katlı kübik germinal epitel ve altında tunika albuginea yer almıştı. Ovaryum korteksinde bulunan primordiyal, primer, sekonder ve antral foliküllerin sayıları kontrol grubuna ile benzerlik gösterdi. Primordiyal foliküllerin etrafında tek tabakalı yassı hücreler gözlemlendi. Primordiyal foliküller içerisinde ö kromatik oosit gözlemlendi. Granuloza hücrelerinin bütünlüğünü korudukları gözlemlendi. Sekonder ve antral foliküller kontrol grubu ile sayıca benzer oldukları görüldü. Bu foliküllerdeki oosit yapısı normaldi. Korpus luteumda ise şekilleri ve sınırları düzenli eosinofilik geniş sitoplazmalı hücreler gözlenirken damar yapılarının ve ödemin de azaldığı gözlemlendi. Korpus luteum sayısı bakımından kontrol grubu ile arasında fark yoktu. Kortekste stromal hücreler kontrol grubuna benzerlik gösterirken hücreler arasında ödemin ileri derecede azaldığı ve kan damarlarının sayısının azaldığı gözlemlendi. Ovaryum medullasında da kortekse göre daha büyük ve çok sayıda kan damarları ve daha çok lif yapıları görüldü. Medullada bulunan stromal hücreler arasında ödemin azaldığı ve kan hücreleri ve lenfosit infiltrasyonunun azaldığı gözlemlendi (**3.1.4.C.**).



Şekil 3.1.4.C. Ondördüncü gün SG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Kök hücre grubu

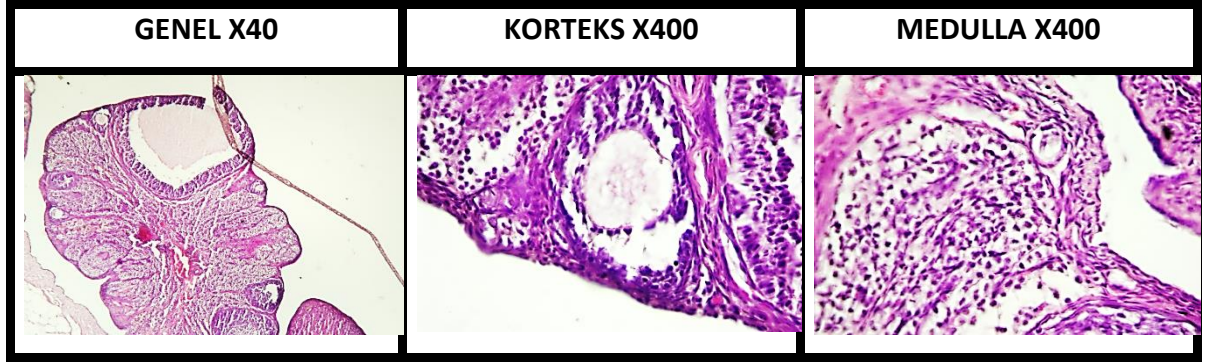
Kök hücre uygulanan yedinci grubu sıçanlardan elde edilen ovaryumların H-E ile boyanmış kesitleri incelendiğinde, ovaryumun dışta korteks içte medulla olmak üzere doğal yapısı gözlemlendi. Yara yeri dışında kalan kısımlarda epitel devamlılığı varken yara alanında ilk gün gruplarına göre iyileşme olayının başladığı gözlemlendi. Epitelin altında tunika albugineanın yer aldığı gözlemlendi. Ovaryumda bulunan primordiyal foliküllerin normal olanlarının sayısı yara ve sham grubuna göre sayılarının aynı olduğu, atretik foliküllerde ise azalmaların olduğu gözlemlendi. Foliküllerin içerisinde bulunan oosit normal yapıda olup büyük nükleuslu ve nükleolusu belirgin halde gözlemlendi. Oositin etrafını saran granüloza hücreleri ve teka tabakalarında dejenerasyon gözlemlenmedi. Kortekste foliküller arasında ve korpusluteuma yakın alanlarda küçük damarlanmaların olduğu gözlemlenirken ovaryum medullasında kortekse göre kan damarlarının sayısının fazla olduğu ve yoğun lif yapılarının yer aldığı görüldü. Medullada bulunan stromal hücreler dışında farklı hücre grupları gözlemlenirken stromal hücrelerde herhangi bir dejenerasyon gözlemlenmedi fakat stromal hücreler arasında ödem ve kanlanma olduğu gözlemlendi (**Şekil 3.1.4.D**).



Şekil 3.1.4.D. Ondördüncü gün KHG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

3.1.5. Yirmisekizinci gün

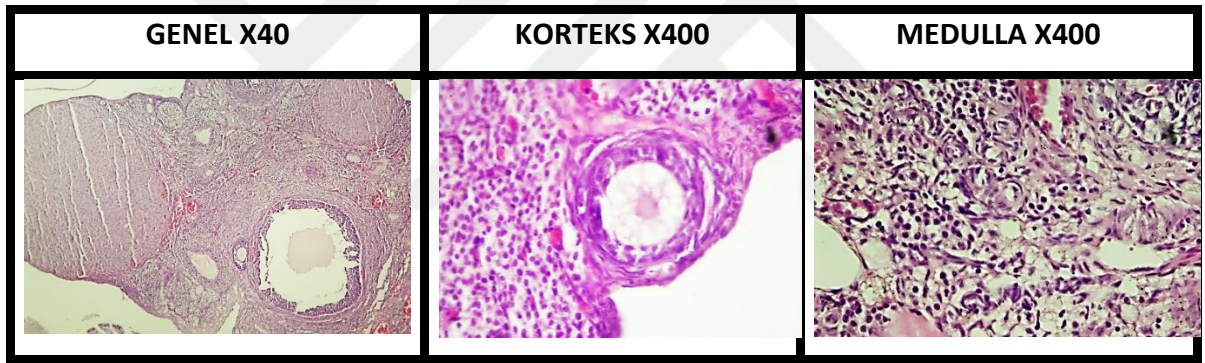
Yirmisekizinci gün KG örneklerinin H-E boyanmış kesitleri incelendiğinde korteks ve medulla olmak üzere ovaryumların genel yapıları ve germinal epitelin devamlı varlığı görüldü. Tek katlı kübik epitel altında tunika albuginea tabakasının varlığına rastlandı. Kortekste çok sayıda primordiyal, primer, sekonder ve graaf foliküllerinin varlığı ve sayılarının çokluğu izlendi. Kortekste bulunan primordiyal foliküllerde ökromatik oosit ve çevresinde normal seyirli hücrelerin varlığı saptandı. Graaf foliküllerinde büyük ve düzenli antrum, büyük ökromatik çekirdekli ve belirgin çekirdekçikli oositlerin varlığı görüldü. Kortekste foliküller arasında küçük kan damarları ve normal seyirli hücrelerin varlığı saptandı. Medulla kısmında kortekse göre daha geniş kan damarları ve intertisiyal hücreler rastlandı. Medulladaki hücrelerin geniş sitoplazmalı eosinofilik hücreler olduğu görüldü(Şekil 3.1.5.A.).



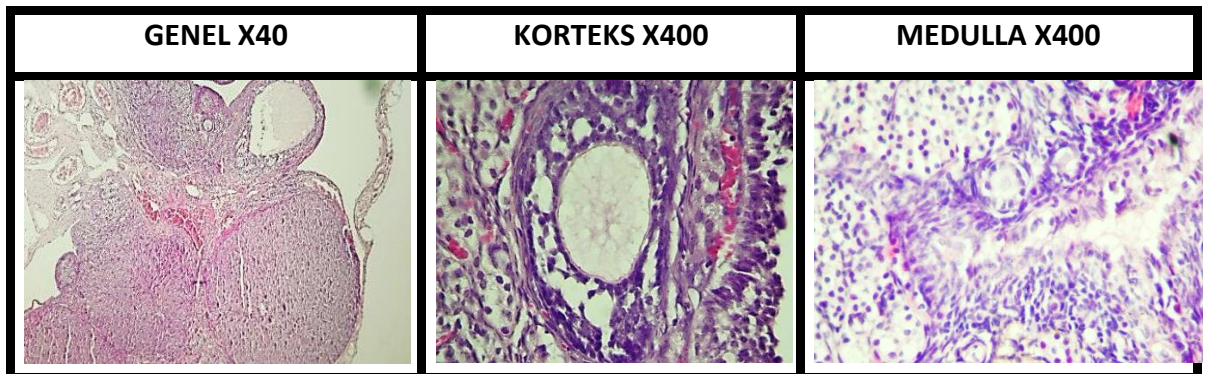
Şekil 3.1.5.A. Yirmisekizinci gün KG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Yirmisekizinci gün YG, SG ve KHG örneklerinin H-E boyamaları incelendiğinde KG örnekleri ile aralarında bir farkın olmadığı görüldü. Organın dışında tek katlı kübik epitel ile epitelin altında ise yoğun olarak bağ dokusu lifleri ve hücrelerinden oluşan tunika albuginea görüldü. Ovaryum kesitlerinde korteks ve medulla bölgeleri ayırt edildi. Ovaryumda tunika albuginea altında yer alan korteks bölgesinde, çeşitli sayı ve tipte foliküllerin olduğu gözlemlendi. Foliküllerin arasında stromada yer alan hücreler gruplar halinde oval şekilli, büyük nükleuslu ve sitoplazmaları bazofilikti. Düz kas demetleri ve bağ dokusu lifleri foliküllerin etrafında görüldü. Kortekste az sayıda damar varlığına rastlandı. Ovaryum korteksinde primordiyal foliküllerde içte oosit ve oositin çevresinde tek katlı yassı granüloza hücreleri yer almıştı. Oosit büyük ökromatik bir nükleusa sahip olup nükleolusu belirgindi. Primer foliküllerde oosit çevresinde tek katlı kübik şekilli granüloza hücreleri gözlemlendi. Oosit ile granüloza hücreleri arasında zona pellusida oluşmaya başlamıştı. Sekonder foliküllerde oositin etrafında çok katlı epitel görünümündeki granüloza hücreleri ile oosit ve granüloza hücreleri arasında zona pellusida belirgin olarak gözlemlendi. Sekonder foliküllerde granüloza hücreleri dışında teka folikülü oluşmaya başladığı görüldü. Antral foliküllerde çok tabakalı granüloza hücreleri arasında düzensiz boşluklar vardı. Bazı antral foliküllerde boşluklar birleşerek antrum oluşturmuştu. Ayrıca antrumun iç kısımlarına doğru oosit ve granüloza hücrelerinin birlikte kümülüs ooforusu şekillendirmişti. Bu foliküllerde zona pellusida oldukça belirgindi. Folikülü dıştan saran teka folikülü iki tabakalı olarak gözlemlendi. Teka

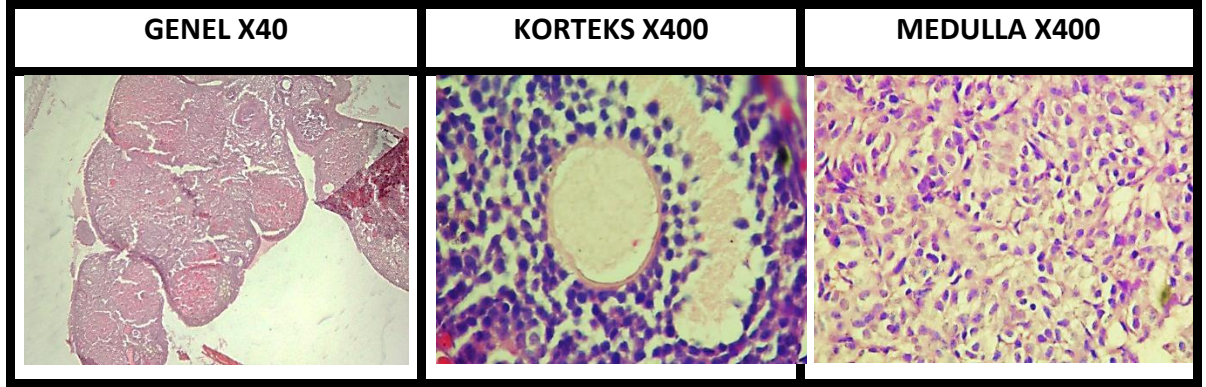
internada fibroblastlar, küçük kas demetleri ve kan damarları görüldü. Teka eksternada ise düz kas demetleri ile birlikte kollajen lifleride gözlemlendi. Kortekste ayrıca korpus luteum ve içi sıvı ile dolu bir boşluğu olan iki üç sıralı granüloza hücrelerinin çevrelediği folikül kistleri gözlemlendi. Korpus luteumun orta kısımlarında büyük ökromatik nükleuslu ve sitoplazmaları açık renkte boyanmış hücreler ile kenar kısımlarında ise daha küçük hücreler gözlemlendi. Ayrıca korpus luteumun orta kısımlarında kan damarları da yer almaktaydı. Ovaryumun medullasında kortekse göre daha az sayıda hücre olmasına karşın damarlanmanın fazla olduğu görüldü. Medulladaki hücrelerin nükleusları merkezde olup sitoplazmaları ise bazofilik boyanmıştı. Ayrıca bağ dokusu hücreleri de görüldü. Bununla birlikte medulladaki lif ve kas demetleri de kortekse göre daha belirgin olarak gözlemlendi (Şekil 3.1.5.B, Şekil 3.1.5.C, Şekil 3.1.5.D.)



Şekil 3.1.5.B. Yirmisekizinci gün YG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.



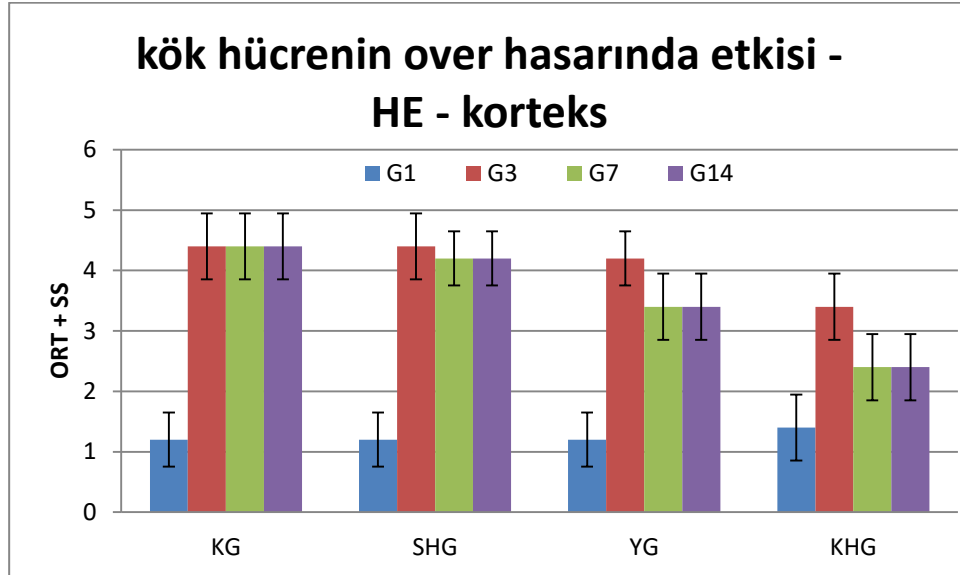
Şekil 3.1.5.C Yirmisekizinci gün SG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.



Şekil 3.1.5.D. Yirmisekizinci gün KHG genel, korteks ve medulla H-E boyaması görüntüleri.

Kesitler üzerinde yapılan skorelama sonucunda kortekste iyileşme sürecine bakıldığında birinci ve üçüncü günde YG, SG ve KHG’nda korteks kısmında hasar çok yüksekken, yedinci günde KHG’nda yara iyileşme oranı diğer gruplara göre anlamlı derecede artmıştı. Ondördüncü günde ise kök hücre grubu korteks kısmında yara alanı tamamen iyileşmiş ve istatistiksel olarak anlamlıydı.

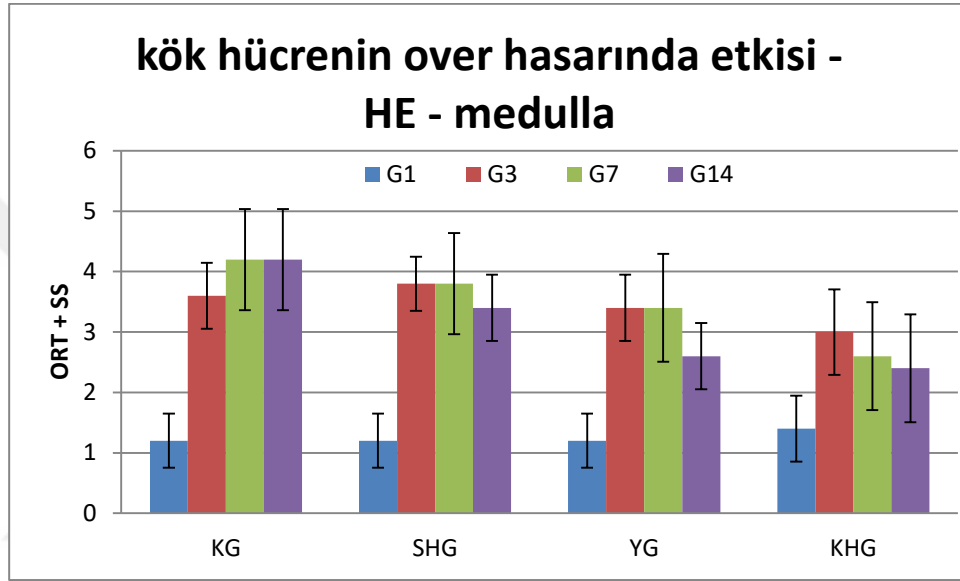
Tablo 3.1. Kök hücrelerin korteks yara iyileşme sürecine etkilerinin istatistiksel değerlendirilmesi.



Kesitler üzerinde yapılan skorelama sonucunda medullada iyileşme sürecine bakıldığında birinci ve üçüncü günde YG, SG ve KHG’nda medulla kısmında hasar çok

yüksekken, yedinci günde KHG’nda yara iyileşme oranı diğer gruplara göre anlamlı derecede artmıştı. Ondördüncü günde ise kök hücre grubu medulla kısmında yara alanı tamamen iyileşmiş ve istatistiksel olarak anlamlıydı.

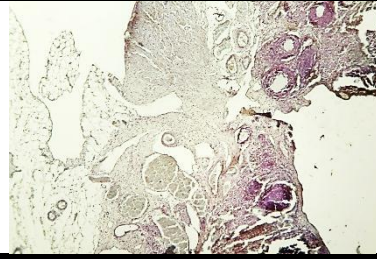
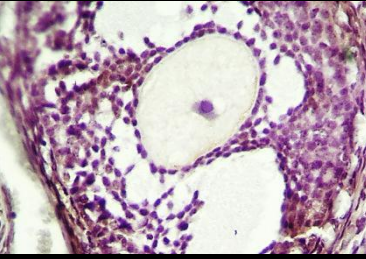
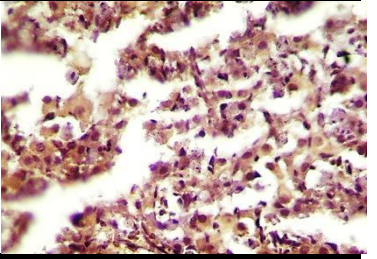
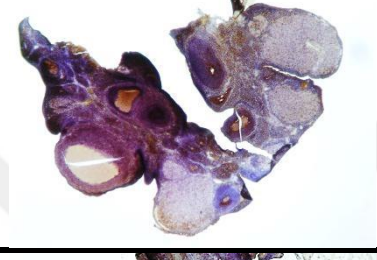
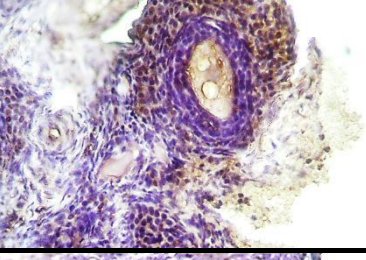
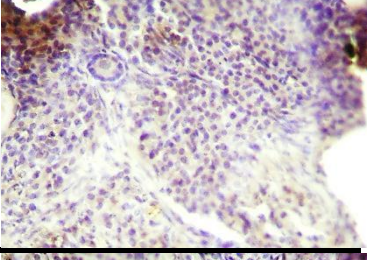
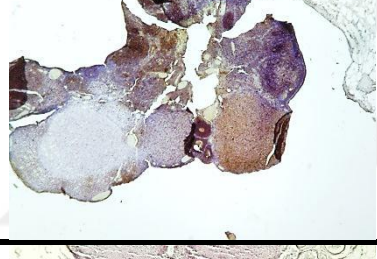
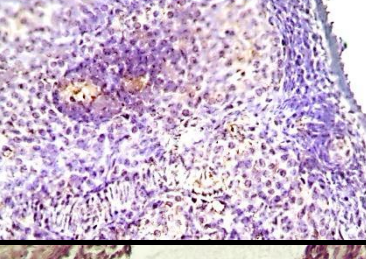
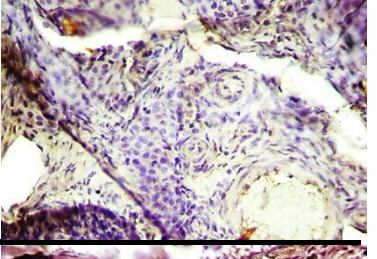
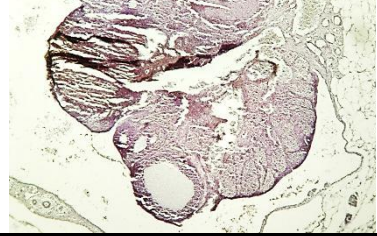
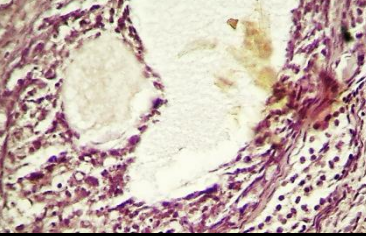
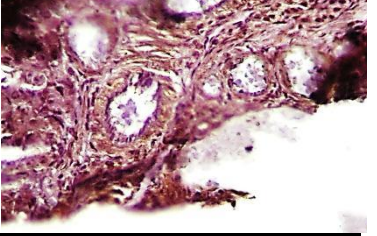
Tablo 3.2. Kök hücrelerin medulla yara iyileşme sürecine etkilerinin istatistiksel değerlendirilmesi.



3.2. STRO 1A immünohistokimya değerlendirmeleri

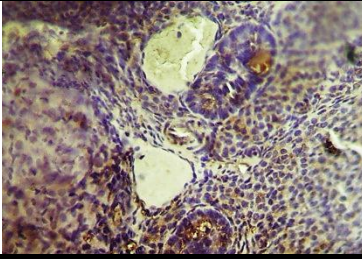
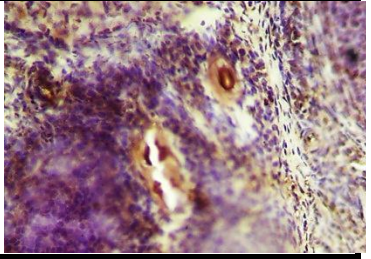
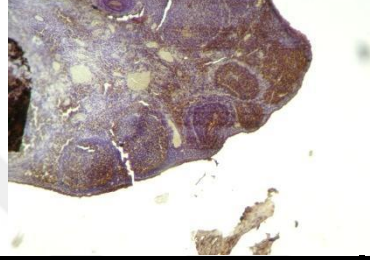
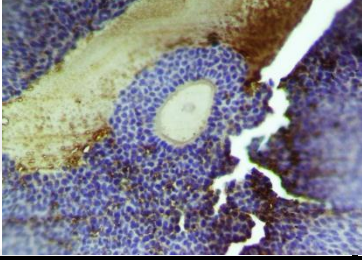
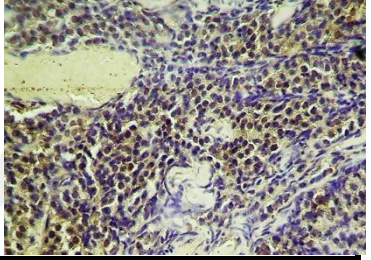
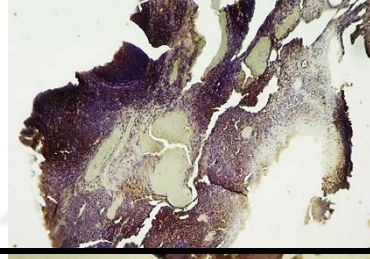
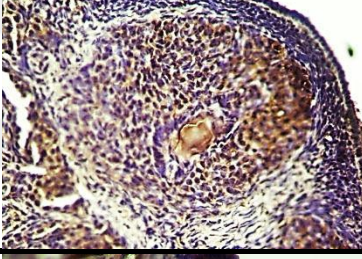
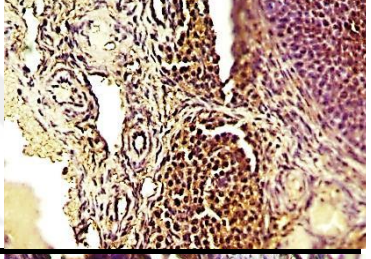
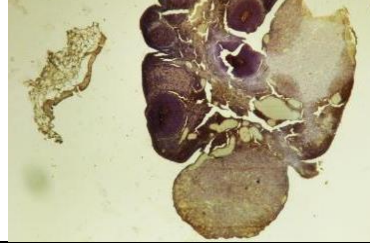
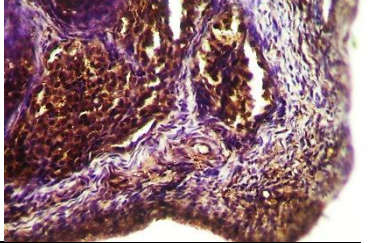
STRO-1 için yapılan immün boyamalarda ovaryumda bulunan stromal hücrelerin bazal seviyede pozitif olarak işaretlendiği görüldü. Primordial ve primer foliküllerin epitel hücrelerinde gözlenirken, sekonder ve tersiyer foliküllerin granüloza hücrelerinde de pozitif boyanma saptandı. Oositler ile Teka ve granüloza hücrelerinde de bazılarını boyandığı görüldü. Korpus luteumda ve ovaryum stroması çok az pozitifken kan damarları daha çok pozitif.

Birinci gün uygulamasında gruplar değerlendirildiğinde ovaryum dokusunda KG’nda bazal seviyede boyanma pozitifliği görülürken YG ve BYG’nda yara alanı çevresinde pozitiflik artmış olarak gözlemlendi. KHG’nda yara yeri çevresinde yüksek pozitif hücre gruplarının olduğu gözlemlendi. Bu hücre gruplarının yara alanı etrafında olması enjeksiyon ile bırakılan KİSKH olduklarını düşündürdü (Resim 3.2.1).

1.GÜN STRO	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
KG			
YG			
BYG			
KHG			

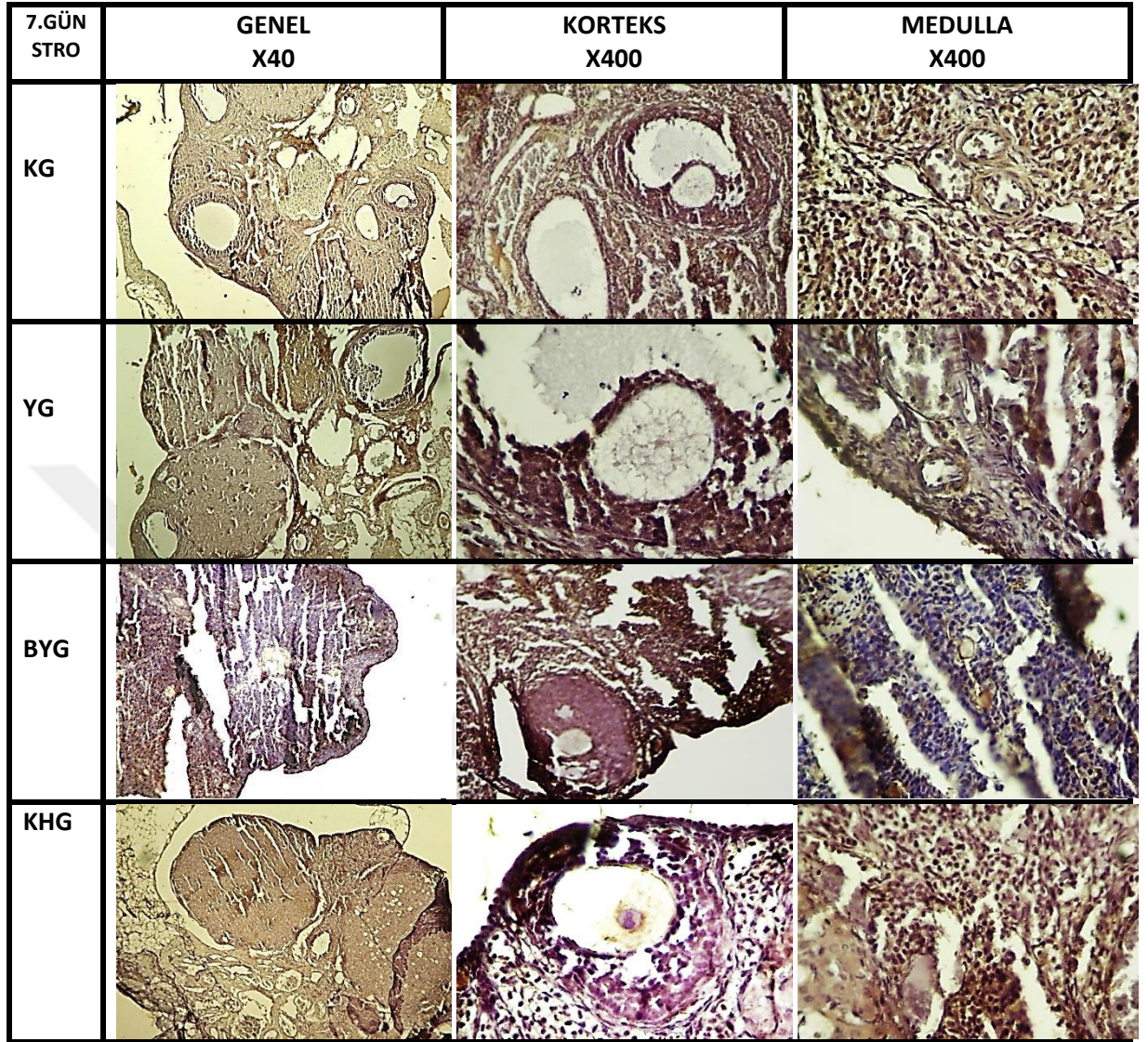
Şekil 3.2.1. Birinci gün STRO 1A tüm grupların immünohistokimya boyaması.

Üçüncü gün uygulamasında tüm gruplar değerlendirildiğinde ovaryum dokusunda KG’nda bazal seviyede boyanma pozitifliği görülürken YG ve BYG’nda yara alanı çevresinde pozitiflik artmış olarak gözlemlendi. KHG’nda yara yeri çevresinde ve kortek alanı içerisine dağılmış şekilde yüksek pozitif hücre gruplarının olduğu gözlemlendi. Bu hücre gruplarının yara alanı etrafında olması enjeksiyon ile bırakılan KİSKH olduklarını düşündürdü (Resim 3.2.2).

3.GÜN STRO	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
KG			
YG			
BYG			
KHG			

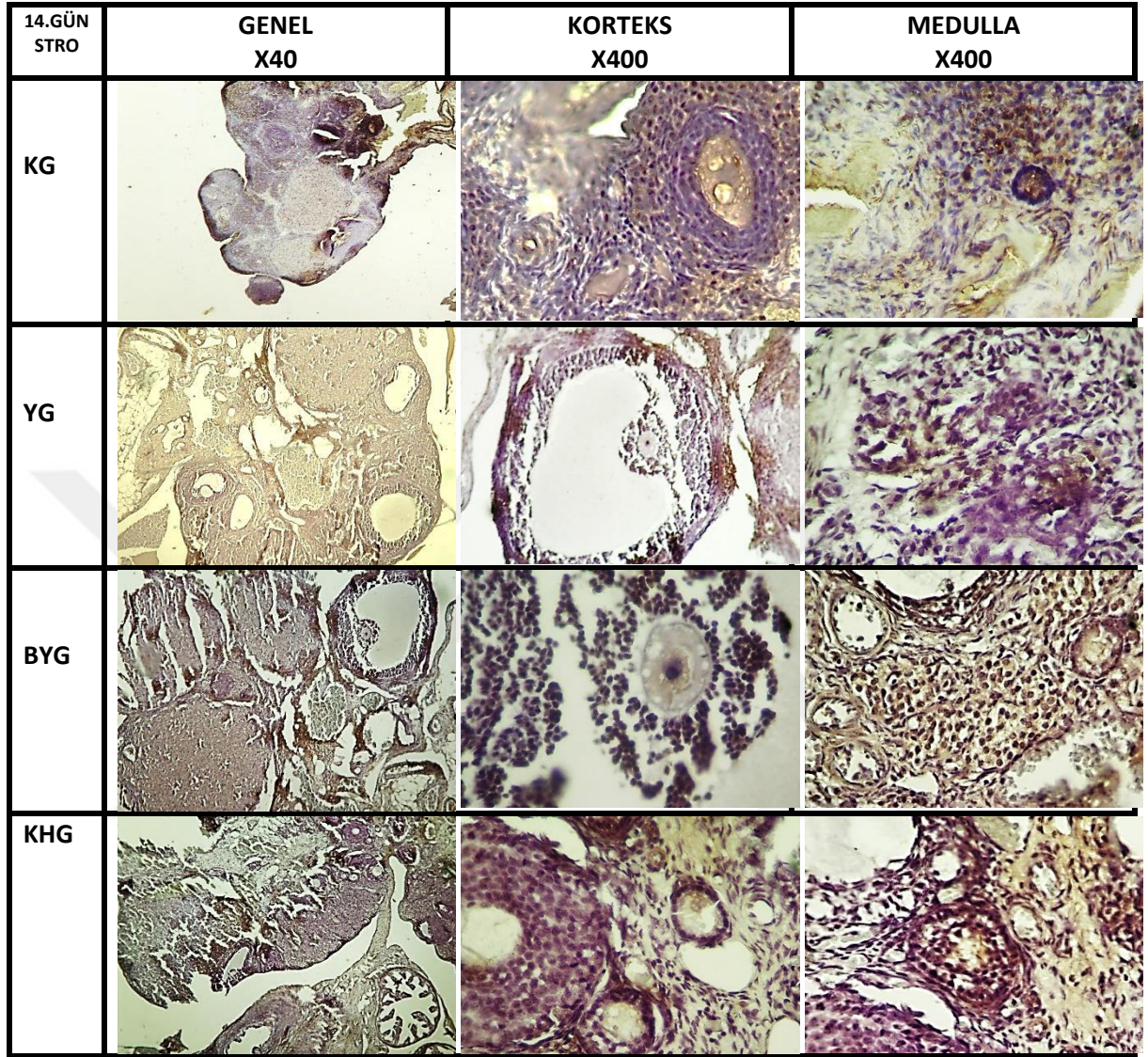
Şekil 3.2.2. Üçüncü gün STRO 1A tüm grupların immünohistokimya boyaması.

Yedinci gün uygulamasında tüm gruplar değerlendirildiğinde ovaryum dokusunda KG, BYG ve YG’nda bazal seviyede boyanma pozitifliği görüldür. KHG’nda korteks içerisinde özellikle foliküler gücrelerin etrafında yüksek pozitif hücre gruplarının olduğu gözlemlendi. Bu hücre gruplarının varlığı bizim transplante ettiğimiz hücrelerin hala bu alanda olduklarını, yara iyileşme sürecine katkıda bulunurken aynı zamanda folikül bütünlüğünü korumaya da katkıda bulunduklarını göstermiştir (Şekil 3.2.3.).



Şekil 3.2.3. Yedinci gün STRO 1A tüm grupların immünohistokimya boyaması.

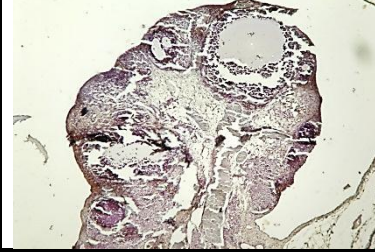
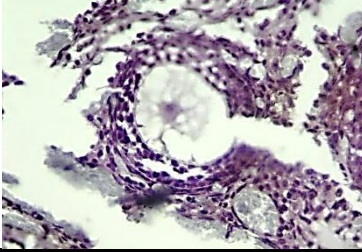
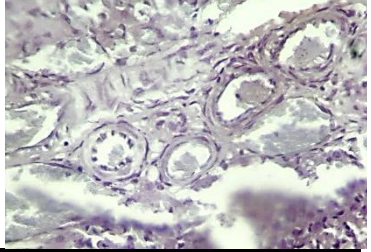
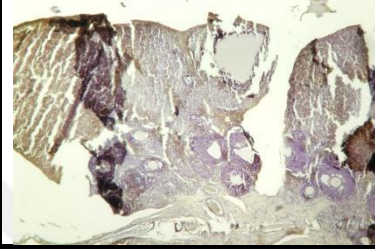
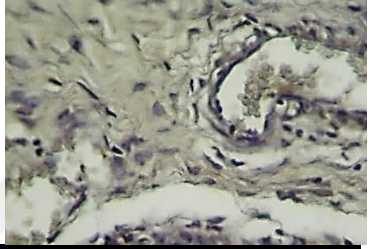
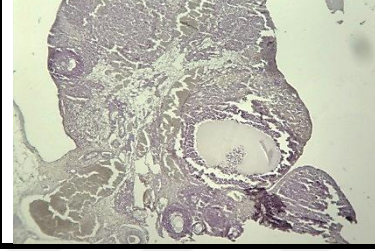
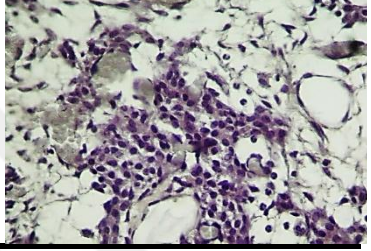
Ondördüncü gün uygulamasında tüm gruplar değerlendirildiğinde ovaryum dokusunda KG, BYG ve YG’nda bazal seviyede boyanma pozitifliği görüldü. KHG’nda korteks ve medulla içerisinde pozitif hücre gruplarının olduğu ve homojen dağılım gösterdiği gözlemlendi. (Şekil 3.2.4.).



Şekil 3.2.4. Ondördüncü gün STRO 1A tüm grupların immünohistokimya boyaması.

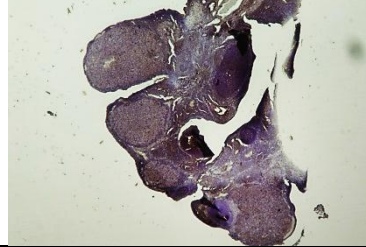
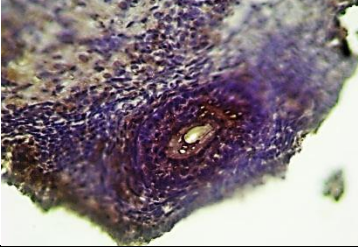
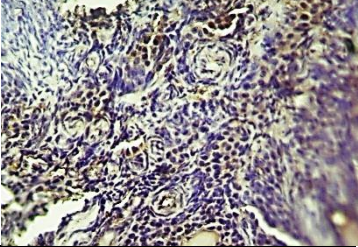
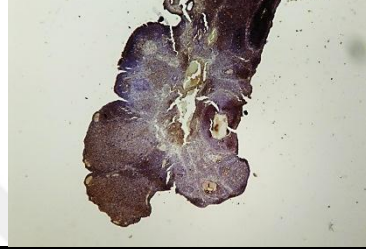
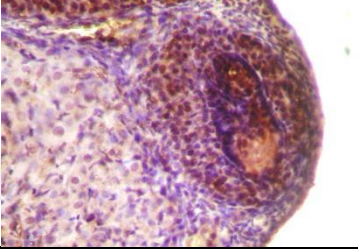
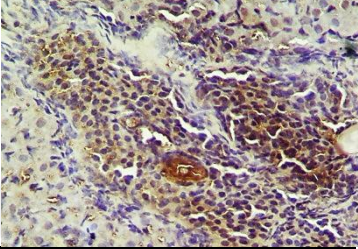
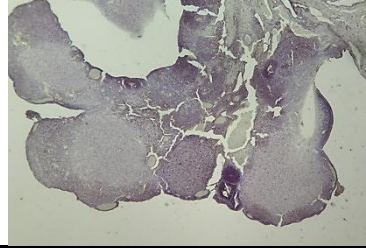
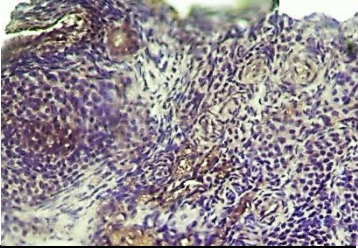
3.3. NOS immünohistokimya değerlendirmesi

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda genelde tüm overi kaplayan bazal bir boyamanın varlığı saptandı ve gruplar arasında anlamlı farklar olduğu gözlemlendi. KG boyamalarında bazal olarak gözlenen boyamanın yara oluşumu ile belirgin bir biçimde arttığı izlendi. BYG ve YG ile karşılaştırıldığında KHG boyamalarında belirgin bir azalma izlendi. Genel olarak i-NOS boyamasının e-NOS boyamasına göre yüksek pozitif olduğu gözlemlendi.

1.GÜN KG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

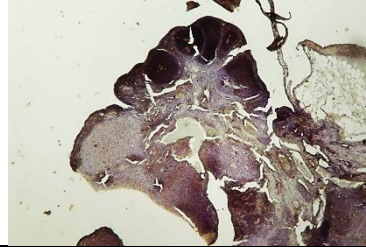
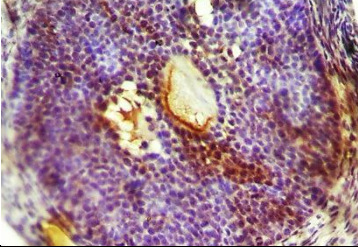
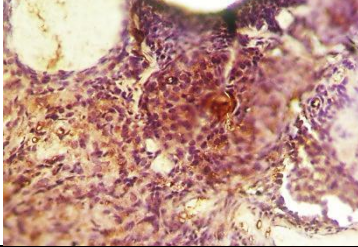
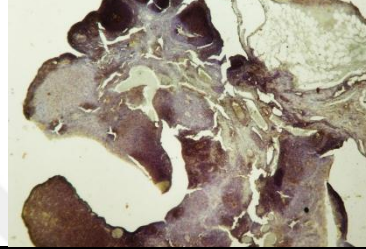
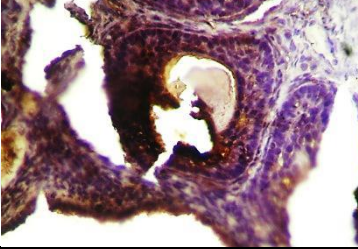
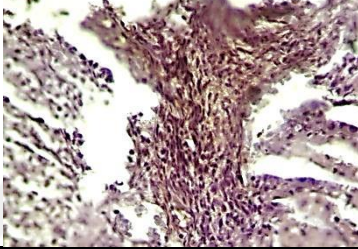
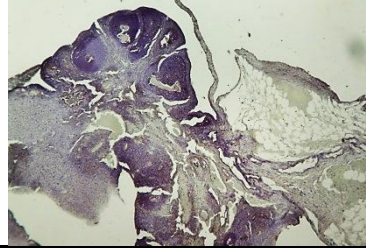
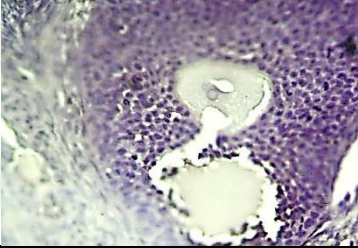
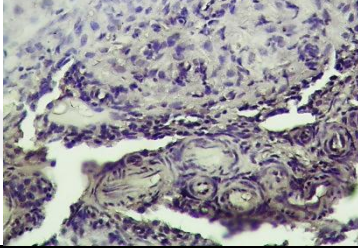
Şekil 3.3.1. Birinci gün KG NOS immünohistokimya boyaması.

Birinci gün KG e-NOS ve i-NOS boyamalarının ovaryum dokusunda bazal seviyede görüldü. Korteks ve medulla kısımlarında boyanma miktarında herhangi bir farklılık gözlenmedi.

1.GÜN YG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

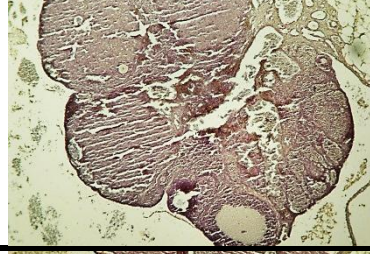
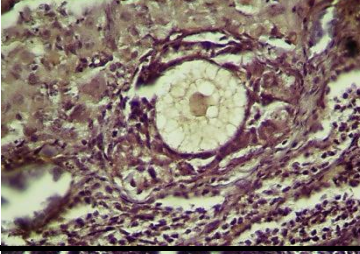
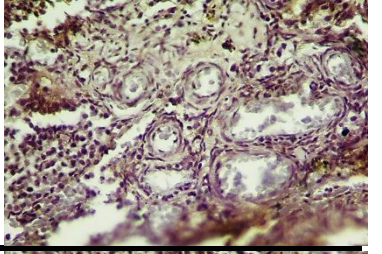
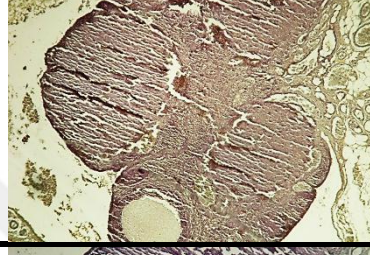
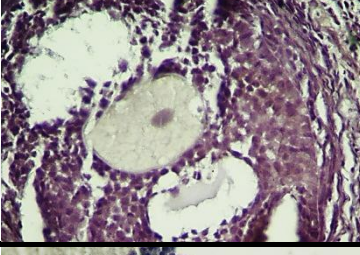
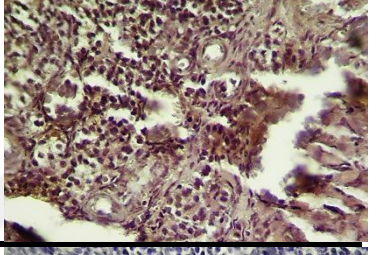
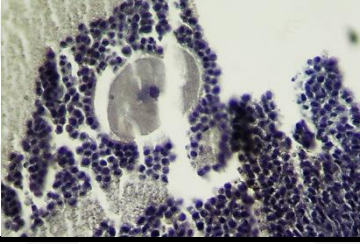
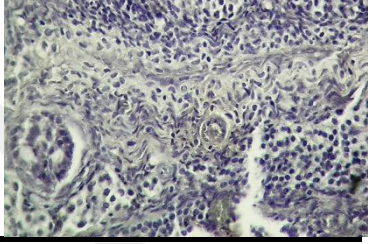
Şekil 3.3.2. Birinci gün YG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda birinci gün YG’nda genelde tüm overi kaplayan bazal bir boyamanın varlığı saptandı ve yara alanı çevresinde boyamanın yoğunlaştığı ve yüksek pozitif olduğu gözlemlendi. Medulla kısmında e-NOS fazlayken i-NOSun korteks ve medullada yüksek pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 3.3.2.).

1.GÜN BYG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

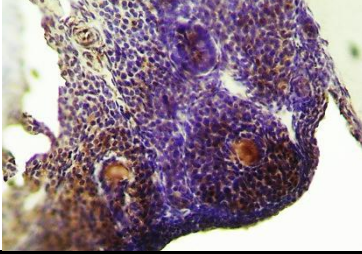
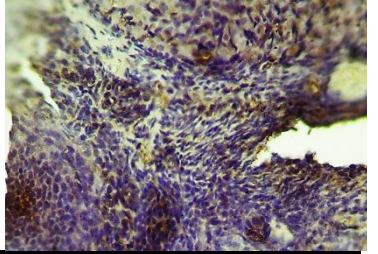
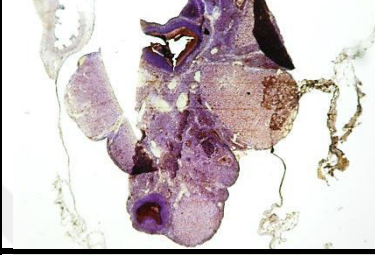
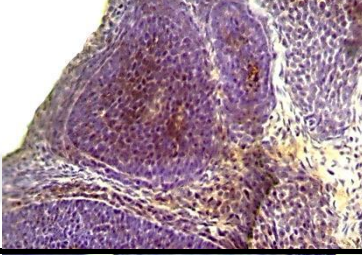
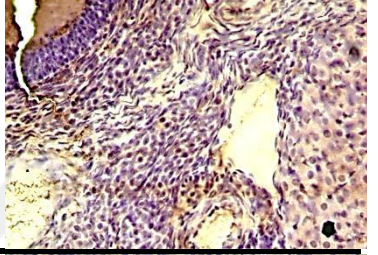
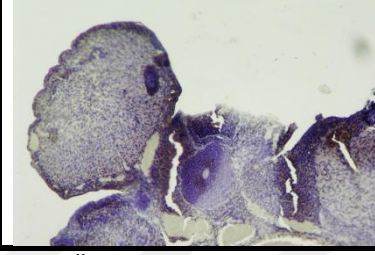
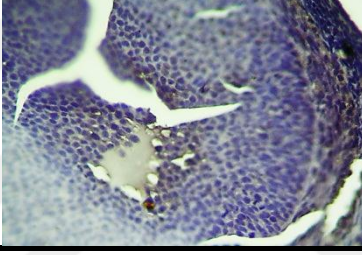
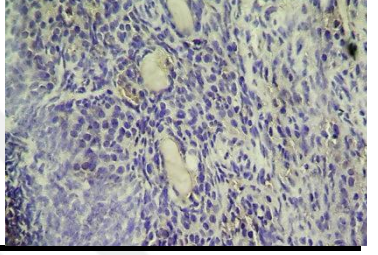
Şekil 3.3.3. Birinci gün BYG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda birinci gün BYG’nda genelde tüm overi kaplayan bazal bir boyamanın varlığı saptandı ve yara alanı çevresinde boyamanın yoğunlaştığı ve yüksek pozitif olduğu gözlendi. Medulla ve korteks kısmında e-NOS ve i-NOSun yüksek pozitif olduğu gözlendi ve özellikle folikül çevresinin ve antrum sıvısının boyandığı gözlendi(Şekil 3.3.2.).

1.GÜN KHG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

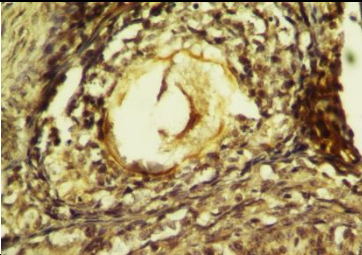
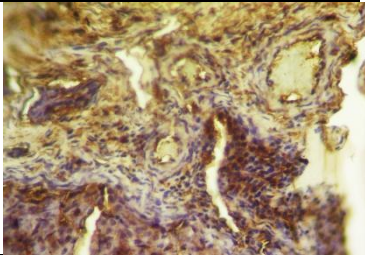
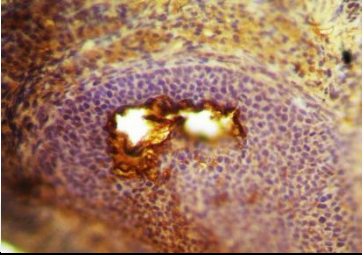
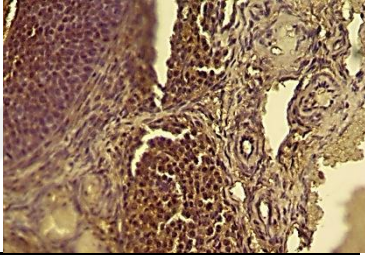
Şekil 3.3.4. Birinci gün KHG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda birinci gün KHG’nda genelde tüm overi kaplayan bazal bir boyamanın varlığı saptandı ve yara alanı çevresinde boyamanın yoğunlaştığı ve yüksek olduğu gözlemlendi. Medulla kısmında e-NOS fazlayken i-NOSun korteks ve medullada yüksek pozitif olduğu gözlemlendi (Şekil 3.3.4.).

3.GÜN KG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
İNOS			
KNT			

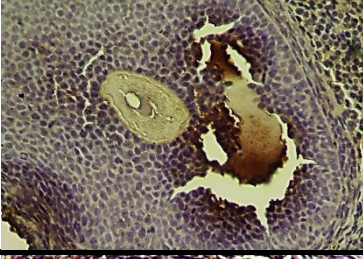
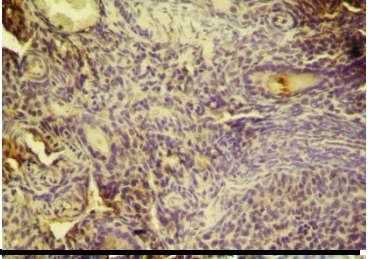
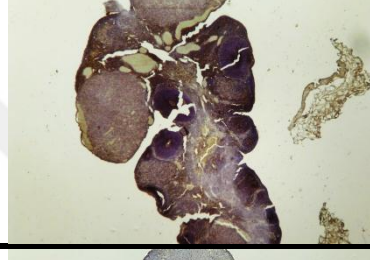
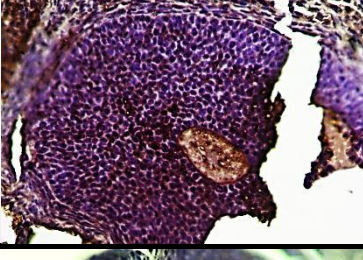
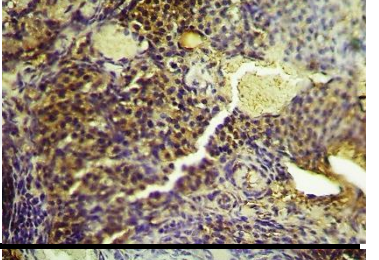
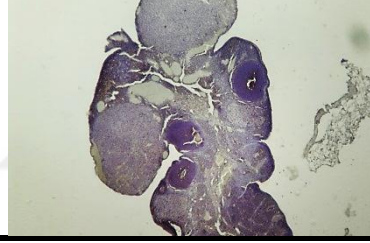
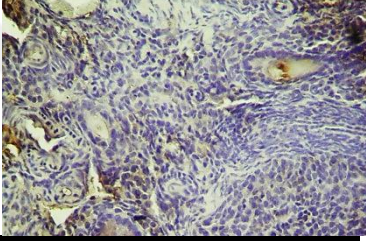
Şekil 3.3.5. Üçüncü gün KG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda üçüncü gün KG’nda genelde tüm overi kaplayan bazal bir boyamanın varlığı saptandı (Şekil 3.3.5.).

3.GÜN YG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

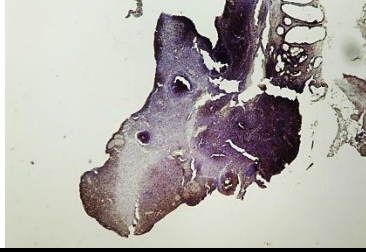
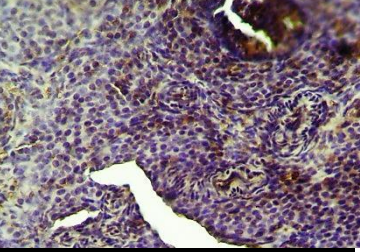
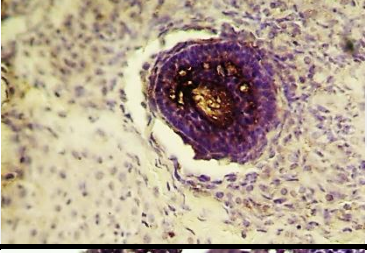
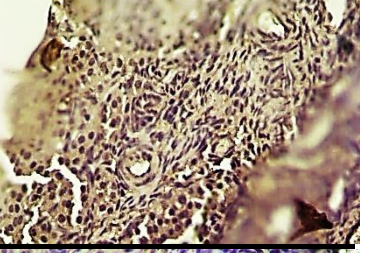
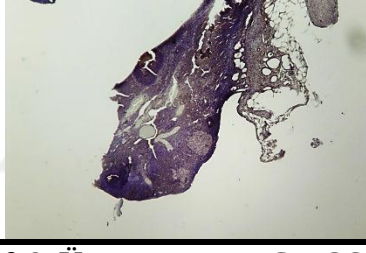
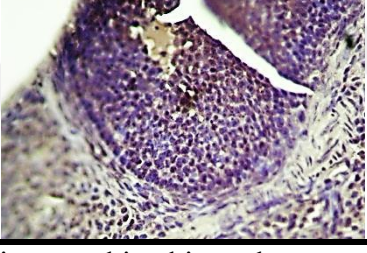
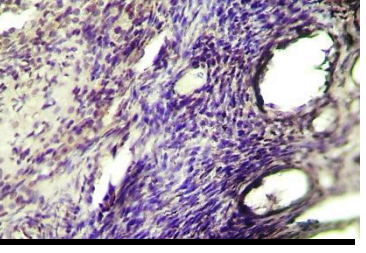
Şekil 3.3.6. Üçüncü gün YG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda üçüncü gün YG’nda genelde tüm overi kaplayan bazal bir boyamanın varlığı saptandı ve yara alanı çevresinde boyamanın yoğunlaştığı ve yüksek pozitif olduğu gözlemlendi. Medulla kısmında e-NOS fazlayken i-NOSun korteks ve medullada yüksek pozitif olduğu gözlemlendi özellikle foliküler hücrelerin etrafında boyanmanın yoğunlaştığı görüldü(Şekil 3.3.6.).

3.GÜN BYG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

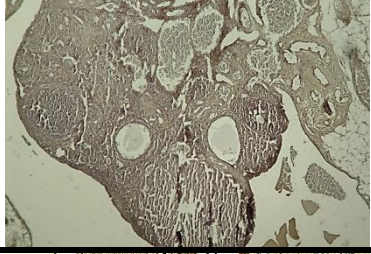
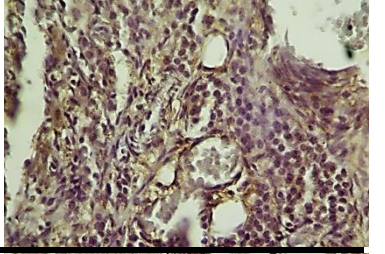
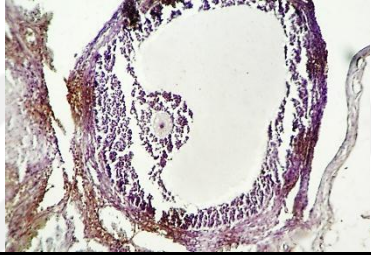
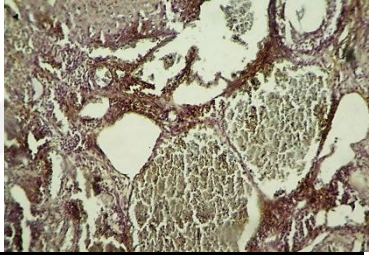
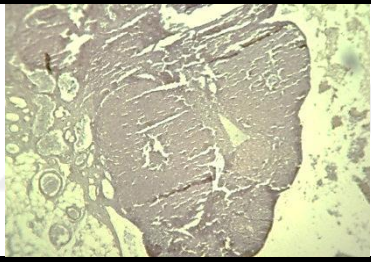
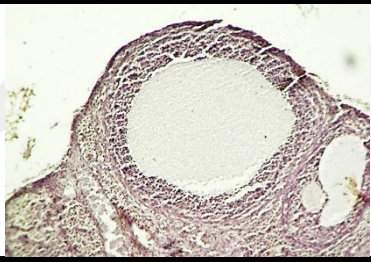
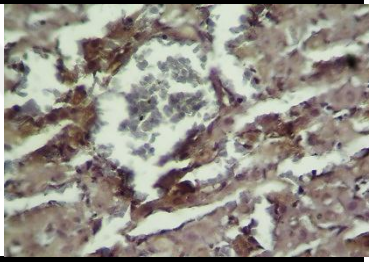
Şekil 3.3.7. Üçüncü gün BYG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda üçüncü gün BYG’nda genelde tüm overi kaplayan bazal bir boyamanın varlığı saptandı ve yara alanı çevresinde boyamanın yoğunlaştığı ve yüksek pozitif olduğu gözlemlendi. Medulla kısmında oluşan besi yeri kaynaklı ödem sıvısı ve medullar hücrelerde e-NOS fazlayken i-NOSun korteks kısmında foliküller etrafında ve antrum sıvısında yüksek pozitif olduğu gözlemlendi özellikle foliküler hücrelerin arasında kalan küçük hücre gruplarında boyanmanın yoğunlaştığı görüldü(Şekil 3.3.7.).

3.GÜN KHG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

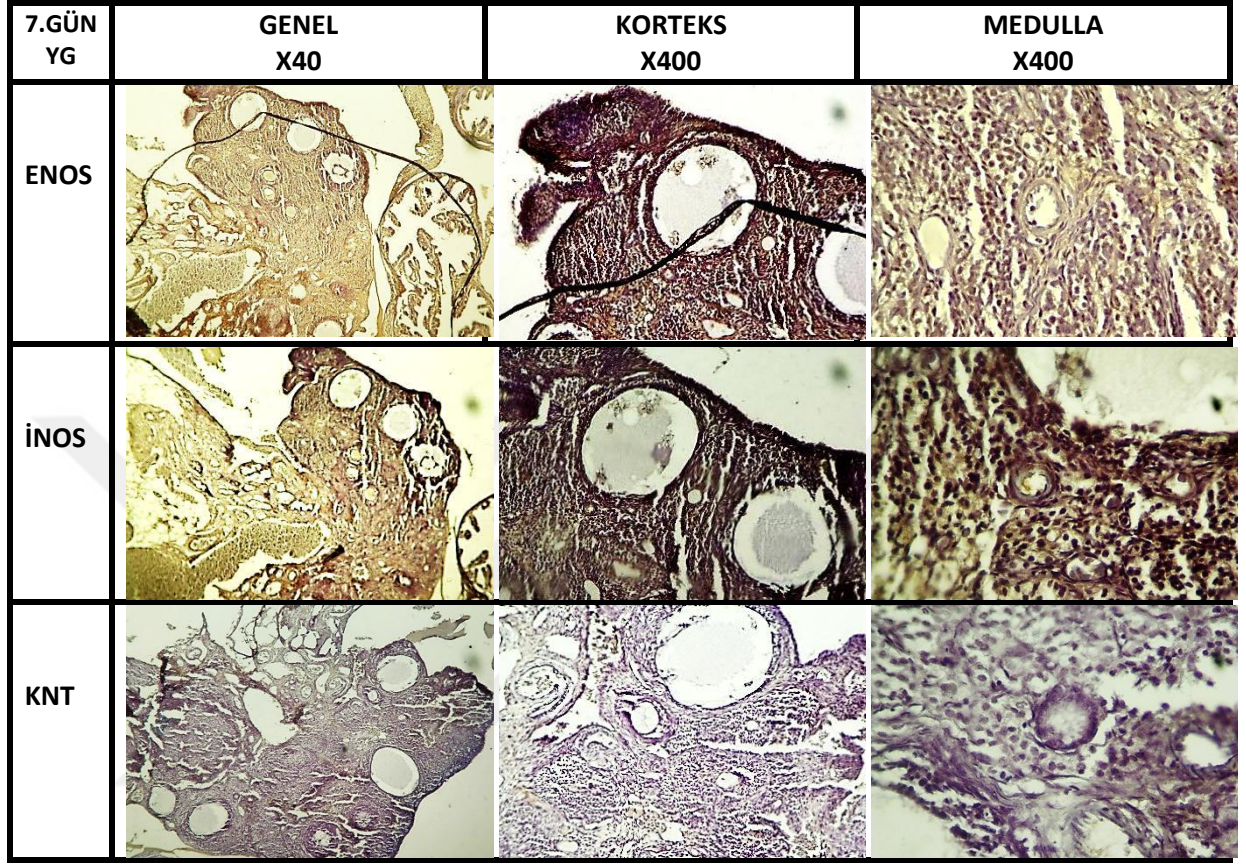
Şekil 3.3.8. Üçüncü gün KHG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda üçüncü gün KHG’nda yara alanı çevresinde boyamanın yoğunlaştığı ve yüksek pozitif olduğu gözlemlendi. Medulla kısmında oluşan besi yeri kaynaklı ödem sıvısı ve medullar hücrelerde e-NOS fazlayken i-NOSun korteks kısmında foliküller etrafında ve antrum sıvısında yüksek pozitif olduğu gözlemlendi özellikle foliküler hücrelerin arasında kalan küçük hücre gruplarında boyanmanın yoğunlaştığı görüldü(Şekil 3.3.8.).

7.GÜ N KG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
İNOS			
KNT			

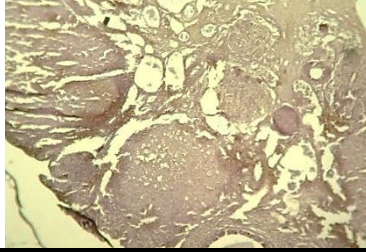
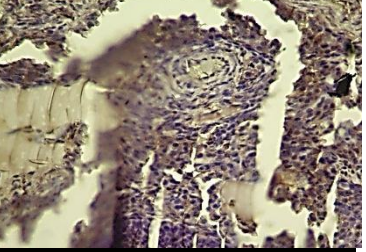
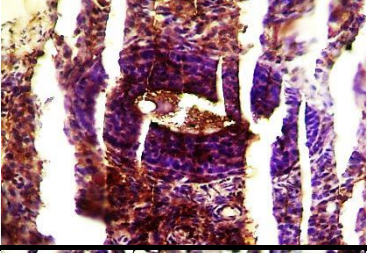
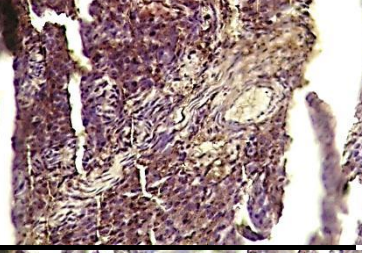
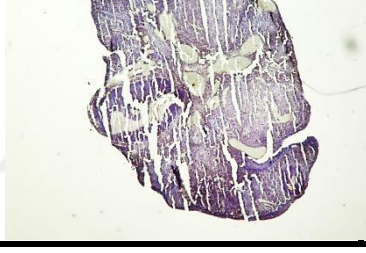
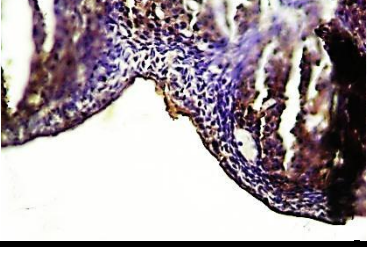
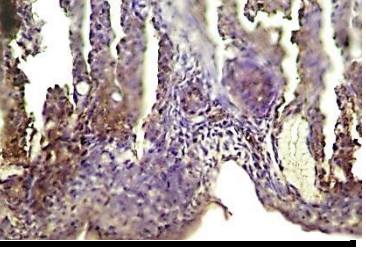
Şekil 3.3.9. Yedinci gün KG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda yedinci gün KG’nda genelde tüm overi kaplayan hafif bazal bir boyamanın varlığı saptandı (Şekil 3.3.9.).



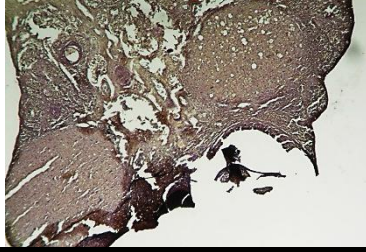
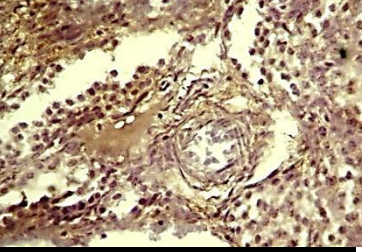
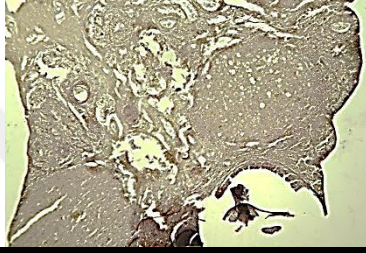
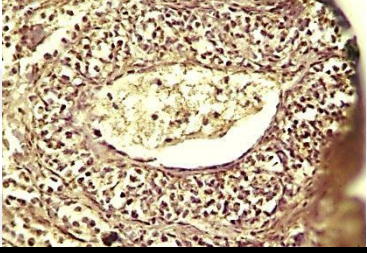
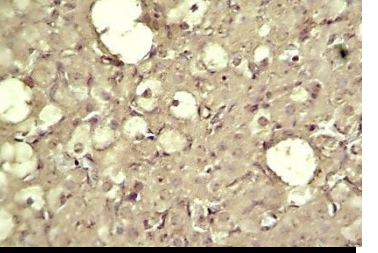
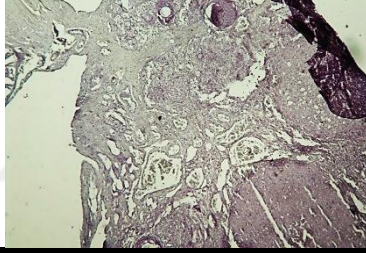
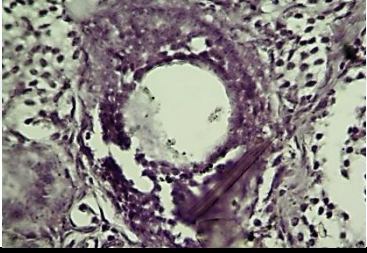
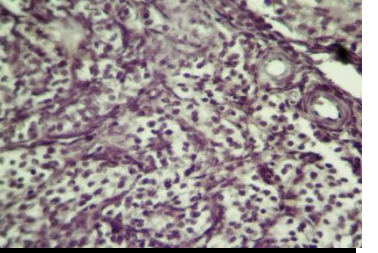
Şekil 3.3.10. Yedinci gün YG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda yedinci gün YG’nda genelde tüm overi kaplayan pozitif bir boyamanın varlığı saptandı. Medulla kısmında hücrelerde e-NOS pozitifliği varken kortekste i-NOS’un foliküller etrafında yüksek pozitif olduğu gözlemlendi özellikle foliküler hücrelerin arasında kalan küçük hücre gruplarında boyanmanın yoğunlaştığı görüldü(Şekil 3.3.10.).

7.GÜN BYG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

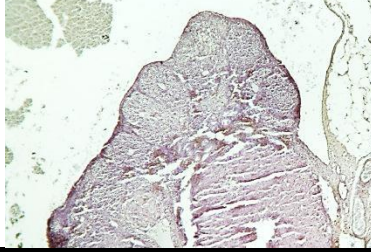
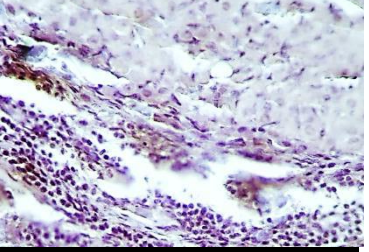
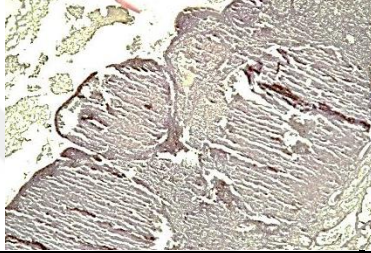
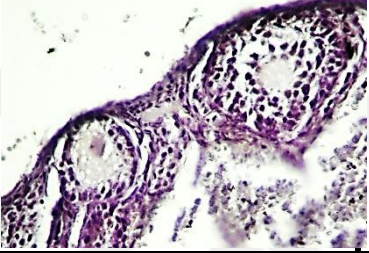
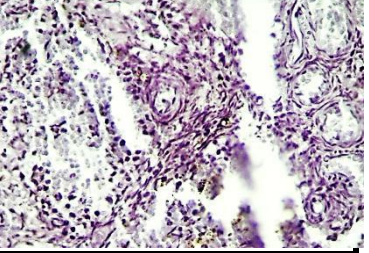
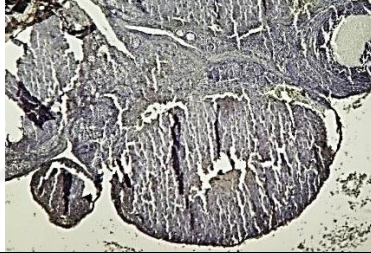
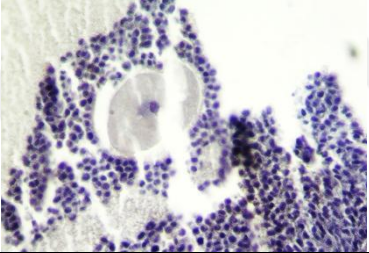
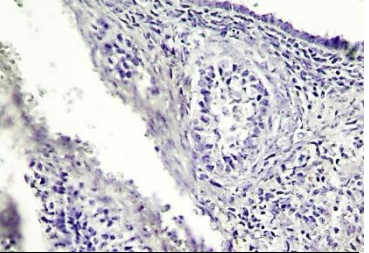
Şekil 3.3.11. Yedinci gün BYG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda yedinci gün BYG’nda genelde tüm overi kaplayan bazal bir boyamanın varlığı saptandı ve yüksek pozitif olduğu gözlemlendi. Medulla kısmında oluşan besi yeri kaynaklı ödem sıvısı ve medullar hücrelerde e-NOS fazlayken i-NOSun korteks kısmında foliküller etrafında ve antrum sıvısında yüksek pozitif olduğu gözlemlendi özellikle foliküler hücrelerin arasında kalan küçük hücre gruplarında boyanmanın yoğunlaştığı görüldü (Şekil 3.3.11.).

7.GÜN KHG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
İNOS			
KNT			

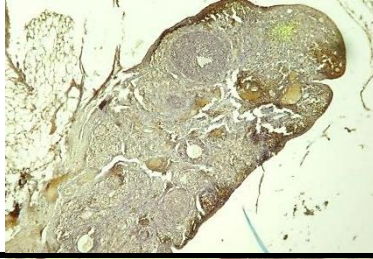
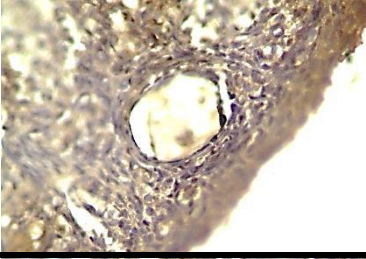
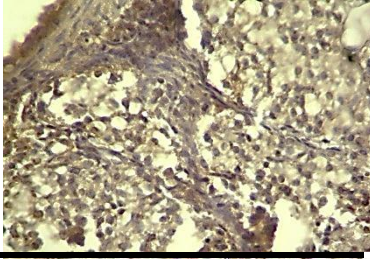
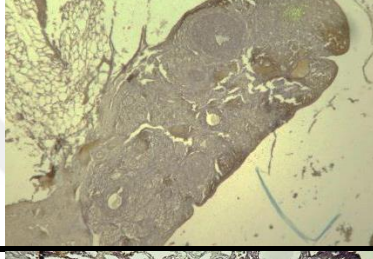
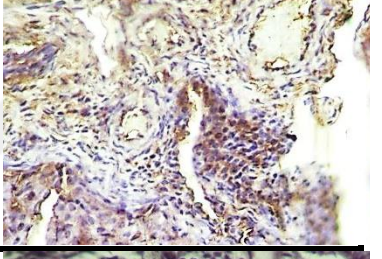
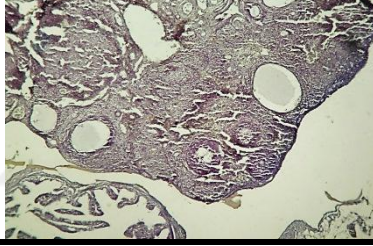
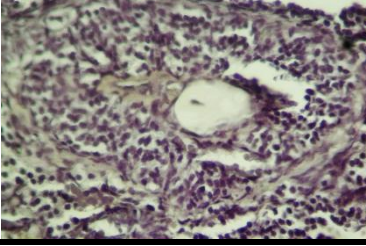
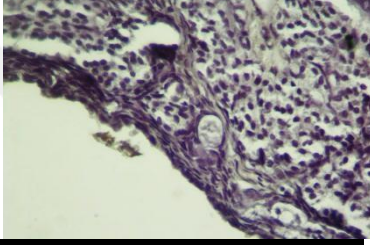
Şekil 3.3.12. Yedinci gün KHG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda yedinci gün KHG’nda genelde tüm overi kaplayan bazal bir boyamanın varlığı saptandı. Korteks ve medullada BYG ve YG’nda olan pozitif boyamanın hafiflediği foliküler hücreler arasında boyanmanın azaldığı gözlemlendi (Şekil 3.3.12.)

14.GÜN KG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
İNOS			
KNT			

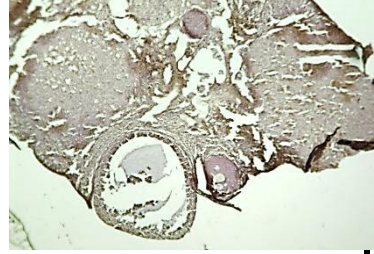
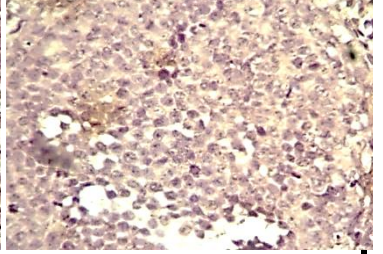
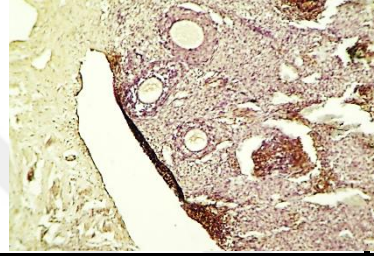
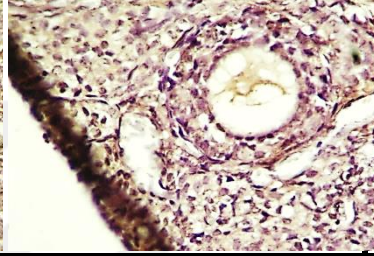
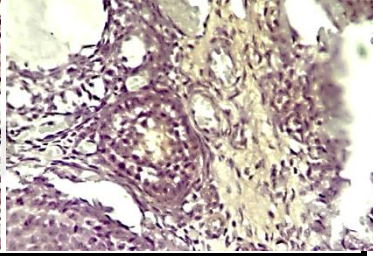
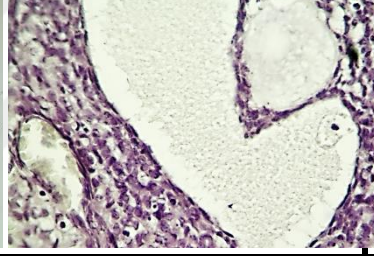
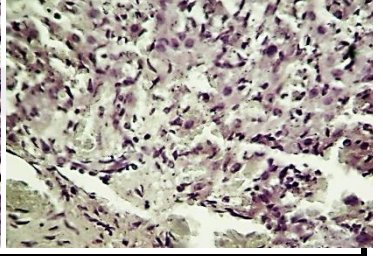
Şekil 3.3.13. Ondördüncü gün KG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda 14. gün KG örneklerinde boyanmanın olmadığı gözlemlendi (Şekil 3.3.13.)

14.GÜN YG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

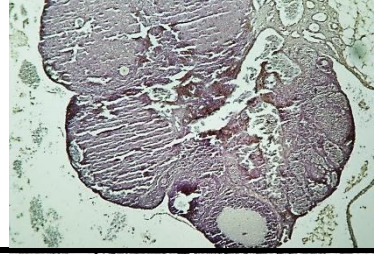
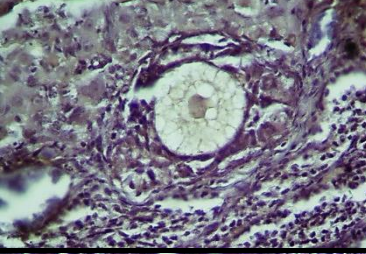
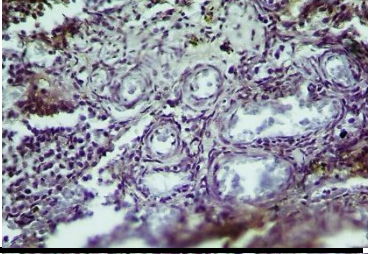
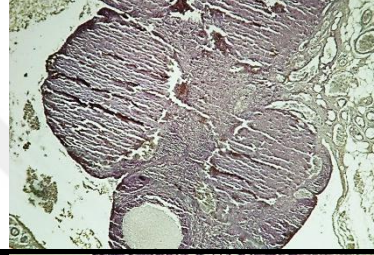
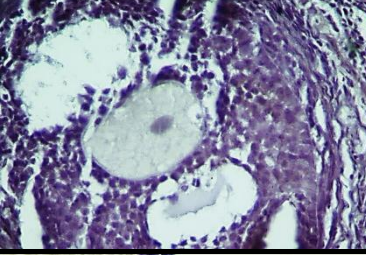
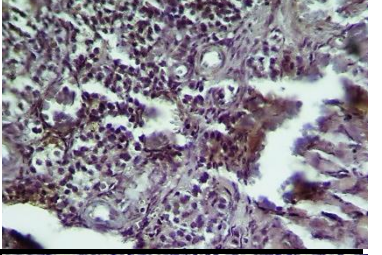
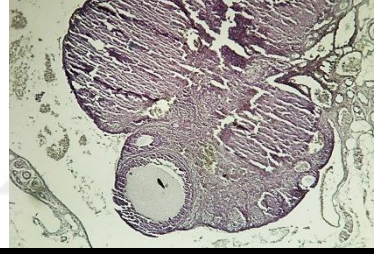
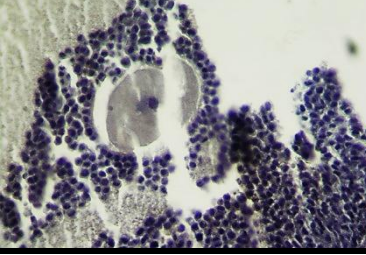
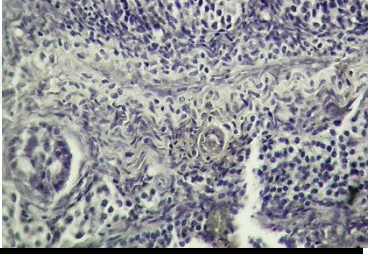
Şekil 3.3.14.Ondördüncü gün YG NOS immünohistokimya boyaması.

NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda 14. Gün YG örneklerinde bazal seviyede hem e-NOS hem i-nos boyamalarının varlığı gözlemlendi (Şekil 3.3.14.)

14.GÜN BYG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

Şekil 3.3.15. Ondördüncü gün BYG NOS immünohistokimya boyaması.

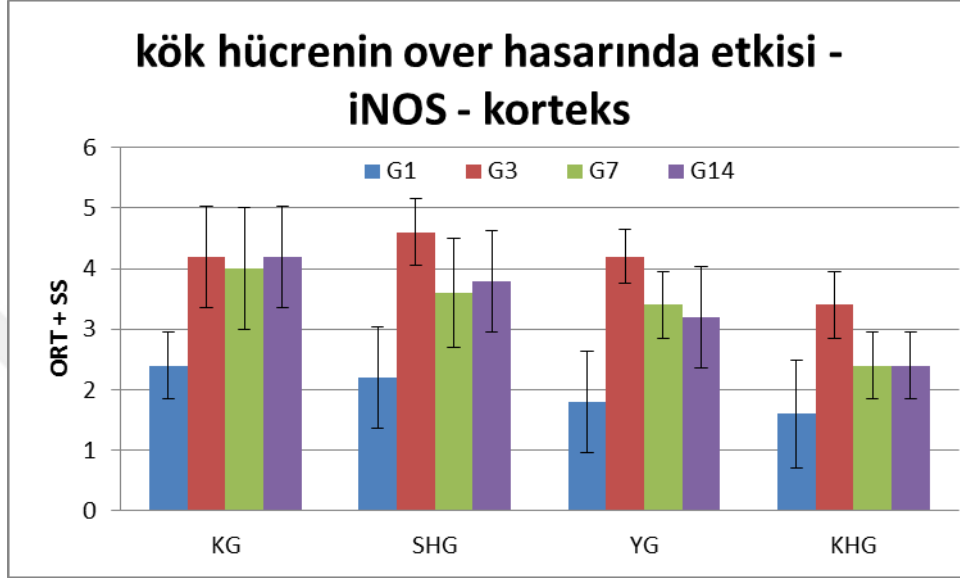
NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda 14. gün BYG örneklerinde bazal seviyede hem e-NOS hem i-nos boyamalarının varlığı gözlemlendi, germinal epitel içerisinde i-NOS pozitif hücrelerin varlığına rastlandı (Şekil 3.3.15.)

14.GÜN KHG	GENEL X40	KORTEKS X400	MEDULLA X400
ENOS			
iNOS			
KNT			

Şekil 3.3.16. Ondördüncü gün KHG NOS immünohistokimya boyaması.

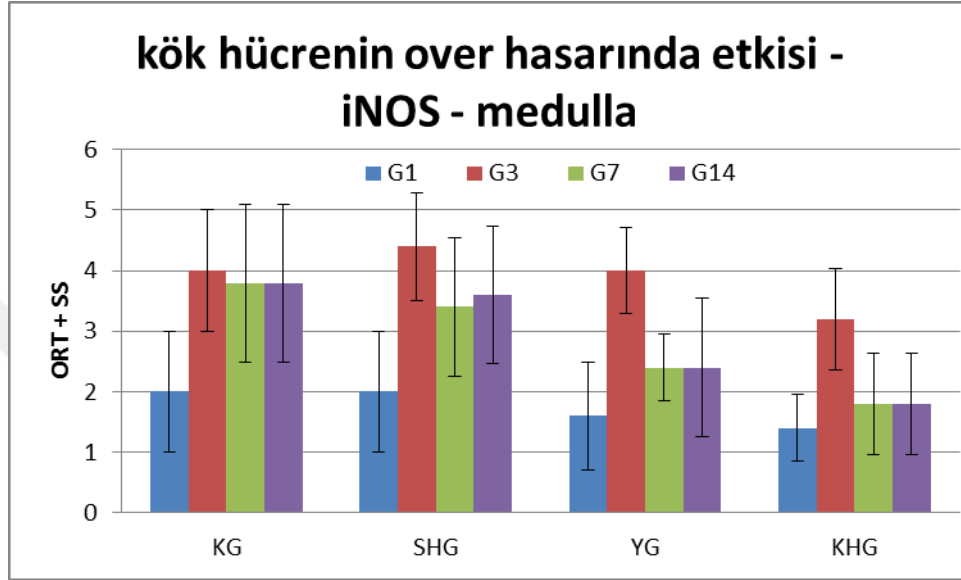
NOS immunositokimyasında yapılan boyamalarda 14. gün KHG örneklerinde hafif seviyede hem e-NOS hem i-nos boyamalarının varlığı gözlemlendi (Şekil 3.3.16.)

Tablo 3.3. Kök hücrelerin over hasarında oksidatif stres parametrelerinden i-NOS'un korteks alanında değerlendirilmesi.



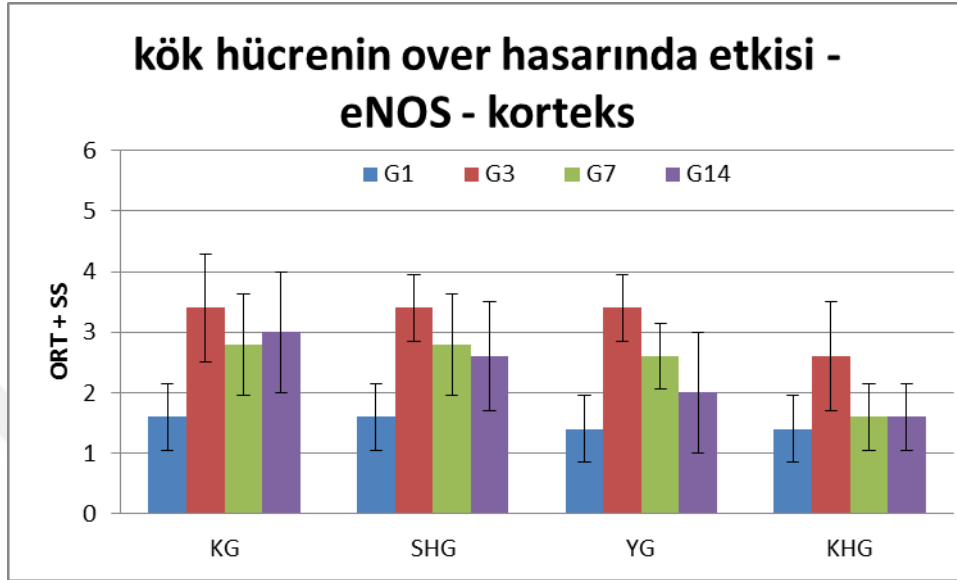
Görüntülerin yapılan skorlama analizlerinde G1 için tüm grupların korteks kısmında az miktarda olan iNOS boyamasının diğer günlerde anlamlı bir ($p<0,001$) artış izlenirken KHG verilen örneklerde yine anlamlı bir şekilde ($p<0,001$) azalma olduğu görüldü. Üçüncü, yedinci ve 14. gün örneklerinde i-NOS varlığı gruplar arasında değerlendirildiğinde KHG için anlamlı bir azalmanın olduğu görülmektedir.

Tablo 3.4. Kök hücrelerin over hasarında oksidatif stres parametrelerinden i-NOS'un medulla alanında değerlendirilmesi.



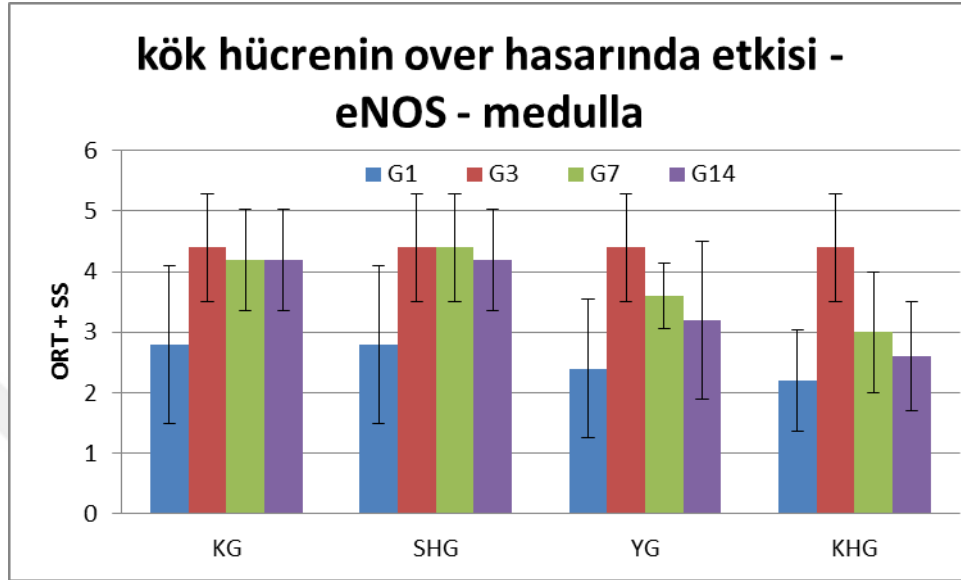
Görüntülerin yapılan skorlama analizlerinde G1 için tüm grupların medulla kısmında az miktarda olan iNOS boyamasının diğer günlerde anlamlı bir ($p<0,001$) artış izlenirken KHG verilen örneklerde yine anlamlı bir şekilde ($p<0,001$) azalma olduğu görüldü. Üçüncü, yedinci ve 14. gün örneklerinde i-NOS varlığı gruplar arasında değerlendirildiğinde KHG için anlamlı bir azalmanın olduğu görülmektedir. .

Tablo 3.5. Kök hücrelerin over hasarında oksidatif stres parametrelerinden e-NOS'un korteks alanında değerlendirilmesi değerlendirilmesi.



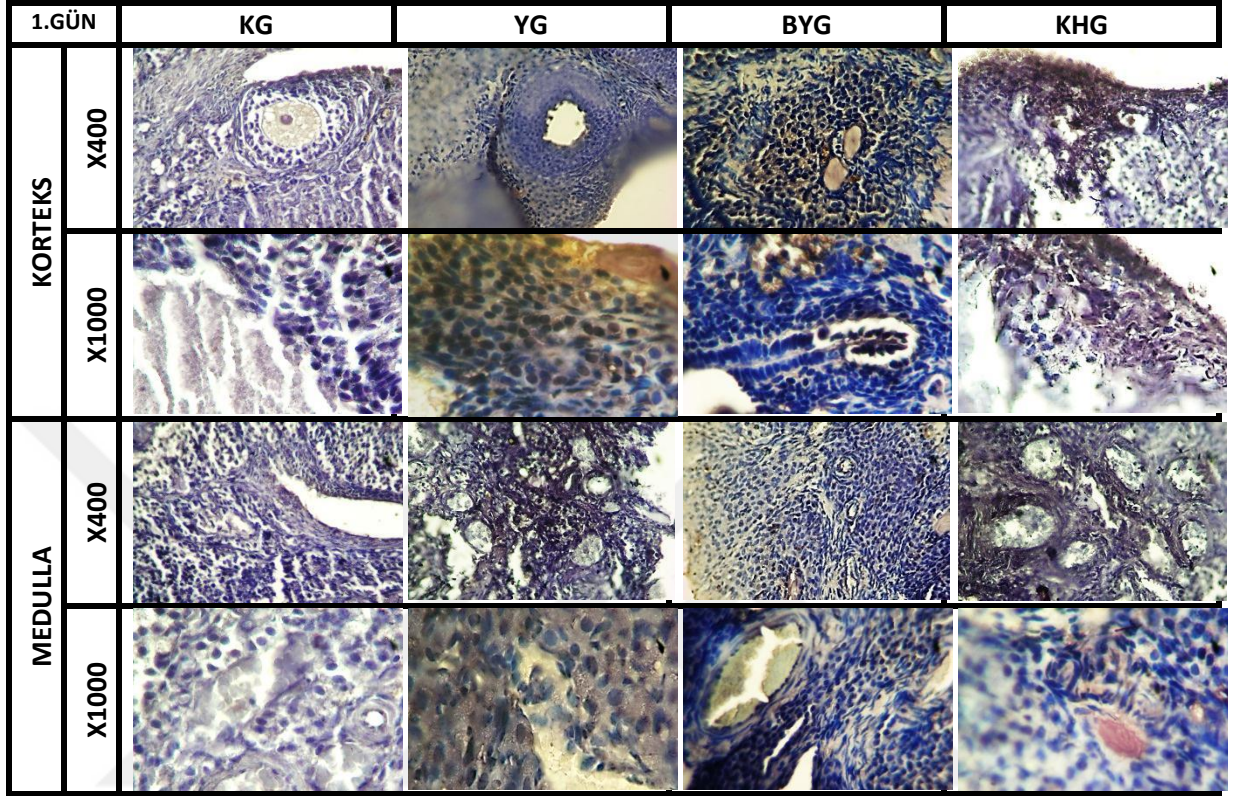
Görüntülerin yapılan skorlama analizlerinde G1 için tüm grupların korteks kısmında az miktarda olan e-NOS boyamasının diğer günlerde anlamlı bir ($p<0,001$) artış izlenirken KHG verilen örneklerde yine anlamlı bir şekilde ($p<0,001$) azalma olduğu görüldü. Üçüncü, yedinci ve 14. gün örneklerinde e-NOS varlığı gruplar arasında değerlendirildiğinde KHG için anlamlı bir azalmanın ($p<0,001$) olduğu görülmektedir.

Tablo 3.6. Kök hücrelerin over hasarında oksidatif stres parametrelerinden e-NOS'un medulla alanında değerlendirilmesi değerlendirilmesi.



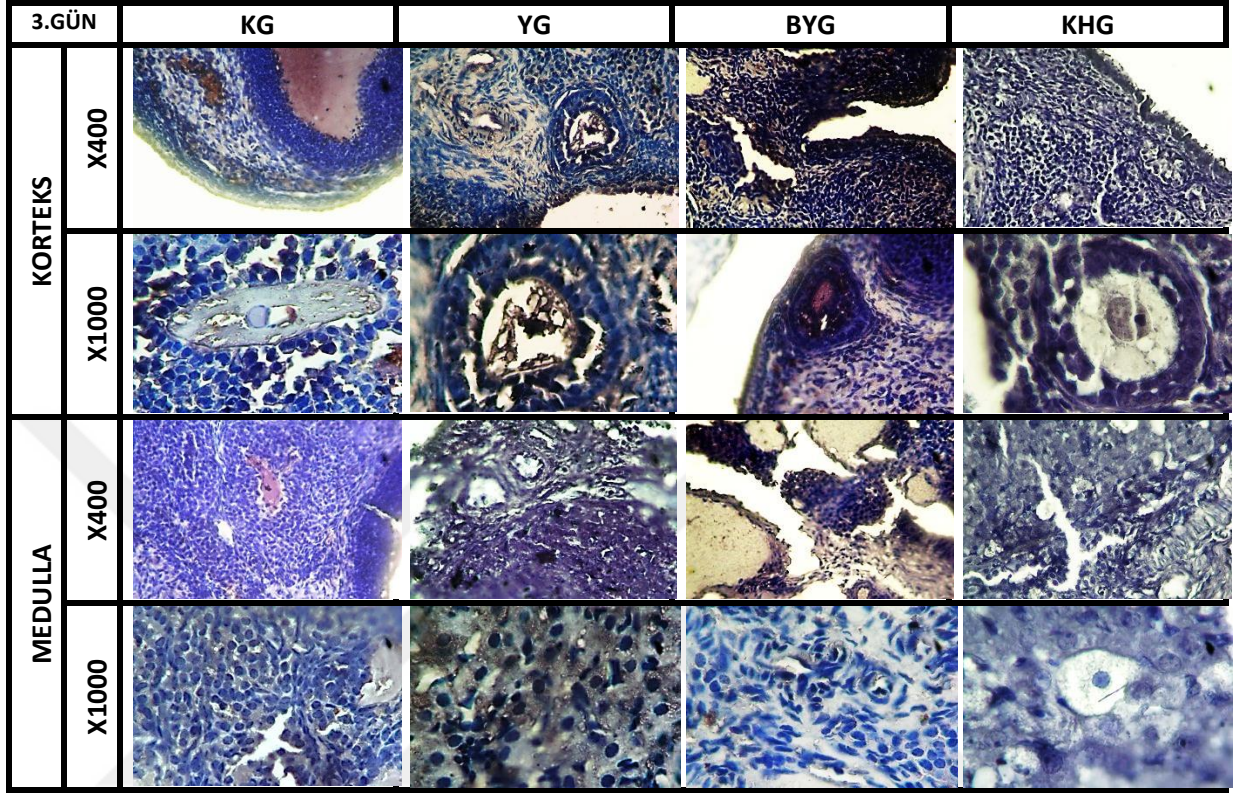
Görüntülerin yapılan skorlama analizlerinde G1 için tüm grupların medulla kısmında az miktarda olan e-NOS boyamasının diğer günlerde anlamlı bir ($p<0,001$) artış izlenirken KHG verilen örneklerde yine anlamlı bir şekilde ($p<0,001$) azalma olduğu görüldü. Üçüncü, yedinci ve 14. gün örneklerinde e-NOS varlığı gruplar arasında değerlendirildiğinde KHG için anlamlı bir azalmanın olduğu görülmektedir.

3.4. TUNEL immünohistokimyası değerlendirmeleri



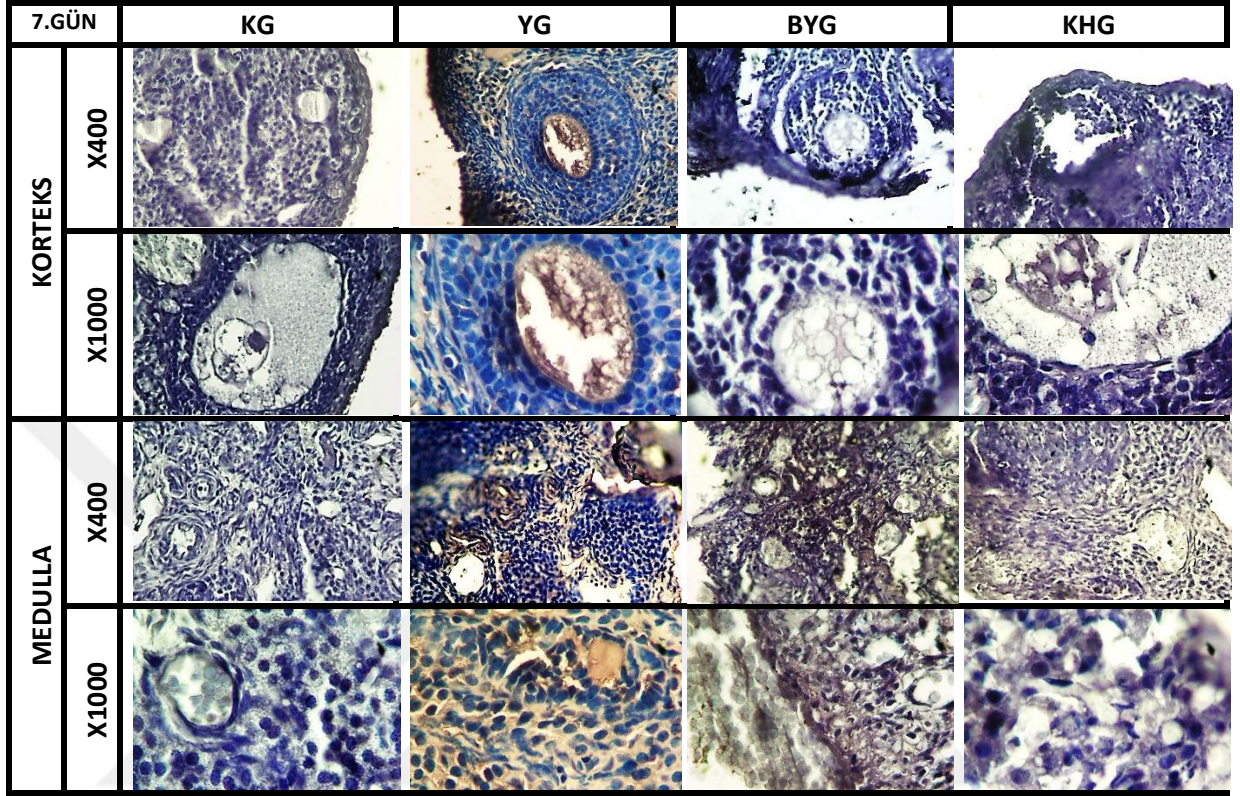
Şekil 3.4.1.Birinci gün TUNEL immünohistokimyası boyamaları.

Birinci gün örneklerinde yapılan TUNEL immünohistokimyası boyama sonuçlarına göre YG, BYG ve KHG örneklerinde yara alanı yakınlarında tünel pozitif hücrelerin varlığına rastlandı. Kortekste germinal epitel içerisinde ve foliküller etrafında TUNEL pozitif hücrelerin varlığına rastlandı.



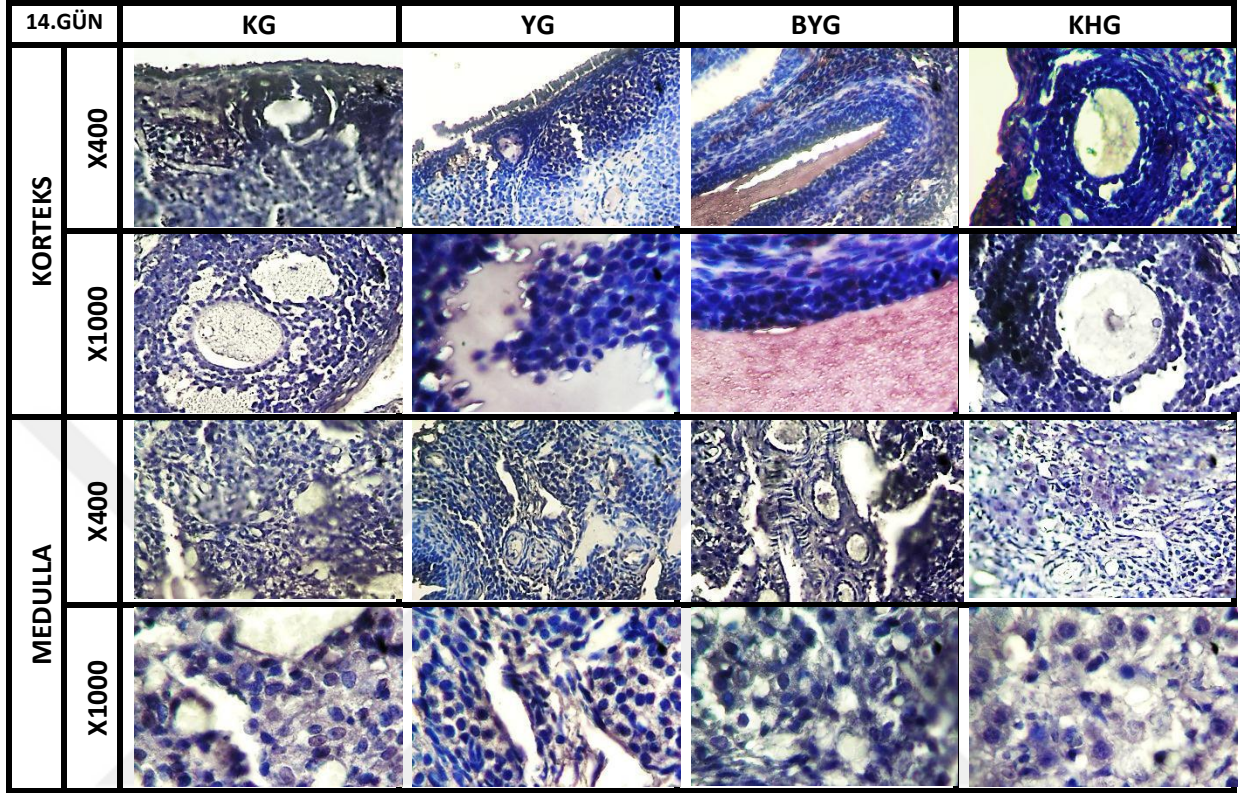
Şekil 3.4.2.Üçüncü gün TUNEL immünohistokimyası boyamaları.

Üçüncü gün örneklerinde yapılan TUNEL immünohistokimyası boyama sonuçlarına göre YG, BYG ve KHG örneklerinde yara alanı yakınlarında tünel pozitif hücrelerin varlığına rastlandı. Kortekste germinal epitel içerisinde ve foliküller hücrelerin arasında ve etrafında TUNEL pozitif hücrelerin varlığına rastlandı.



Şekil 3.4.3. Yedinci gün TUNEL immünohistokimyası boyamaları.

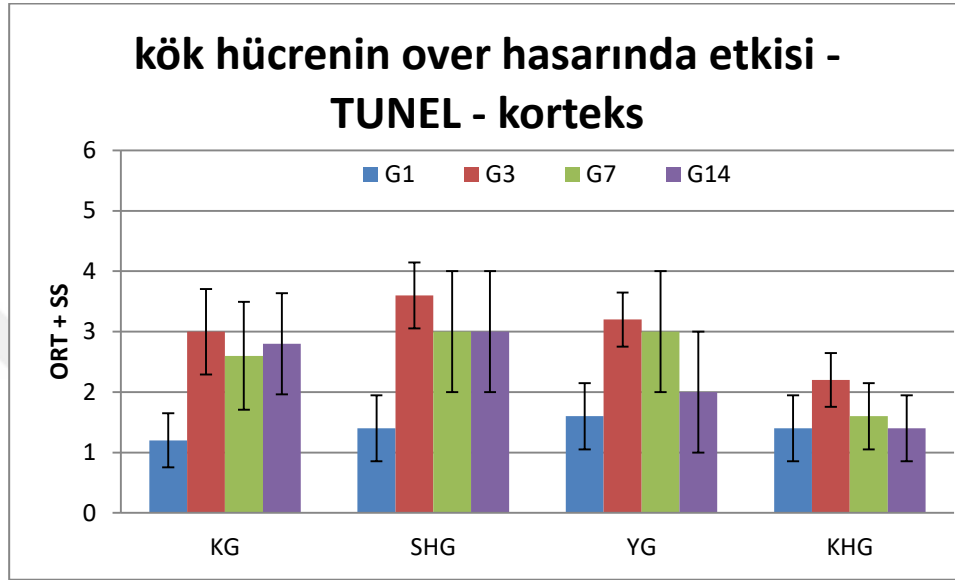
Yedinci gün örneklerinde yapılan TUNEL immünohistokimyası boyama sonuçlarına göre KGnda tünel pozitif hücre sayısı çok az iken, YG ve BYG’nda çok sayıda TUNEL pozitif hücrelerin varlığına rastlandı. YG’nda kortekste germinal epitel içerisinde ve foliküller etrafında TUNEL pozitif hücrelerin varlığına rastlandı. BYG’nda medulla ve kortekste Tunel pozitif hücrelerin sayısı azalırken, KHG’nda TUNEL pozitif hücreler az sayıdaydı.



Şekil 3.4.4. Ondördüncü gün TUNEL immünohistokimyası boyamaları.

Ondördüncü gün örneklerinde yapılan TUNEL immünohistokimyası boyama sonuçlarına göre KG’nda TUNEL pozitif hücre sayısı çok az iken, YG ve BYG’nda çok sayıda TUNEL pozitif hücrelerin az sayıda da olsa varlığına rastlandı. KHG’nda TUNEL pozitif hücreler çok az sayıdaydı.

Tablo3.5. kök hücrelerin over hasarına etkisinin apoptatik açıdan tünel immünohistokimyası ile değerlendirilmesi.



4. TARTIŞMA

Günümüzün gelişen modern dünyasında yaşam kalitesini, beslenmeye ve teknolojik ürünlere maruz kalma sebebiyle infertilite giderek artan bir sorun olarak tababet ilminde geniş bir yer almaktadır. Fertilitenin yarı kısmını oluşturan kadın biyolojisi ve üreme sağlığı bu sorunda önemli bir yer tutmaktadır. Yaşamın başladığı dönemden bu güne kadar ürettikleri oosit ile fertilitiyi başarılı tutan ve türün devamlılığını sağlayan kadınların oosit üretmekte problemler yaşadığı bilinmektedir. Özellikle son zamanlarda şeker ürünlerindeki kalitenin düşmesine bağlı olarak overler zarar görmekte ve oosit üretememektedir. Gelişen teknoloji zararlarından daha fazla fayda sağlamaktadır. En önemli faydalarından bir tanesi kök hücrenin eldesi, çoğaltılması ve gerekli faktörler kullanılarak istenilen hücreye farklılaştırılabilmesi ve daha da önemlisi insan biyolojik yapısı içine taşınarak orada fonksiyon gösterebilmesidir. Kök hücre kendi başına oosite yönlenebildiği gibi bu dönüşüm sürecine oosit mikroçevresinde bulunan diğer hücrelerle de iş birliği yaparak, ürettiği niş adı verilen faktörlerle katkı sağlamaktadır. Bu amaçla çalışmamızda biyopsi modeli örneğinde overde yara oluşturulup kök hücrenin yara iyileşmesine ve hücresel üretime etkilerini inceledik. Besi yeri uygulaması ile karşılaştırıldığında besi yeri içinde verilen kök hücrenin yara iyileşmesini hızlandırdığı ve hücreler üzerinde olumlu etki gösterdiği anlaşıldı. Yara iyileşmesinin bir, üç, yedi, on dört ve yirmi sekiz günlük zaman dilimleri incelendiğinde on dördüncü günde tamamlanan bir iyileşmenin olmasından dolayı yirmi sekiz günlük örneklerin sonuçları çalışmaya dahil edilmedi. Birinci gün sonuçları anlamlı bir farklılık oluşturmamasına karşılık üç, yedi ve on dördüncü günlerde iyileşmenin kök hücre etkisi ile belirgin bir şekilde hızlandığı saptandı. Kök hücrenin olası olarak kullanabileceği mekanizmalardan oksidatif stres ve apoptozis parametreleri NOS ve TUNEL, İHK boyaması ile incelendiğinde yara oluşumu ile artan serbest radikallerin hücre intiharına neden olduğu ve kök hücrenin bu mekanizmalar üzerinden stresi azaltarak hücre ölümünü engellediği bulundu.

KİSKH eldesi, çoğaltılması tamamlandıktan sonra STRO-1 İHK ile çoğunluk hücrenin pozitif immunreaktivite göstermesi sonucunda kök hücre tanımlanması yapıldı. Birinci ve üçüncü günlerde yara yerine lokalize olan biçimde ayrıca damarların etrafında pozitif immünreaktivite izlendi. Yedincinci günde kortekse doğru dağılmış,

özellikle foliküler hücrelerin içinde ve etrafında dağılmış immünreaktivite görüldü. On dördüncü günde over dokusunun her alanına dağılmış bazal boyamadan daha yüksek bir immünreaktivite görüldü. STRO1 iyi bilinen bir yüzey belirteci olup birçok farklı mezenkimal kök hücre için tanımlayıcı olarak kullanılmaktadır. Ayrıca multipotent olmanında bir belirteçdir. Odontoblasta ve nörona farklılaşmış hücrelerde de pozitif olarak boyandığı bilinmektedir. Birçok dokuda özellikle arteriyollerin etrafında pozitif olduğu gösterilmiştir. Yapılmış çalışmalarda bu hücrelerin mezenkimal kök hücre olabileceği düşünülmüştür. STRO1 ayrıca mezenkimal kök hücre popülasyonu için erken bir belirteç olabilme ihtimalini düşündürmektedir. Yara iyileşmesi esnasında yara yerinde bol miktarda arttığı diş ve kemik örneklerinde gösterilmiştir (Youshube ve ark 2012, Stimpfel M ve ark. 2013). Çalışmamızın sonuçları literatür ile uyumlu olup over gibi bir dokuda var olan mezenkimal kök hücrelerin boyandığını BYG ile karşılaştırıldığında ise artan pozitif immünreaktivitenin uygulamada kullanılan kök hücreleri gösterdiğini düşündürmektedir.

Overde biyopsi modelindeki yara hasarlanmasında kök hücre uygulamasının anlamlı ve olumlu etkilerinin kullandığı mekanizmaları incelemek üzere NOS ile TUNEL boyamaları üzerinden oksidatif stres ve apoptozis araştırıldı. Yara sonrasında özellikle birinci gün başlayan ve iyileşme ile azalan i ve e-NOS immünreaktivitesinin arttığı ve buna eşlik eden TUNEL pozitifliğinin olduğu görüldü. Kök hücrenin bu mekanizmaları kullanarak yara iyileşmesini hızlandırdığı düşünüldü. NO için over içi düzenleyici bir faktör olduğu ve i, e ve n-NOS üç izoformunun da bazal bir düzeyde bulunduğu önceki çalışmalarda gösterilmiş (Zik B. ve ark. 2012) ayrıca oosit maturasyonunda gerekli oldukları oositin sitoplazmasında bulundukları ortaya konmuştur (Jablonka-Sariff A. 1999). Hiperstimulasyon yapılan overlerde teka, stroma ve oosit yüzeyindeki hücrelerde e-NOS'un varlığı ve ovulasyondan sonra korpus luteum hücrelerinde ifade edildiği saptanmıştır. Aynı şartlarda i-NOS ifadesinin e-NOS' tan farklı olduğu, olgunlaşmamış overlerde teka ve stromada bulunmakta, ovulasyondan sonra gelişmemiş overin korpus luteumunda sadece dış yüzeyinde bulunmakla birlikte dejenere olan korpus luteumda bulunmamaktadır. Korpus luteumun parankimal olmayan hücrelerinde ise kuvvetli pozitif olduğu gösterilmiştir. Hiperstimulasyon yapılan overlerde ise her iki NOS'un da anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir

(Jablonka-Sariff A. 1999). NADPH diaforoz aktivitesi ile bakılan overlerde histokimyasal olarak NOS'un stromada ve tekada bol miktarda bulunduğu ve korpus luteumda azaldığı gösterilmiştir. Bu boyamaların İHK'sal karşılıkları olarak yapılan e-NOS ve i-NOS boyamasında benzer boyama şekli ve dağılımı görülmüş olup stroma, teka ve korpus luteumda varlıkları overyan siklusun düzenlenmesinde rol oynadıklarını işaret etmiştir, tüm çalışmalarda damar etrafında kuvvetli boyama olduğu saptanmıştır(Zach Krisson 1996). Bu gözle bakıldığında çalışmamızın sonuçları literatür ile uyumlu bulunup normal durumlarda overde dengenin sağlanması ve normal bir ovulasyonun yapılması için var oldukları düşünüldü. Daha önce hiç bakılmaması nedeniyle özgün değere sahip olan biyopsi modeli yara iyileşmesindeki NOS artışı, yetmezlik olan overlerde de kök hücre uygulamasının yararlı olacağı düşüncesine varıldı. Daha önce yapılmış çalışmalarda iskemik reperfüzyon yapılarak hasar oluşturulmuş overlerde ödem ve kanamanın ön planda olduğu ve bunun oksidatif strese kaynaklandığı gösterilmiştir. TNF alpha ve interlökin betanın ayrıca apostein ve kaspaz 3 faktörlerinin serbest radikallerin bulunduğu nekrotik ortamlarda fazla miktarda ifade edilirken antioksidan tedavisi ile azaldığı gösterilmiştir(Gezer S. 2009). Benzer durum torsiyonu olmuş overlerde iskemik hasarlarda görülmüş ve MDA seviyeleri ile ispatlanmıştır. Reperfüzyon sonrasında overe aşırı miktarda gelen serbest radikallerin beraberinde aktif nötrofilleride dokuya getirmeleri lipid peroksidasyonunu hızlandırarak katalaz, SOD, ve GSPHx gibi antioksidanlarla temizlenmek durumundadır. Oluşan bu stres ortamına hormonlarında anlamlı bir etkisi olup hasarın temizlenmesinde değişiklik oluşturdukları saptanmıştır. Bu ortamda hücrelerin belirgin bir şekilde apoptoza uğradıkları ve TUNEL pozitif olarak boyandıkları görülmüştür. Apoptoz görülen hücreler folikülün tüm evrelerinde var olup toksik etkinin oluşturduğu, apoptoz benzer şekilde hormona duyarlı olup ölen hücre sayısının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu etkinin varlığı bir fitoöstrojen olan silmarin ile gösterilmiş antioksidan, antiinflamatuvar ve immünmodülatör olarak davrandığı ifade edilmiştir. Ayrıca bu etken kaspaz, bcl2 ve nf-beta üzerinden anjiyogenezi inhibe etmiştir (Gürgen S. 2009).

Overde bulunan oositlerin embriyonik olanları over dışı kaynaklardan oluşurken fetal ve postnatal olanları OSE'den kaynaklanır. Fetal primer foliküller intrauterin

yaşamın ikinci trimesterinde oluşurken regli siklusu ile birlikte primer foliküller şekillenir ve taze yumurtaları üretkenlik için sürekli bir şekilde hazır olmasını sağlar. Prematür over yetmezliği gibi hastalıklar veya menapoz gibi durumlarda oosit kaynakları yetersizleşir böyle durumlar içinde yine over dışı kaynaklı kök hücrelere dönmek gelecek için büyük umut vaad etmektedir. Lee ve ark. 2007’de yaptığı bir çalışmada over dışı kök hücre kaynakları ile yeniden oogeneze yapılabileceği düşüncesi ortaya çıkmış ve yeşil florasan protein taşıyan transgenik fare embriyonik kök hücreleri kullanılarak in vitro oosit elde edilmiştir(Johnson 2007, Hüpner ve ark. 2003). Dyce ve ark. 2006 yılında fetal domuzların deri kök hücrelerini kullanarak VASA ve DAZL ifade eden granüloza hücreleri ve bir süre sonra folikül gelişimini izlemişlerdir. Ghadami 2008 yılında hormona duyarlı farklılaşmış kemik iliği hücrelerinin oluşabileceğini göstermişlerdir. Ovaryum yüzey epitelinden elde edilen kök hücrelerinin Sox 2, Oct 4 ve Nanog ifade ederek embriyonik kök hücre özelliği gösterdiği ve bu kök hücrelerden germ hücresi belirteçlerini ifade eden hücreler yapabildiklerini ortaya koymuşlardır (Zhang ve ark. 2008, Virant-Klun 2010, Skutella 2010). Yapılmış birçok çalışmada embriyonik döneme ait transkripsiyonel faktörlerden birçoğu ile çelişkili sonuçlar ortaya atılmış ve son yapılan çalışmada ergin dönem fare ovaryumunda tüm düzeydeki foliküllerde bazı belirteçlerin varlığı saptanmıştır, bunlar içerisinde SSEA-1 özellikli olarak gösterilmiştir.

5. SONUÇ, YORUM VE ÖNERİLER

Bu çalışmada biyopsi modellemesi ile over dokusunda hasar oluşturulup oluşan hasara KİSKH uygulaması yapıp tedavi sürecine katkısı 3. Günde en aktif yara oluşumu gözlenirken 14. Günde iyileşmenin gerçekleştiği saptandı ve kök hücrenin yedinci gün gruplarında anlamlı bir şekilde iyileşmeyi hızlandırdığı ve olumlu katkılar sağladığı saptandı.

Kök hücre varlığı STRO-1 boyaması ile ortaya konulup kemik iliği stromasından alınan mezenkimal kök hücrelerin 4. Pasaja geldiğinde hoöojen bir yapıya kavuştuğu ve klasik kök hücre gibi davrandığı bulundu.

Kök hücrenin over dokusundaki hasara katkısı hem parankimin tamiri hemde oogenez sürecinde folikül oluşumuna katılan hücrelere verdiği destek saptandı. primer oositten graaf folikülüne ve teka ile granüloza hücrelerine olumlu katkılar sağladığı izlendi.

NOS boyamaları ile sürecin oksidatif hasar ile gerçekleştiği e-NOS daha belirgin olmak kaydı ile i-NOS immün boyamalarının bazale göre çok fazla arttığı saptandı.

Oksidatif stresin hücre ölümü üzerine ilişkisi ve etkili olduğunda TUNEL boyamalarındaki artışla belirlendi.

Kök hücrenin serbest radikal oluşumunu azaltıp hasarı engellediği ve buna bağlı olarak apoptozun gerilediği düşünüldü.

Kök hücrenin bu olumlu etkilerinin günümüz kadınının beslenme, teknoloji ve ilgil faktörler nedeniyle bozulan over sağlığının ve buna bağlı azalan üreme yeteneğinin yeniden kazandırılmasında önemli olabileceğini düşündürdü.

Kök hücrenin overdeki olumlu etkilerine niş faktörünün eklenmesi, folikül yapımına ve atılmasına katkısının belirlenmesi, graaf folikülünün oluşuma ve atılmasını sağlayan tüm destek hücrelerle bu hücrelere katkı sağlayan bağ dokusu hücrelerinin kök hücreler ile tekileşimlerinin ortaya konması ve burada kullanılan mekanizmaların ortaya konması çalışmadan çıkarılan sonuçların getirdiği önerilerdir.

Kök hücrenin kullandığı mekanizmalar olan oksidatif stres ve proglanmış hücre ölümü akıllıca kullanıldığı taktirde önleyici ve tedavi edici olarak klinik tıpta yerini alacak önemli bir silah olarak gözükmektedir. Bu ifadenin her geçen gün azalan üreme yeteneğine katkısı gelecekteki fonksiyonu açısından en önemli yorumdur (Stimpfell M. ve ark. 2013).



KAYNAKLAR

1. Abraham, L., K. Histology and Cell Biology, 2006; Mosby, s618.
2. Agarwal A, Gupta S, Sharma RK. Role of oxidative stress in female reproduction. *Reprod Biol Endocrinol* 3: 28-48, 2005.
3. Alhadlaq, A., Mao, J.J. 2004. Mesenchymal stem cells: isolation and therapeutics. *Stem. Cells and Dev.*, 13(4); 436-448.
4. Anasti, J.N., Kalantaridou, S.N., Kimzey, L.M., Defensor, R.A. at Nelson, L.M., 1998, Bone loss in young women with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure, *Obstet Gynecol*, 91 (1), 12-15 p.
5. Arıncı K, Elhan A: *Anatomi 1. Cilt*. Ankara: Güneş Kitap Evi Lmt; 2001.
6. Auersperg, N., A. S. T., Wong., K. C., Choi., S. K., Kang., and P. C. K., Leung. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology and pathology. *Endocr Rev.*, 2001;22:255
7. Azizi, S.A., Stokes, D., Augelli, B.J., DiGirolamo, C., Prockop, D.J. 1998. Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats- similarities to astrocyte grafts. *Med. Sci.*, 95(7); 3908-3913.
8. Baravealle C, Savletti NR, Mira GA, Pezzone N, Ortega HH. Microscopic characterization of follicular structures in letrozole-induced polycystic ovarian syndrome in the rat. *Arch Med Res* 37: 830-839, 2006. *Res Treat* 48: 45-51, 1998.
9. Baron C. Torsion of the normal ovary. *Journal of American Medical Association* 102: 1676-1934, 1934.
10. Barry FP, Boynton RE, Haynesworth S, Murphy JM, Zaia J. The monoclonal antibody SH-2, raised against human mesenchymal stem cells, recognizes an epitope on endoglin (CD105). *Biochem Biophys Res Commun* 1999;265: 134e9.
11. Betül Çelebi, Sıçan Kemik İliği Mezenkimal Kök Hücrelerinin Proteom İncelemesi, Ankara Üniversitesi 2007.

12. Blazsek, I., Delmas, M.B., Legras, S., Marion, S., Machover, D., Misset, J.L. 1999. Large scale recovery and characterization of stromal cell associated primitive haemopoietic progenitor cells from filterretained human bone marrow. *Bone Marrow Transplant.*, 23(7); 647-657.
13. Boland, G.M., Perkins, G., Hall, D.J., Tuan, R.S. 2004. Wnt 3a promotes proliferation and supresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.*, 93(6); 1210-1230.
14. Bruder, S.P., Jaiswal, N., Haynesworth, S.E. 1998. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.*, 64(2); 278-294.
15. Bukovsky, A. (2005) Can ovarian infertility be treated with bone marrow- or ovaryderived germ cells? *Reprod. Biol. Endocrinol.*, Aug 15;3:36.
16. Bukovsky, A., Caudle, M. R., Svetlikova, M., Upadhyaya, N. B. (2004) Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, Apr 28;2:20
17. Bukovsky, A., Svetlikova, M. and Caudle, M.R., 2005, Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3:17, 1-13 p.
18. Bukovsky, A., ve ark., 2005, Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 3:17, 1-13 p.
19. Can, A. (2008) Haematopoietic stem cell niches: Interrelations between structure and function. *Trans. Apheresis Sci.* 8; 2 1–2 8.
20. Can, A. (2009) *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar*, TÜBA, Ankara, 113s.
21. Can, A., Karahüseyinoğlu, S. (2009) Kök Hücre: Biyolojik ve Klinik Yaklaşım. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sağlıkta Birikim Dergisi*, Cilt 1, Sayı 5, 57-65s.
22. Carlson, B.M., 1996, *Patten's foundations of embriology*, Mcgraw-Hill companies, New York, 752 p.

23. Chiquoine, A.D., 1954, The Identification, origin and migration of primordial germ cells in the mouse embryo, *The Anatomical Record*, 118: 135-146 p.
24. Colter, C.D., Sekiya, I., Prockop, D.J. 2001. Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Cell Biol.*, 98(14); 7841-7845.
25. Conget, P.A., Minguell, J.J. 1999. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 181(1); 67-73.
26. Davis, S.R., 1996, Premature ovarian failure, *Maturitas*, 23;1-8 p.
27. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., Luyten, F.P. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis & Rheumatism*, 44(8); 1928-1942.,
28. de Smedt V, Szöllösi D, Kloc M.: The balbiani body: asymmetry in the mammalian oocyte. *Genesis*, 26(3):208-212, 2000. Review).
29. De Smedt V, Szöllösi D, Kloc M.: The balbiani body: asymmetry in the mammalian oocyte. *Genesis*, 26(3):208-212, 2000. Review.
30. De Ugarte, D.A., Morizono, K., Elbarbary, A., Alfonso, Z., Zuk, P.A., Zhu, M., Dragoo, J.L., Ashjian, P., Thomas, B., Benhaim, P., Chen, I., Fraser, J., Hedrick, M.H. 2003.
31. Delilbaşı L., 2008, *İn vitro Fertilizasyon (IVF) Laboratuvar Yöntemleri*, Güneş Tıp Kitabevleri.,
32. Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact Of Various Endocrine And Paracrine Factors On In Vitro Culture Of Preantral Follicles In Rodents. *Reproduction*. 2005; 130: 147–156.).
33. Demeestere I, Centner J, Gervy C, Englert Y, Delbaere A. Impact Of Various Endocrine And Paracrine Factors On In Vitro Culture Of Preantral Follicles In Rodents. *Reproduction*. 2005; 130: 147–156.
34. Deschaseaux F, Charbord P. Human marrow stromal precursors are alpha 1 integrin subunit-positive. *J Cell Physiol* 2000;184:319e25.

35. DeUgarte D.A. Morizono K. Elbarbary A. Alfonso Z. Zuk P.A. Zhu M. Dragoo J.L. Ashjian P. Thomas B. Benhaim P. Chen I. Fraser J. Hedrick M.H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs.*, 174(3); 101-109.
36. Devine, P.J., Sipes, I.G., Skinner M.K., and Hoyer, P.B., 2002, Characterization of a Rat in Vitro Ovarian Culture System to Study the Ovarian Toxicant 4- inylcyclohexene Diepoxide, *Toxicology and Applied Pharmacology* 184, 107–115 p.
37. Diefenderfer, D.L., Osyczka, A.M., Reilly, G.C., Leboy, P.S. 2003. BMP responsiveness in human mesenchymal stem cells. *Connect. Tiss. Res.*, 44; 305-311.
38. Ding W, Zhang W, Hui FM, Zhang YH, Zhang FF, Li XM, Shi FX. Cell-specific expression and immunolocalization of nitric oxide synthase isoforms and soluble guanylyl cyclase $\alpha 1$ and $\beta 1$ subunits in the ovary of fetal, neonatal and immature pigs. *Anim Reprod Sci.* 2012 Apr;131(3-4):172-80. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.02.013. Epub 2012 Mar 7.
39. Dissen, G.A., Romero, C., Hirshfield, A.N. at Ojeda, S.R., 2001, Nevre growth factor is required for early follicular development in the mamalian ovary, *Endocrinology*, (142) 2078-2086 p.
40. Dominici, M., Hofmann, T.J., Horwitz, E.M., 2001. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and clinical application. *J. Biol. Reg. Homeo. Ag.*, 15; 28-37.
41. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J. Cell. Biochem.*, 75(3); 424-436.
42. Durlinger, A.L., Grujters, M.J., Kramer, P., Karels, B., Ingraham, H.A., Nachtigal, M.W., 2002, Anti-mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary, *Endocrinology*, 143 : 1076 – 84 p.
43. Durlinger, A.L., Kramer, P., Karels, B., Jong, F.H., Uilenbroek, J.T., Themmen, A.P.N., at Grootegoed, J.A., 1999, Control of primordial follicle recruitment by anti-mullerian hormone in the mouse ovary, *Endocrinology*, 140 : 5789 –5796 p.

44. Durlinger, A.L., Visser, J.A. at Themmen, A.P., 2002, Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone, *Reproduction*, 124 601–609 p.
45. Elçin, Y. M., (2009) Embriyonik Kök Hücreler: Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik
46. Elçin, Y.M. 2003 *Tissue Engineering, Stem Cells and Gene Therapies*, AEMB Series: 534, Kluwer-Plenum Press, New York & London.
47. Erkoçak A: Özel Histoloji. Ankara: A.Ü. Tıp Fak. Basım Evi, 1982.
48. Esrefoglu, M., 2004, Genel ve özel histoloji, Pelikan Tıp Ve Teknik Kitapçılık, Ankara, 356 s.
49. Fair, T., Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, 2003. 78(3-4): p. 203-16.
50. Fawcett, D.W., 1997, Bloom and Fawcett: concise histology, Chapman And Hall, U.S.A., 964 p.)
51. Fenwick, M.A. and Hurst, P.R., 2002, _mmunohistochemical localization of active caspase-3 in the Mouse ovary: growth and atresia of smal follicles, *Reproduction*, 124, 659-665 p.
52. Fernandez, S.M., Brooks, H.L. at Hoyer, P.B., 2006, The involvement of c-Kit receptor in 4-vinylcyclohexene diepoxide-induced ovarian follicle loss using whole ovary cultures, *Biol Reprod*, (Special Issue): Abstract 300 p.
53. Fukumoto, T., Sperling, J.W., Sanyal, A., Fitzsimmos, J.S., Reinholz, G.G., Conover, C.A., O'Driscoll, S.W. 2003. Combined effects of insulin-like growth factor-1 and transforming factor beta-1 on periosteal mesenchymal cells during chondrogenesis in vitro. *Osteoarthritis and Cartilage*, 11(1); 55-64.
54. Galmiche, M.C., Koteliansky, V.E., Brière, J., Hervé, P., Charbord, P. 1993. Stromal cells from human long-term marrow cultures are mesenchymal cells that differentiate following a vascular smooth muscle differentiation. *Blood*, 82(1); 66-76.
55. Galotto, M., Berisso, G., Delfino, L., Podesta, M., Ottaggio, L., Dallorso, S., Dufour, C., Ferrara, G.B., Abbondandolo, A., Dini, G., Bacigalupo, A., Cancedda, R., Quarto, R. 1999. Stromal damage as consequence of high-dose

chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp. Hematol.*, 27(9); 1460-1466

56. Gandolfi F, Brevini TAL, Cillo F, Antonini S. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev. Sci. Tech. Off. İnt. Epiz.* 2005; 24 (1): 413-423.

57. Gardner DK., 2008, İn Vitro Fertilizasyon Pratik Yaklaşım, (Çev: Serdaroğlu H.), Hayat Tıp Kitapçılık.

58. Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K., Daley, G. Q. (2004) Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature*, Jan 8;427(6970):148-54.

59. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mamalian ovary, *Nature*, Vol 428: 145-150 p.

60. Goto, T., Adjaye, J., Rodeck, C. H. and Monk, M. (1999) Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. *Mol Hum Reprod.*, 5,851–860.

61. Gövsa F: Sistematik Anatomi. İzmir: Güven Kitapevi; 2003.

62. Gradishar, W.J., Schilsky, R.L., 1989, Ovarian function following radiation and

63. Green, S. H., Zuckerman, S. (1951) Quantitative aspects of the growth of the human ovum and follicle. *J Anat.*, Oct;85(4):373-5.

64. Gregory, C.A., Prockop, D.J., Spees, J.L. 2005. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Exp. Cell. Res.*, 306(2); 330-335.

65. Grove, J. E., Bruscia, E., and Krause, D. S. (2004) Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cell.*, 22: 487–500.

66. Gruijters, M.J., Visser, J.A., Durlinger, A.L. at Themmen, A.P., 2003, Anti- Mullerian hormone and its role in ovarian function, *Mol Cell Endocrinol*, 211:85-90 p.

67. Gürgen S. Kemoterapi uygulamasının sıçan ovaryum follikülleri üzerine etkisi ve çeşitli antioksidanların koruyucu rollerinin yapısal ve

immünohistokimyasal düzeyde belirlenmesi. Doktora tezi; Ankara, 2009.

67. Hassa H., 2003, İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları, Osmangazi Üniversitesi Yayınları.
68. Hassa H., 2003, İnfertil Olgulara Klinik Yaklaşım ve IVF Laboratuvar Uygulamaları, Osmangazi Üniversitesi Yayınları.
69. Heikinheimo O, Gibbons W. E. The Molecular Mechanisms Of Oocyte Maturation And Early Embryonic Development Are Unveiling New Insights Into Reproductive Medicine. *Molecular Human Reproduction*. 1998; 4(8): 745-756.
70. Himmelstein-Braw, R., et al., Follicular atresia in the infant human ovary. *J Reprod Fertil*, 1976. 46(1): p. 55-9.
71. Identification of Stromal Cell Precursors in Human Bone Marrow by a Novel Monoclonal Antibody, STRO-1 By (Paul J. Simmons and Beverly Torok-Storb, *Blood*, Vol78, No 1 (July I), 1991: pp 55-62.
72. Inanç B, Elçin AE, Unsal E, Balos K, Parlar A, Elçin YM.2007. Differentiation of human embryonic stem cells on periodontal ligament fibroblasts in vitro. *Artificial Organs* 32(2):100–109.
73. Inanç, B., Elçin, A.E., Elçin, Y.M. 2007. Effect of osteogenic induction on the in vitro differentiation of human embryonic stem cells cocultured with periodontal ligament fibroblasts. *J. Artif. Organs*, 31(11); 792-800.
74. J. Orthop, Multileneage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. *Res.*, 20(5); 1060-1069.
75. Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P. 1997. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.*, 64(2); 295-312.
76. Jamnongjit M, Hammes SR. Oocyte maturation: the coming of age of a germ cell. *Semin Reprod Med*. 2005;23: 234-241.
77. Jiang, H., Sha, S., Schacht, J. 2002. The protein kinaseB/Akt signalling pathway in human malignancy. *J. Neurochem.*, 269-276.

78. Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. (2005) Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell.*, Jul
79. Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature.*, Mar 11;428(6979):145-50.
80. Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K. at Tilly, J.L., 2004, Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mamalian ovary, *Nature*, Vol 428: 145-150 p.
81. Junqueira, L.C., and Carniero, J., Temel histoloji, 2003, (Çev.: Aytekin, A. V Solakoglu, S.), Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 512 s.),
82. Junqueira, L.C., and Carniero, J., Temel histoloji, 2003, (Çev.: Aytekin, A. V Solakoglu, S.), Nobel Tıp Kitapevleri, Ankara, 512 s.
83. Kafali H, Iriadam M, Ozardali I, Demir N. Letrozole-induced polycystic ovaries in the rat: a new model for cystic ovarian disease. *Arch Med Res* 35: 103- 108, 2004.
84. Kalaycı Ş. Histoloji, Bursa:Uludağ Üniversitesi Yayıncılık; 1986) (Eşrefoğlu M. Genel ve özel histoloji. Ankara:Pelikan Tıp Ve Teknik Kitapçılık; 2004
85. Kalaycı, S., 1986, Histoloji, Uludag Üniversitesi Yayıncılık, Bursa, 565 s.
86. Kansu, E., (2006) Kök Hücre Biyolojisi ve Plastisitesinde Güncel Kavramlar, Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü ve Hematopoietik Stem Hücre Transplantasyon Ünitesi, ANKEM Derg. Ankara, 20(Ek 2): 1-8.
87. Karaöz E., Ovalı E.: Kök Hücreler, Derya Kitapevi Celepler Matbaacılık, (2004).
88. Keating, A., Singer J.W., Kilen P.D., Striker, G.E., Salo, A.C., Sanders, J., Thomas, E.D., Thorning, D., Fialkow, P.J. 1982. Donor origin of the in vitro haematopoietic microenvironment after marrow transplantation in man. *Nature*, 298; 280-283

89. Kerr, C. L., Gearhart, J. D., Elliott, A. M., Donovan, P. J. (2006) Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells. *Semin. Reprod. Med.*, 24(5): 304- 313.
90. Khan, E., Abu-Amer, Y. 2003. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma inhibits differentiation of preosteoblasts. *J. Lab. Clin. Med.*, 142(1);29-34.
91. Kierszenbaum, A. L. (2006) *Histoloji ve Hücre Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş*. Palme Yayıncılık, Çev. Ed: Prof. Dr. Ramazan Demir, Mosby Inc., 618s.
92. Koc, O., Lazarus, H. 2001. Mesenchymal stem cell: heading into clinic. *Bone Marrow Transplant*, 27; 235-239.
93. Kokoska ER, Keller MS, Weber TR. Acute ovarian torsion in children. *Am J Surg* 180: 462-465, 2001.
94. Kulterer, B., Friedl, G., Jandrositz, A., Sanchez-Cabo, F., Prokesch, A., Paar, C., Scheideler, M., Windhager, R., Preisegger, K.H., Trajanoski, Z. 2007. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*, 12; 8-70.
95. L, Li., and Xie, T. (2005) Stem cell niche: Structure and Function. *Annu. Rev. Cell*.
96. Lacham-Kaplan, O., Chy, H., Trounson, A. (2006) Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells*, Feb;24(2):266-73.
97. Lee, H. J., Selesniemi, K., Niikura, Y., Niikura, T., Klein, R., Dombkowski, D. M. Et al. (2007) Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *J Clin Oncol*; 25: 3198- 204.
98. Lee, W.S., Otsuka, F., Moore, R.K. at Shimasaki, S., 2001. Effect of bone morphogenetic protein 7 on folliculogenesis an ovulation in the rat, *Biology of Reproduction* 65, 994-999 p.

99. Li, T.F., O'Keefe, R.J., Chen, D. 2005. TGF-beta signaling in chondrocytes. *Front. Biosci.*, 10; 681-688.
100. Lue, Y., Erkkila, K., Liu, P. Y., Ma, K., Wang, C., Hikim, A. S., Swerdloff, R. S. (2007) Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. *Am J Pathol.*, Mar;170(3):899-908.
101. Marletta MA., Olken NM,. NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase. *Biochemistry*. 1993 Sep 21;32(37):9677-85.
102. Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak JZ.: Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reprod. Biol.*, 9(3):203-224, 2009,)
103. Marteil G, Richard-Parpaillon L, Kubiak JZ.: Role of oocyte quality in meiotic maturation and embryonic development. *Reprod. Biol.*, 9(3):203-224, 2009.
104. Masson, S., Harrison, D. J., Plevris, J. N., and Newsome, P. N. (2004) Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: A critical review. *Stem Cell.*, 22: 897-907.
105. McGee, E.A. and A.J. Hsueh, Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev*, 2000. 21(2): p. 200-14.
106. Méduri, G., Massin, N., Guibourdenche, J., Bachelot, A., Fiori, O., Kuttann, F., Misrahi, M. at Touraine, P., 2007, Serum anti-müllerian hormone expression in women with premature ovarian failure, *Human Reproduction*, Vol.22, No.1, 117–123 p.
107. Minguell, J.J., Erices, A., Conget, P. 2001. Mesenchymal stem cells, Minireview. *Soc. Exp. Biol. Med.*, 226; 507-520.
108. Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, B., Fisher, L.W., Robey, P.G., Shi, S. 2003. SHED: stem cells from exfoliated deciduous teeth. *Cell Biol.*, 100(10); 5807-5812.

109. Moore KL, Persaud TVN: Klinik Yönleri ile İnsan Embriyolojisi. M. Yıldırım, I. Okar, H.Dalçık (Çev). 6. baskıdan çeviri. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri; 2002.
110. Motta, P.M. at Makabe, S., 1986, Germ cells in the ovarian surface during fetal development in humans. A three dimension microanatomical study by scanning and transmission electron microscopy, J. Submicrosc. Cytol., 18: 271-290 s.
111. Motta, P.M., Makabe, S. at Nottola, S.A., 1997, The ultrastructure of human and mouse reproduction. The natural history of the female germ cell: origin, migration, and differentiation inside the developing ovary, Human Reproduction Update, Vol.3, No.3 281-297 p.
112. Nevin S, Üçler K and Alpaslan A. Ischaemia-reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. Human Reproduction. 2002; 17(11):2972-76
113. Nilsson, E.E. at Skinner, M.K., 2003, Bone morphogenetic protein 4 acts as on ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development, Biol. Reprod. 69: 1265-1272 p.
114. Noort, W.A., Kruisselbrink, A.B., Anker, P.S., Kruger, M., Van Bezooijen, R.L., De Paus, R.A., Heemskerk, M.H.M., Lowik, C.W.G.M., Falkenburg, J.H.F., Willemze, R., Fibbe, W.E. 2002. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD 34 (+) cells in NOD/SCID mice. Exp. Hematol., 30(8); 870-878.
115. Nöth, U., Osyczka, A., Tuli, R., Hickok, N.J., Danielson, K.G., Tuan, R.S. 2002. O'Driscoll, S.W.M., Saris, D.B.F., Ito, Y., Fitzimmos, J.S. 2006. The chondrogenic potential of periosteum decreases with age. J. Orthop. Res.; 19(1); 95-103.
116. Okarma, T. B., (1999) Human primordial stem cells. Hastings Cent. Rep., 29(2):30.
117. Oktem, O., and K, Oktay. (2009) Current knowledge in the renewal capability of germ cells in the adult ovary. Birth Defects Res., 87:90–95.

118. Ovalle WK, Nahirney PC. Netter's Essential Histology, Güneş Tıp kitabevi; 2009.
119. Owen, M., Friedenstein, A.J. 1988. Stromal stem cells: marrow – derived osteogenic precursors. Ciba Found. Symp., 136; 42-60.
120. Öktem, Ö. ve Oktay, K., 2008, Stem cells: a perspective on oocytes, Annals of the New York Academy of Sciences, 1127: 20-26 p.
121. Öktem, Ö. ve Oktay, K., 2008, The ovary anatomy and function throughout human life, Annals of the New York Academy of Sciences , 1127: 1-9 p.
122. Pedersen, T. at Peters, H., 1968, Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. J Reprod Fertil, 17:555–557 p.
123. Pepling M. E and Spradling A. C. Mouse Ovarian Germ Cell Cysts Undergo Programmed Breakdown to Form Primordial Follicles. Dev. Biol. 2001; 234: 339-351.
124. Pereda, J., Zorn, T. at Soto-Suazo, M., 2006, Migration of human and mouse primordial germ cells and colonization of the developing ovary: an ultrastructural and cytochemical study, Microsc. Res. Tech., 69: 386-395 p.
125. Petersen, B.E., Bowen, W.C., Patrene, K.D., Mars, W.M., Sullivan, A.K., Murase, N., Boggs, S.S., Greenberger, J.S., Goff, J.P. 1999. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. Science, 284(5417); 1168-1170.
126. Phinney, D.G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., Prockop, D.J. 1999.
127. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science, 284(5411); 143-147.
128. Prockop, D. 1997. Marrow stromal cells as stem cells for non-hematopoietic tissues. Science, 276(5309); 71-74
129. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Delilieri GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. Exp Hematol 2002;30:783e9

130. Reyes, M., Lund, D., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., Verfaillie, C.M. 2001. Purification and ex vivo expansion of postnatal human bone marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*, 98(9); 2615-2625.
131. Roche, S., Provansal, M., Tiers, L., Jorgensen, C., Lehmann, S. 2006. Proteomics of primary mesenchymal stem cells. *Regenerative Medicine*, 1(4); 511-517.
132. Ross HM, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*. 4. Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2003; 726-757).
133. Sadler, T. W. (2005) *Langman's Medical Embryology* 9th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 507s.
134. Sağsöz ve Ark. Kök Hücreler Dicle Üniv Vet Fak Derg 2008: 1 (2): 29 – 33
135. Sarraj M. A, Drummond A. E. *Mammalian Foetal Ovarian Development: Consequences for Health and Disease*. *Reproduction* 2012; 143: 151-163.
136. Scheffer, G.J., et al., Antral follicle counts by transvaginal ultrasonography are related to age in women with proven natural fertility. *Fertil Steril*, 1999. 72(5): p. 845-51
137. Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., Benvenisty, N. (2000) Effect of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97(21): 11307-11312.
138. Schwab, K. E., Chan, R. W. S., and Gargett, C. E. (2005) Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril*. 84: 1124–1130.
139. Schwartz, R.E., Reyes, M., Koodie, L., Jiang, Y., Blackstad, M., Lund, M., Lenvik, T., Johnson, S., Hu, W.S., Verfaillie, C.M. 2002. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.*, 109(10); 1291-1302.
140. Seema, Parte., Deepa, Bhartiya., Jyoti, Telang., Vinita, Daithankar., Vinita, Salvi., Kusum, Zaveri., and Indira, Hinduja. (2011) Detection, Characterization, and Spontaneous Differentiation In Vitro of Very Small

Embryonic-Like Putative Stem Cells in Adult Mammalian Ovary. *Stem Cells and Development*, 2010.0461.

141. Sekiya, I., Larson, B.L., Vuoristo, J.T., Cui, J.G., Prockop, D.J. 2004. Adipogenic differentiation of human adult stem cells from bone marrow stroma. *J. Bone Miner. Res.*, 19(2); 256-264.

142. Shalev E, Bustan M, Yoram I, Peleg D. Recovery of ovarian function after laparoscopic detorsion. *Hum Reprod* 10: 2965-2966, 1995.

143. Shinpei Yamaguchi, Hironobu Kimura, Masako Tada, Norio Nakatsuji, Takashi Tada (2005) Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expression Patterns* 5, 639–646.

144. Shiraishi K1, Naito K. *BJU Int.* 2007 May;99(5):1086-90. Epub 2007 Mar 6. Nitric oxide produced in the testis is involved in dilatation of the internal spermatic vein that compromises spermatogenesis in infertile men with varicocele.

145. Shufaro, Y., and Reubinooff, B. E. (2004) Therapeutic applications of embryonic stem cells. *Best Pract. Res. Clin. Obs. Gyn.*, 18: 909–927.

146. Simkins, C. (1932) Development of the human ovary from birth to sexual maturity. *Am J Anat.*, 51: 465- 505.

147. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 1991;78:55e62.

148. Smith, B.J., Mattison, D.R. at Sipes, I.G., 1990, The role of epoxidation in 4- vinylcyclohexene-induced ovarian toxicity, *Toxicol Appl Pharmacol*, 105:372– 831 p.

149. Solomon EP. (Çev.: Süzen LB) İnsan anatomisi ve fizyolojisine giriş. İstanbul: Birol Basın Yayın Dağıtım; 2000.

150. Sternberg SS. *Histology for pathologist*. Lippincott-Raven. New York; 1997. Şahin, F., Saydam, G., Omay, S.B. 2005. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *THOD*, 15(1); 48-56.

151. Stoop, H., Honecker, F., Cools, M., Krijger, R.de., Bokemeyer, C., and Looijenga, L. H. J. (2005) Differentiation and development of human female

germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. Human Reproduction Vol.20, No.6 pp. 1466–1476.

152. Strulovici, Y., Leopold, P. L., O'Connor, T. P., Pergolizzi, R. G., and Crystal, R. G. (2007) Human Embryonic Stem Cells and Gene Therapy. The American Society of Gene Therapy, vol. 15 no. 5, 850–86

153. Sue O'Shea², K. (2004) Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, Biol. Reprod., 71:1755–1765.

154. Syrop, C.H., et al., Ovarian volume may predict assisted reproductive outcomes better than follicle stimulating hormone concentration on day 3. Hum Reprod, 1999. 14(7): p. 1752-6.).

155. Şahin, F., Saydam, G., Omay, S. B., (2005) Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hematoloji AnaBilim Dalı, İzmir.

156. Şeftalioğlu, A. (2003) Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, 4. Baskı, Alp Ofset Matbaacılık Ankara, 653s.

157. Şenel, F. (2002, Şubat) Kök Hücreler. Bilim ve Teknik Dergisi (Yeni Ufuklara). 1- 15.

158. Tae, S.K., Lee, S.H., Park, J.S., Im, G.I. 2006. Mesenchymal stem cells for tissue engineerind and regenerative medecine. J. Biomed. Mater.,1; 63-71.).

159. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell, 131:1-12.

160. Tam, W. L., Ang, Y. S., Lim, B. (2007) The molecular basis of ageing in stem cells. Mech. Ageing Dev., 128(1): 137-148.

161. Tannishtha Reya and Hans Clevers , Wnt signalling in stem cells and cancer, NATURE | VOL 434 | 14 APRIL 2005.

162. Taşkın Ö, Birincioğlu M, Aydın A, Buhur A, Burak F, Yılmaz and Wheeler, J.M. The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischaemi-reperfusion rodent model. Human Reprod. 1998; 13, 2823-27.

163. Tekelioğlu M. Özel Histoloji İnce Yapı ve Gelişme. Ankara: Antıp AŞ yayınları; 2002.
164. Templeman C, Hertweck SP, Fallat ME. The clinical course of unresected ovarian torsion. *J Pediatr Surg* 35: 1385-1387, 2000.
165. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, Nov 6; 282 (5391):1145-1147.
166. Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., During, M., Harris, C. P., Hearn, J. P. (1996) Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol. Reprod.*, 55:254-259.
167. Tilly, J. L., Rueda, B. R., (2008) Minireview: stem cell contribution to ovarian development, function, and disease. *Endocrinology.*, Sep;149(9):4307-11.
168. Tippet, P., Andrews, P. W., Knowles, B. B., Solter, D., Goodfellow, P. N. (2009) Red cell antigens P (globoside) and Luke: identification by monoclonal antibodies defining the murine stagespecific embryonic antigens -3 and -4 (SSEA-3 and SSEA-4). *Vox Sang* 1986; 51:53–56.
169. Trounson, A. (2006) The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocrine Reviews*, 27(2): 208-219.
170. Trounson, A. O., Gardner, D. K., Baker, G., Barnes, F.L., Bongso, A., Bourne, H., Calderon, I., Cohen, J., Dawson, K. Et al: (2000) Handbook of in vitro fertilization, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., CRC Press.
171. Tuli, R., Seghatoleslami, M.R., Tuli, S., Wang, M.L., Hozack, W.J., Manner, P.A., Danielson, K.G., Tuan, R.S. 2003. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol. Biotechnol.* 23(1); 37-49.
172. Turkoz Y, Celik O, Hascalik S, Cigremis Y, Hascalik M, Mizrak B, Yologlu S. Melatonin reduces torsion-detorsion injury in rat ovary: biochemical and histopathologic evaluation. *J Pineal Res* 37: 137-141, 2004.

173. Vats, A., Bielby, R. C., Tolley, N. S., Nerem, R., and Polak, J. M. (2005) Stem cells. *Lancet.*, 366: 592–602.
174. Verfaillie, C. M., Pera, M. F., Lansdorp, P. M. (2002) Stem cells: hype and reality. *Hematology*, 1:369-91.
175. Vescovi, A., Gritti, A., Cossu, G., Galli, R. (2002) Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. *Cells Tissues Organs.*, 171(1): 64-76.
176. Virant-Klun, I., and T., Skutella., (2010) Stem cells in aged mammalian ovaries. *Aging* 2:3–6.
177. Virant-Klun, I., Zech, N., Rozman, P., Vogler, A., Cvjeticanin, B., Klemenc, P., Malicev, E., Meden-Vrtovec, H. (2008) Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. *Differentiation.*, Oct;76(8):843-56.
178. Wakitani S1, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve*. 1995 Dec;18(12):1417-26.
179. Wang, S. H., Tsai, M. S., Chiang, M. F., Li, H. (2003) A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells. *Gene Expr. Patterns* 3, 99–103.
180. Weissman, I. L. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100: 157-168.
181. Williams and Wilkins, Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB.: Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2:20, 2004.
182. Williams and Wilkins. , Kierszenbaum AL., 2006, *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*, (Çev.: Demir R), Palme Yayıncılık. ,
183. Winton, D. (2000) Stem cells in the epithelium of the small intestine and colon. In *Stem Cell Biology*, (ed. D. R. Marshak, R. L. Gardner, D. Gottlieb.) NY:Cold Spring Harbor Lab. Press, pp. 515–36.

184. Wobus, A. M. (2001) Potential of embryonic stem cells. *Mol. Aspects Med.*, 22:149-64.
185. Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J. (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat. Biotechnol.*, 19:971-4.
186. Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A., Ding, S. (2006) Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 103(18) : 6907-6912.
187. Yıldırım M., 2000, Klinik İnfertilite, 2. Baskı, Eryılmaz Offset.
188. Yi Shen & Weili Wang & Xiaomiao Li & Zude Liu & David C. Markel & Weiping Ren, *International Orthopaedics (SICOT)* (2012) 36:879–886, Impacts of age and gender on bone marrow profiles of BMP7, BMPRs and Stro-1+ cells in patients with total hip replacement.
189. Yongmiao, Pan., Jie, Jiao., Caiyun, Zhou., Qi, Cheng., Yuting, Hu., Huaizeng, Chen. (2010) Nanog Is Highly Expressed in Ovarian Serous Cystadenocarcinoma and Correlated with Clinical Stage and Pathological Grade. *Pathobiology*, 77:283–288.
190. Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., Nishikawa, S. I. (1997) Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev Biol* 184:122–137.
191. Young, R. H. (2005) A brief history of the pathology of the gonads. *Mod Pathol.*, Feb;18 Suppl 2:S3-S17.
192. Zaehres, H., Lensch, M. W., Daheron, L., Stewart, S. A., Itskovitz-Eldor, J., and Daley, G. Q. (2005) High efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 23, 299–305.
193. Zhang, D., Fouad, H., Zoma, W. D., Salama, S. A., Wentz, M. J., Al-Hendy, A. (2008) Expression of stem and germ cell markers within nonfollicle structures in adult mouse ovary. *Reprod. Sci.*, Feb;15(2):139-46.
194. Zik B, Altunbas K, Tutuncu S, Ozden O, Ozguden Akkoc CG, Peker S, Sevimli A. Effects of capsaicin on nitric oxide synthase isoforms in prepubertal

rat ovary. Biotech Histochem. 2012 Apr;87(3):218-25. doi:
10.3109/10520295.2011.608716. Epub 2011 Sep 28.

195. Zuckerman, S. (1951) The number of oocytes in the mature ovary.
Recent Prog Horm Res., 1951; 6: 63- 109.

