

**SIÇAN OVARYUMLARINDA FARKLI ÜREME DÖNEMLERİNDEKİ KÖK
HÜCRE VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE FARKLILIKLARININ
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

İREM BEKALP YILMAZ

**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**MERSİN
ŞUBAT 2020**

**SIÇAN OVARYUMLARINDA FARKLI ÜREME DÖNEMLERİNDEKİ KÖK
HÜCRE VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE FARKLILIKLARININ
BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

İREM BEKALP YILMAZ

**T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

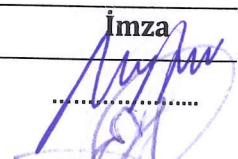
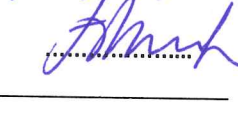
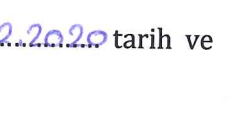
**TIBBİ BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI**

**Danışman
Prof. Dr. Nurcan Aras**

**MERSİN
ŞUBAT 2020**

ONAY

İrem BEKALP YILMAZ tarafından Prof. Dr. Nurcan ARAS danışmanlığında “Sıçan Ovaryumlarında Farklı Üreme Dönemlerindeki Kök Hücre Varlığının Araştırılması Ve Farklılıklarının Belirlenmesi” başlıklı bu çalışmada aşağıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından 10/02/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonucunda oy birliği ile Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Görevi	Ünvanı, Adı ve Soyadı	İmza
Başkan	Prof.Dr. Nurcan ARAS	
Üye	Prof.Dr. Etem AKBAŞ	
Üye	Prof.Dr.Yusuf ÖZKUL	
Üye	Doç.Dr.Zühal HAMURCU	
Üye	Dr.Öğr.Üyesi Ebru DERİCİ EKER	

Yukarıdaki Jüri kararı Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 18.02.2020 tarih ve 2020-04/103 sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof.Dr. Bahar TAŞDELEN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

Bu tezde kullanılan özgün bilgiler, şekil, tablo ve fotoğraflardan kaynak göstermeden alıntı yapmak 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunu hükümlerine tabidir.

ETİK BEYAN

Mersin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliğinde belirtilen kurallara uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- Tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçlar bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Baskılanın eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- Atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak kullandığımı,
- Kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- Bu tezin herhangi bir bölümünü Mersin Üniversitesi veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı,
- Tezin tüm telif haklarını Mersin Üniversitesi'nce devrettiğimi beyan ederim.

ETHICAL DECLARATION

This thesis is prepared in accordance with the rules specified in Mersin University Graduate Education Regulation and I declare to comply with the following conditions:

- I have obtained all the information and the documents of the thesis in accordance with the academic rules.
- I presented all the visual, auditory and written information and results in accordance with scientific ethics.
- I refer in accordance with the norms of scientific works about the case of exploitation of others' works. I used all of the referred works as the references.
- I did not do any tampering in the used data.
- I did not present any part of this thesis another thesis at Mersin University or another university.
- I transfer all copyrights of this thesis to the Mersin University.

10 Şubat 2020/ February 10th,2020

İmza


İrem BEKALP YILMAZ

ÖZET

SIÇAN OVARYUMLARINDA FARKLI ÜREME DÖNEMLERİNDEKİ KÖK HÜCRE VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI VE FARKLILIKLARININ BELİRLENMESİ

Günümüzde, kadınlarda infertilite giderek artan ve dünya çapında milyonlarca kadını etkileyen bir sağlık sorunu haline gelmiştir. Memeli ovaryumları son derece dinamik organlar olmalarına rağmen erişkin yaşamda yeni oosit üretmemeleri kadın infertilitesi tedavisinde başarı şansını düşürmektedir. Memeli ovaryumlarının bu rejeneratif potansiyeli son yıllarda tartışmalı bir alan olmuş, ovaryumlarda germline kök hücre (GKH) ve oogonial kök hücre (OKH) varlığından söz edilmeye başlanmıştır. Ovaryum dokusundaki OKH'leri araştırmak preovaryan yetmezlik, premature menopoz, polikistik over sendromu ve kanserden kurtulan kadınlarda doğurganlığı sürdürmek ve geri kazandırmak için mevcut oositlerle çalışmak yerine yeni oosit üretme olasılıkları üzerine yapılan çalışmalara zemin hazırlayacaktır. Bu tezin amacı erişkin öncesi (2-3 hafta), erişkin (6-8 hafta) ve yaşlı sıçanlarda (25-30 hafta) memeli ovaryumundaki kök hücre varlığını araştırmak, farklı üreme dönemlerindeki yerleşimi ve dağılımını incelemektir. OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4) ve SOX2 (SRY-box transcription factor 2) embriyonik kök hücre belirteçleri (EKB) kullanılarak kök hücre olduğu düşünülen hücrelerin flow sitometri ile belirlenmesi, gruplar arasındaki sayısal farklılıkların ortaya konması ayrıca bu hücrelerin yerleşim ve dağılımlarının immünfloresan işaretleme ile gösterilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada her grup için 6 adet Wistar cinsi albino dişi sıçan kullanılmıştır. Sıçanların iki overi de çıkarılmış, overlerden biri flow sitometri için diğeri ise immünfloresan işaretleme için kullanılmıştır. Deneyler sonucunda, flow sitometri analizlerine göre gruplar arasında SOX2 (+) hücrelerin yüzdelere ait medyanlar arasında anlamlı farklılık gözlenmiştir. ($p<0,05$). Buna göre; Erişkin öncesi sıçanların SOX2 (+) hücrelerinin (medyan değeri: % 9,25) erişkin sıçanların SOX2 (+) hücrelerinden düşük olduğu görülmüştür (medyan değeri: % 65,10) ($p<0,0001$). OCT4 (+) hücrelerin yüzdelere ait ortalamalar arasında anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0,05$). SOX2 ve OCT4 ifade eden hücrelerin yerleşimini incelemek için yaptığımız immünfloresan işaretleme sonucunda pozitif hücrelerin hem stromal hem de foliküler hücrelerde lokalize olduğu gözlenmiştir. Buna göre; SOX2 (+) hücrelerin tüm gruplarda çoğunlukla stromada olmak üzere foliküllerde de lokalize olduğu ancak yaşlı sıçanlarda foliküllerde çok azaldığı görülmüştür. OCT4 (+) hücrelerin ise tüm gruplarda hem stromada hem folikülerde lokalize olduğu ancak yaşlı sıçanlarda foliküllere oranla daha çok stromada lokalize olduğu gözlenmiştir. Pozitiflik gösteren hücrelerin reaksiyon kuvvetleri zayıftan kuvvetliye doğru değişim göstermiştir. Buna göre; SOX2 proteini açısından kuvvetli pozitif (+++) olan hücreler tüm gruplar arasında erişkinlerde daha fazla olduğu görülmüştür (Mean değeri:12) ($p=0,043$). OCT4 proteini açısından zayıf pozitif (+) olan hücreler en yüksek yaşlılarda (Mean değeri: 39) ($p=0,004$), kuvvetli pozitif (+++) hücrelerin ise yine en yüksek erişkinlerde olduğu görülmüştür (Mean değeri:8) ($p=0,014$). Bu veriler bize memeli ovaryumlarında EKB ifade eden hücrelerin olduğunu ve bu hücrelerin farklı üreme dönemlerinde oranlarının değişebileceğini göstermektedir. EKB ifade eden bu hücrelerin gerçekten kök hücre olup olmadığı farklılaşabilme kapasitelerini gösteren deneylerle kanıtlanmalıdır.

Anahtar Kelimeler: Ovaryum kök hücresi, OCT4, SOX2, Flow Sitometri, İmmünfloresan İşaretleme

Danışman: Prof. Dr. Nurcan ARAS, Mersin Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Mersin.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF STEM CELL PRESENCE IN DIFFERENT REPRODUCTIVE PERIODS RAT'S OVARY AND DETERMINATION OF DIFFERENCES.

Recently, infertility in women has become a health problem that is increasingly increasing and affecting millions of women worldwide. Although mammary ovaries are highly dynamic organs, they do not produce new oocytes in adulthood, thus reducing the chances of success in the treatment of female infertility. This regenerative potential of mammalian ovaries has been a controversial field in recent years and the presence of germline stem cells (GSC) and oogonial stem cells (OCS) in ovaries. Investigating OCSs in ovarian tissue will provide the basis for studies on the possibility of producing new oocytes instead of working with existing oocytes to maintain and restore fertility in preovarian insufficiency, premature menopause, polycystic ovary syndrome and cancer survivors. The aim of this thesis is to investigate the presence of stem cells in mammalian ovary in pre-adult (2-3 weeks), adult (6-8 weeks) and elderly rats (25-30 weeks), and to investigate the location and distribution of different reproductive periods. For this purpose, using OCT4 and SOX2 embryonic stem cell markers, flow cytometry to determine the stem cells that are thought to be stem cells, revealing numerical differences between groups, and it is aimed to demonstrate the location and distribution of these cells by immunofluorescence marking. In this study, 6 Wistar albino female rats were used for each group. both ovaries of the rats were removed, one of which was used for flow cytometry and the other for immunofluorescence marking. As a result of the experiments, according to the flow cytometry analysis, significant differences were observed between the groups for the percentages of SOX2 (+) cells ($p < 0.05$). According to this; Percentage of pre-adult rats SOX2 (+) cells (median value: 9.25%) was significantly lower than the percentages of SOX2 (+) cells in adult rats (median value: 65.10%) ($p < 0.0001$). No significant difference was observed between the mean percentages of OCT4 (+) cells ($p > 0.05$). As a result of our immunofluorescence labeling to investigate the localization of SOX2 and OCT4 expressing cells, it was observed that positive cells were localized in both stromal and follicular cells. According to this; SOX2 (+) cells were found to be localized in follicles, mostly stroma in all groups, but follicles decreased in elderly rats too. OCT4 (+) cells were found to be localized in both stroma and follicular in all groups but in older rats it was more localized than follicles. Cells showing positivity, reaction forces varied from weak to strong. According to this; Cells with strong positive (+++) in terms of SOX2 protein were found to be higher in adults among all groups (Mean value: 12) ($p = 0.043$). Cells with weak positive (+) in terms of OCT4 protein were found to be highest in the elderly (Mean value: 39) ($p = 0.004$), while strong positive (+++) cells were also found in the highest adults (Mean value: 8) ($p = 0.014$). These data show us that cells expressing embryonic stem cell marker in mammalian ovaries and the rates of these cells may vary at different reproductive periods. Whether these embryonic stem cell marker-expressing cells are indeed stem cells should be demonstrated by their ability to differentiate.

Keywords: Ovarian stem cell, OCT4, SOX2, Flow Cytometry, Immunofluorescence Marking

Advisor: Prof. Nurcan ARAS, Mersin University, Medical Faculty, Medical Biology Department, Mersin.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimlerini paylaşarak akademik anlamda yetişmemde büyük katkısı olan ve her anlamda desteğini benden esirgemeyen, bilgi birikimimi artıran, karşılaştığım zorluklarla başa çıkmamda yardımcı olan, danışman hocam sevgili Prof.Dr. Nurcan ARAS'a sabrı ve anlayışı için teşekkür ederim.

Tezimde bulunan çalışma gruplarının oluşturulmasından sonuçlarının yorumlanmasına kadar her aşamada yardımını benden esirgemeyen ME. Ü. Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görev yapmakta olan değerli hocam Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ ve asistanı Deniz KİBAR'a, tezimin istatistikleri ve bulguların değerlendirilmesi konusundaki yardımlarından dolayı Biyoistatistik Anabilim Dalı Arş. Gör. Merve TÜRKEGÜN'e teşekkür ederim.

Akademik eğitimime başladığım ilk günden beri, desteğini benden esirgemeyen, hayatımı birleştirmekten onur duyduğum her türlü zorlukta yanımda olan sevgili eşim Semih YILMAZ'a, zamanından çalarak bu tezi hazırladığım biricik oğlum SELİM'e ve yanımda olmasalar da varlıklarını her zaman hissettiğim aileme teşekkür ederim.

“Sıçan Ovaryumlarında Farklı Üreme Dönemlerindeki Kök Hücre Varlığının Araştırılması ve Farklılıklarının Belirlenmesi” konulu doktora tez çalışmam, Mersin Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeler Birimi tarafından 2016-2-TP3-1885 kodlu proje olarak desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İç Kapak	i
ONAY	ii
ETİK BEYAN	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	vi
İÇİNDEKİLER	vii
TABLolar DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
KISALTMALAR ve SİMGELER	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI	3
2.1. Üreme Biyolojisine Genel Bakış	3
2.2. İnsan Germ Hücre Gelişimi	3
2.3. Gametogenez	5
2.3.1. Dişi Gamet Oluşumu; Oogenez	6
2.3.2. Ovaryan Siklus	7
2.4. Folikülogenez	8
2.4.1. Postnatal Folikülogenez	11
2.4.2. Postnatal Oogenez	13
2.5. Kök Hücreler	15
2.5.1. Kök Hücrelerin Temel Özellikleri	16
2.5.2. Kök Hücre Çeşitleri	16
2.5.3. Embriyonik Kök Hücreler	17
2.5.4. Embriyonik Kök Hücre Kaynakları	17
2.5.6. Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri	18
2.5.7. OCT4 (Octomer-Binding Transcription Factor 4)	18
2.5.8. SOX2 (SRY- Box Transcription Factor 2)	19
2.5.9. Ovaryum Kök Hücreleri	20
2.6. Ovaryum Yüzey Epiteli	21
2.6.1. Ovaryum Kök Hücre Yuvaları	22
2.6.2. Ovaryum Kök Hücre Yuvalarının Bileşimi ve Biyolojik Özellikleri	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1. Grupların Oluşturulması	24
3.2. Sıçanların Sakrifiye Edilmesi ve Over Dokularının Çıkarılması	24
3.3. Flow Sitometri Uygulaması	24
3.3.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	24
3.3.2. Flow Sitometri İçin Solüsyon Hazırlanması ve Örneklerin Analizi	25
3.4. İmmünfloresan İşaretleme Uygulaması	26
3.4.1. Kullanılan Malzeme ve Cihazlar	26
3.4.2. Kesit Alma	27
3.4.3. Antikor Boyama	27
3.5. İstatistik Analiz Yöntemi	28
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	29
4.1. Flow Sitometri Bulguları	29
4.1.1. SOX2 İfade Eden Hücrelerin Bulguları	29
4.1.2. OCT4 İfade Eden Hücrelerin Bulguları	29
4.2. İmmünfloresan İşaretleme Bulguları	33
4.2.1. Skorlama Sonuçları	35

	Sayfa
4.2.1.1.Reaksiyon Kuvvetine Göre SOX2(+) Hücrelerin Değerlendirilmesi	35
4.2.1.2.Reaksiyon Kuvvetine Göre OCT4(+) Hücrelerin Değerlendirilmesi	37
4.3. Tartışma	40
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	50
ÖZGEÇMİŞ	56



TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 3.1. Işıma Kuvvetlerine Göre Skolama Değerleri	28
Tablo 4.1. SOX2 (+) Hücrelerin Oranlarının Yaş Gruplarına Göre Dağılımı	29
Tablo 4.2. OCT4 (+) Hücrelerin Oranlarının Yaş Gruplarına Göre Dağılımı	29
Tablo 4.3. SOX2 (+) Hücrelerin Işıma Kuvvetlerine Göre Dağılımı	35
Tablo 4.4. OCT4 (+) Hücrelerin Işıma Kuvvetlerine Göre Dağılımı	38



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 2.1. İnsan Germ Hücre Gelişimi	4
Şekil 2.2. Memelilerde Erken Embriyonik Dönemde Ovaryum Gelişiminde İlkel Cinsiyet Hücreleri Görevlidir	5
Şekil 2.3. Oogenezin Şekilsel Gösterimi	7
Şekil 2.4. Ovulasyonun Şekilsel Gösterimi	8
Şekil 2.5. Oosit ve Granüloza Hücreleri Arasındaki Konneksin Bağlantılarının Gösterimi	9
Şekil 2.6. İnsan Ovaryumlarında Folikül Büyümesi	11
Şekil 2.7. Postnatal Oogenez	14
Şekil 2.8. Kök Hücre Tipleri	15
Şekil 2.9. POU Domaini Yapısı	19
Şekil 2.10. OCT4'ün EKH'ler Üzerine Olan Etkileri	19
Şekil 2.11. EKH Belirteçlerinin Hücrelerin Kaderi Üzerine Olan Etkisi	20
Şekil 2.12. Doğumdan İtibaren Yeni Folikül Oluşma Mekanizması	21
Şekil 2.13. Ovaryum Kök Hücre Yuvaları	22
Şekil 3.1. Flow Sitometri Cihazı	26
Şekil 4.1. SOX2 (+) Hücrelerin Yaş Gruplarına Göre Değişiminin Grafikselsel Gösterimi	29
Şekil 4.2. OCT4 (+) Hücrelerin Yaş Gruplarına Göre Değişiminin Grafikselsel Gösterimi	30
Şekil 4.3. Erişkin Öncesi Sıçanların Boyasız Örneklerinin Flow Sitometri Analiz Sonuçları	31
Şekil 4.4. Erişkin Öncesi Sıçanların SOX2 (+) Hücrelerinin Flow Sitometri Analiz Sonuçları	31
Şekil 4.5. Erişkin Öncesi Sıçanların OCT4 (+) Hücrelerinin Flow Sitometri Analiz Sonuçları	31
Şekil 4.6. Erişkin Sıçanların Boyasız Örneklerinin Flow Sitometri Analiz Sonuçları	32
Şekil 4.7. Erişkin Sıçanların SOX2 (+) Hücrelerinin Flow Sitometri Analiz Sonuçları	32
Şekil 4.8. Erişkin Sıçanların OCT4 (+) Hücrelerinin Flow Sitometri Analiz Sonuçları	32
Şekil 4.9. Yaşlı Sıçanların Boyasız Örneklerinin Flow Sitometri Analiz Sonuçları	33
Şekil 4.10. Yaşlı Sıçanların SOX2 (+) Hücrelerinin Flow Sitometri Analiz Sonuçları	33
Şekil 4.11. Yaşlı Sıçanların OCT4 (+) Hücrelerinin Flow Sitometri Analiz Sonuçları	33
Şekil 4.12. Erişkin Öncesi Sıçan Ovaryumlarında SOX2 (yeşil) ve OCT4 (kırmızı) Eksprese Eden Hücrelerin Yerleşiminin Gösterimi	34
Şekil 4.13. Erişkin Sıçanların Ovaryumlarında SOX2 (yeşil) ve OCT4 (kırmızı) Eksprese Eden Hücrelerin Yerleşiminin Gösterimi	34
Şekil 4.14. Yaşlı Sıçanların Ovaryumlarında SOX2 (yeşil) ve OCT4 (kırmızı) Eksprese Eden Hücrelerin Yerleşiminin Gösterimi	35
Şekil 4.15. SOX2 (+) Işıma Veren Hücrelerin Grafikselsel Gösterimi	36
Şekil 4.16. SOX2 (++) Işıma Veren Hücrelerin Grafikselsel Gösterimi	37
Şekil 4.17. SOX2 (+++) Işıma Veren Hücrelerin Grafikselsel Gösterimi	37
Şekil 4.18. OCT4 (+) Işıma Veren Hücrelerin Grafikselsel Gösterimi	39
Şekil 4.19. OCT4 (++) Işıma Veren Hücrelerin Grafikselsel Gösterimi	39
Şekil 4.20. OCT4 (+++) Işıma Veren Hücrelerin Grafikselsel Gösterimi	40

KISALTMALAR ve SİMGELER

Kısaltma / Simge	Tanım
BSA	Bovin serum albumin
BFGF	Bazik fibroblast büyüme faktörü
DAPI	4' 6, 6-diamidino-2-fenilindol
EKH	Embriyonik kök hücre
EKB	Embriyonik kök hücre belirteci
FSH	Folikül uyarıcı hormon
FACS	Floresan aktive hücre sıralama
FGSC	Kadın germ kök hücre hattı
FSC-A	Forward scatter arae
FSC-W	Forward scatter width
GKH	Germinal kök hücre
GV	Germinal vezikül
GFP	Yeşil floresan protein
hPGC	İnsan primordial germ hücreleri
HBSS	Hank's balanced salt solution
İHK	İç hücre kitlesi
KL	Korpus luteum
LH	Lüteinleştirici hormon
MACS	Manyetik aktive hücre sıralama
MDC	Monosit türevi hücreler
OKH	Ovaryum kök hücresi
OYE	Ovaryum yüzey epiteli
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
PGC	Primordial germ hücreleri
PBS	Phosphate buffered saline
PSC	Varsayılan kök hücre popülasyonu
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RF	Resting folikül
SSA	Seviye spesifik antijen
SSC-A	Side scatter area
SSC-W	Side scatter Widht
SDS	Sodyum dodesil sülfat
SOX2	SRY-box transcription factor 2
SSEA-4	Seviye spesifik embriyonik antijen-4
TA	Tunica albuginea
VSEL	Very Small Embryonic Like
ZP	Zona pellucida

1.GİRİŞ

Küresel bir sağlık sorunu haline gelen kadın infertilitesinin artmasında ileri evlilik yaşı, bazı psikiyatrik ilaçların kullanımı, sigara, alkol tüketiminin artması, obezite, iş hayatıyla ilgili kaygı, stress gibi şartlarda etkili olmuştur. Bu sebeplerden dolayı çocuk sahibi olamayan ya da ileri yaşlarda çocuk sahibi olmak isteyen kadınların önündeki en önemli sorun yeterli ve uygun oosit hücrelerinin bulunmamasıdır. Memeli ovaryumları son derece dinamik organlar olmalarına rağmen erişkin yaşamda yeni oosit üretmede yetersizdir. Ovaryumlardaki foliküllerin gelişmesi, yenilenmesi anlamına gelen oogenez ergenlikle başlayan ve menopoza sonlandığı varsayılan bir süreç olmakla birlikte bazı yönleriyle halen tartışmalı bir konudur. Çoğu memeli türünde oosit sayısının fetal ve neonatal dönemde sabit olduğu, postnatal ve yetişkin yaşamda kendilerini yenilemedikleri üreme biyolojisinin temel bir dogmasıdır. [1,2,3]. Bu teori, folikül ve oosit sayımlarının, menopoza kadar yavaş yavaş azaldığını, folikül sayısının, rahim içi yaşamın 20. haftasında (yaklaşık 7 milyon) maksimum seviyeye ulaştığını; Doğumda 1-2 milyona, ergenlikte 30000-40000'e ulaştığını ve menopozda 1000'den az olduğunu, yaklaşık 400 folikülün Graffin aşamasına ulaştığını ve oositi serbest bıraktığını ileri sürmektedir [4]. Bu düşünce, 2004 yılında ilk defa Johnson ve meslektaşları tarafından tartışılmaya başlanmıştır. Daha sonra başka çalışmalarda da foliküler atrezi ve ovulasyon yoluyla oosit kaybı oranının, oosit düşüşünün net oranından çok daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalardan yola çıkılarak, insan ve fare ovaryumlarında, germline kök hücre ve oogonial kök hücre varlığından söz edilmeye başlanmıştır [5,6].

Kök hücreler uzun süreli kendini yenileme ve farklılaşma arasında seçim yapabilme yeteneğine sahip olan hücrelerdir. Bu seçimi iç sinyaller ve dış çevrenin etkisinde kalarak yaparlar. Kök hücreler birçok yetişkin memeli dokusunda tespit edilebilir ve epitel, kan, germline gibi bazı dokularda hücresel yaşlanma ve yaralanma gibi durumlarda kaybedilen hücrelerin yerini doldurmada katkı sağlarlar. Kök hücreler totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 ana grup altında tanımlanmaktadır. Totipotent embriyonik kök hücreler bir canlıyı oluşturabilecek tüm hücre tiplerine farklılaşabildikleri gibi embriyo dışı dokulara da farklılaşma yeteneğine sahiptirler. Embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler pluripotent kök hücreler olup gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptirler. Multipotent kök hücreler, embriyonik gelişimin ileri evresine (fötal, prenatal, postnatal, infertil ve çocukluk dönemleri) ait hücreler olup, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler (ör. hematopoetik kök hücre) ve yetişkin (dokuya özgü) kök hücrelere dönüşebilirler. Multipotent hücreler doğumla birlikte kordon kanında ve erişkin vücudunda özellikle kemik iliği ve yağ dokusunda bulunurlar. İnsanda gelişimin ikinci haftasının başında epiblast tabakasından köken alan ve ilk kez dördüncü haftanın başında vitellus kesesi duvarında gözlenen kök hücrelere ise 'Primordiyal Germ

Hücreleri' denir. Bu hücreler kadında oositlerin öncüsü olan oogonyumları, erkekte ise spermatozoonların öncüsü olan spermatogonyumları oluştururlar. 'Embriyonik Germ Hücreleri' ise primordiyal germ hücrelerinden köken alan pluripotent kök hücrelerdir [2,7,8,9].

Kadında ovaryum kök hücreleri (OKH) olarak kabul edilen bu hücreler OKH nişindeki bağışıklık sistemi kökenli hücrelerin ve hormonların etkisiyle ikincil germ hücreleri olan oogonyumların kökenidir. Fetüsteki OKH'ler hem oogonyumların hem de granüloza hücrelerinin kaynağı olarak işlev görür. Yetişkin kemirgen ve insan yumurtalıklarından oogonial kök hücrelerin izolasyonu bildirilmiştir. Ovaryumlarda bulunan bu germline kök hücre ve oogonial kök hücrelerin kültüre edildiklerinde hem germ hem kök hücre belirteçleri sergiledikleri görülmüştür. Bu hücreler yumurtalıklara yeniden bırakıldıklarında kemirgenlerde sağlıklı yavrular üretebilen foliküllere dönüşmüş oldukları gözlenmiştir. Spermatogonyumlarda bir kök hücre, iki yavru hücre olacak şekilde bölünür ve daha sonra bu geçici çoğalan hücreler niş ile ilişkiye girerek kök hücre haline dönüşür ve kök hücre havuzu genişler. Ancak bu hücrelerin ovaryum içindeki potansiyel ve fizyolojik rolü ile ilgili veri yoktur, özellikle primordial folikül havuzuna katkıda bulunup bulunmadıklarına dair hiçbir kanıt yoktur. Bu hücrelerden oosit farklılaşması için gereken işaretler de anlaşılamamıştır [1,2,10].

Ovaryum dokusunda EKB ifade eden hücreleri araştırmak normal insan germ hücre farklılaşmasını, ovaryum somatik hücrelerini, hücre dışı etkileşimlerini ve over dokusunda gelişen kanserleri anlamada yardımcı olacaktır. Bunun yanı sıra OKH'leri araştırmak başta infertilite olmak üzere preovaryan yetmezlik, premature menopoza, polikistik over sendromu gibi doğurganlığı etkileyen durumlarda, kemoterapi almış kadınlarda doğurganlığı sürdürmek için yeni oosit üretme olasılıkları üzerine yapılan çalışmalara zemin hazırlayacaktır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMALARI

2.1. Üreme Biyolojisine Genel Bakış

Tipik bir kadın pelvisi, uterusun iki tarafında olmak üzere iki over taşır. Her over, utero-over bağından servikse ve ovaryum damarlarını taşıyan infundibulopelvik ligaman tarafından pelvik yan duvara tutturulmuştur [11]. Kadınlarda üremeden, overlerin ürettiği olgun ve üreme yeteneği olan oositler sorumludur. Ayrıca overler, seks hormonları olan östrojen ve progesteronun üretimi ile ekzokrin, oositin üretimi ile de endokrin fonksiyon gösteren karma organlardır [12]. Aynı zamanda da folikülogenez ve oogenezin sinyal yollarına katılan sitokin büyüme faktörü ve hormonların seçiminden de sorumludurlar [13].

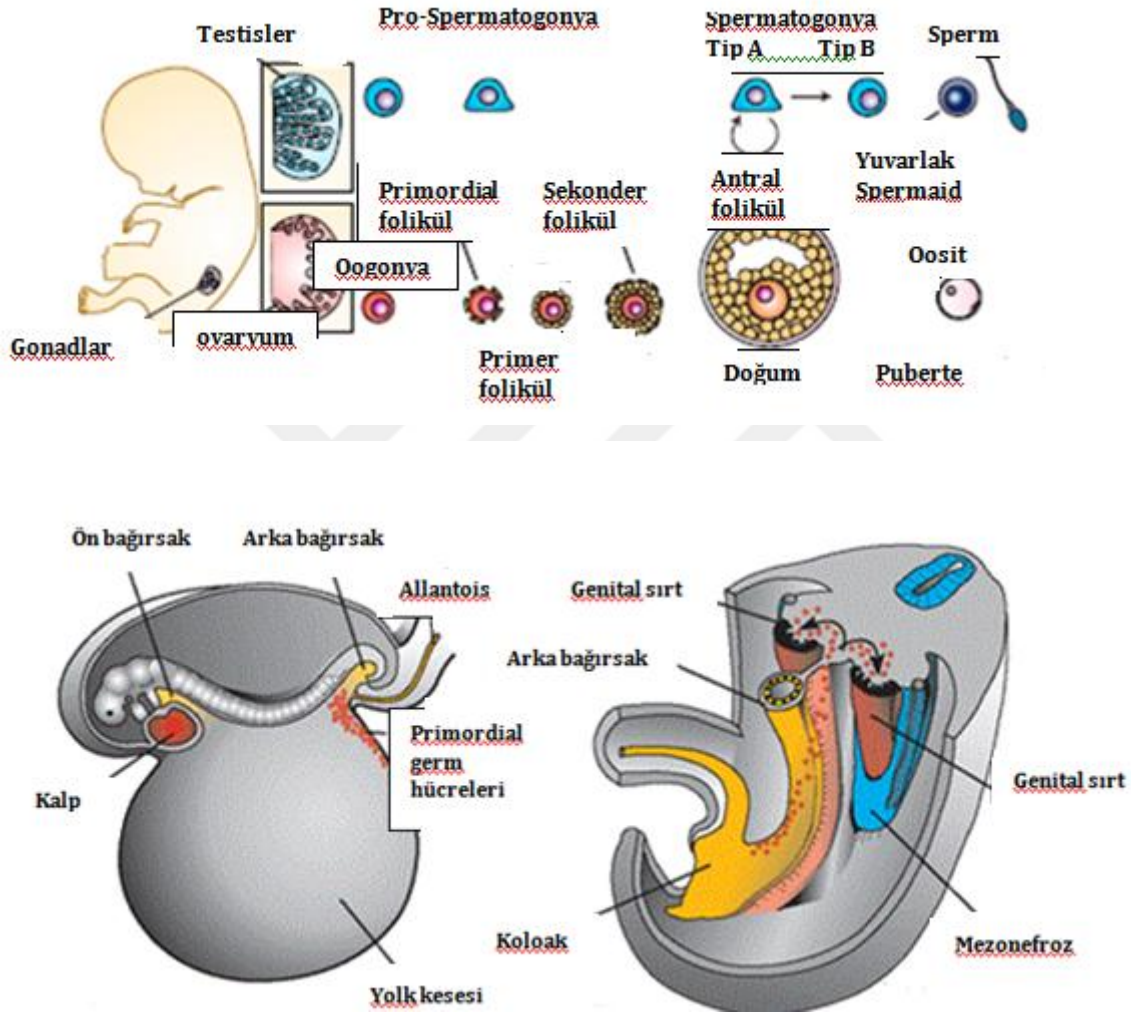
Ovaryum medulla ve korteks olmak üzere iki ana kısımdan oluşur. Medulla ovaryumun iç kısmında yer alan gevşek bir bağ doku içinde damarların ve sinirlerin bulunduğu kısımdır. Korteks ise medullanın çevresindeki, foliküllerin olduğu bölümdür. Ovaryumun yüzeyi kübik-yassı bir epitel tabakasıyla sarıdır. Bu kısma germinal epitel adı verilir. Bu tabakada sadece yenidoğan döneminde mitoz görülür. Erişkin ovaryumundaki yüzey epiteli göreceli olarak embriyodaki yapısını korur [2].

Dişiler, bir ömür boyu olgunlaşmamış oosit rezervi ile doğarlar; Her over bir milyon ila iki milyon oosit içerir. Oosit sayısı tipik bir kadın ömrü içinde azalırken, yaklaşık 300-500 oosit olgunlaşır ve tuba üterina da ilerler; overden komşu fallop tübüne olgun oosit bırakma süreci boyunca oositin uterusu taşınması sağlanır. Overler fallop tüplerine doğrudan bağlı değildir ve her fallop tüpü overlerden bir oosit alabilir [11]. Overlerin fonksiyonel birimleri, foliküller, oosit ve granüloza hücrelerinden oluşur. Ergenlik süreci boyunca foliküller büyür ve primordial foliküllere, birincil foliküllere, ikincil foliküllere, pre-antral foliküllere, antral foliküllere ve son olarak da Graffin foliküllerine dönüşür. Antral aşamada, çok sayıda folikül atretik hale gelir ve bunlardan sadece birkaçı büyür ve periovülatuar evrelere ulaşır. Tüm bu süreç gonadotropinlerin ve büyüme faktörlerinin etkisi altındadır. Bu aşamalardan sonra foliküllerden biri oositini serbest bırakır. Buna ovulasyon denir [14]. Ovulasyondan sonra folikülün bozulmasıyla korpus luteum (KL) oluşur. Folikül oluşumu esnasında oositler büyürken onlara eşlik eden granüloza hücreleri de çoğalır, farklılaşır ve birincil mayotik bölünmenin tamamlanması oositin fertilizasyon için tubalardan geçişi esnasında olur. Oositlerin ana kaynağı ise primordial germ hücreleridir [12].

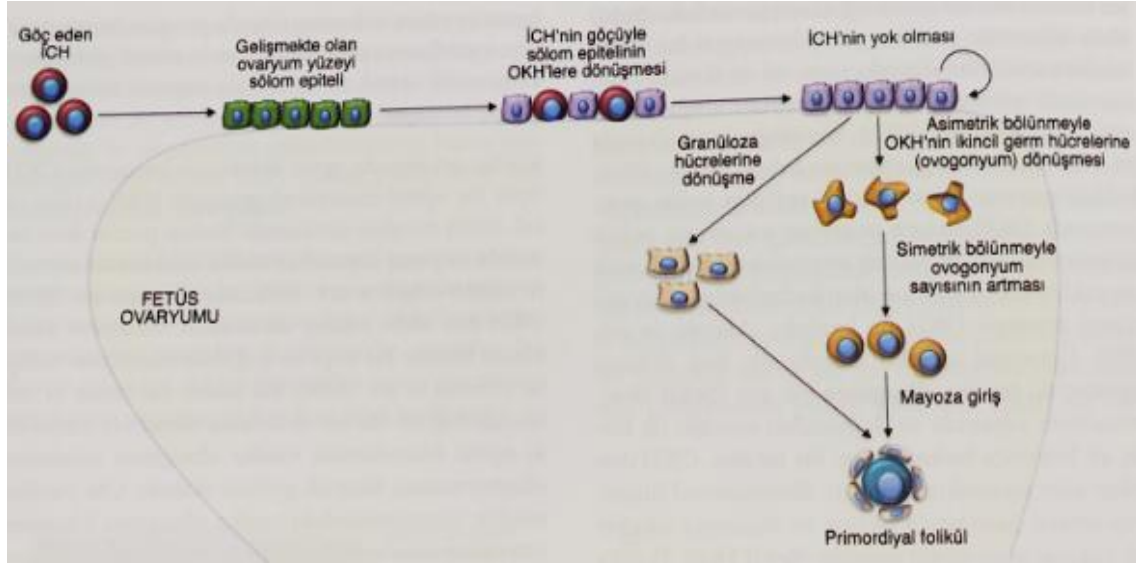
2.2. İnsan Germ Hücre Gelişimi

Fuss ve Felix 4 haftalık embriyoda insan primordial germ hücreleri olarak benzersiz morfolojiye sahip bir hücre grubu tanımladıklarında, insan germ hücresi soyunun gelişimi üzerine yapılan araştırmalar bir asırdan öncesine dayanmaktaydı. Daha sonra Pulitzer ve Wishi, önemli sayıda embriyo analiz ederek, hPGC (insan primordial germ hücrelerinin)'lerin vitellüs

kesesi (yolk sac) endoderminden arka bağırsak (hindgut) endoderm ve dorsal mezenter (bağırsak askısı) yoluyla genital sırtta birleştiklerini ve mitozla çoğalmaya devam ettiklerini bulmuşlardır. 9 hafta sonra, kadın PGC (primordial germ hücreleri)'leri mayoz bölünmenin I. fazında diploten aşamasında tutuklanır. Diğer yandan, erkek PGC'ler ergenlikten sonra mayoz bölünmesi için mitotik bir tutuklama geçirirler [15].



Şekil 2.1. İnsan germ hücre gelişimi intrauterin 3. haftanın sonunda yolk kesesi duvarının allantoise doğru olan kısmında görülür [16].



Şekil 2.2. Memelilerde erken embriyo döneminde ovaryum gelişiminde ilkel cinsiyet hücreleri görevlidir [2].

PGC'ler yeni bir organizma üretme yeteneğine sahip sperm ve oositlerin öncüleridir. PGC'ler, erken memeli postimplantasyon gelişiminde ortaya çıkar ve sonraki nesillere genetik ve epigenetik bilgilerin aktarılması için benzersiz şekilde programlanmışlardır. Primordial germ hücreleri, gametlerin habercisi olan son derece uzmanlaşmış hücrelerdir, mayozlaşmayı takiben, fertilizasyon üzerine yeni bir organizma üreten haploid sperm ve oosit olarak gelişirler [16]. İnsan germ hücre gelişimin anlaşılması için gametogenez ve folikülogenez kavramları iyi anlaşılmalıdır.

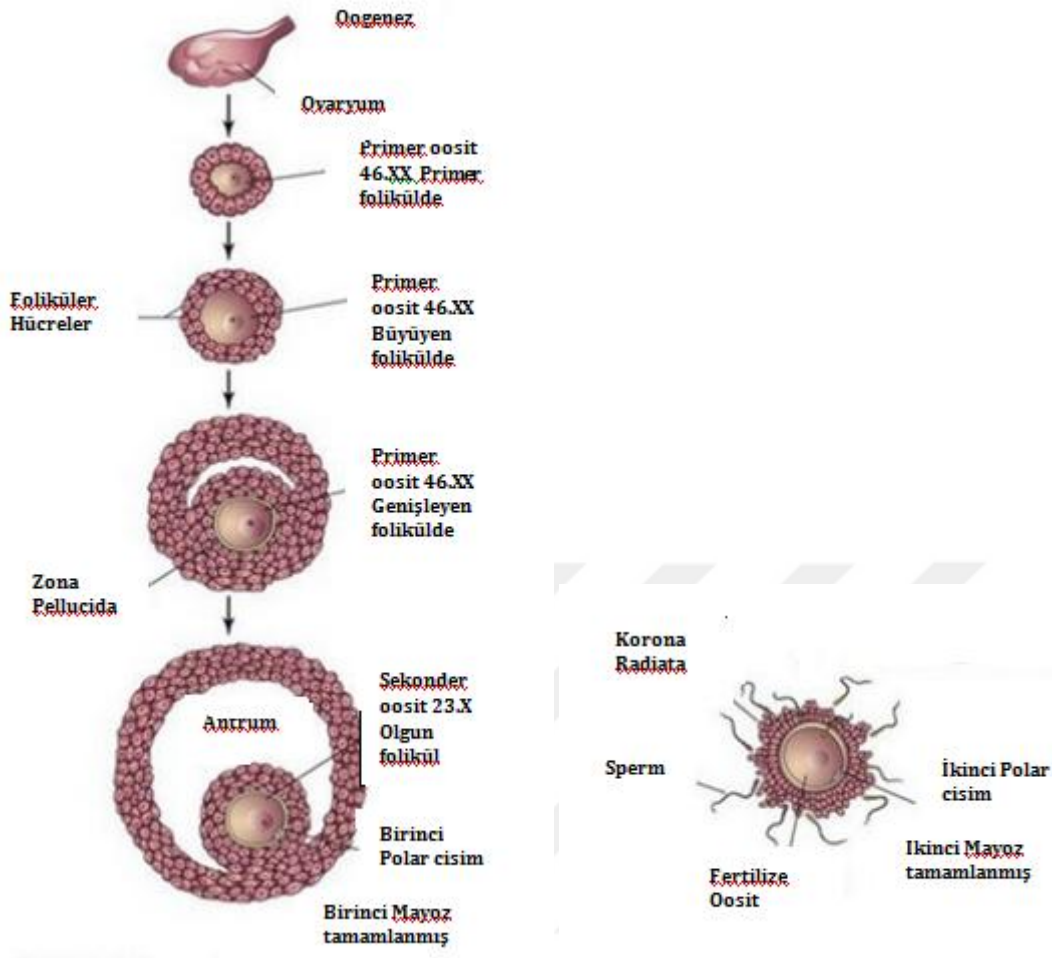
2.3. Gametogenez

Çok hücreli organizmalarda, somatik ve germ hücreleri olmak üzere iki temel hücre tipi vardır. Diploid germ hücreleri, mayotik hücre bölünmelerine uğrarlar ve haploid gamet (sperm ve oosit) üretirler. Gametogenez (gamet formasyonu), özelleşmiş generatif hücrelerin, gametlerin (oositler veya spermelerin) oluşumu ve gelişmesi sürecidir. Bu süreç, gametlerin kromozomlarını ve sitoplazmasını içeren seks hücrelerini döllenme için hazırlar. Gametogenez sırasında, kromozom sayısı yarıya indirilir ve hücrelerin şekli değiştirilir. Gametogenez embriyolardaki PGC'lerin oluşumuyla başlar, erkeklerde ve kadınlarda farklı şekilde ilerler. Gamet maturasyonu erkeklerde spermatogenez kadınlarda oogeneze olarak adlandırılır. Gametogenezin tamamlanması insanlarda on yıldan fazla sürer. İnsan gametogenezi ve embriyogenez araştırması, insani gelişim, üreme, evrim ve hastalıkların anlaşılması için önemli olmuştur. Bununla birlikte, bu tür çalışmalar insan embriyonik ve fetal dokuların kullanımı ile ilgili kısıtlamalar sebebiyle teknik ve etik açıdan yapılması zor olmuştur [17,18].

2.3.1. Dişi Gamet Oluşumu; Oogenez

Oogenez sırasında dişi gametleri oluşur. Oogenez süreci, primordial germ hücrelerinden oogonia gelişimi ile birlikte fetal yumurtalıklarda başlar. Ovumlar foliküler veziküller içinde muhafaza edilir. Gelişimin bu aşamasında oosit çekirdeği, germinal vezikül (GV) olarak adlandırılır. GV oositleri, primordial foliküller içinde lokalize edilir. Fetal dönem sonunda tüm primer oositler oluşur ve gelişimini diktiye aşamasında durdururlar. Primer oositler ergenliğe kadar yıllarca korunur [19,20]. Primordial germ hücreleri oogoniya farklılaşırlar, mayoz başlar ve birincil oositler haline gelirler. Primer oositlerin hücre döngüsü I. mayozun profazında (diploten evresinde) duraklar. daha sonra uzun bir süre orta-mayozda kalır. Yumurtlamadan önce oositler bir büyüme fazına maruz kalır ve boyutları önemli ölçüde artar. Daha sonra hormonal bir işaretle oosit maturasyonunu tetiklenir, bu da mayozun yeniden başlatılmasını, ilk mayoz bölünmesinin tamamlanmasını ve sonuç olarak diploid kromozom sayısındaki azalmayı sağlar. Hücre döngüsü tekrar durur; omurgalılarda bu duraklama, ikinci mayoz bölünmesinin metafaz aşamasında gerçekleşir. Sperm, oositi dölediğinde oositin maturasyonu tamamlanmış olur ve ilk embriyonik hücre döngüsü başlar [20].

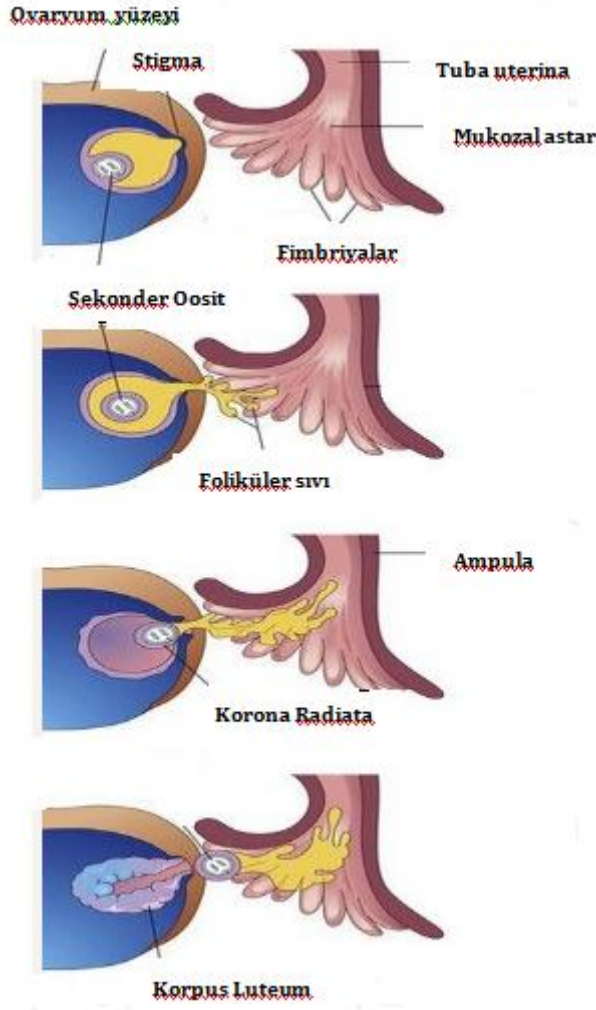
Genel olarak, ovaryumların doğumdan önce, “yaşla birlikte azalan ve menopoza tükenmekte olan” sabit sayıdaki büyümeyen bir folikül havuzu içerdiği kabul edilmektedir [19]. Primer spermatositlerin sürekli üretilmesinin aksine, doğumdan sonra primer oosit oluşmaz [18]. Wallace ve Kelsey, insan ovaryumlarında yetişmeyen (büyümeyen) folikül popülasyonunun yaşa bağlı bir modelini kurmuşlardır. Bu çalışma doğumdan menopoza kadar 8 farklı kantitatif histolojik deneye dayanmaktadır. Bu çalışmayla kadınlarda, doğumdan sonraki 7 haftadan menopoza kadar (51 yaş) büyüme göstermeyen folikül popülasyonunu tahmin etmişlerdir. Kadınların % 95’ inde 30 yaşına kadar doğum sonrası büyümeyen folikül sayısının % 12’ sinin kaldığı 40 yaşına geldiklerinde ise bu oranın % 3’e indiğini tahmin etmişlerdir [19]. Sayılabilir terimlerle, doğumda ovaryumlarda yaklaşık 1.000.000 veya daha fazla folikül düzenli olarak mevcuttur, 30 yaşında genellikle 10.000 ila 100.000 folikül arasında, 40 yaşında 1000 ila 10.000 folikülden, menopoza foliküllerin sayısı 1000’den daha azına inmiştir. İlginç bir şekilde, çoğu kadının ovaryumlarında büyüyen folikül alım oranının doğumdan yaklaşık 14 yaşına kadar arttığı ve daha sonra menopoza doğru yoğun bir şekilde azaldığı bulunmuştur [19].



Şekil 2.3. Oogenezin şekilsel gösterimi. Oogonialar doğumdan önce primer oositlere ayrıldıklarından bu şekilde gösterilmemektedir [18].

2.3.2. Ovaryan Siklus

Ovaryan siklus, foliküllerin gelişimi, yumurtlama ve korpus luteumun formasyonunu içerir. Folikül uyarıcı hormon (FSH) ve Lüteinleştirici hormon (LH) ovaryumlarda döngüsel değişikliklere sebep olur. FSH, birçok primordiyal folikülün 5 ila 12 ana folikül halinde büyümesini teşvik eder. Bununla birlikte, sadece bir primer folikül genellikle olgun bir folikül içine gelişir ve yumurtalık yüzeyinden koparak oositini çıkarır (Şekil 2.4.) [21].

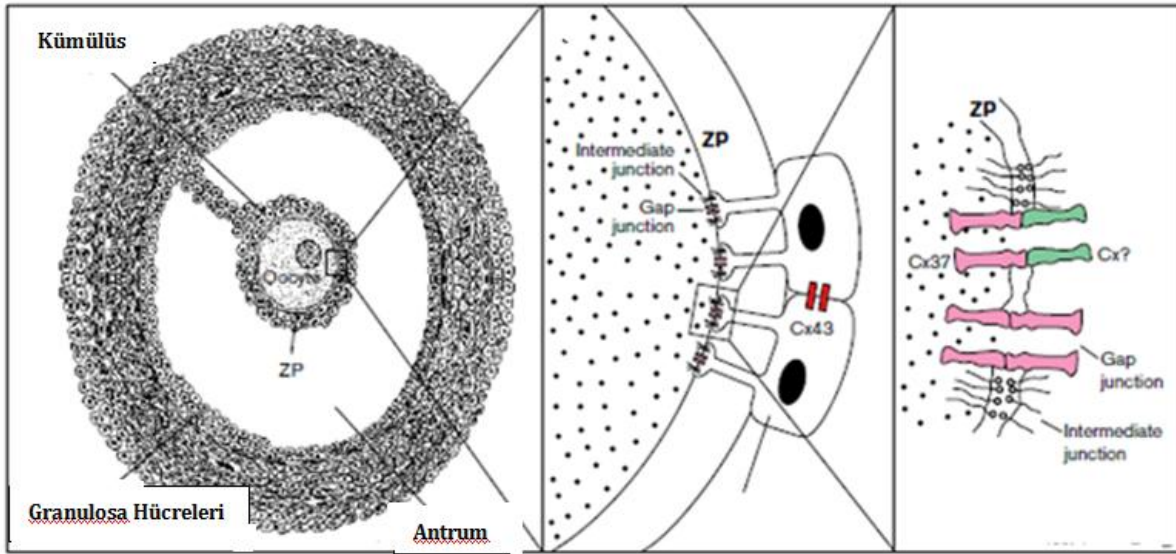


Şekil 2.4. Ovulasyonun şekilsel gösterimi.

2.4. Folikülogenez

Ovaryumun temel fonksiyonel birimleri foliküllerdir. Bir follikülün yapısı, oosit ile onu çevreleyen granüloza ve teka hücrelerinden oluşmaktadır. Normal folikül oluşumu esnasında, her bir follikül içindeki oositin büyümesi ve olgunlaşması; granüloza ve teka hücrelerinin çoğalmaları ve büyümeleri koordineli bir şekilde gerçekleşir. Bu koordinasyon ovüle olan oositin fertilizasyona ve sonraki embriyonik gelişime hazır olduğunu gösterir. İmmatür oositin mayoz bölünmesini tamamlaması, büyüme ve gelişmesi için granüloza hücrelerine; granüloza hücrelerinin de proliferasyon, differensiyasyon ve fonksiyon görmeleri için oosite ihtiyaçları vardır. Bu çift yönlü etkileşim, gelişim süresince devam etmektedir. Ovariyan folliküllerin gelişimini düzenleyen kompleks hücre-hücre etkileşimleri, endokrin, otokrin, parakrin regülatörler ve oluklu bağlantı tipi hücrelerarası bağlantılar ile olmaktadır. Sonuçta memeli

folliküllerinin gelişimini düzenleyen asıl faktör oosit olarak tanımlanmıştır [22,23].



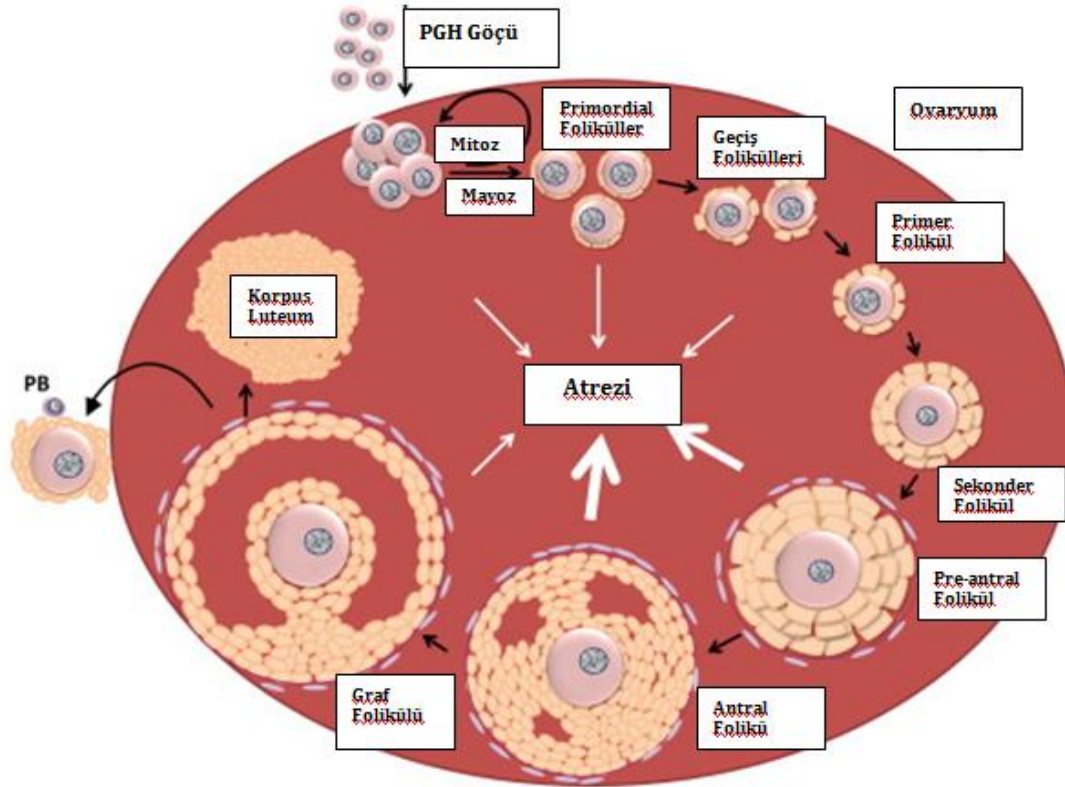
Şekil 2.5. Oosit ve granüloza hücreleri arasındaki konneksin bağlantılarının gösterimi; Cx37, oosit ve granüloza hücreleri arasındaki sinyal transferini sağlar. Olgun foliküllerde, foliküler antrumun akışkanına asılan oosit, yoğun kütle granüloza hücreleri, kümülüs ooforu ile çevrelenir. Kümülusun en içteki katmanındaki hücreler, oosit ile hem ara geçişler hem de boşluk kavşakları oluşturan zona pellucida (ZP) yoluyla prosesleri uzatır. Granüloza hücreleri I. profazda arrestte uğramış, kromatini paketlenmiş, genetik makinesi durdurulmuş primordiyal yumurta hücrelerini, konneksin adı verilen düğme benzeri yapılarla hem beslemekte, hem de protein sentezi yapabilsinler diye yumurta hücrelerine maternal RNA sağlamaktadır [22].

Yetişkin ovaryumlarında folikülogenez, büyüme evresine girmek için dinlenme halinde bekleyen foliküllerin, folikül havuzunu terk etmesiyle başlar. Erken büyüyen folikül, hücresel proliferasyon ve farklılaşma dahil olmak üzere bir gelişim sürecinden geçer. Primatlarda, sadece bir folikül her döngüde preovulatuvar aşamaya ulaşır; Çoğu folikül bu olgunlaşma şemasını tamamlayamaz, atrezi olarak adlandırılan bu süreçte ölür. İnsan ovaryumlarında, fetal yaşamın dördüncü ayında foliküller oluşmaya başlar. Bu yeni oluşmuş foliküllerin bir kısmı hemen çoğalmaya başlasa da, birçoğu ya dejenerere olana kadar ya da bazı sinyaller onları büyüme evresine girmeye zorlayana kadar dinlenme aşamasında (RF: Resting Follicul) kalır. Bu foliküller RF stoğunu oluşturur. İnsanlarda üç tip RF tanımlanmıştır. Bunlar primordiyal, ara ve küçük primer RF'lerdir. RF stoğu esas olarak, hem insanlarda hem de maymunlarda sağ ve sol overlerde benzer sayılarda görülen primordiyal ve aracı foliküllerden oluşur [24].

Intrauterin folikülogenez sırasında büyüyen ve mayotik olgunlaşmaya giden primordial germ hücreleri 1. mayozun profaz aşamasında diktiyothen safhasında bekler. Bekleyen her diktiyothen oosit pregranuloza hücrelerinden oluşmuş tek katlı yassı hücre tabakası ile çevrilidirler ve daha sonra bazal lamina ile çevrilip primordiyal folikülleri oluştururlar. Postnatal dönemde primordiyal foliküller 3 haftalık büyüme fazına girer ve etraflarını saran tek katlı yassı epital görünümdeki granuloza hücreleri de kübik bir şekil alarak farklılaşır ve primer folikülü oluşturur. Oositin büyümesi ile granuloza hücreleri çoğalır ve çok katlı granuloza hücreleri tarafından çevrelenmiş preantral foliküller oluşur. Puberteden sonra gonadotropinler ve FSH'nin etkisi ile foliküllerin büyüme hızı artar ve granuloza hücreleri arasında boşlukların şekillendiği, antral foliküller oluşmaya başlar. Antral foliküller içerisindeki oositler olgunlaşmak için yeterli özelliğe sahiplerdir ancak kendilerini çevreleyen granuloza hücreleri ile etkileşimlerinden dolayı gelişmeleri durmuş olarak kalırlar. LH'nin artmasıyla birlikte oositler gelişimlerini birinci mayozlarının bitmesiyle tamamlar, ilk polar cisimciği atıp, metafaz II de duraklamış hale gelirler. Büyüme için ortaya çıkan foliküllerle ovülasyonla sonuçlanan foliküllerin sayısı aynı değildir. Çünkü bu foliküllerin çoğu atreziye uğrar. Primatlarda, genelde sadece bir folikül her döngüde preovulatar aşamaya ulaşır; Oositin folikül içerisindeki ölümü iç sinyaller sebebiyle ya da, foliküler hücrelerin ölümü neticesinde olabilir [12,24].

Folikülogenezin ilk evreleri gonadotropinlerden bağımsızdır, hücreye özgü ve hücre dışı faktörleri içerir. Hala moleküler düzeyde anlaşılamamasına rağmen, başarılı folikül oluşumu ve folikül büyümesinin başlatılması, hem germ hem de somatik hücrelerin sağlıklı etkileşimi ile olmaktadır. Bu önemli süreçlerin aydınlatılmasında fare modelleri oldukça yarar sağlamaktadır. Spesifik gen ürünlerinden yoksun fare dizilerinin fenotiplerini araştırarak, folikülogenezin ilk evrelerini düzenleyen genetik hiyerarşiler açıklığa kavuşturulmaktadır. Bu araştırmalar, memeli doğurganlığının düzenlenmesine ilişkin bilgi sağlayacaktır [25].

Özetleyecek olursak, folikülogenez ve oogeneze gap junction tipi bağlantıları kullanarak fertilizasyon ve embriyonik gelişimi sağlayacak yeteneğe sahip olgun oositi oluşturmayı sağlar. Aynı zamanda oosit oluşumu çevresindeki granuloza hücreleri tarafından da düzenlenir. Granuloza hücrelerinin sinyalleri mayotik duraklamayı düzenler, oosit büyümesini artırır ve mayoz ile oosit gelişiminin devamını kolaylaştırır [12].



Şekil 2.6. İnsan ovaryumlarında folikül büyümesi. Proliferatif primordial germ hücreleri (PGC'ler) germ hücre yuvalarını oluşturmak için geliştirmekte olan ovaryuma göç eder. Mayoza girip çoğalırlar ve primordial folikülleri oluştururlar. Reprotüktif yaşam boyunca foliküller dinlenme halinden çıkarak salınırlar. Büyüyen foliküllerin çoğu atreziye uğrar ve ergenlik döneminde her adet döngüsünde bir oositin salınmasıyla sonuçlanır ovulator folikülün kalanı korpus luteumu (KL) oluşturur [26].

2.4.1. Postnatal Folikülogenezis

Son zamanlarda yapılan çalışmalar postnatal yeni primer foliküllerin, overlerin tunika albugineasında (TA) bulunan CK+ mezenkimal progenitör hücrelerden primitif granüloza ve germ hücre oluşumunun, ya farklılaşarak ya da kendiliğinden olabileceğini göstermiştir. Üreme periyodu boyunca yeni primer foliküllerin meydana gelmesi, foliküler havuzdaki belirgin atreziyi kompanse edip en kaliteli oositin seçimine katkıda bulunabilir bu da 18 ile 38 yaş arası kadınlardaki primer folikül sayısının göreceli olarak sabit kalmasını açıklar. Üreme çağındaki kadınlarda primer folikül havuzu durağanlıktan uzak ancak farklılaşan ve gerileyen yapılarla dinamik bir topluluktur. Böylece foliküler döngünün, kalan foliküllerde spontan veya çevresel faktörlerle meydana gelen genetik değişiklikleri elemine ettiği düşünülmektedir [12]. Yarım yüzyıldan fazla bir süredir, çoğu memeli türünde oositlerin doğum sonrası veya yetişkin yaşamında kendilerini yenileyemediği ve oositlerin sayısının zaten fetal veya neonatal ovaryumlarda sabitlendiği kabul edilmektedir. Ancak bu varsayım son onbeş yılda tartışılmalı

hale gelmiştir. Son zamanlarda, öncelikle iki araştırma grubundan yapılan çalışmalar, antikör bazlı manyetik aktive hücre sıralama (MACS) veya floresan aktive hücre sıralama (FACS) yöntemleri kullanılarak fonksiyonel kadın germ kök hücre hatlarının (FGSCs) ve oogonial kök hücrelerin (OKH'ler) var olduğunu yetişkin fare ve insan ovaryumlarında ortaya koymuşlardır. Zou ve arkadaşları [27], postnatal fare ovaryumlarından izole edilen FGSC'lerin in vitro kültür sırasında mitotik olarak aktif olduğunu ve fertilizasyondan hemen hemen 24 saat kadar sonra FGSC'lerin çoğalmaya başladığını bildirmişlerdir. Dahası, bu FGSC'lerin 68 pasajda stabil olduğu ve kemoterapi ilaçları ile sterilize edilmiş dişi farelerin ovaryumlarına nakledildiği zaman oositlere farklılaşabilmeleri ve fonksiyonel folikülleri yeniden üretebildikleri bildirilmiştir [3]. Yetişkin insan ovaryumlarından saflaştırılan OKH'ler, in vitro kültür sırasında fare FGSC'lerine benzer proliferatif özellikler sergilemiştir. Bu yetişkin insan over kortikal dokusundan alınan OKH örnekleri, immun yetmezliği olan dişi fareye enjekte edildiğinde, transplantasyondan bir hafta sonra rejenere primer foliküller görülmeye başlanmıştır. Bununla birlikte, bu foliküllerin ne kadar gelişebileceğine ilişkin olarak hiçbir bilgi sağlanmamıştır. Rejenere edilen oositlerin mayozal olarak yetkin ve fonksiyonel olup olmadığı net değildir [3,12,27].

Fare ve insan ovaryumlarından elde edilen OKH'lerin (FGSC'ler olarak da bilinir) yakın zamandaki tespiti ve izolasyonu, üreme biyolojisi, kök hücre biyolojisi ve klinik üreme tıbbi alanlarında hem coşku hem de tartışmalara yol açmıştır. Her ne kadar memelilerde postnatal oogenezis ve folikül yenilenmesi kavramını destekleyen çok sayıda zorlayıcı kanıt mevcut olsa da, bu yeni bulgular sahada 10 yıldan fazla süredir dogmatik düşünceyle çelişmektedir. Bugüne kadar, doğumla ilişkili oositlerin "sabit oosit rezervinin" yaşa bağlı olarak tükenmesi popülerliğini korumaktadır. Ancak son zamanlardaki çalışmalardan sonra, birçok laboratuardan gelen sonuçlar, şimdi memelilerin ovaryumlarının üreme döneminde yeni oositler ve foliküller oluşturduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir [6]. OKH biyolojisi alanı aslında doğumdan önce oogenezin durup durmadığını test etmek için değil, farelerde oosit sayma deneylerinde şanseseri ortaya çıkmıştır [6]. Folikül atrezisi yoluyla oosit kaybının görülme sıklığı, seri ovaryan kesitlerdeki dejeneratif oositler ile doğrudan değerlendirilerek, yavrulardan yetişkin hayvanlara geçtikçe dişi farelerde yumurtalık oosit rezervlerindeki net düşüşü aştığı görülmüştür. Bu nedenle mantıksal olarak, doğum sonrası yaşamdaki bu şaşırtıcı derecede yüksek oosit kaybının, yumurtalık fonksiyonu için yeni oosit içeren foliküllerin rutin olarak eklenmesiyle kısmen dengelenmesi gerektiği sonucuna varılmıştır. Daha sonra matematiksel modeller kullanılarak fare yumurtalıklarının en azından üreme hayatında ~ 77 yeni folikülü yeniden ürettikleri hesaplanmıştır. Bu, oojenezden sorumlu olan oosit progenitör hücrelerinin ya çok nadir ya da proliferasyonun yavaş olduğunu göstermektedir [6].

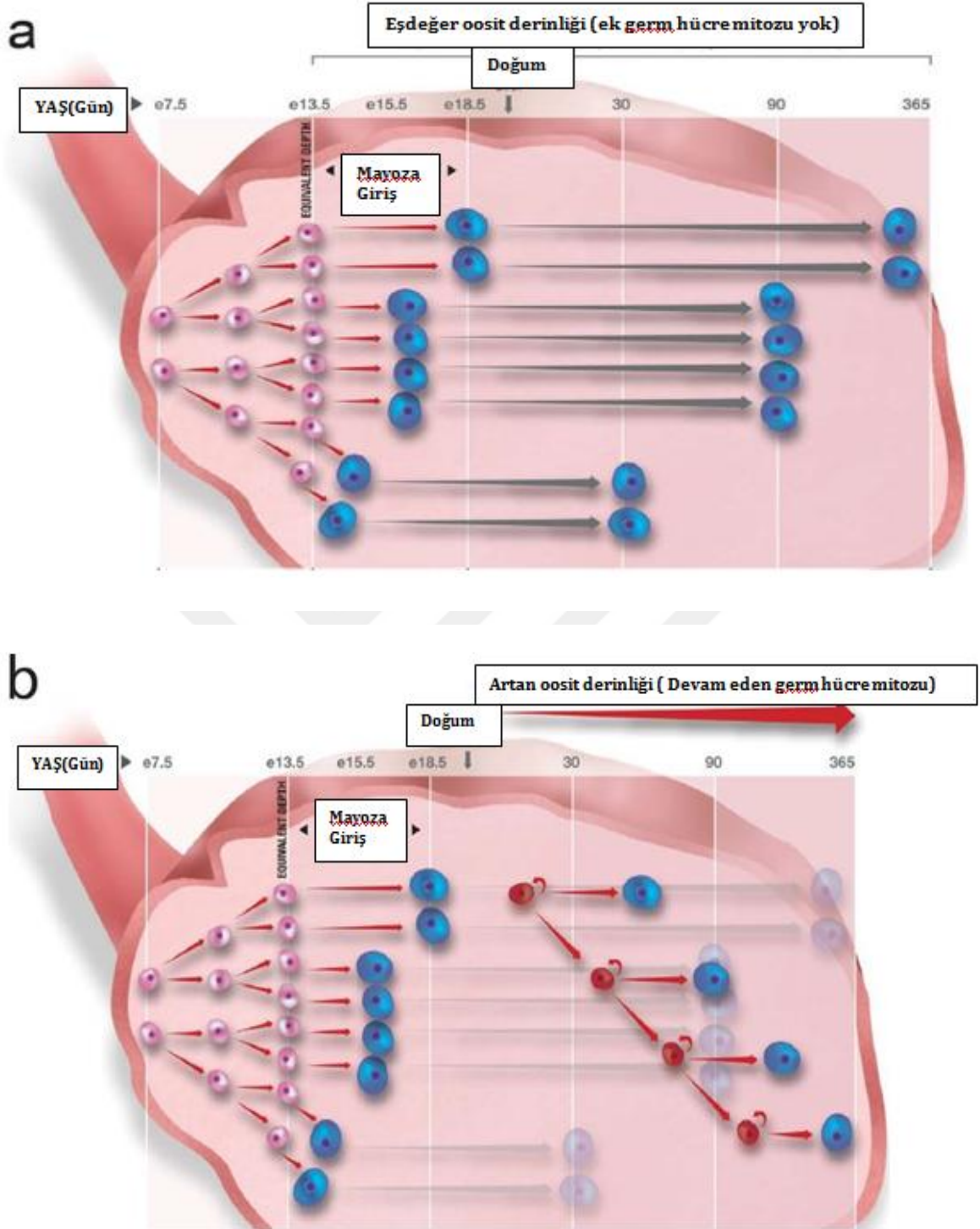
2.4.2. Postnatal Oogenezis

Postnatal oogenezis kavramı ilk olarak 1923 yılında Allen [28]. tarafından farede ve ardından 1932 yılında Simkins [29]. tarafından insanda ortaya atılmıştır. Daha sonraları 2004 yılında Tilly ve ekibi periferik kan ve kemik iliğinde varsayımsal germ hücreleri olduğu ve bu hücrelerden yeniden oositlerin meydana geldiğini göstererek postnatal oogenezis fikrini yeniden canlandırmışlardır [5]. Fare overlerini kemoterapi ile sterilize etmişler ve hem sağlıklı hem de atretik folikülleri sayarak folikül sayısında hızlı bir artış olduğunu ve 2. ayın sonunda kontrol ile kemoterapi almış overlerde folikül sayılarının hemen hemen aynı kaldığını bulmuşlardır. Tamamen sterilize edilmiş farelere kemik iliği nakli uyguladıklarında oositlerin yeniden oluştuğunu gözlemişlerdir. Bunun yanı sıra yeşil floresan protein (GFP) ekprese eden transjenik fareden kemoterapi ile overleri sterilize edilmiş normal fareye periferik kök hücre nakli yapıldığında bu hayvanların overlerinde GFP-Pozitif primordial foliküllerden oositler oluştuğunu gözlemlemişlerdir [5,30].

Bu sonuçlar bilim dünyasında çok büyük bir yankı bulmakla kalmamış aynı zamanda tartışmalara sebep olmuş ve üç yeni görüşün doğmasına zemin hazırlamıştır.

1. görüş; Over yüzey epitelinde mevcut germ hücrelerinin periferik kana geçerek kemik iliği örneklerinde gözlenen germ hücre belirteçlerinin pozitif çıkmasına neden olduğu [31,32].
2. görüş; Çoğalmakta olan oositlerin aslında yanlış tanımlanmış immun hücreler olduğu [33].
3. görüş ise; Atretik primordial folikül sayımında hata yapıldığı veya kemoterapiden sonra nasıl 2 günde folikül yenilenmesi olduğu [32] ve insan overinde aktif mayoz bulgusuna rastlanmadığı yönünde gelişmiştir [34].

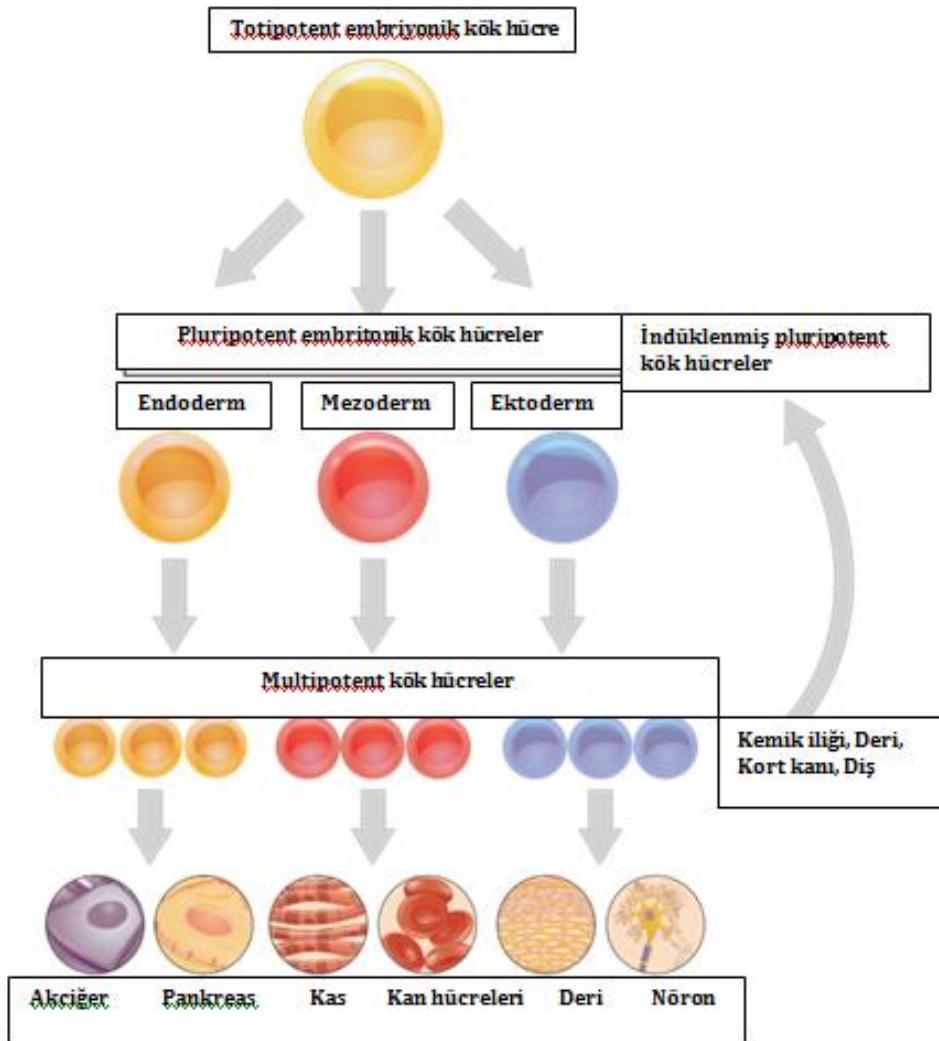
Bununla birlikte, artan sayıda çalışma, yetişkin insan ve diğer memeli türlerinin ovaryumlarında farklı kök hücre popülasyonlarının bulunduğunu göstermiştir. Bu kök hücre popülasyonlarının de novo oogenezisi ve yetişkin insan ovaryumlarının yenilenme kapasitesini temsil edebileceği düşünülmektedir.



Şekil 2.7. Devam eden postnatal oogenesis OKH mitozu ile yaşla birlikte artan oosit derinliğini açıklar. (a) farelerde dişilerde oogenesis süreci (oogoni:pembe) genişlemesi yaklaşık 7. günde başlar ve 5 günlük periyod sonunda sona erer (oosit:mavi) yaşla artan oosit derinliğini açıklamaz. (b) OKH'lerin proliferasyonunun devam etmesi (kırmızı) ve doğum sonrası yaşamda oositlere (mavi) sonradan farklılaşmaları kadınlar yaşla artan oosit derinliğini açıklar [35].

2.5. Kök Hücreler

Kök hücre yaşamın kökenidir. Rudolph Virchow'un belirttiği gibi, "Tüm hücreler hücrelerden gelir." En başarılı kök hücre, germinal kök hücrelerin kaynaşmasından oluşan döllenmiş oositir. Döllenmiş oosit totipotenttir; Ondan geliştirmekte olan embriyonun tüm dokularını oluşturur. Embriyonun gelişimi sırasında, yaşam döngüsünün devam etmesine izin vermek için yetişkinde devam eden germinal kök hücreler oluşur. Erişkinlerde doku, kök hücreler ve olgun hücre tipinin uzmanlaşmış fonksiyonuna farklılaşma sürecini başlatan, bir hücreyi oluşturmak üzere bölünen özel kök hücrelerin çoğalmasıyla yenilenir [36].



Şekil 2.8. Kök hücre tipleri [37]

Kök hücreler, bir organizmayı oluşturan birçok farklı hücre türüne dönüşebilirler. Böylece kök hücreler, karakteristik şekillere veya sinir hücreleri, kalp, deri gibi özel işlevlere sahip olan olgun hücrelere dönüşebilir. Uzun süre bölünme veya kendini kopyalama yeteneğinde olurlar; Bu çoğaltma organizmanın ömrü boyunca devam edebilir [38]. Kök hücreler uzamış kendini yenileme ve farklılaşma arasında seçim yapma yeteneğine sahip hücrelerdir. Bu kader tercihi büyük ölçüde, içsel sinyaller ve dış mikroçevre tarafından düzenlenir. Bu hücreler birçok

yetişkin memeli dokusunda tanımlanabilir. Epitel, kan ve germ hattı gibi bazı dokularda, normal hücrel yaşlanma veya yaralanma ile kaybedilen hücrelerin yenilenmesine katkıda bulunurlar. Kök hücreler, normal olarak çok sınırlı hücrel rejenerasyon veya devir işlemine maruz kalan beyin ve pankreas gibi diğer yetişkin organlarda da mevcut olabilir. Erişkin dokulardaki kök hücreler, başlangıçta düşünülenlerden daha fazla “plastisite”ye sahip olsalar da, tipik olarak sadece sınırlı sayıda hücre tipi oluştururlar. Erişkin dokuların aksine erken memeli embriyosunun kök hücreleri, herhangi bir hücre tipi oluşturma potansiyeline sahiptir [7].

2.5.1. Kök Hücrelerin Temel Özellikleri

Hücreleri kök hücre olarak tanımlaya bilmek için bazı temel özelliklere sahip olmaları gerekmektedir. Bu özellikler;

1. Pluripotensi (Köklülük)
2. Kendini Yenileme
3. Asimetrik Bölünme
4. Diferensiyasyon (Farklılaşma).

Pluripotensi: Köklülük özelliği, kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biridir. Erken embriyo gelişiminde (insanda döllenmeden sonraki 5-6. günlerde) blastokisti oluşturan hücreler pluripotent özellikleri nedeni ile embriyoyu oluşturabilecek tüm hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptirler. Pluripotensi özelliği embriyo büyüdükçe azalmaktadır.

Kendini yenileme: hücrenin kendini yenilemesi eskiyen organellerini tamir etmesi anlamına değil içinde bulunduğu kök hücre popülasyonunun yenilenmesi anlamına gelmektedir. Yani her bölündüğünde kök hücre en az bir yedeğini yerine koymaktadır.

Asimetrik Bölünme: Farklılaşma yeteneğine sahip bir kök hücre bölündüğünde hücrelerden birisi kök hücrenin yedeği gibi kalırken diğer hücre farklı bir hücre tipine dönüşmek için özelleşmeye başlamaktadır.

Diferensiyasyon: Bölünen kök hücrelerden birisi eksikliği tamamlamak için kök hücre havuzuna dönerken, özelleşmek üzere bölünen hücre uygun koşullar altında farklılaşmaya giderek dönüşeceği hücreye farklılaşmış olmaktadır. Örn; Bağırsak yüzeyinde emilim yapan hücreler sonuna kadar farklılaşmış hücrelerdir [2].

2.5.2. Kök Hücre Çeşitleri

Kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olmak üzere farklılaşma potansiyellerine göre gruplandırılırlar (Şekil 2.8.) [39,40].

Totipotent kök hücreler; Döllenmeyi takiben geçen 4. güne kadar olan aşamadaki her bir blastokist hücresi plasenta gibi ekstraembriyonik dokulara da farklılaşarak tüm embriyonik

dokulardaki özelleşmiş hücrelerle birlikte tam bir organizmayı oluşturabilirler. Bu blastomerlerin her biri totipotent kök hücredir [41,42].

Pluripotent kök hücreler; Döllenmeyi takiben geçen 5-6 günde blastokist iki ayrı hücre grubuna farklılaşır. Bir kısım hücre trofoektodermi oluşturup plasenta gibi embriyo dışı dokulara dönüşmek üzere farklılaşır. Diğer hücre grubu ise iç hücre kitlesi olarak adlandırılan embriyoyu oluşturacak kısımlara farklılaşır. Embriyonik tabakalar olan endoderm, mezoderm, ektodermi temsil eden hücre tiplerine farklılaşabilme özelliğine sahip bu hücreler pluripotent kök hücrelerdir.

Multipotent kök hücreler; sınırlı sayıda hücre tipine farklılaşabilme potansiyeline sahiptirler genelde kendileriyle aynı embriyonik tabakadaki hücrelere dönüşebilirler [39].

Unipotent kök hücreler ise tek bir farklılaşmış hücre tipini oluşturabilirler [42,43]. Öncü hücreler olarakta bilinirler.

2.5.3. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler (EKH), blastokistin iç hücre kitlesinden (İHK) köken alan hücrelerdir. Kendi kendilerini yenileyebilen hücrelerdir. Aynı zamanda, embriyonik tabakalara (endoderm, mezoderm ve ectoderm) da farklılaşabilen *pluripotent* özellikte hücrelerdir. EKH'ler ilk olarak 1981 yılında fare İHK'sinden, daha sonra da 1998 yılında insan blastosistlerinden elde edilmiştir. EKH'lerin pluripotentlik özelliği transkripsiyon faktörleri tarafından sağlanmaktadır. Transkripsiyon faktörleri ihtiyaca göre; uygun hücrede, uygun zamanda ve uygun miktarda gen ifadesinin düzenlenmesinde görev almaktadırlar bu transkripsiyon faktörleri hücre farklılaşmasında da görevlidirler. İnsan EKH'leri pluripotent ve farklılaşmamış hücrelerin belirteçleri olan genleri eksprese ederler [42, 44].

2.5.4. Embriyonik Kök Hücre Kaynakları

Embriyonik Kök hücreler üç farklı kaynaktan elde edilmektedir.

- I. Tüp bebek merkezlerinde in vitro fertilizasyon sonrası kullanılmayan embriyolardan elde edilen kök hücreler: Bu hücrelere gerçek embriyonik kök hücre veya fertil embriyonik kök hücre denir.
- II. Somatik nükleer transfer yöntemiyle elde edilen kök hücreler: Bu yöntemle oosit hücre nükleusu ince bir iğne yardımı ile çıkartılıp, yerine somatik bir hücre nükleusu nakledilir. Yeniden programlanan oosit aktive edilip çoğalmaya bırakılır. Bu yöntemle elde edilen hücre nükleer transfer embriyonik kök hücre olarak adlandırılır.
- III. Döllenmemiş oositten parthenogenez ile elde edilen embriyonik kök hücreler: Bu hücrelere parthenogenetik embriyonik kök hücre denir [45].

2.5.6. Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri

Embriyonik kök hücreler metabolik olarak yüksek alkalen fosfataz ve telomeraz aktivitesi gösterirlerken fenotipik olarak yoğun sitoplazma içerirler. İnsanda Alkalen fosfataz aktivitesi TRA-2-49 ve TRA-2-54 antikorlarıyla belirlenirken, kemirgenlerde enzime bağlı reaksiyonla görüntülenir. Embriyonik kök hücreler yüksek alkalen fosfataz aktivitesine sahip oldukları için indüklenmiş pluripotent kök hücreler bu enzimin aktivitesi ile belirlenirler. Ancak bir hücre topluluğunun EKH olup olmadığını belirlemede bazı yüzey belirteçleri ve transkripsiyon faktörleri kullanılır [45].

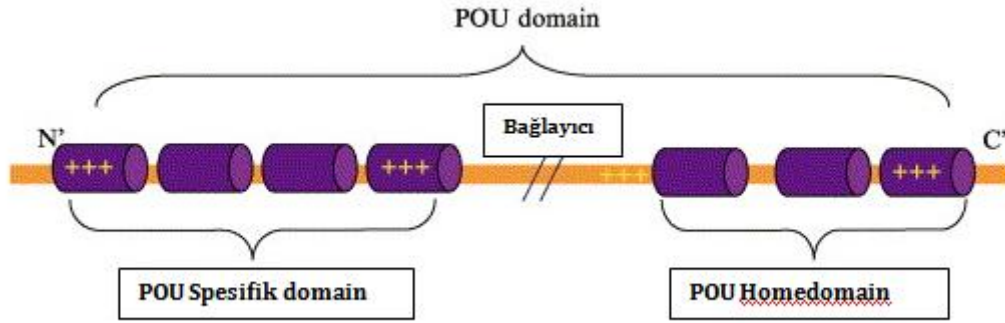
Hücre Yüzey Belirteçleri: Hücre yüzey antijenleri hücrelerin tanımlanmasında oldukça önemlidir. Erken embriyonik gelişim süresince seviye spesifik antijenler (SSA) gelişime bağlı olarak düzenlenirler. Bu sebepten yüzey belirteçleri, hem fare hem de insan EKH'lerin farklılaşmasının gösterilmesinde sıklıkla kullanılan belirteçlerdir. Padokaliksin adlı glikoprotein yapıdaki hücre yüzey antijenleri TRA-1-60 ve TRA-1-81 insan pluripotent kök hücreleri ve embriyonal karsinoma hücrelerinin yüzeyinde bulunurlar EKH'lerin tanımlanması ve izolasyonunda sıklıkla kullanılan antijenlerdir [46,47,48].

Transkripsiyon Faktörleri: Yeniden programlamadan ve pluripotensiden sorumlu transkripsiyon faktörleri OCT4, SOX2, NANOG, KLF4, C-MYC ve LIN 28 proteinleridir bunlardan OCT4, NANOG ve SOX2 fare EKH'lerinin pluripotentliğinin sağlanmasında önemli rol oynar. Bu transkripsiyon faktörlerinin ekspresyonu farklılaşmamış EKH'lerde oldukça fazladır (15). Bu genlerin susturulması sonucu pluripotensi ortadan kalkmakta ve erken embriyonik ölüm gerçekleşmektedir [44].

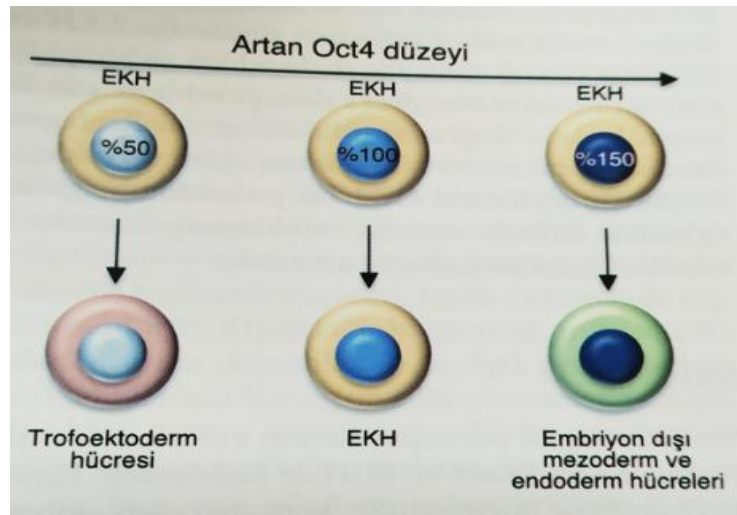
2.5.7. Oktomer Bağlayıcı Transkripsiyon Faktörü 4 (OCT4:Octamer-Binding Transcription Factor 4)

Bu transkripsiyon faktörü, OCT4, OCT3, OCT3/4, POU5f1, OTF3 veya NF-A3 olarak çeşitli şekillerde adlandırılır. OCT4, toti/pluripotensi'deki rolü nedeniyle memeli erken embriyonik gelişiminin kontrolünde kritik bir faktör olarak kabul edilir. Bu sebepten EKH tanımlanmasında en çok kullanılan belirteçlerden biridir. OCT4, tüm pluripotent hücrelerde eksprese edilen POU domaini (Pit-1, Oct-1, Oct-2, ve Unc-86) (Şekil 2.9.) içeren transkripsiyon faktörüdür ve pluripotensinin korunmasında ana rolü oynar. Fare preimplantasyonu sırasında, döllenmemiş oositlerde ve sonraki bölünme aşamasında kalıntı maternal OCT4 ifadesi gözlenmiştir. Embriyonik OCT4 ekspresyonu 4-8-hücre aşamasında başlatılır ve tüm blastomerlerin her çekirdeğinde bol miktarda eksprese edilir. Blastoskistin İHK'inde farklılaşma devam ettikçe ve ekstraembriyonik dokular oluştuğunda ekspresyonu azalır. Genin susturulması fare embriyolarında gelişimin durmasına ve yalnızca trofektodermin gelişmesine neden olmakla

birlikte aşırı ekspresyonu endoderm ve mezoderm farklılaşması ile sonuçlanır (Şekil 2.10). OCT4 ekspresyonu primordial germ hücrelerini baskılar. Erişkinlerde OCT4 ekspresyonu yalnızca germ hücrelerinde görülür. Bu hücreler dışında erişkin dokulardaki ekspresyonu tümörögenезle ilişkilendirilmiştir [50].



Şekil 2.9. POU domaini yapısı. POU spesifik domainin dört α -heliksi (silindir) vardır, bunların ikisi bazik amino asitlerin bir bölgesini (+++) içerir. POU homeodomain'in üç α helisi vardır. İki domain, aile üyeleri arasında 14 ila 25 amino asit arasında değişen bir bağlayıcı bölge ile ayrılır. [51].



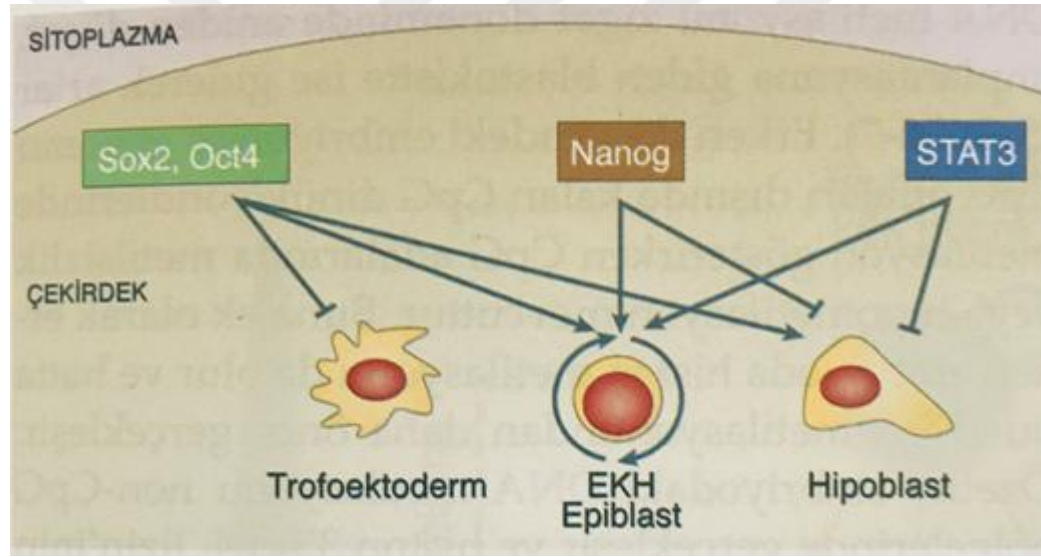
Şekil 2.10. OCT4'ün EKH'ler üzerine olan etkilerinin gösterimi [2].

2.5.8. SRY ilişkili Homebox Transkripsiyon Faktörü 2 (SOX2: SRY-box transcription factor 2)

Transkripsiyon faktörü SOX2, memeli embriyogenezindeki kritik rolleriyle tanınmaktadır. Pluripotensi ile ilişkili transkripsiyon faktörü SOX2, memeli embriyogenezinde

ve daha sonra ki yaşamda esastır. SOX2'nin her iki alelinin de ortadan kaldırılmasının, farelerde embriyonun ölmesine sebep olduğu görülmüştür. SOX2 null embriyolar blastosist aşamasına ulaşır, ancak implantasyondan sonra hayatta kalmaz. Bundan kısa bir süre sonra, fare embriyonik kök hücrelerinde SOX2'nin ekspresyonunun azalmasının kendi kendini yenilenmeyi bozduğu ve farklılaşmaya neden olduğu gösterilmiştir [52].

SOX2 ekspresyonu ilk olarak oositte görülür daha sonra 2 hücreli embriyoda morula evresine kadar artarak devam eder İHK' de ve trofektoderimde de eksprese olduğu bilinmektedir. SOX2'nin farelerdeki eksikliği hücrelerin % 95'inin insandaki eksikliği ise hücrelerin % 98'inin trofektoderm (+) hücrelere dönüşmesine yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca SOX2, OCT4 ekspresyonunuda düzenleyip Nanog da dahil olmak üzere birçok genin ekspresyonunu etkilemektedirler [43,44].



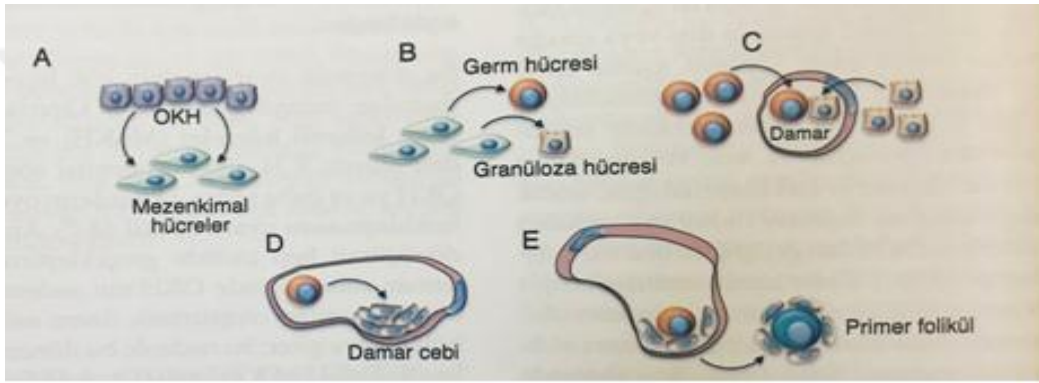
Şekil 2.11. Pluripotensi ve kendini yenilemede etkili EKB'lerinin hücrenin kaderi üzerindeki etkileri. Ucu sivri oklar indüklemeyi ucu küt oklar ise baskılamayı göstermektedir [2].

2.5.9. Ovaryum Kök Hücreleri

Dişi embriyodaki ilkel cinsiyet hücreleri, gelişmekte olan ovaryuma ulaşır ve ovaryumu çevreleyen sölom epitelinde çoğalır. Çoğalan bu hücreler ovaryum kök hücreleri (OKH) olarak kabul edilir ve OKH nişindeki bağışıklık sisteminde yer alacak hücreler ve hormonların etkisiyle ikincil germ hücreleri oogonyumların kökenini oluştururlar. OKH'ler hem oogonyumların hemde granuloza hücrelerinin oluşmasında görevli olmakla birlikte bu oluşumların gerçekleşmesi için tek başına yeterli değildir. Ovaryumun yüzeyini saran germinal epitel kübik-yassı bir hücre tabakasıdır ve fetüste OKH'lerinin bulunduğu yüzey epitelidir. Günümüzdeki çalışma

sonuçlarına göre OKH'ler yetişkin ovaryumların yanı sıra menopoz sonrası ovaryumlarda da bulunur ve in vitro koşullarda yeni oositlere farklılaşabilirler [2,53].

Bu bilgileri özetleyecek olursak; fetus döneminde hem germ hem de granüloza hücrelerinin kökeni OKH'lerdir. OKH'lerin bu dönüşümü asimetrik hücre bölünmesiyle başlar hormonların ve immün sistem kaynaklı hücrelerden alınan sinyallerin doğrultusunda gerçekleşir. Oogonyumlar mayoz bölünmeye girdikten sonra OKH'ler mezenkim benzeri hücrelere dönüşerek kalıcılaşır. İlk menstrual döngü ve bunu izleyen üreme dönemi boyunca bu hücrelerden bazıları yeniden OKH'lere dönüşerek ilksel granülaza hücrelerini oluşturur. Kümelenen granüloza hücreleri arasından damarlara geçen OKH'ler kortekse ulaşp dolaşımdaki granüloz hücreleriyle birlikte primordial folikülleri oluştururlar. (Şekil 2.12) [2,53].



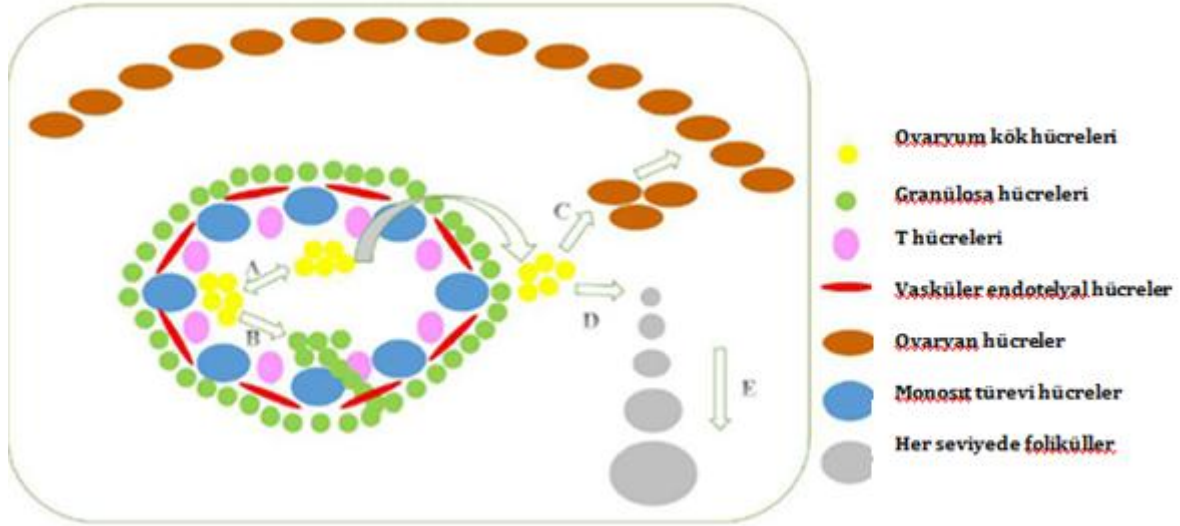
Şekil 2.12. Doğumdan itibaren yeni folikül oluşma mekanizması. (A) Doğumdan sonra OYE'deki OKH'leri mezenkimal hücrelere dönüşür. (B) menarş dönemi ile birlikte bu hücreler germ hücreleri ve granuloza hücrelerini oluşturmak üzere tekrar OKH'lerine dönüşür. (C) Bu hücreler germ ve granüloza hücrelerini oluşturmak üzere ovaryum korteksindeki damarlara giriş yaparlar. (D) damar içi derin kortekse yerleşen granüloza hücreleri damar içi ceplere yerleşir. (E) ceplere yerleşen hücreler dolaşımdaki germ hücrelerini kendine çekerek bir niş oluşturur. Sonrasında primer folikül oluşturup derin korteks stroması içinde yerlerini alırlar [2].

2.6. Ovaryum Yüzey Epiteli

Overler, intraembriyonik hücrelerden türeyen ve kuboidal düşük psödostratize sütunlu mezodermal olarak türemiş ovaryan yüzey epitelinin (OYE) beyazımsı bir tabakası ile çevrilidir. Bütünlüğü, basit desmozomlar, tamamlanmamış sıkı bağlantılar, birkaç integrin ve kaderinler tarafından korunur. Son zamanlardaki araştırmalar yumurtalık kök hücrelerinin OYE içinde bulunduğunu ve yetişkin yaşamında hem neogenez hem de over kanserinden sorumlu olabileceğini göstermektedir [54]. Yapılan çalışmalar, ovaryan yüzey epitel kök hücrelerinin neo-oogenez ya da over kanseri dönüşümü geçirme kararının mekanizmasının hem iç hem de dış faktörleri içerebileceğini düşündürmektedir [54].

2.6.1. Ovaryum Kök Hücre Yuvaları (Nişi)

Erken embriyonik dönemde oluşan ovaryum kök hücre nişi esas olarak granüllü hücrelerden meydana gelir. Damar endotel hücreleri, immünolojik hücreler ve moleküller, ovaryum reproduktif kök hücrelerini çevreler ve işlevlerini düzenler.



Şekil 2.13. Ovaryum kök hücre yuvaları

- A: Yumurtalık çekirdeği kök hücreleri kendi kendine çoğalma
B: Yumurtalık germ kök hücreleri granülosa hücrelerine farklılaşır.
C: Yumurtalık germ kök hücreleri farklılaşır. Ovülasyonda yumurtalık epitel kaybını telafi edebilen yumurtalık epitel hücreleri
D: Yumurtalık germ kök hücreleri primordial foliküllere farklılaşır.
E: Her seviyede foliküllere primordial foliküler gelişim [55].

Over germ kök hücreleri, yumurtalık korteksindeki potansiyel kök hücrelerden asimetric bölünme yoluyla üreme hücreleri ve primitif granüler hücrelere ya da oositlere farklılaşabilir veya simetric bölünme ile yeni kök hücreler üretebilir. Over germ kök hücreleri, 10-15 um arasında bir çapa sahip, ışık mikroskobu altında yuvarlak görünürler. Son derece nadirdir ve pasajlandıklarında gruplar veya kümeler olarak görülebilirler. Ek olarak, PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile belirlendiği üzere, MVH, OCT4, Nanog, Fragilis, Stella, C-kit, SOX2 ve reproduktif hücreler ile diğer birçok kök hücre belirtecini eksprese edebilirler [55].

2.6.2. Ovaryum Kök Hücre Nişlerinin Bileşimi ve Biyolojik Özellikleri

Kök hücre nişi, dokuyu çevreleyen kök hücrelerin hayatta kaldığı mikro-ortam olup, hematopoetik kök hücrelerin incelenmesi sırasında Schofield tarafından önerilen bir kavramdır. Daha sonra sindirim sistemi, sinir sistemi, saç folikülü bezleri ve cinsel bezlerde benzer niş yapıları bulundu. Kök hücre nişi, niş hücreleri, hücre dışı matris ve sitokinlerden oluşur ve vücudun erken gelişimi ve doğumdan sonra doku onarımının histogenezinde önemli bir rol oynar. Ovaryan kök hücre yuvası, esas olarak granüloza hücreleri, vasküler endotel hücrelerden oluşan ovarian kök hücre nişinin vazgeçilmez bileşenlerinden biridir. immünolojik olarak ilgili hücreler ve moleküller, yumurtalık reproduktif kök hücrelerini çevreler ve işlevlerini düzenler. Bukovsky ovarian kök hücre yuvasının erken embriyonik gelişim döneminde oluştuğunu ve nonsite spesifik ovarian Monosit türevi hücrelerin (MDC'ler), T hücrelerinin ve vasküler endotel hücrelerinden oluştuğunu gözlemlemiştir. Yumurtalık kök hücre yuvasındaki ilgili immünolojik hücreler ve moleküller, OGSC'lerin asimetric bölünmesine katılır, germ hücrelerinin üretimine katkıda bulunur ve simetric bölünme, göç, yeni granül hücrelerinin oluşumu, ayrıca fetal ve yetişkin primordial foliküllerin düzenlenmesine katkıda bulunur. Dominant foliküllerin oluşumu ve daha sonra yumurtalıkların normal işlevlerini sürdürmek de dahil olmak üzere, primordial foliküllerin seçimini ve büyümesini teşvik eder [55].

Bu tezin amacı, EKH belirteçlerinden OCT4 ve SOX2 ifadelerinin erişkin öncesi, erişkin ve yaşlı dönem sıçan ovarium dokularındaki varlığının, yerleşiminin, dağılımının ve yaşa bağımlı değişiminin belirlenmesiyle günümüzde varlığı halen tam olarak kabul edilmemiş olan OKH'ler ile ilgili tartışmalara katkı sağlamaktır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Grupların Oluşturulması

Çalışmaya erişkin öncesi (2-3 hafta), erişkin (6-8 hafta) ve yaşlı dönem (25-30 hafta) olmak üzere üç grup dahil edilmiştir. Mead yöntemine göre yapılan hesaplamada, her gruba düşen hayvan sayısı 5 olarak hesaplanmıştır. % 20 hayvan kaybı ihtimali ile her grup için minimum 6 hayvan, 3 grup için toplamda 18 adet Wistar cinsi albino dişi sıçan ile çalışma yapılmıştır. Her üç gruptaki deneklere aynı işlemler uygulanmış her iki over çıkarılmış ve çıkarılan overlerden biri flow sitometri için diğeri ise immünfloresan işaretleme için kullanılmıştır.

3.2. Sıçanların Sakrifiye Edilmesi ve Over Dokularının Çıkarılması

Sıçanlar 5 mg/kg ksilazin ve 50 mg/kg dozda ketamin kullanılarak intraperitoneal enjeksiyon yoluyla derin anestezi altına alınmıştır. Daha sonra uygun cerrahi yöntem ile batin açılmış ve over dokuları çıkarılarak stereo mikroskop altında bağ doku komponentlerinden sıyrılıp yaklaşık 1 mm³'lük parçalara küçültülmüştür. Sol overler flow Sitometrik analizlerde, sağ overler ise immünfloresan işaretlemelerde kullanılmak üzere +4°C sıcaklıkta yeni hazırlanmış % 0,6'lık glukoz içeren HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) solüsyonu (sol overler) ve paraformaldehit solüsyonuna (sağ overler) alınmıştır.

3.3. Flow Sitometri Uygulaması

3.3.1. Kullanılan malzeme ve cihazlar

- Primer antikor Anti-OCT4 antibody (Goat polyclonal to OCT4, ABCAM, ab27985)
- Primer antikor Anti-SOX2 antibody (Rabbit polyclonal to SOX2, ABCAM, ab97959)
- Sekonder antikor Donkey Anti Goat IgG H&L (Cy5 ®) preadsorbed (ABCAM, ab6566)
- Sekonder antikor Goat Anti Rabbit IgG H&L (Alexa Flour ®488) preadsorbed ABCAM, ab150077)
- Liberase™ TL Research Grade (Roche, Kat no:05401020001)
- DNase I, RNase-free (supplied with MnCl₂) (1 U/μL)
- HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)
- BSA (Bovine serum albumin) Solüsyonu; HBSS 25 ml Triton x 25 ml (% 0,1'lik Triton-X100) BSA 37,5 mg karıştırıldı. Vortekslenip 50'lik enjektör ile filtreden geçirilmiştir.

- Liberase solüsyonu; 37°C HBSS solüyonu ve liberase 1 enzimi (200 ml (mikrolitre) enzim+800 ml HBSS).
- Naylon strainer
- Flow Sitometri Cihazı (BD, FACSARIA III)
- Santrifüj Cihazı
- Su banyosu

3.3.2. Flow Sitometri İçin Solüsyon Hazırlanması ve Örneklerin Analizi

- Çıkarılan her bir over ayrı ayrı soğuk HBSS tamponu içinde, stereo mikroskop altında disekte edilmiştir.
- HBSS'nin fazlası çekilerek her bir tüpe 200 µl liberaz enzimi eklenmiştir.
- Dokular bu enzim içinde orbital çalkalayıcı inkübatörde devamlı ajite edilerek 37°C sıcaklıkta 90 dakika inkübe edilmiştir. Bu süreçte dokular 15 dakikada bir olmak üzere plastik transfer pipetiyle pipetaj yapılarak karıştırılmıştır.
- İnkübasyonun sonunda her bir örneğe birkaç dakika pipetaj işlemi yapılmıştır.
- İnkübasyon süresi dolunca örnekler soğutuculu bir santrifüjde 4°C sıcaklıkta 200 g devir hızında 5 dakika çevrilmiştir.
- Üst fazı atılarak dipteki hücre pelletinin üzerine DNase1 içeren 1 mL soğuk HBSS konulmuş ve 1000'lik mikropipet ile yumuşak hareketlerle resüspande edilmiştir.
- Örnekler 10 dk. oda sıcaklığında inkübe edilmiş ve süspansiyonlar 50 mL'lik falcon tüp üzerine yerleştirilmiş ve önceden HBSS ile ıslatılmış 70 µm gözenek çapına sahip hücre eleğinden (cell strainer) geçirilmiştir.
- Her bir örnek için altta kalan sıvı 5 dk 200g de santrifüj edilmiştir.
- Pelletler üzerine 1 ml % 1'lik BSA/HBSS eklenmiş ve 20 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda tekrar 5 dk 200g de santrifüj edilmiştir.
- Pelletler üzerine 2 cc % 1'lik BSA/HBSS ve 1µl % 0,1'lik Triton-X100 eklenmiştir.
- Her bir antikor için hücreler ikiye bölünmüş OCT4 ve SOX2 için ayrı tüplere alınmıştır.
- Primer antikorlar eklenmeden boyasız örnek ayrılmıştır.
- Her bir örnek için kalan solüsyona 5µl OCT4 ve 5µl SOX2 primer antikorlarından eklenmiş ve boyama işlemi için 20 dk buz üzerinde inkübe edilmiştir.
- İki kere HBSS solüsyonu ile yıkama yapılmıştır.

- Sekonder antikorlar 1 µl donkey anti goat ve 0,5 µl goat anti rabbit eklenmiş ve 20 dk. karanlıkta buz üzerinde inkübe edilmiştir.
- İnkübasyon sonunda HBSS ile yıkama yapılmış ve analize geçilmiştir.
- Cihaza yüklenen hücre süspansiyonunda öncelikle hücre ve debris ayrımı için önce Forward Scatter Area (FSC-A) vs Side Scatter Area (SSC-A) pilotunda analiz yapılmıştır.
- Kapı (gate) içine alınan hücreler daha kesin debris eliminasyonu için FSC-A vs FSC-W (Forward Scatter-Width) pilotunda analiz edildikten sonra takiben SSC-A vs SSC-W (Side Scatter-Width) pilotunda kapı içine toplanmıştır.
- Kapı alma işleminden sonra FITC (SOX2) ve APC (OCT4) kanalında analiz yapılmış ve SOX2 pozitif hücreler ile OCT4 pozitif hücreler ayrı ayrı sayılmıştır.
- Aynı işlemler tüm sıçanlara uygulanmıştır.



Şekil 3.1. Flow Sitometri Cihazı (BD, FACSARIA III)

3.4. İmmünflorasan İşaretleme Uygulaması

3.4.1. Kullanılan malzeme ve cihazlar

- Paraformaldehit Çözeltisi
- Sükroz
- % 0,1'lik sodyum azid
- PBS (Phosphate Buffered Saline)
- SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)
- % 0,1 Triton-X100
- 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI)
- Adheziv kaplı lam
- Konfokal Mikroskop
- Kriyostat (Leica CM1900, Avusturya, Viyana)

Kullanılan primer ve sekonder antikorlar aşağıdaki gibidir.

- Goat Anti-OCT4 primer antikor: 1/100
- Rabbit Anti-SOX2 primer antikor: 1/100
- Goat Anti-Rabbit FITC konjuge sekonder antikor: 1/500
- Donkey Ant-Goat Teksas red konjuge sekonder antikor: 1/500

3.4.2. Kesit alma

Sakrifikasyon işleminden sonra ayrılıp paraformaldehit çözeltisi içine alınan dokular bir gece buzdolabında +4°C'de bekledikten sonra, 12 saat % 20 sükröz, takiben % 3 0'luk sükröz + % 0,1'lik sodyum azid solusyonunda bekletilmişlerdir. Daha sonra over dokularından kriyostat ile (Leica CM1900, Avusturya, Viyana) 10 µm kalınlığında kesitler adeziv kaplı lamlara alınmıştır. Boyanana kadar buzdolabında -20 °C'de saklanmıştır.

3.4.3. Antikor Boyama

Her bir antikor için tekli işaretleme metodu uygulanmıştır. İmmüno floresan işaretleme protokolünde aşağıdaki basamaklar takip edilmiştir.

- Her gruba ait over dokusu kesitleri 0,1M PBS ile 3 kez 5'er dakika (3x5) yıkanmıştır.
- PBS içinde hazırlanmış % 1'lik SDS solüsyonunda 5 dakika oda sıcaklığında antijen retrieval sağlanmıştır.
- Kesitler 0,1M PBS ile 3 kez 5'er dakika (3x5) yıkanmıştır.
- % 0,1 Triton-X100 ve % 1,5 normal serum içeren PBS solüsyonunda 90 dakika bloklama yapılmıştır.
- Primer antikorun bloklama solüsyonu içerisinde uygun dilüsyonu sağlanmış (1:100) ve +4°C'de (buzdolabında) gece boyu inkübasyona bırakılmıştır.
- Kesitler 0,1M PBS ile 3 kez 5'er dakika (3x5) yıkanmıştır.
- Uygun floresan konjuge sekonder antikorun bloklama solüsyonu içerisinde optimum dilüsyonuyla oda sıcaklığında en az 90 dakika inkübasyona bırakılmıştır.
- Kesitler oda sıcaklığında ve karanlık ortamda 0,1M PBS ile 3 kez 5'er dakika (3x5) yıkanmıştır.
- DAPI içeren kapatma medyumunu ile dikkatlice lam üzerine yapıştırılmış (mounting) ve hızlıca lamel ile kapatılmıştır.
- Lamelin sabitlenmesi için kenarları oje ile yapıştırılmıştır.

Çalışmamızda kantitatif ve semi-kantitatif analizler için kullandığımız kesitler dokunun başlangıç, orta ve son kısımlarını içerecek şekilde ve her bölgeden üçer tane olmak üzere alınmıştır. Flow sitometri analizinde pozitif çıkan hücrelerin reaksiyon şiddetlerinin belirlenmesi için pozitif hücrelerin skorlaması yapılmıştır. OCT4 ve SOX2 faktörlerinin semi-

kantitatif analizi için over korteksinden 10 farklı alandan 40X objektif ile fotoğraflar çekilmiştir. Skorlama bu fotoğraflar üzerinden aşağıdaki tabloda belirtildiği şekilde yapılmıştır:

Tablo 3.1. Işıma kuvvetlerine göre skarlama değerleri.

+	İşaretlenme alanın % 25'inden az
++	İşaretlenme alanın % 25-50'sini kapsıyor
+++	İşaretlenme alanın % 50'sinden fazla

3.5. İstatistik Analiz Yöntemi

Verilerin istatistiksel analizi STATISTICA 13.3 programı ile yapılmıştır. SOX2 ve OCT4 ölçümlerine ait değerler ortalama, standart sapma, medyan, minimum, maksimum, 1.ve 3. Çeyreklik değerleri ile özetlenmiştir. Normal dağılım kontrolü Shapiro Wilk testi ile yapılmıştır. OCT4 normal dağılım göstermiştir. Bu sebeple ortalamalar arası farklılıklar parametrik olan yöntemlerden Tek yönlü Varyans Analizi (ANOVA) ile araştırılmıştır. Gruplar arası varyansların homojenlik kontrolü Levene istatistiği ile kontrol edilmiştir. Varyanslar homojen dağılmadığından Welch istatistiğine ait p değeri kullanılmıştır. OCT4 ortalamaları için hata-çubuk (Error-Bar) grafiği kullanılmıştır. SOX2 normal dağılıma uygunluk göstermiştir. Bu sebeple medyanlar arası farklılıklar parametrik olmayan yöntemlerden Kruskal Wallis testi ile araştırılmıştır. En az bir grup arasında farklılık gözlemlenmiş olup ikili karşılaştırmalar Dunn-Bonferroni testi ile yapılmıştır. SOX2 medyanları için Kutu-Bıyık (Box-Wisher) grafiği kullanılmıştır. Tüm karşılaştırmalar için istatistik anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak alınmıştır.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Flow Sitometri Bulguları

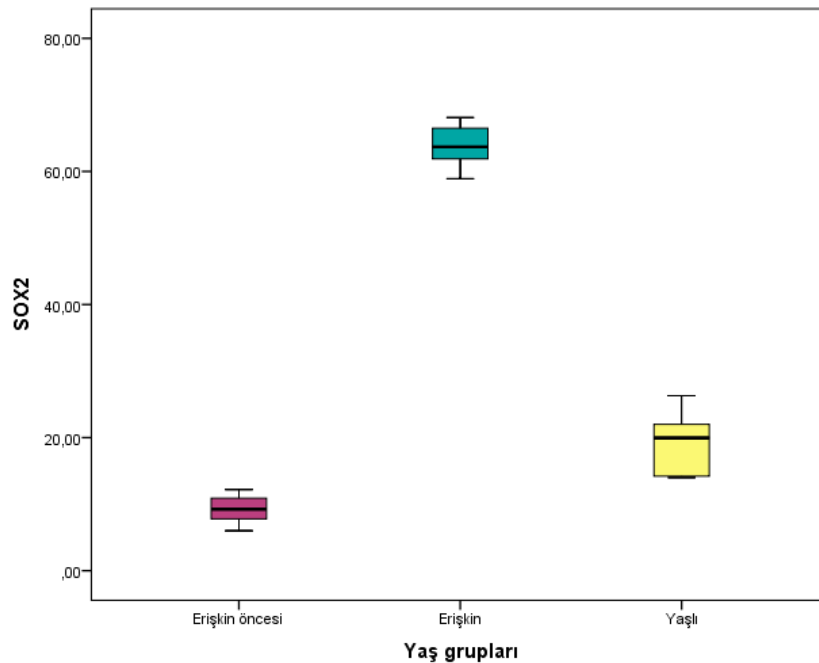
4.1.1. SOX2 İfade Eden Hücrelerin Bulguları

Kruskall Wallis testine göre gruplarda SOX2 (+) hücrelerin yüzdelere ait medyanlar arasında anlamlı farklılık olduğu gözlenmiştir ($p < 0,05$). Buna göre;

- Erişkin öncesi sıçanların SOX2 (+) hücrelerinin yüzdelere ait medyan (% 9,25) ile erişkin sıçanların SOX2 (+) hücrelerinin medyanı (% 65,10) arasındaki farkın anlamlı olduğu gözlenmiştir ($p < 0,0001$). Erişkin sıçanların SOX2 (+) hücrelerinin oranının tüm gruplar arasında en yüksek olduğu gözlenmiştir.
- Erişkin öncesi sıçanların SOX2 (+) hücrelerinin yüzdelere ait medyan ile yaşlı sıçanların medyanı arasındaki farkın anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p = 0,155$).
- Erişkin sıçanların SOX2 (+) hücrelerinin medyanı ile yaşlı sıçanların medyanı arasındaki farkın anlamlı olmadığı gözlenmiştir ($p = 0,155$).

Tablo 4.1. SOX2(+) hücrelerin oranlarının yaş gruplarına göre dağılımı.

SOX2								
Gruplar	Ortalama	Standart sapma	Medyan	Min	Max	Q1	Q3	p
Erişkin öncesi Dönem	9,2333	2,31229	9,25	6,0	12,20	7,35	11,225	0,001
Erişkin Dönem	66,4167	7,15106	65,1	58,9	79,40	61,15	70,925	
Yaşlı Dönem	19,4000	4,81622	19,95	14,0	26,30	14,15	23,075	



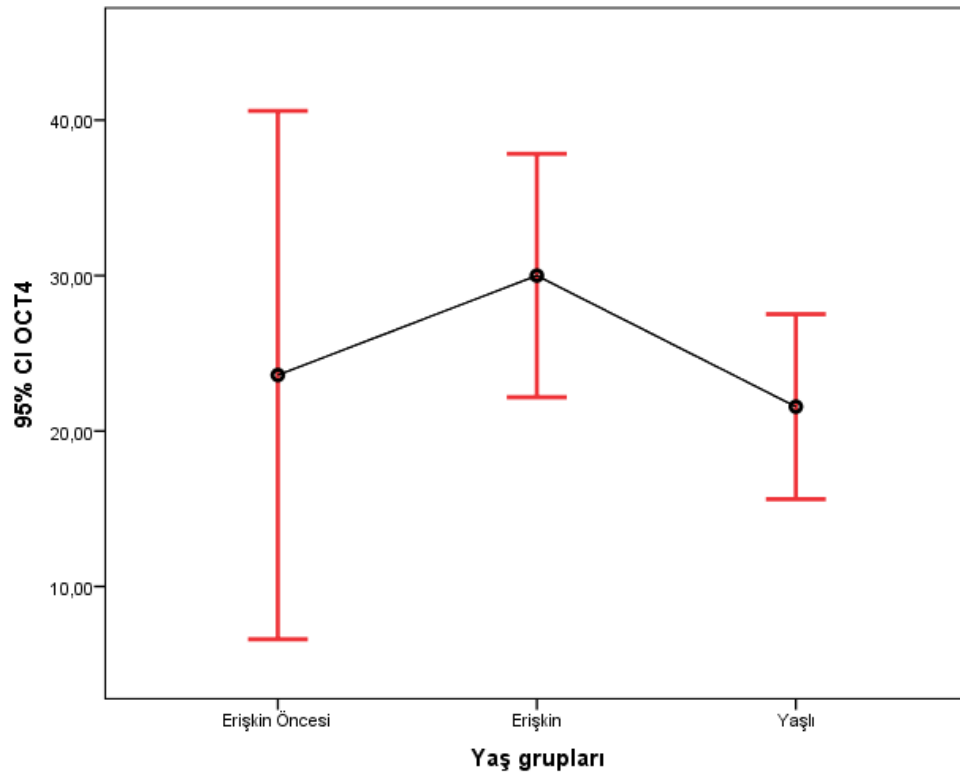
Şekil 4.1. SOX2(+) hücrelerin yaş gruplarına göre değişiminin grafiksel gösterimi.

4.1.2. OCT4 İfade Eden Hücrelerin Bulguları

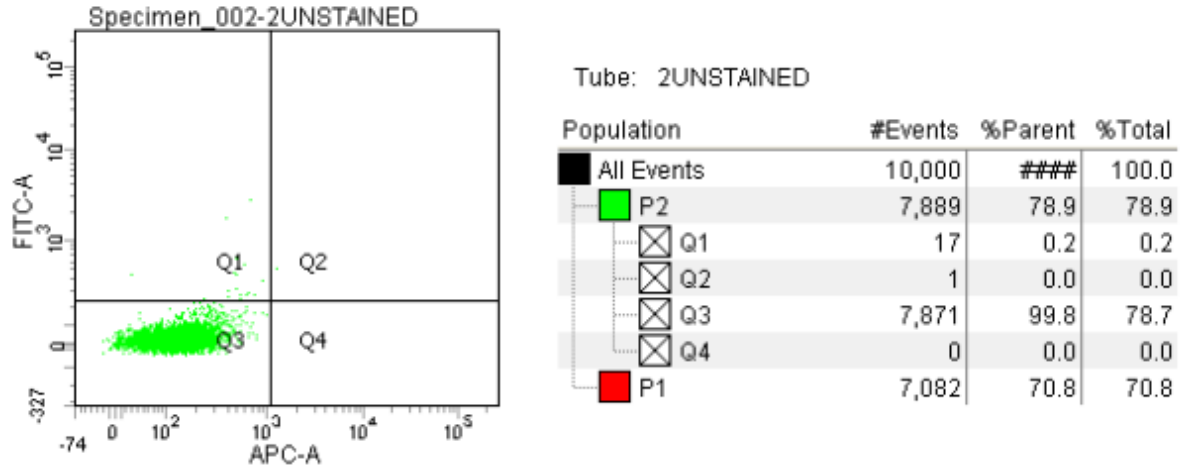
ANOVO testine göre gruplar arasında OCT4 (+) hücrelerin yüzdelere ait oranlar arasında anlamlı farklılık olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).

Tablo 4.2. OCT4 (+) hücrelerin oranlarının yaş gruplarına göre dağılımı.

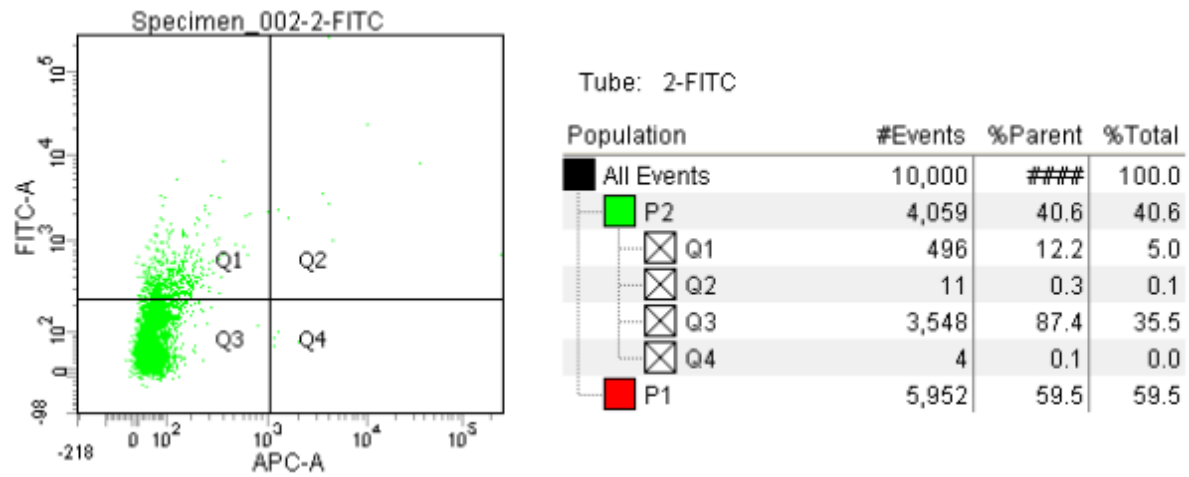
OCT4								
Gruplar	Ortalama	Standart sapma	Medyan	Min	Max	Q1	Q3	p
Erişkin öncesi Dönem	23,6	16,19716	15,7	10,3	51,0	12,4	39,6	0,158
Erişkin Dönem	30,0	7,46217	32,65	19,6	39,3	21,7	34,875	
Yaşlı Dönem	21,5667	5,6698	21,7	14,1	28,5	16,12	27,075	



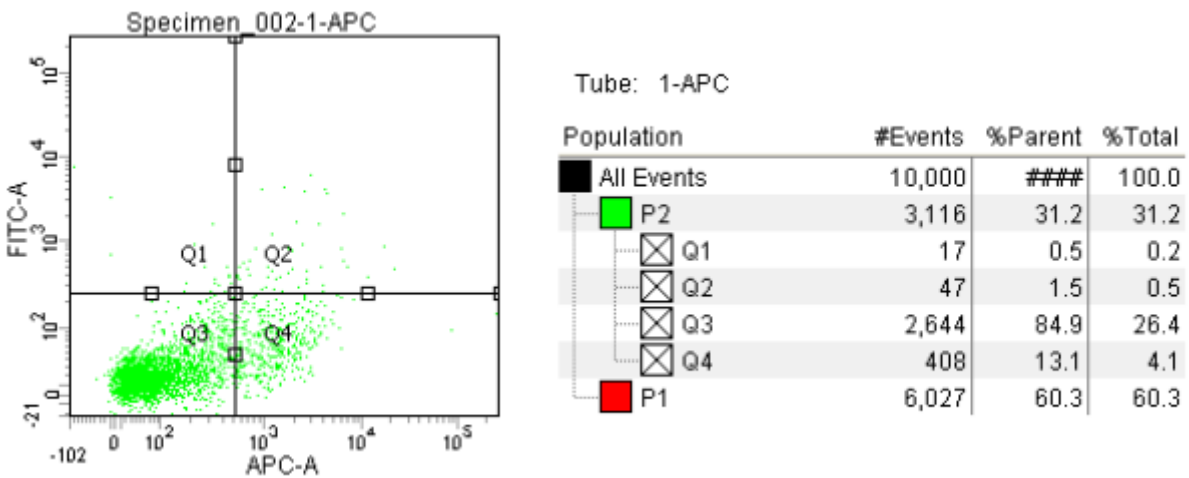
Şekil 4.2. OCT4(+) hücrelerin yaş gruplarına göre değişiminin grafiksel gösterimi.



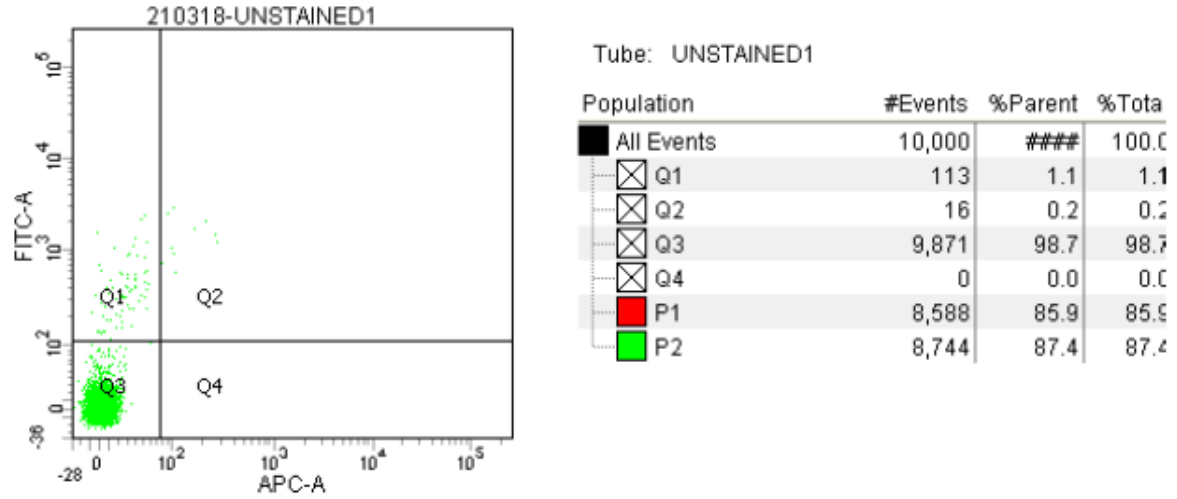
Şekil 4.3. Erişkin öncesi sıçanların boyasız örneklerinin flow sitometri analiz sonuçları (Q3 kadranda gösterilmektedir).



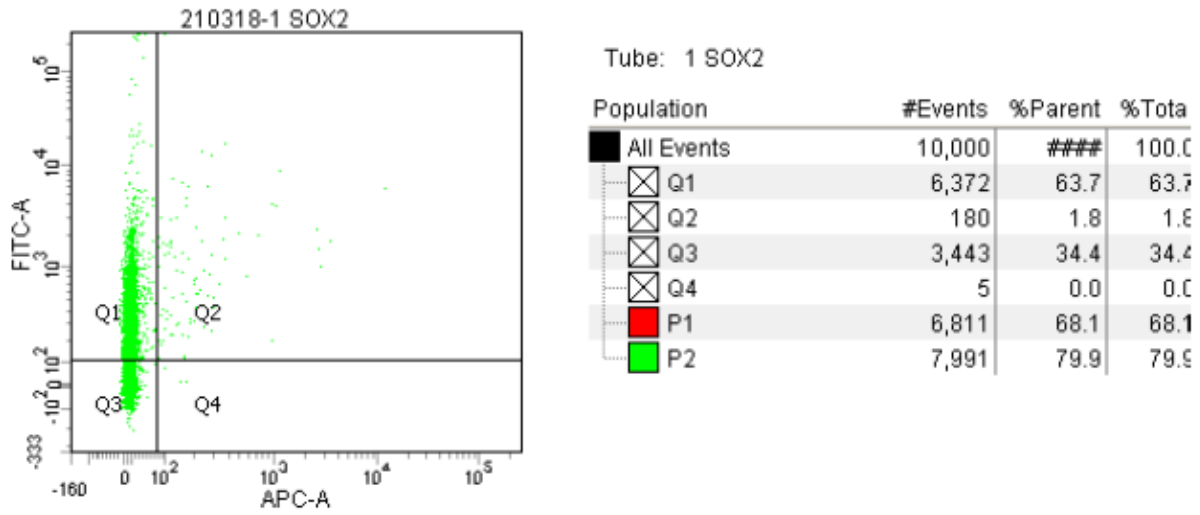
Şekil 4.4. Erişkin öncesi sıçanların SOX2 (+) (FITC) hücrelerinin flow sitometri analiz sonuçları (Q1 kadranda gösterilmektedir).



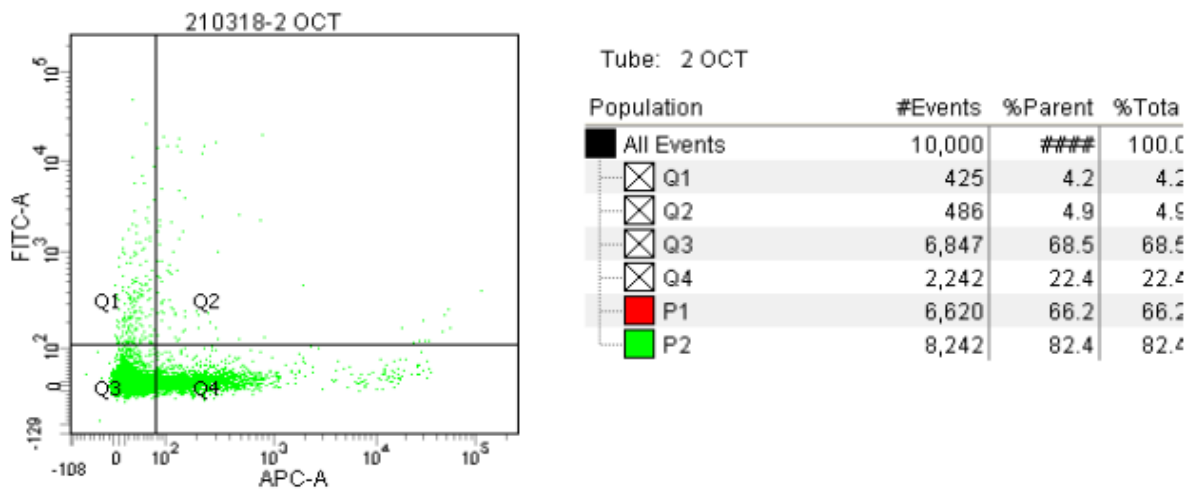
Şekil 4.5. Erişkin öncesi sıçanların OCT4 (+) (APC) hücrelerinin flow sitometri analiz sonuçları (Q4 kadranda gösterilmektedir).



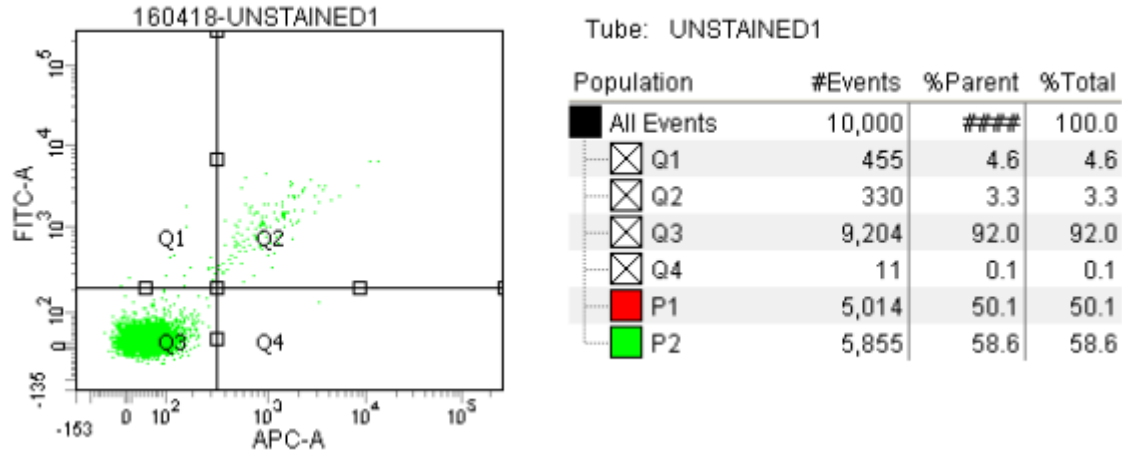
Şekil 4.6. Erişkin sıçanların boyasız örneklerinin flow sitometri analiz sonuçları (Q3 kadranda gösterilmektedir).



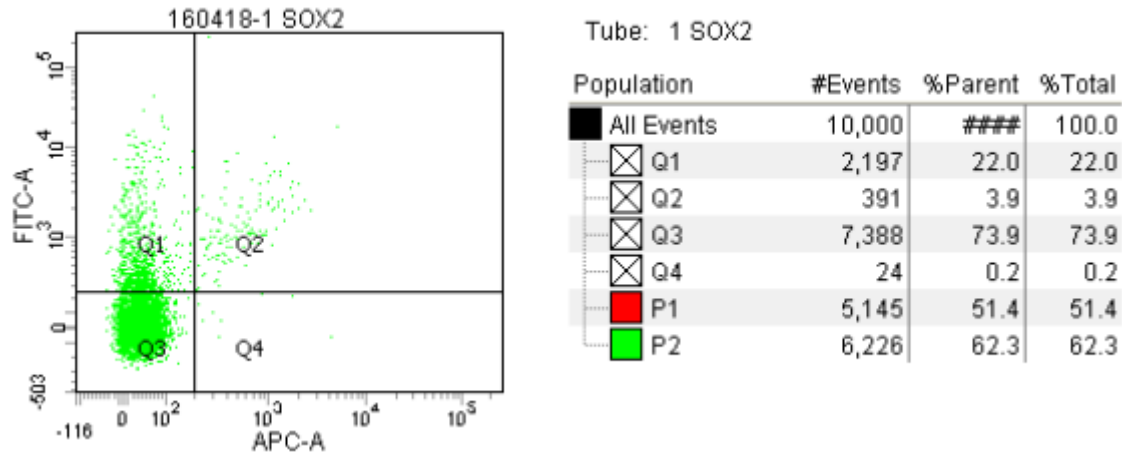
Şekil 4.7. Erişkin sıçanların SOX2 (+) hücrelerin flow sitometri analiz sonuçları (Q1 kadranda gösterilmektedir).



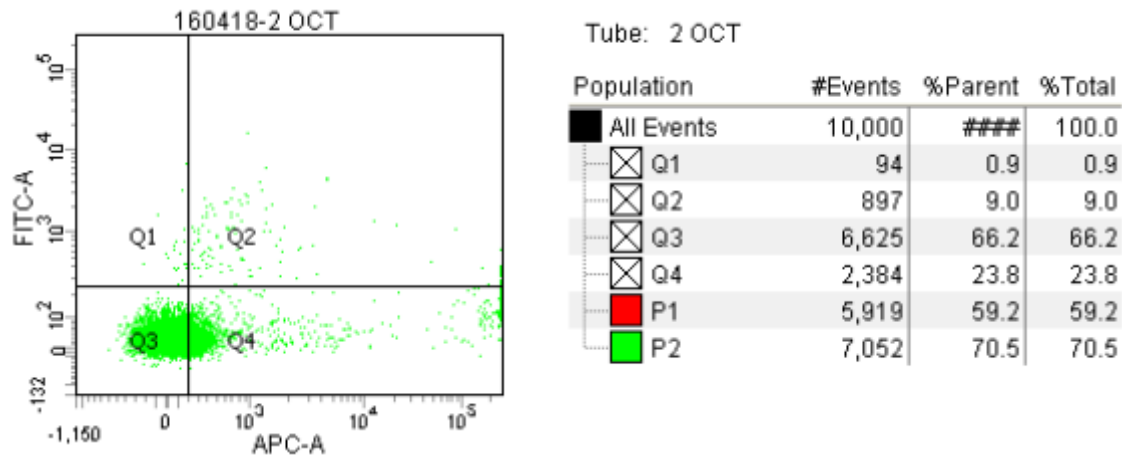
Şekil 4.8. Erişkin sıçanların OCT4 (+) hücrelerin flow sitometri analiz sonuçları (Q4 kadranda gösterilmektedir).



Şekil 4.9. Yaşlı sıçanların boyasız örneklerinin flow sitometri analiz sonuçları (Q3 kadranda gösterilmektedir).



Şekil 4.10. Yaşlı sıçanların SOX2 (+) hücrelerinin flow sitometri analiz sonuçları (Q1 kadranda gösterilmektedir).



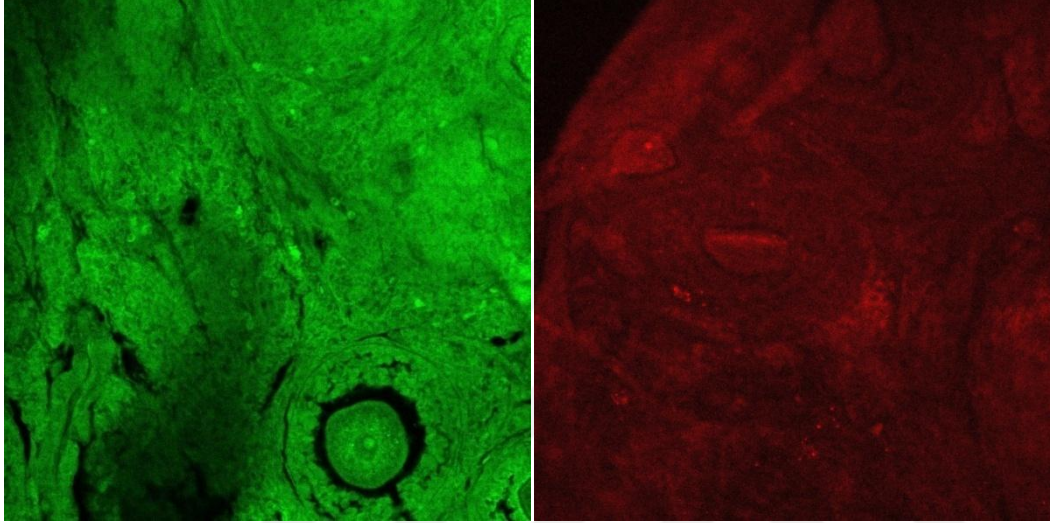
Şekil 4.11. Yaşlı sıçanların OCT4 (+) hücrelerinin flow sitometri analiz sonuçları (Q4 kadranda gösterilmektedir).

4.2. İmmünflorasan İşaretleme Bulguları

Kök hücre olduğu düşünülen, SOX2 ve OCT4 ifade eden hücrelerin yerleşim ve dağılımlarının belirlenmesi amacıyla yapılan işaretlemenin sonuçları aşağıda verilmiştir.

1. Grup Erişkin Öncesi Dönem

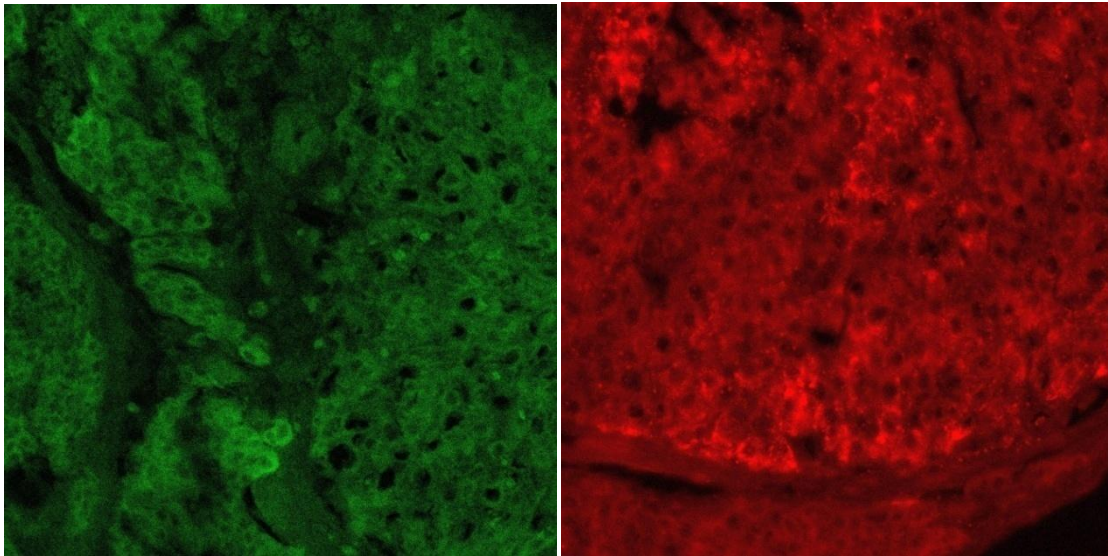
SOX2 (+) ve OCT4 (+) hücrelerin hem stromada hem de foliküler granüloza hücrelerinde lokalize olduğu görülmüştür. Ancak SOX2 (+) hücrelerin stromada daha fazla olduğu görülmüştür (şekil 4.10).



Şekil 4.12. Erişkin öncesi sıçan ovaryumlarında SOX2 (yeşil) ve OCT4 (kırmızı) eksprese eden hücrelerin yerleşiminin gösterimi.

2. Grup Erişkin Dönem

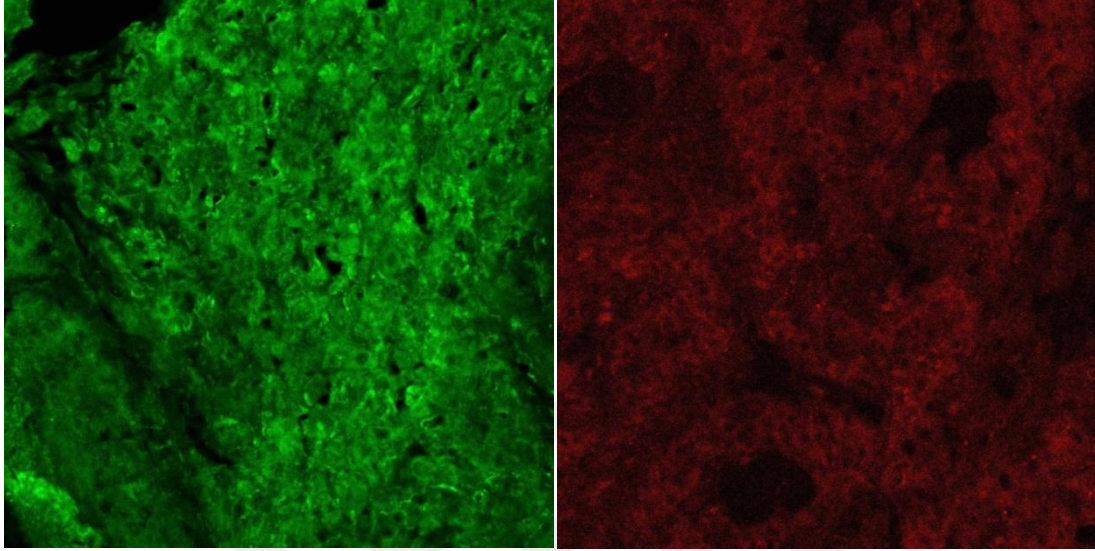
SOX2 (+) ve OCT4 (+) hücrelerin hem stromada hem de foliküler granüloza hücrelerinde eksprese olduğu görülmüştür. Ancak SOX2 (+) hücrelerin stromaya oranla foliküllerde daha çok lokalize olduğu görülmüştür (Şekil 4.11).



Şekil 4.13. Erişkin sıçan ovaryumlarında SOX2 (yeşil) ve OCT4 (kırmızı) eksprese eden hücrelerin yerleşiminin gösterimi.

3. Grup Yaşlı Dönem

SOX2 (+) ve OCT4 (+) hücrelerin foliküllerden ziyade daha çok stromada yer aldığı, SOX2 (+) hücrelerin ise foliküllerde oldukça azaldığı görülmüştür (Şekil 4.12).



Şekil 4.14. Yaşlı sıçan ovaryumlarında SOX2 (yeşil) ve OCT4(kırmızı) eksprese eden hücrelerin yerleşiminin gösterimi.

4.2.1. Skorlama Sonuçları

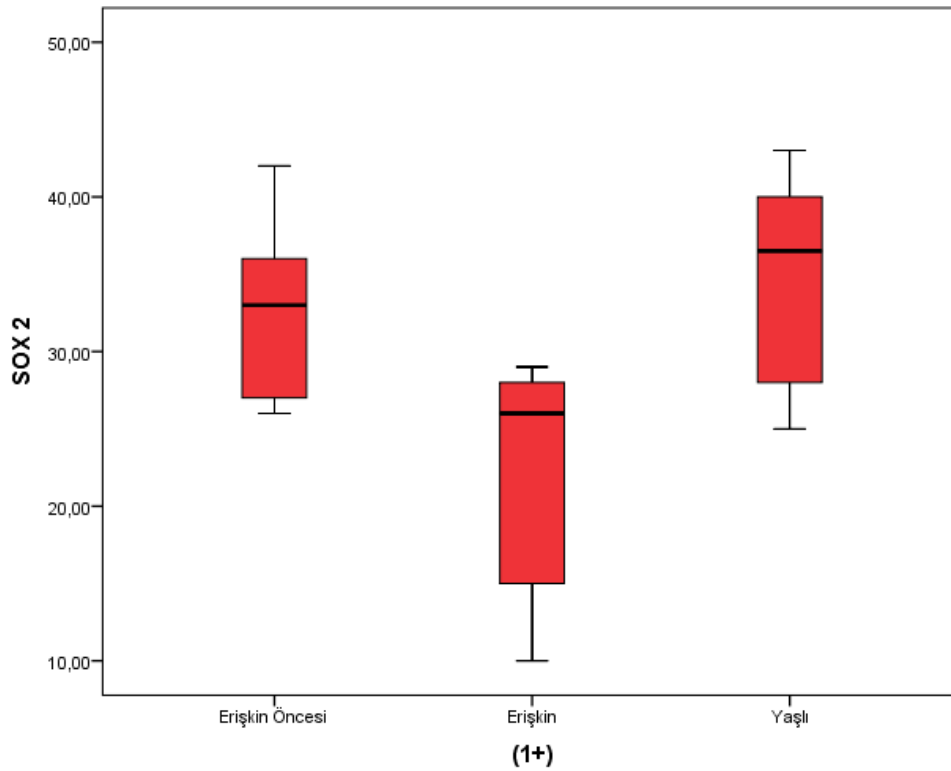
4.2.1.1. Reaksiyon Kuvvetine Göre SOX2(+) Hücrelerin Değerlendirilmesi

Reaksiyon kuvvetine göre + ve ++ ışıma verenler tüm gruplar arasında anlamlı farklılık göstermemiştir ($p>0,05$). Şekil 4.13’de + ışıma veren hücrelerin yoğunluğu gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde + ışıma verenlerin en fazla yaşlı dönemde, en az ise erişkin sıçanlarda olduğu gösterilmiştir. Yaşla birlikte SOX2 ifadesinin şiddeti azalmıştır. Şekil 4.14’de ++ ışıma veren hücrelerin yoğunluğu gösterilmiştir. Grafikte ++ ışıma verenlerin en fazla erişkin dönemde olduğu yaşlı döneme gidildikçe azaldığı gösterilmiştir.

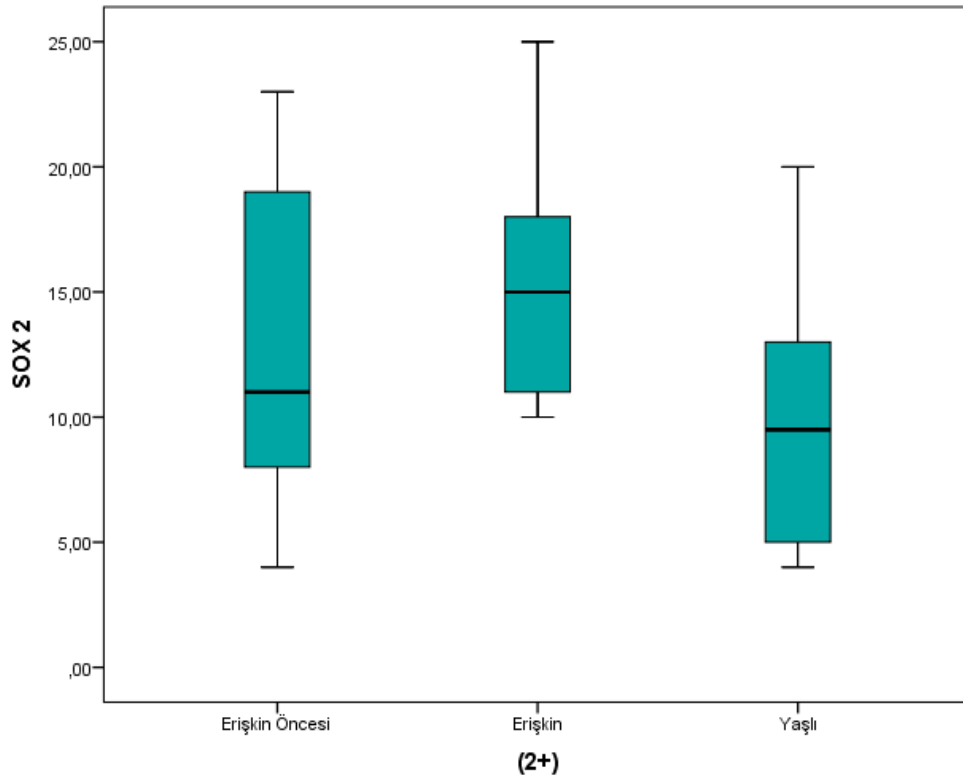
Kuvvetli ışıma verenler (+++) yaş grupları arasında anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Buna göre; Erişkin öncesi sıçanlar ile erişkin sıçanlar ($p=0,024$) ve yaşlı sıçanlar ile ($p=0,039$) erişkin sıçanların reaksiyon kuvvetleri arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür. Erişkin sıçanların (+++) ışıma veren hücrelerinin oranının her iki gruptaki sıçanlardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak erişkin öncesi sıçanlar ile yaşlı sıçanlar arasındaki farkın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0,849$). Şekil 4.15’de +++ ışıma veren hücrelerin yoğunluğu gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde en şiddetli ışıma veren hücrelerin erişkin öncesi dönemde toplandığı gösterilmiştir.

Tablo 4. 3. SOX2 (+) hücrelerin ışına kuvvetlerine göre dağılımı

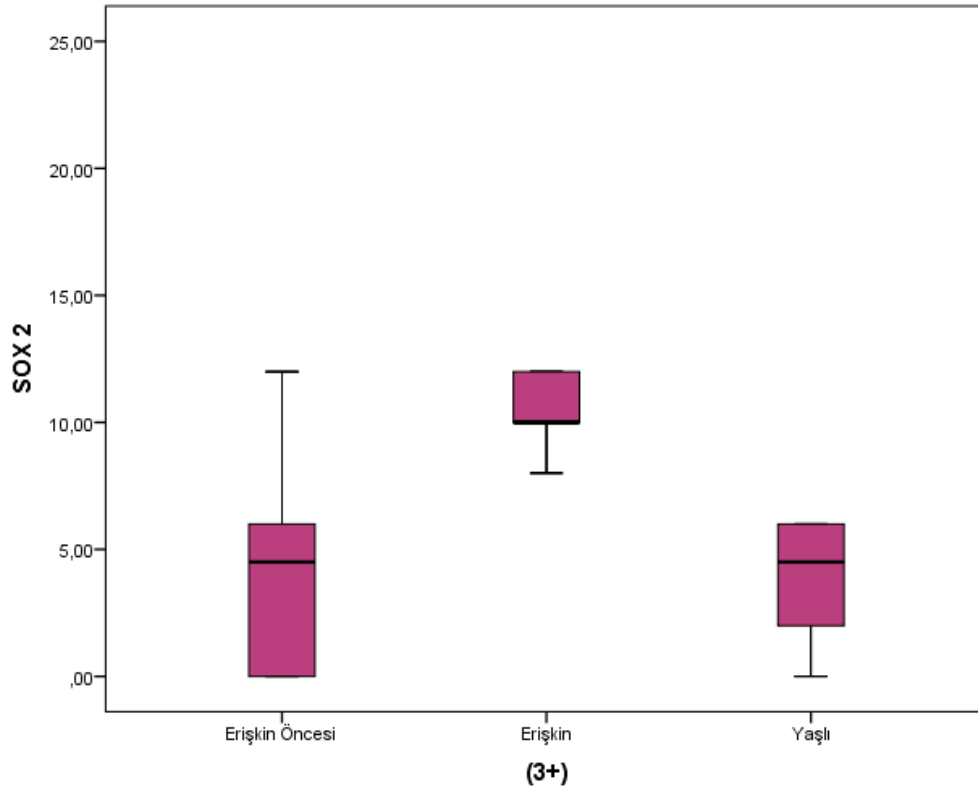
+	Yaş grupları (n=6)	Mean	Med	Std. Sap.	Q1	Q3	p
SOX2	Erişkin Öncesi	32,83	33	5,94	26,75	37,5	0,06
	Erişkin	22,33	26	7,89	13,75	28,25	
	Yaşlı	34,83	36,5	7,3	27,25	40,75	
++							
SOX2	Erişkin Öncesi	12,66	11	7,08	7,00	20	0,347
	Erişkin	15,66	15	5,42	10,75	19,75	
	Yaşlı	10,16	9,5	6,04	4,75	14,75	
+++							
SOX2	Erişkin_öncesi	4,5	4,5	4,46		7,5	0,043
	Erişkin	12	10	5,05	9,50	14,5	
	Yaşlı	5	4,5	4,47	1,50	7,75	



Şekil 4.15. SOX2 (+) Işıma Veren Hücrelerin Grafikselsel Gösterimi



Şekil 4.16. SOX2 (++) Işıma Veren Hücrelerin Grafiks gösterimi



Şekil 4.17. SOX2 (+++) Işıma Veren Hücrelerin Grafiks gösterimi

4.2.1.2. Reaksiyon Kuvvetine Göre OCT4(+) Hücrelerin Değerlendirilmesi

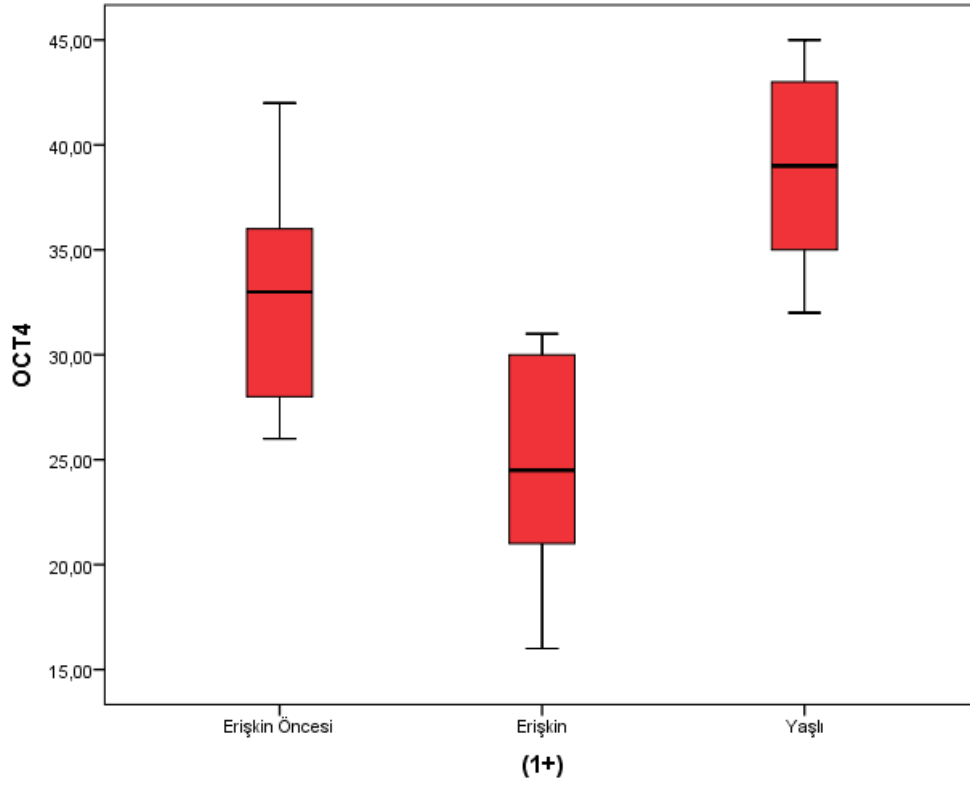
Reaksiyon kuvvetine göre + zayıf ışıma verenler; Yaş grupları arasında anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Buna göre; Sadece erişkin sıçanlar ve yaşlı sıçanlar arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,004$). Yaşlı sıçanlarda (+) ışıma veren hücrelerin sayısının daha yüksek olduğu görülmüştür. Erişkin sıçanlar ile erişkin öncesi sıçanlar ($p=0,210$) ve erişkin öncesi sıçanlar ile yaşlı sıçanlar ($p=0,479$) arasındaki farkın ise anlamlı olmadığı görülmüştür. Şekil 4.16'daki grafikte + ışıma veren hücrelerin en fazla yaşlı dönemde en az erişkin dönemde olduğu gösterilmiştir.

++ ışıma veren hücreler yaş grupları arasında anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Buna göre; Sadece erişkin sıçanlar ve yaşlı sıçanlar arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,044$). Erişkin sıçanlarda (++) ışıma veren hücrelerin oranının daha yüksek olduğu görülmüştür. Erişkin sıçanlar ile erişkin öncesi sıçanlar ($p=0,125$) ve erişkin öncesi sıçanlar ile yaşlı sıçanlar arasındaki farkın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=1,00$). Şekil 4.17'deki grafikte ++ ışıma veren hücrelerin en fazla erişkin dönemde olduğu erişkin öncesi ve yaşlı dönem arasında çok farklılık olmadığı gösterilmiştir.

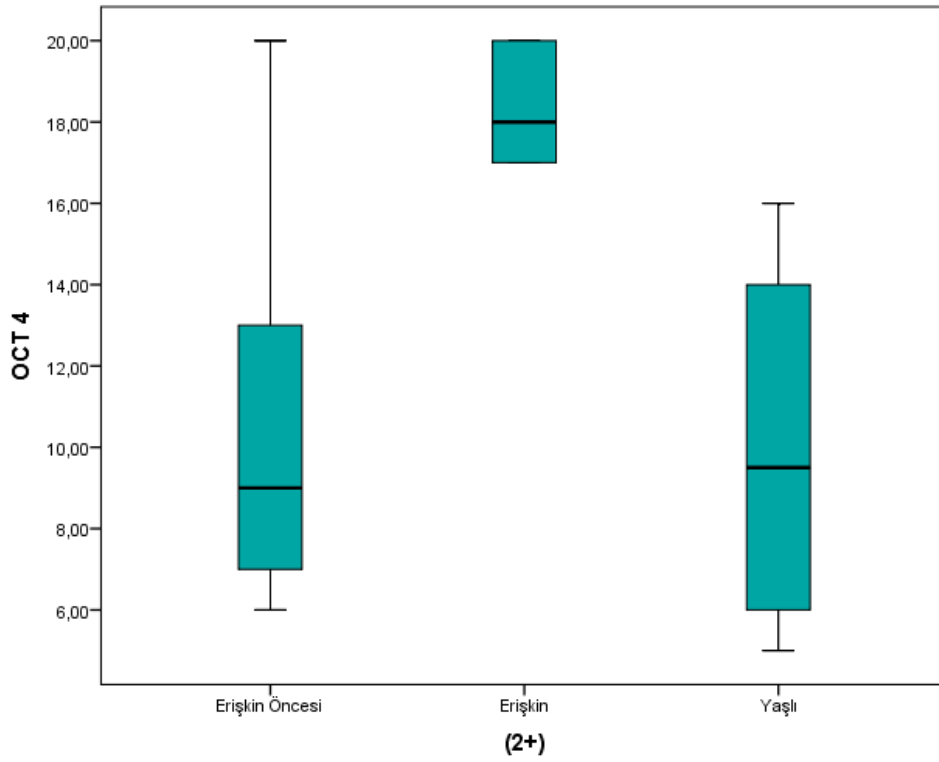
+++ kuvvetli ışıma veren hücreler yaş grupları arasında anlamlı farklılık göstermiştir ($p<0,05$). Buna göre; Erişkin sıçanlar ile yaşlı sıçanlar ($p=0,037$) ve erişkin öncesi sıçanlar ile yaşlı sıçanlar arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür ($p=0,031$). Erişkin öncesi ve erişkin sıçanların (+++) ışıma veren hücrelerinin oranının yaşlı sıçanlardan daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak erişkin sıçanlar ile erişkin öncesi sıçanlar arasındaki farkın anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=1,00$). Şekil 4.18'deki grafikte +++ ışıma veren hücrelerin en fazla erişkin dönemde bulunduğu yaşlı dönemde ise çok azaldığı gösterilmiştir. Erişkinlikten yaşlılığa geçtikçe OCT4 ifadesinin şiddetinin azaldığı görülmüştür.

Tablo 4.4. OCT4 (+) hücrelerin ışıma kuvvetlerine göre dağılımı.

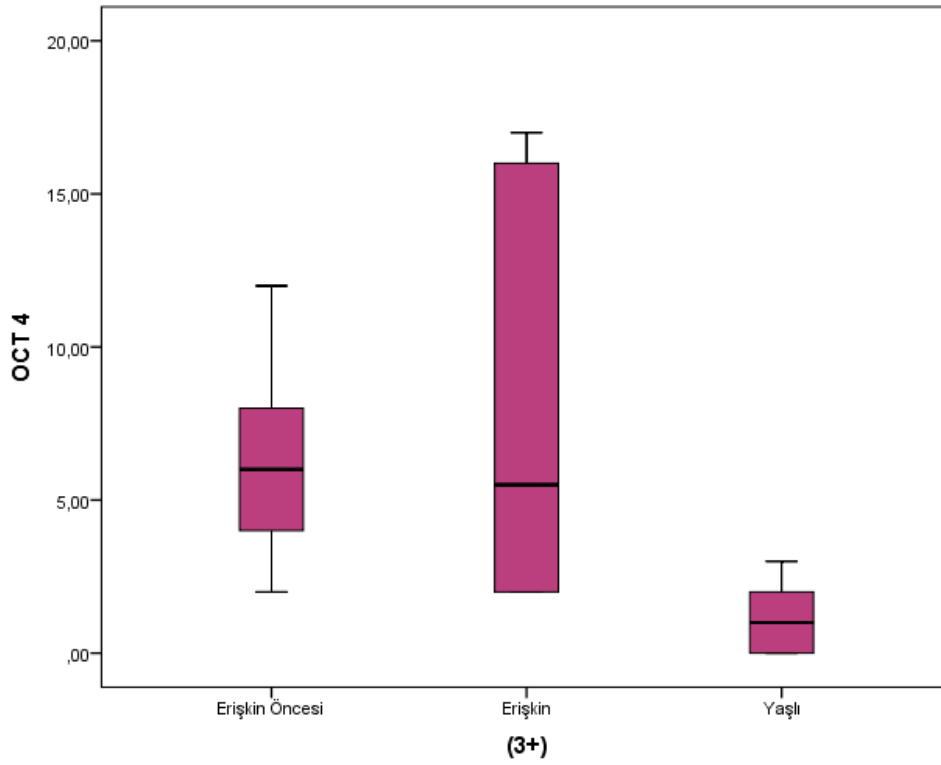
+	Yaş grupları (n=6)	Mean	Median	Std. Sap	Q1	Q3	p
OCT4	Erişkin Öncesi	33	33	5,76	27,5	37,5	0,005
	Erişkin	24,5	24,5	5,82	19,75	30,25	
	Yaşlı	38,83	39	4,99	34,25	43,5	
++							
OCT4	Erişkin Öncesi	10,66	9	5,20	6,75	14,75	0,032
	Erişkin	17,5	18	2,94	15,75	20,0	
	Yaşlı	10	9,5	4,60	5,75	14,5	
+++							
OCT4	Erişkin Öncesi	6,33	6	3,50	3,5	9,0	0,014
	Erişkin	8	5,5	6,95	2,0	16,25	
	Yaşlı	1,16	1	1,16		2,25	



Şekil 4.18. OCT4 (+) Işıma Veren Hücrelerin Grafiks gösterimi



Şekil 4.19. OCT4 (++) Işıma Veren Hücrelerin Grafiks gösterimi



Şekil 4.20. OCT4 (+++) Işıma Veren Hücrelerin Grafikselsel Gösterimi

4.3. Tartışma

Üreme biyolojisi alanı, yaklaşık on beş yıl önce Johnson [5] ve arkadaşlarının Nature dergisinde yayınladıkları, yetişkin farelerin yumurtalıklarında proliferatif GSC'lerin varlığını ortaya koyan bir çalışma ile Zuckerman [4] tarafından 1951 yılında kurulan ve uzun süredir devam eden dogmaya meydan okuyarak köklü bir değişikliğe uğramaya başladı. Zuckerman'a göre, memeli ovaryumları yenilenebilir kök hücrelere sahip değildir, bunun yerine postnatal yaşam boyunca azalarak sonlanan bir oosit rezervi içermektedirler. Yani folikül sayısı, rahim içi yaşamın 20. haftasında (yaklaşık 7 milyon) maksimum seviyeye ulaşır; Doğumda 1-2 milyona, ergenlikte ve üreme çağında 30.000-40.000'e ulaşır, menopozda 1000'den azdır [4]. Over germline kök hücrelerin varlığı, memeli olmayan türlerin yetişkin dişileri ve türlerin çoğunluğunun yetişkin erkekleri için tam olarak kabul edilmiş olmasına rağmen, yetişkin dişi memelilerde varlığı hala bir tartışma konusudur [4,5,56]. Öyleki Johnson 2004'te yayınladıkları çalışmayı 1 yıl sonra belirsiz ilan etti ve 2005'te yayınladıkları yeni bir makale ile memeli oositlerinin kemik iliğindeki varsayılan germ hücrelerinden kaynaklandığını ve periferik kanla ovaryumlara dağıldığını bildirdi. Çalışmalarında kemoterapi ile sterilize edilen ve ataksi telanjiektazi mutasyonlu farelerde kemik iliği transplantasyonu sonucu oosit üretiminin yeniden olduğunu, donör kaynaklı oositlerin varlığını göstermişlerdir [57].

Bu tartışmaların ışığında sıçan ovaryumları ile yaptığımız çalışmada, flow sitometri analizleri sonucu hem SOX2 hemde OCT4 EKB'lerini ifade eden bir hücre popülasyonu olduğu ve

bu hücrelerin farklı üreme dönemlerindeki sıçanlarda değişkenlik gösterdiği gözlenmiştir. SOX2 (+) hücrelerin gruplar arasındaki değişkenliğinin anlamlı ($p=0,001$) olduğu ancak OCT4 (+) hücrelerin değişkenliğinin anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0,158$). Buna göre; Erişkin öncesi sıçanların SOX2 (+) hücrelerinin (medyan değeri: % 9,25) erişkin sıçanların SOX2 (+) hücrelerinden anlamlı derecede düşük olduğu görülmüştür (medyan değeri: % 65,10) ($p<0,0001$). Üç grup karşılaştırıldığında en yüksek SOX2 (+) hücre oranının, erişkin dönem sıçanlarda olduğu görülmüştür. OCT4 (+) hücrelerin yüzdelерinin gruplar arasında anlamlı olarak değişmediği fakat en yüksek oranın yine erişkin dönem sıçanlarda olduğu görülmüştür. OKH'lerinin insan, koyun, marmoset maymunları, tavşan ve fare ovaryumlarında sitoplazmik OCT4'ü eksprese ettiği bildirilmektedir [58].

Silvestris ve ark. [59]. farklı antikörler kullanarak uterin fibroma, ovaryum kisti veya diğer iyi huylu patolojiler sebebiyle histerektomi geçirmiş 32 kadın hastanın ovaryum korteks dokusundan aldıkları örneklerle çalışmışlardır. Hastaların 19'u menopozal (yaş ort. 56) 13'ü ise henüz menopoza girmemiş (yaş ort. 45) olan kadınlardan seçilmişti. Menopozda olmayan kadınların Fragilis ve SSEA-4 (seviye spesifik embriyonik antijen-4) pozitif hücrelerinin % 65'e varan değerleri olduğunu menopozda olan kadınlarda sayının düşmesine rağmen ortalama % <48'lerde olduğu ve rezervin çoğunluğunun korunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçları, çalışmamızdaki erişkin dönem sıçanların SOX2 (+) hücrelerinin oranına (65,10) yakın olması dikkat çekicidir.

Bukovsky [32] ve ekibi 2005 yılında yayınladıkları çalışmalarında, oositlerin ve granülosa hücrelerinin yetişkin insan ovaryumlarından elde edilen kültürlerden farklılaşabileceklerini göstermişlerdir. Over yüzey epitelinden elde ettikleri hücreleri fenol kırmızısı (PhR) gibi östrojenik uyarıcıların oldukları ortamlarda 5-6 gün boyunca büyütmüş PhR varlığında kültürü yapılan hücrelerin doğrudan oosit fenotipinin büyük (180 mikron) hücrelerine farklılaştıklarını PhR'siz ortamda kültürü yapılan hücrelerin OYE hücrelerinin ise granülosa fenotipinin küçük (15 mikron) hücrelerine, epitel, nöral ve mezenkimal tip hücrelere farklılaştıklarını belirtmişlerdir. Bu hücreler ikincil oosit özellikleri olan germinal vezikül yıkımı, polar gövde ve zona pellucida proteinlerinin yüzey ifadesini sergilemişlerdir.

Virant Klunt [60] ve ark.'nın 2008 yılında yaptıkları çalışmada doğal olarak oosit ve folikül üretmeyen kadınlarda varsayılan OKH'leri izole etiklerini öne sürmüşlerdir. Çalışmalarında 20 postmenopozal ve 5 preovaryan yetmezliği olan kadın kullanmışlardır. OYE kazıma ile elde ettikleri materyalden, kabarcık benzeri bir yapıya sahip çapı 2 ila 4 mm arasında olan küçük yuvarlak hücreler izole etmişlerdir. Bu hücrelerin SSEA-4, OCT4, NANOG, SOX2 VE C-KIT transkripsiyon faktörleri gibi erken embriyonik gelişim belirteçlerini ifade ettiklerini belirlemişlerdir. Ayrıca bu hücrelerin belirgin C-KIT immünohistokimyasal boyama gösterdiklerini belirtmişlerdir. Bukovsky ve ekibinin çalışması, postmenopozal ve preovaryan

yetmezliği olan kadın ovaryum dokusunda OCT4 ve SOX2 ifade eden hücrelerin varlığını göstermesi açısından bizim çalışmamızla uyumludur. Kullandığımız yaşlı dönem sıçanlarda bu belirteçlerin ifadesinin olduğunu göstermiş bulunmaktayız.

Bu çalışmanın ardından 2009 [61] yılında doğal oositleri olmayan 21 postmenopozal kadında in vitro oogenezi ve muhtemel partenogenetik embriyo oluşumunu takip etmek ve OYE kazıntılarından varsayılan kök hücreleri izole etmek için bu hücrelerden hücre kültürü oluşturmuşlardır. Kazınan materyalden çapı 2 ila 4 µm arasında olan küçük yuvarlak hücreler izole etmişler ve bu hücrelerin SSEA-4 yüzey antijeni, OCT4, NANOG, SOX2 ve C-KIT transkripsiyon faktörleri gibi erken embriyonik gelişim belirteçlerini ifade ettiklerini belirlemişlerdir. Daha sonra bu hücreleri in vitro olarak büyütmüş ve embriyoid vücut benzeri yapılar oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. Telomeraz aktivitesi gibi pluripotent belirteçlerin in vitro kültürde azaldığını bazı hücrelerin 5-7 günlük kültürden sonra yaklaşık 20 µm çapa ulaştıklarını 20 günlük kültürden sonra ise OCT4, C-KIT, VASA ve ZP2 transkripsiyon faktörlerini ifade ettiklerini belirtmişlerdir. Aynı zamanda partenogenetik blastosist benzeri yapılar oluşturduklarını ve bu yapıların OCT4, SOX2 ve NANOG genlerini ifade ettiklerini ve X, Y, 13, 16, 18, 21 ve 22. kromozomlar için normal olduklarını rapor etmişlerdir.

2011 [62] yılında yaptıkları çalışmada ise kazıdıkları dokuda SOX2 eksprese eden küçük hücreleri, az da olsa ovaryum nişi sağlamak için folikül sıvısı içeren ortamda kültüre etmişlerdir. Alkalın fosfataz üzerine pozitif boyanmış ilkel oosit benzeri hücreler ve tipik yuvarlak şekilli hücre kümeleri SOX2 ve SSEA-4 gibi pluripotensi belirteçlerini ifade etmişlerdir. Tek oosit benzeri hücreler, pluripotent kök hücreler için karakteristik olan OCT4, SOX2, NANOG, STELLA, CD9, LIN28, KLF4, GDF3 ve MYC genlerini ifade etmişlerdir. Bu bulgular Menopoz sonrası kadınlarda ve doğal olarak oosit ve folikül üretmeyen kadınların Ovaryumlarında OYE'de nadir görülen kök hücrelerin ilk bulgularıdır [60,61,62].

Bukovsky ve Virant'ın yaptıkları bu çalışmalar postmenopozal ve preovaryan yetmezliği olan kadın ovaryum dokusunda OCT4 ve SOX2 ifade eden hücrelerin varlığını göstermesi açısından bizim çalışmamızla uyumludur. Bizde çalışmamızda kullandığımız yaşlı dönem sıçanlarda bu belirteçlerin ifadesinin olduğunu göstermiş bulunmaktayız.

Bu çalışmalar üzerine Parte [63] ve ark. (2011)'da kazınmış OYE'de değişken büyüklükte iki farklı varsayılan kök hücre popülasyonu (PSC) tespit ettiler. Bunlardan biri, OYE çevresindeki kırmızı kan hücrelerine göre daha küçük ve 1-3 µm boyutlarında çok küçük embriyonik benzeri kök hücrelerdi ve nükleer OCT4 ile SSEA-4 ifadeleri kuvvetliydi. Oysa daha büyük olan 4 -7 µm boyutundaki hücreler sitoplazmik OCT4 ve SSEA-4'ü minimal düzeyde ifade ediyorlardı Parte bu hücrelerin dokuya bağlı progenitör kök hücreler olduğunu belirtmiştir. Bu çalışmalarla insan ve koyun OYE'sinde OCT4, OCT4A, NANOG, SOX2, TERT ve STAT-3'ün ifadelerinin olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlar bizimde çalışmamızda kullandığımız pluripotent kök hücreler için

karakteristik olan OCT4 ve SOX2 belirteçlerinin ifadesinin over dokusunda olduğunu doğrulamaktadır.

Ancak Jia Li [64] ve ark. (2015) yaptıkları çalışma sonuçları bizim sonuçlarımız ile uyuşmamaktadır. Çalışmalarında 7 günlük, 2 aylık ve 20 aylık (denek sayısı belirtilmemiş) farelerinin over kortekslerinde MVH/OCT4 ifadesini Western Blot, RT-PCR ve İmmünohistokimya yöntemlerini kullanarak belirlemeye çalışmışlar ve bu genlerin ifadelerinin, fareler yenidoğandan yaşlılığa geçtikçe önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir ($p < 0.001$). Oysaki bizim çalışmamızda erişkin sıçanların OCT4 ifadesinin, erişkin öncesi sıçanların OCT4 ifadesinden yüksek olduğu görülmüştür. Ancak yinede en düşük oran yaşlı dönem sıçanlarda görülmüştür. Fakat bu farklılığın sebebinin metodoloji ve kullanılan denek sayısındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceği görüşündeyiz.

Tüm gruplar incelendiğinde, SOX2 ifadesinin erişkin öncesi dönemde en düşük, OCT4 ifadesinin ise yaşlı dönemde en düşük görülmesi bize gonodotropinlerin kök hücre havuzuna etkisinin olabileceğini düşündürmüştür.

Overlerdeki OCT4 (+) hücreler bir gonodotropin olan FSH (folikül uyarıcı hormon) tarafından düzenlenir [65] OCT4 düşük seviyelerde ise pluripotentlik kaybolur. Gastrulasyon sonrası farklılaşmış hücrelerde bulunmaz [66]. Patel ve ark. koyun OKH'lerinin FSHR (Folikül uyarıcı hormon reseptörü) ifade ettiğini oysa epitelyum hücrelerinin belirgin şekilde negatif olduğunu göstermişlerdir [58,65]. Kök hücreler, FSH tedavisine cevap olarak aktive edilir ve ayrıca mayoza uğrar. Bu sonuçlar, insan ve marmoset kortikal dokusunun FSH varlığında ve yokluğunda kültürlerinin yapıldığı in-vitro çalışmalar ile desteklenmiştir [63].

Bhartiya [65] ve ekibi fare ovaryumları ile yapmış oldukları flow sitometri analizi sonucu iki farklı boyutta hücre popülasyonu tespit etmişlerdir. Bunlardan ilki olan VSEL hücrelerin 3–5 μm boyutunda olduğu ve nükleer OCT4'ü ifade ettiği belirtilirken, OKH'lerin 8 μm 'den fazla olduğu ve sitoplazmik OCT4'ü ifade ettiğini göstermişlerdir. VSEL hücreler ve OKH'ler, boyutlarında ve OCT4 ifadelerinde birbirlerinden farklılık gösterir. VSEL'ler, nükleer OCT4 dahil pluripotent belirteçleri ifade ederken, OKH'ler, farklı bir durumu düşündüren sitoplazmik OCT4'ü ifade eder.

Paccihiarotti [67] ve ekibi 2010 yılında yaptıkları çalışmalarında 2 günlük, 5 günlük ve 1 yetişkin fare kullanmışlardır. Yaptıkları analiz sonucunda overlerin yüzey epitelinde bulunan ortalama 10–15 μm çapında ve foliküler bölünmenin ortasında bulunan ortalama 50–60 μm çapında oositleri temsil eden küçük bir hücre grubunun olduğunu belirlemişlerdir. İmmünohistokimyasal işaretmede ise fare overinin yüzey epitelinde GFP-OCT4 pozitif hücreler olduğunu doğrulamışlar bu hücrelerin ayrıca germ hücre belirteçleri VASA ve C-KİT ile pluripotent hücre belirteci SSEA-1 için pozitif olduklarını belirtmişlerdir. Flow sitometri analizi sonucunda ise GFP-OCT4 pozitif hücrelerin yüzdesinin yaşla birlikte önemli ölçüde azaldığını

belirlemişlerdir. Yenidoğan farelerin overlerinde % 1-2 GFP pozitif hücreler bulunurken, yetişkin overde sadece % 0.05 oranında bulunduğunu belirtmişlerdir. GFP-OCT4 pozitif hücrelerin ise % 60'ının C-KİT negatif, % 40'ının ise C-KİT pozitif olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışma OCT4 ifadesinin pozitifliği açısından çalışmamızla uyumlu olsa da pozitiflik gösteren hücrelerin oranının çok düşük olmasıyla farklılık göstermektedir. Bu değişkenlik flow sitometri için kullanılan hücre solüsyonunun hazırlanması aşamasındaki farklılıklardan kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca bu çalışmada kullanılan denek sayısı bizim sayımızın oldukça altındadır.

Imudia [68] ve ark. (2013), yabanıl tip C57BL/6 fareler kullanarak yetişkin fare (8 hafta) overlerinden türetilmiş OKH'lerini, Ddx4'ün C-terminalinin hücre-yüzeyi ekspresyonuna dayanan FACS ile saflaştırmış ve genç yetişkin fare overlerinde, bu hücrelerin toplam ovaryum hücre popülasyonunun % 0.014 ± % 0.002'sini ve ayırışmadan sonra sıralanan canlı hücre fraksiyonunun yaklaşık % 1.5 ± % 0.2'sini oluşturduklarını belirlemişlerdir. Bu çalışmadaki oranların bizim çalışmamızdaki varsayılan OKH oranlarından düşük olmasının sebebi ise kullanılan EKH belirteçlerinin farklı olmasından kaynaklanıyor olabilir.

Yine 2013 'de Stimpfel [69] ve ekibi tarafından yaş ortalaması 50 olan 18 kadından alınan over korteksi biyopsileri (ovaryum dışı kanser nedeniyle) ile yapılan çalışma sonuçları da overlerin pluripotent/multipotent karakterli potansiyel bir kök hücre kaynağı olduğunu göstermektedir. Çalışmada kullanılan hastaların 5'i üreme yaşamında (35-45 yaş), 7'si perimenopozda (47-50 yaş) ve 6'sı menopoz/postmenopozdaydı (52-73 yaş). Hastaların yaşlarına göre hücre kolonilerinin sayısı, boyutları ve kök hücre özelliklerinde herhangi bir farklılık gözlememişler ancak over hücre kültürünün kurulu olduğu fakat hücre kolonisi oluşturmayan 73 yaşındaki hastadan kök hücre elde edememişlerdir. Kültürleri kurulan hücrelerin pluripotensi belirteçlerini ifade eden hücre/koloni varlığını (alkalin fosfataz, yüzey antijeni SSEA-4, OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, STELLA) çeşitli yöntemlerle doğrulamışlardır. Ayrıca immünfloresan boyama sonuçlarına göre LIN28, NANOG, OCT4, SOX2, SSEA-4 ve STELLA belirteçleri pozitif sonuç vermiştir. Ancak hücre kolonileri germinal-lineage bağlı belirteç DDX4/VASA için negatifti. Flow sitometri analizi sonucunda ise, bir hücre kültüründe SSEA-4-pozitif hücrelerin en yüksek oranını % 3.4 diğer iki hücre kültüründe, SSEA-4-pozitif hücrelerin oranlarını tüm hücrelerin % 3.1'i ve % 0.8'i olarak belirlemişlerdir.

SOX2 ve OCT4 ifade eden hücrelerin yerleşimini incelemek için yaptığımız immünfloresan işaretleme sonucunda pozitif hücrelerin hem stromal hem de foliküler hücrelerde lokalize olduğu gözlenmiştir. Buna göre; SOX2 (+) hücrelerin tüm gruplarda çoğunlukla stromada olmak üzere foliküllerde de lokalize olduğu ancak yaşlı sıçanlarda foliküllerde çok azaldığı görülmüştür. OCT4 (+) hücrelerin ise tüm gruplarda hem stromada hem folikülerde lokalize olduğu ancak yaşlı sıçanlarda foliküllere oranla daha çok stromada lokalize olduğu gözlenmiştir. Pozitiflik gösteren hücrelerin reaksiyon kuvvetleri zayıftan kuvvetliye

doğru değişim göstermiştir. Buna göre; SOX2 proteini açısından kuvvetli pozitif (+++) olan hücreler tüm gruplar arasında erişkinlerde daha fazla olduğu görülmüştür (Mean değeri: 12) ($p=0,043$). OCT4 proteini açısından zayıf pozitif (+) olan hücreler en yüksek yaşlılarda (Mean değeri: 39) ($p=0,004$), kuvvetli pozitif (+++) hücrelerin ise yine en yüksek erişkinlerde olduğu görülmüştür (Mean değeri: 8) ($p=0,014$). Sabit sayıda folikül kavramını zorlayan ve yetişkin fare overlerinde kök hücre varlığını belirten Johnson bu hücrelerin ovaryum yüzey epitelinde yerleştiğini belirlemiştir [5]. Bizim bulgularımızda da yüzey epiteli ve çevresinde bu hücrelerin konumlanması literatür de desteklenmektedir. Son zamanlardaki araştırmalar OKH'nin OYE içinde bulunduğunu ve yetişkin yaşamında hem neoojenez hem de ovaryum kanserinden sorumlu olabileceğini göstermektedir [54].

OCT4 ifadesi SOX2 tarafından düzenlenir. SOX2, EKH'lerin pluripotensi özelliğinin korunması için vazgeçilmezdir. Blastokist gibi erken safhalarda germ hücrelerinde ifade edilir. Farelerdeki eksikliği hücrelerin % 95'inin insandaki eksikliği ise % 98,5'inin trofoektoderm (+) hücrelere değişmelerine yol açar. Ayrıca kök hücre havuzunun yenilenmesinde SOX2 ifadesi mutlaka gereklidir [66].

Yaşlı dönem sıçanlarda kök hücre belirteçlerinin ekspresyonunun erişkin döneme göre daha düşük çıkması immün sistemle ilişkilendirilebilir. Yaş artışıyla birlikte immün sistemde düşüş olur. Kök hücre nişi tahrip edilir neoojenez ve folikülogenezis azalarak sonlanır. Kök hücreler oosite farklılaşmaz ve FSH varlığına rağmen menopoz gerçekleşir. (deepa2015 nikura). Bununla birlikte, son yıllarda bazı çalışmalar, yaşlanma sorununun kök hücre nişinin yaşlanmasıyla daha yakından bağlantılı olduğunu göstermektedir. Yaşlanan bireylerde, kök hücrelere rağmen, nişteki bozulma ovaryum dokusunda dengesizliklere yol açacaktır ve OKH aktivitesine rağmen ovaryum fonksiyonu sürdürülemeyecektir. Bu nedenle, ovaryum fonksiyonları, OKH varlığı ile doğrudan ilişkili değildir [55,72,73,74].

Massasa [75] ve ark. yaptıkları çalışmada, genç farelerin ovaryumlarına yaşlanan farelerin ovaryum dokusunu nakletmişler ve oluşan primordial foliküllerin GFP ekspresyonu için pozitif olduğunu gözlemlemişlerdir. Bununla birlikte, genç farelerin dokularının yaşlı fareye transplante edilmesiyle, genç farelerin ovaryum dokusunda immatür foliküllerin sayısının azaldığını görmüşlerdir. Folikül sayısında hızlı düşüş kavramı hızlanmış kayıptan ziyade azalmış oosit yenilenmesinden kaynaklanmaktadır.

Nikura [71] ve ark. (2009) yaşlı dişi fareler ile yaptıkları çalışmada oosit içermemelerine rağmen premayotik belirteçler olan Stra8 (Stimulated by retinoic acid gene 8) ve Daz1 (Deleted in azoospermia 1) ifadesinin yüksek oranda olduğunu göstermişlerdir. Yaşlı fare ovaryumları, genç bir konak ortamına maruz kaldığında oositler oluşturma kapasitesini koruyan nadir bir premayotik germ hücresi popülasyonuna sahiptir. Bu sonuçlar, vücut ve organların yaşlanmasının kök hücrelerin yaşlılığına bağlı olduğu fikrini ortadan kaldırıp ovaryumlardaki bu

fonksiyon düşüşünün ovaryum GSC nişlerinin yaşlanmasına bağlı olduğunu, ancak GSC'lerin yaşlanmasına bağlı olmadığını göstermektedir. OKH'lerin over fonksiyonunu yalnızca ileri yaşta sürdürememesinin, ovaryan mikroçevrede yaşa bağlı değişikliklerden kaynaklanabileceğini düşünüyoruz.

OSC'lerin oogenezele sonuçlanan bir farklılaşma programını başlatma kabiliyetine ek olarak, yetişkin over dokusuna transplantasyonun ardından foliküllerin üretilmesi için granülosa öncü hücrelerini koordine etme kapasitesi, yetişkin memeli yumurtalıklarının folikül yenilenmesi için uygun olduğunu ortaya koymaktadır. Zou [27] ve ekibi, yayınladıkları “ Yenidoğan yumurtalıklarından elde edilen bir germ hattı kök hücre soyundan yavruların üretimi ” isimli makalede immünomagnetik izolasyon ve kültürle yenidoğan fare FGSC (female germ stem cell) hattını kurduklarını ve bu hücrelerin normal karyotip ve yüksek telomeraz aktivitesi olan hücreler olduklarını belirtmişlerdir. Ayrıca yetişkin farelerden elde ettikleri FGSC'leri izole edip 6 aydan fazla bir süre boyunca psajladıklarını bu FGSC'leri, GFP virüsü ile enfekte ettiklerini ve infertil farelerin ovaryumlarına naklettiklerini belirtmişlerdir. Nakledilen hücrelerin oogeneze geçirdiğini ve farelerin GFP transgenine sahip yavrular doğurduklarını göstermişlerdir.

Dunlop [76] ve ark. insan over dokusundaki OKH'lerinin varlığını bağımsız olarak doğrulamak ve sığır dokusundan izole edilemeyeceklerini tespit etmek için 2014 yılında bu hücreleri FACS bazlı bir teknik ile ayrıştırarak sığır ve insan ovaryum korteksinden izole etmişlerdir. Hücreleri, bir germ hücre spesifik proteini olan VASA'nın varlığına göre sıralamışlardır. Hücreleri daha sonra bir besleyici katmana ihtiyaç duyulmadan in-vitro olarak kültürlerini kurup germline-spesifik belirteçlerin mRNA ekspresyonunu RT-PCR ile analiz etmişlerdir. Hücreler, izleme amacıyla bir lentivirüs kullanılarak GFP ifade etmek için transdüksiyona tabi tutulmuştur. Sonuçta mitotik olarak aktif VASA-pozitif hücrelerin nadir bir popülasyonunu hem sığır hemde insan dokusundan izole ettiklerini ve birkaç ay boyunca in vitro olarak büyüttüklerini belirtmişlerdir. IFITM3 (Interferon induced transmembrane protein 3) , DPPA3 (Developmental pluripotency associated 3) , PRDM1(PR/SET domain 1) , POU5F1 (OCT4) ve KIT (KIT proto-oncogene receptor) dahil olmak üzere birkaç germline belirtecin ifade edildiğini RT-PCR ile göstermişlerdir. Bu belirteçlerin ifadesi, bu hücrelerin germline (oogonial) kök hücrelerin özelliklerine sahip olduğunu göstermektedir.

Ovaryumlarda kök hücre varlığını sorgulayan ve doğruluğunu gösteren bu çalışmaların aksine 2012 yılında Zhang ve ark. “ Doğum sonrası fare yumurtalıklarında mitotik olarak aktif dişi germline progenitörlerinin olmadığını gösteren deneysel kanıtlar ” adlı makaleyi yayınlamış ve ovaryum dokusunda yeni oosit üretiminden sorumlu progenitör hücrelerin olmadığını benimsemişlerdir. Dişi germline hücre soyunun gelişiminin in vivo ve in vitro izlenmesi için bir çoklu floresan Rosa26^{rbw}/+;Ddx4-Cre germline raportör fare modeli kullanarak canlı hücre

görüntüleme ve de novo folikülogenez deneyleri ile postnatal fare ovaryumlarından DDX4 ifade eden hücrelerin mitoz içine girmediğini ve de novo folikülojenez sırasında oositlere katkıda bulunmadıklarını göstermişlerdir [3].

Zhang ve ark. (2012) 'nın yaptığı çalışmayı destekler nitelikte bir çalışma 2016 yılında Zarate-Garcia ve ark. tarafından yapılmıştır. OKH benzeri hücrelerin DDX4'e karşı bir antikor kullanılarak ovaryumlardan izole edilebilse de, yüzeye bağlı bir DDX4'ün varlığını desteklemek için siliko modellemede (hayvan testlerine alternatif modeller) yetersiz olduklarını bu hücrelerin ölümsüz olmadıklarını izole edildikten birkaç ay sonra öldüklerini ve yetişkinlerde de novo oosit üretiminin nadir veya önemsiz olduğunu belirtmişlerdir [77].

Xiong [78] ve ark. (2015)'ları Zhang ve Zarate-Garcia'nın aksine kemoterapi sonrası (KS) farelerden (3-7 haftalık 59 C57BL/6 dişi fare) FGSC'leri izole edip saflaştırdıklarını (MACS sonucu % 2 (1.6–2×10⁴ fragilis; fare germ hücre belirteci pozitif hücre) ve GFP işaretli FGSC'lerini KS infertil olan farelere intraovariyan enjeksiyon yolu ile verip normal yavrular üretebildiklerini göstermişlerdir. Bu bulgular, KS farelerin, FGSC'lere sahip olduğunu, ovaryum fonksiyonunu geri kazandığını göstermektedir.

Ovaryumlar, yoğun hücre çoğalması ve büyümesi ile oldukça dinamik bir yapıdır. Gelişmekte olan herhangi bir germ hücresi, hücre bakımı, yenilenmesi veya farklılaşması açısından işlevini yerine getirmek için uygun bir nişte (örneğin, granuloza hücreleri) büyütülmelidir. Bu çalışmada açıklanan pluripotent veya multipotent özelliklere sahip varsayılan kök hücreler, böyle bir dinamik nişin oluşturulmasında iyi rol oynayabilir. Yetişkin memeli ovaryumlarının korteksinin çeşitli kök hücre belirteçleri ifade eden önemli bir kök hücre kaynağı olduğu sonucuna varabiliriz. Kemoterapi sonrası çocuk sahibi olmak isteyen kanserli çok az sayıda kadın, şu ana kadar dondurulmuş overdokusu veya oositlerle hamile kalabilmiştir [78].

OKH olduğu varsayılan bu hücrelerin iyi tanımlanıp izole edilmesi bu açıdan da oldukça önemlidir. Bu hücreler yüksek derecede bir plastisite gösterir ve örneğin ovariektomili hastalar için ve teratoma oluşma potansiyelleri düşük olduğundan rejeneratif tıpta güvenle kullanılabilir.. Ayrıca Zou (2009) ve Zhang (2011) bu hücrelerin kültürlenip hızlı, ucuz ve verimli gen transferinde kullanılabileceğini de göstermişlerdir. Eksojen FGSC'ler, aynı suşta immün reddi olmayan farelerden türetilbilse de, insan dişi germline kök hücreleri (hFGSC'ler) elde etmek zordur ve farklı bireyler arasında immün reddi gerçekleşebilir [27,69,79]. Bu sorunların aşılması ve OKH'lerin koruma ve tedavi amaçlı kullanılabilmesi için çok sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Yaptığımız deneyler sonucunda SOX2 ve OCT4 EKH belirteçlerinin memeli ovaryum hücrelerinde ifade edildiği flow sitometri tekniği kullanarak gösterilmiştir. Ayrıca bu hücrelerin oranlarının erişkin öncesi, erişkin ve yaşlı dönem sıçanlarda farklılık gösterdiği belirlenmiştir. SOX2 (+) hücrelerin gruplar arasındaki değişkenliği anlamlı ($p=0,001$) iken OCT4 (+) hücrelerin değişkenliğinin anlamlı olmadığı görülmüştür ($p=0,158$). Erişkin öncesi sıçanların SOX2 (+) hücreleri (medyan % 9,25) ile erişkin sıçanların SOX2 (+) hücreleri (medyan % 65,10) arasındaki farkın anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0,0001$). Üç grup karşılaştırıldığında en yüksek SOX2 (+) hücre oranının, erişkin dönem sıçanlarda olduğu görülmüştür.
- Bunun yanı sıra immünfloresan işaretleme tekniği kullanılarak bu hücrelerin ovaryum dokusundaki yerleşimleri ve dağılımları gösterilmiştir. Pozitif hücrelerin hem stromal hem de foliküler hücrelerde lokalize olduğu gözlenmiştir. Buna göre; SOX2 (+) hücrelerin tüm gruplarda çoğunlukla stromada olmak üzere foliküllerde de lokalize olduğu ancak yaşlı sıçanlarda foliküllerde çok azaldığı görülmüştür. OCT4 (+) hücrelerin ise tüm gruplarda hem stromada hem folikülerde lokalize olduğu ancak yaşlı sıçanlarda foliküllere oranla daha çok stromada lokalize olduğu gözlenmiştir. Pozitiflik gösteren hücrelerin reaksiyon kuvvetleri zayıftan kuvvetliye doğru değişim göstermiştir. Buna göre; SOX2 proteini açısından kuvvetli pozitif (+++) olan hücreler tüm gruplar arasında erişkinlerde daha fazla olduğu görülmüştür (Mean değeri: 12) ($p=0,043$). OCT4 proteini açısından zayıf pozitif (+) olan hücreler en yüksek yaşlılarda (Mean değeri: 39) ($p=0,004$), kuvvetli pozitif (+++) hücrelerin ise yine en yüksek erişkinlerde olduğu görülmüştür (Mean değeri: 8) ($p=0,014$).
- Bulduğumuz bu sonuçlar bize memeli over dokusunda EKH belirteçlerinin ifade edildiğini göstermektedir ancak bu hücrelerin kök hücre olarak tanımlanması için farklılaşma kapasiteleri izlenmelidir.
- Bu hücrelerin farklılaşma kapasitelerinin gösterilebilmesi için sorting (sıralama) ile izole edilip toplanması, uygun koşullarda kültürlerinin yapılması ve çeşitli uyarılara maruz bırakılarak dönüşümleri izlenmelidir.
- OKH olduğu varsayılan hücrelerin iyi tanımlanıp izole edilmesi infertilite, prematürmenapoz, polikistik over sendromu gibi doğurganlığı etkileyen durumlarda ayrıca kemoterapi almış ve kanseri atlatmış kadınlarda doğurganlığın sürdürülebilmesi için oldukça önem taşımaktadır.
- Bu hücreler yüksek derecede bir plastisite gösterirler ve teratom oluşturma potansiyelleri oldukça düşüktür ve rejeneratif tıpta güvenle kullanılabilirler.

- Bunun yanı sıra bu hücrelerin araştırılmasının OYE kaynaklı jinekolojik kanserlerde de erken tanı ve tedavi şansının artmasında fayda sağlayacağı düşünülmektedir.
- Bu hücrelerin elde edilmesi, tanımlanması ve çoğaltılması aşamasındaki zorlukların aşılması ayrıca farklılaşabilme kapasitelerinin gösterilmesi ve OKH'nin tedavi amaçlı kullanılabilmesi için çok sayıda çalışma yapılması gerekmektedir.



KAYNAKLAR

- [1]. Grieve KM, McLaughlin M, Dunlop CE, Telfer EE, Anderson RA (2015). The controversial existence and functional potential of oogonial stem cells. *Maturitas*. 82(3):278-81.
- [2]. Can A (2013). Kök Hücre. Akademisyen Kitabevi.
- [3]. Zhang H, Zheng W, Shen Y, Adhikari D, Ueno H, Liu K. (2012). Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. *Proc Natl Acad Sci U S A*.109(31):12580-5.
- [4]. Zuckerman S (1951). The number of oocytes in the mature ovary. *Recent Prog Horm Res* 6: 63-108.
- [5]. Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*.428 (6979):145-50.
- [6].WoodsDC, TillyJL. (2013).Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human ovaries. *Nat Protoc*. 8(5):966-88.
- [7]. Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA.(2001).Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells*. 19(3):193-204.
- [8]. Gök D. (2011). Ovaryum Dokusunda Kök Hücre Varlığının Araştırılması. Pamukkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Denizli
- [9]. Weissman IL (2002). Stem cells scientific, medical, and political issues. *N Engl J Med*. 346(20):1576-9.
- [10]. G.F. David, T.C. Anand Kumar, T.G. Baker, (1974). Uptake of tritiated thymidine by primordial germinal cells in the ovaries of the adult slender loris, *J Reprod Fertil* 41 447–451.
- [11]. Julie E. Holesh; Megan Lord (2019). Physiology, Ovulation. StatPearls [Internet].
- [12]. Celik O, Celik E, Turkcuoglu I, Yilmaz E, Simsek Y, Tiras B (2012). Germline cells in ovarian surface epithelium of mammals: a promising notion. *Reprod Biol Endocrinol*. 10:112.
- [13]. Gheorghisan-Galateanu AA, Hinescu ME, Enciu AM (2014).Ovarian adult stem cells: hope or pitfall?. *J Ovarian Res*, 7:71.
- [14]. Seghinsara AM, Banimohammad M (2018). New Facts About Ovarian Stem Cells: The Origin and the Fate. *International Journal of Women's Health and Reproduction Sciences*, 6;1127–133.
- [15].OtteJ, WruckW, AdjayeJ(2017).New insights into human primordial germcells and early embryonic development from single-cell analysis. *FEBS Lett*. ;591(15):2226-2240.
- [16].SaitouM, MiyauchiH. (2016). Gametogenesis from Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*.18(6):721-35.
- [17].IshiiT, SaitouM. (2017).Promoting In Vitro Gametogenesis Research witha Social Understanding. *Trends Mol Med*. 23(11):985-988.

- [18]. Moore KL, Persaud TVN, Torchia MG (2011). The Developing Human Clinical Oriented Embryology. 9. Baskı.
- [19]. Virant-Klun I (2015). Postnatal oogenesis in humans: a review of recent findings. Stem Cells Cloning. 8:49-60.
- [20]. Machaty Z, Miller AR, Zhang L (2017). Egg Activation at Fertilization. Adv Exp Med Biol. 953:1-47.
- [21]. Adashi E (1997). The ovarian cycle. In Yen SSC, Jaffe RB (eds): Reproductive Endocrinology, 4th ed. Philadelphia, WB Saunders,
- [22]. Nicholson SM, Bruzzone R (1997). Gap junctions: getting the message through. Curr Biol. 7(6):R340-4.
- [23]. Matur İ, Solmaz S (2010). Ovarian Follikül Gelişiminin Moleküler Temelleri. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi ARŞİV 19:193.
- [24]. Gougeon A, Notarianni E (2011). There is no neo-oogenesis in the adult mammalian Ovary. J Turkish-German Gynecol Assoc. 12: 270-3.
- [25]. Epifano O, Dean J (2002). Genetic control of early folliculogenesis in mice. TRENDS in Endocrinology & Metabolism Vol.13 No.4.
- [26]. https://www.researchgate.net/figure/264937083_Follicle-growth-in-a-human-ovary Proliferating-primordial-germ-cells-PGCs-migrate-to. Erişim tarihi 07.11.2019.
- [27]. Zou K (2009) Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. Nat Cell Biol 11:631-636.
- [28]. Allen E (1923). Ovogenesis during sexual maturity. Am J Anat 439-81.
- [29]. Simkins C (1932). Development of the human ovary from birth to sexual maturity. Am J Anat; 51: 465- 505.
- [30]. Öktem Ö, Urman B (2011). Over Hayat Döngüsünü Anlamak. J Turk Soc Obstet Gynecol, Cilt: 8 Sayı: 2 Sayfa: 71- 82.
- [31]. Bukovsky A, Caudle M R, Svetlikova M, and Upadhyaya N B (2004). Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. Reprod Biol Endocrinol. 2: 20.
- [32]. Bukovsky A, Svetlikova M, and Caudle M R (2005). Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. Reprod Biol Endocrinol, 3: 17.
- [33]. Eggen K, Jurga S, Gosden R, Min I M, and Wagers A J (2006). Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. Nature , 441: 1109- 14.
- [34]. Liu Y, Wu C, Lyu Q, Yang D, Albertini D F, Keefe D L (2007) Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. Dev Biol; 306: 112- 20.
- [35]. Dori C. Woods, Evelyn E. Telfer, and Jonathan L. Tilly (2012). Oocyte Family Trees: Old Branches or New Stems? PLoS Genet; 8(7).

- [36]. Landry DW, Zucker HA (2004). Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells. *J Clin Invest* 114: 1184-6.
- [37]. Microscopemaster. 08.12.2019 tarihinde <https://www.microscopemaster.com/stem-cells.html> adresinden erişildi.
- [38]. K Klara, PC Tomar (2014). Stem Cell: Basics, Classification and Applications. *AJPCT* 2;7,919-930.
- [39]. Kuijk EW, Chuva de Sousa Lopes SM, Geijsen N (2011). The different shades of mammalian pluripotent stem cells. *Hum Reprod Update*, 254-271.
- [40]. Tarnowski M, Sieron AL (2006). Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit*, 12:154- 163.
- [41]. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 18:399-404.
- [42]. Ateş U (2016). Kök Hücreyi Tanıyalım. *FNG & Bilim Tıp Transplantasyon Dergisi* 2016;1(1):19-28.
- [43]. İskender B, Canatan H (2016). İndüklenmiş pluripotent kök hücreler ve hücre tedavisi. *Journal of Clinical and Experimental Investigations* ; 4 (4): 550-561.
- [44]. İsan H, Uyanık A, Aktaş Ranan G. (2016) Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri. *Maltepe Tıp Dergisi* 8:2.
- [45]. Avcılar H, Saraymen B, Özturan OÖ, Köker My (2018) Embriyonik Kök Hücreler Ve İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler. *Asthma Allergy Immunol*, 16:1-10.
- [46]. Henderson J.K, Draper J.S, Baillie H. (2002). Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells*, 20: 329–337.
- [47]. Draper J.S, Pigott C, Thomson J.A, Andrews P.W (2002). Surface antigens of human embryonic stem cells: Changes upon differentiation in culture. *J. Anat.* 200: 249–258.
- [48]. Schopperle W.M, DeWolf W.C (2007). The tra-1-60 and tra-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma. *Stem Cells*. 25: 723–730.
- [49]. Niwa, H (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development*. 134: 635–646.
- [50]. G.Cauffman, H.Van de Velde, I.Liebaers, A.Van Steirteghem (2005). Oct-4 mRNA and protein expression during human preimplantation development. *Molecular Human Reproduction* Vol.11, No.3 pp. 173–181.
- [51]. Ilia M (2004). Disorders of Synaptic Plasticity and Schizophrenia. *International Review of Neurobiology*.
- [52]. Erin L. Wuebben¹ and Angie Rizzino (2017). The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview. *Oncotarget*, 8: 27- 44917-44943.

- [53]. Bukovsky A (2011). Ovarian stem cell niche and follicular renewal in mammals. *Anat Rec (Hoboken)*.294(8):1284-306.
- [54]. Xu J, Zheng T, Hong W, Ye H, Hu C, Zheng Y (2018). Mechanism for the Decision of Ovarian Surface Epithelial Stem Cells to Undergo Neooogenesis or Ovarian Tumorigenesis. *Cell Physiol Biochem*. 2018;50(1):214-232.
- [55]. Ye H, Zheng T, Li W, Li X, Fu X, Huang Y, Hu C, Li J, Huang J, Liu Z, Zheng L, Zheng Y (2017). Ovarian Stem Cell Nests in Reproduction and Ovarian Aging. *Cell Physiol Biochem*. 43(5):1917-1925.
- [56]. Ozakpinar OB, Maurer AM, Ozsavci D (2015) Ovarian stem cells: From basic to clinical applications. *World J Stem Cells*. 7(4):757-68.
- [57]. Johnson J, Bagley J, Skaznik-Wikiel M, Lee HJ, Adams GB, Niikura Y, Tschudy KS, Tilly JC, Cortes ML, Forkert R, Spitzer T, Iacomini J, Scadden DT, Tilly JL (2005). Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bonemarrow and peripheral blood. *Cell*. 122(2):303-15.
- [58]. Patel H, Bhartiya D, Parte S (2018). Further characterization of adult sheep ovarian stem cells and their involvement in neo-oogenesis and follicle assembly. *J Ovarian Res*. 11(1):3.
- [59]. Silvestris E, D'Oronzo S, Cafforio P, D'Amato G, Loverro G (2015). Perspective in infertility: the ovarian stem cells. *J Ovarian Res*. 8:55.
- [60]. 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*. 76(8):843-56.
- [61]. Virant-Klun I, Rozman P, Cvjeticanin B, Vrtacnik-Bokal E, Novakovic S, Rulicke T, Dovc P, Meden-Vrtovec H (2009). Parthenogenetic embryo-like structures in the human ovarian surface epithelium cell culture in postmenopausal women with no naturally present follicles and oocytes. *Stem Cells Dev*. 18(1):137-49.
- [62]. Virant-Klun I, Skutella T, Stimpfel M, Sinkovec J (2011). Ovarian surface epithelium in patients with severe ovarian infertility: a potential source of cells expressing markers of pluripotent/multipotent stem cells. *J Biomed Biotechnol*. 2011:381928.
- [63]. Parte S, Bhartiya D, Telang J, Daithankar V, Salvi V, Zaveri K, Hinduja (2011). Detection, characterization, and spontaneous differentiation in vitro of very small embryonic-like putative stem cells in adult mammalian ovary. *J Stem Cells Dev*. 20(8):1451-64.
- [64]. Li J, Zhou F, Zheng T, Pan Z, Liang X, Huang J, Zheng L, Zheng Y (2015). Ovarian Germline Stem Cells (OGSCs) and the Hippo Signaling Pathway Association with Physiological and Pathological Ovarian Aging in Mice. *Cell Physiol Biochem*. (5):1712-24.

- [65]. Bhartiya D. Ovarian stem cells are always accompanied by very small embryonic-like stem cells in adult mammalian ovary. *J Ovarian Res.* 2015 Nov 5;8:70. doi: 10.1186/s13048-015-0200-0.
- [66]. Adachi K, Suemori H, Yasuda Sh, Nakatsuji N, Kawase E (2010). Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes to Cells.* 2010; 15: 455–469.
- [67]. Pacchiarotti J , Maki C, Ramos T, Marh J, Howerton K, Wong J, Pham J, Anorve S, Chow YC, Izadyar F (2010). Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation.* 79(3):159-70.
- [68]. Imudia AN, Wang N, Tanaka Y, White YA, Woods DC, Tilly JL (2013). Comparative gene expression profiling of adult mouse ovary-derived oogonial stem cells supports a distinct cellular identity. *Fertil Steril.* 100(5):1451-8.
- [69]. Stimpfel M, Skutella T, Cvjeticanin B, Meznaric M, Dovc P, Novakovic S, Cerkovnik P, Vrtacnik-Bokal E, Virant-Klun I (2013). Isolation, characterization and differentiation of cells expressing pluripotent/multipotent markers from adult human ovaries. *Cell Tissue Res.* 354(2):593-607.
- [70]. Bhartiya D, Singh J (2015). FSH-FSHR3-stem cells in ovary surface epithelium: basis for adult ovarian biology, failure, aging, and cancer. *Reproduction.* 149(1):R35-48.
- [71]. Niikura Y, Niikura T, Tilly JL (2009). Aged mouse ovaries possess rare premeiotic germ cells that can generate oocytes following transplantation into a young host environment. *Aging (Albany NY).* 1(12):971-8.
- [72]. Mendelson A, Frenette PS (2014). Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat Med.* 20:833-846.
- [73]. Decarolis NA, Kirby ED, Wyss-Coray T, Palmer TD (2015). The Role of the Microenvironmental Niche in Declining Stem-Cell Functions Associated with Biological Aging. *Csh Perspect Med.* 5:a025874.
- [74]. Tilly JL, Telfer EE (2009). Purification of germline stem cells from adult mammalian ovaries: a step closer towards control of the female biological clock? *Mol Hum Reprod.* 15:393-398.
- [75]. Massasa E, Costa XS, Taylor HS (2010). Failure of the stem cell niche rather than loss of oocyte stem cells in the aging ovary. *Aging (Albany NY).* 2(1):1-2.
- [76]. Dunlop CE, Bayne RA, McLaughlin M, Telfer EE, Anderson RA (2014). Isolation, purification, and culture of oogonial stem cells from adult human and bovine ovarian cortex. *Lancet* 2014;383:S45.
- [77]. Zarate-Garcia L, Lane SI, Merriman JA, Jones KT (2016). FACS-sorted putative oogonial stem cells from the ovary are neither DDX4-positive nor germ cells. *Sci Rep.* 6:27991.

[78]. Xiong J, Lu Z, Wu M, Zhang J, Cheng J, Luo A, Shen W, Fang L, Zhou S, Wang S (2015). Intraovarian Transplantation of Female Germline Stem Cells Rescue Ovarian Function in Chemotherapy-Injured Ovaries. PLoS One. 10(10):e0139824.

[79]. Zhang Y, Yang Z, Yang Y, Wang S, Shi L, Xie W, Sun K, Zou K, Wang L, Xiong J, Xiang J, Wu J (2011). Production of transgenic mice by random recombination of targeted genes in female germline stem cells. J Mol Cell Biol. 3(2):132-41.



ÖZGEÇMİŞ

Adı ve Soyadı : İrem BEKALP YILMAZ

Doğum Tarihi : 06.04.1986

E-mail: irembekalp@mersin.edu.tr

Öğrenim Durumu:

Derece	Bölüm/Program	Üniversite	Yıl
Lisans	Biyoloji Bölümü	Mersin Üniversitesi	2004-2009
Yüksek Lisans	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Mersin Üniversitesi	2010-2013
Doktora	Tıbbi Biyoloji	Mersin Üniversitesi	2013-2020

Görevler:

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yıl
Arş.Gör.	Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	2013-2020

ESERLER

Tezleri

Yüksek Lisans Tez Başlığı ve Danışmanı

“İnterlökin-6 ve interlökin-18 gen polimorfizmlerinin ve plazma düzeylerinin kolorektal kanser ile ilişkisinin araştırılması”, Mersin, 2013. Prof. Dr. Nurcan ARAS

YAYINLAR

Makaleler

SCI, SCI-EXP. SSCI, AHCI kapsamında olan dergilerde yayınlanan makaleler

Araştırma makalesi

Kandemir, F. Böğrekci, G.; **Bekalp I.**; çetinkaya, A.; Aras, N. Is there any association between interferon gamma (IFN-) gene polymorphism (874 A/T, rs2430561) and hepatitis B virus infection?. HEPATOLOGY İNTERNATİONAL, **2017**.

Kandemir O, Aras N, Borekci G, Cetinkaya A, **Bekalp Yilmaz I**, Orekici Temel G. Association between IFN-gamma1874 polymorphisms and hepatitis C virus infection. *Hepatology International* 12 (2): 329 (2018).

Aras N, Borekci G, Kandemir O, Cetinkaya A, **Bekalp Yilmaz I**, Orekici Temel G. Investigation of the relationship between gene polymorphisms of TNF a (-1031) and chronic hepatitis C infection. *Hepatology International* 12 (2): 481 (2018).

Ulusal hakemli dergilerde yayınlanan makaleler

Araştırma makalesi

Bekalp İ., Ateş N.A., Çelik Karakaş S., Çayan F.: İnsülün Reseptör Substrat-2 Gen Polimorfizminin Serviks Kanseri ile İlişkisi: 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, Antalya 27-30 Ekim, *Türkiye Klinikleri Tıp bilimleri dergisi*, Cilt 31, sayı, 6, 225, (2011) ”

Bekalp, İ. İnsülün Reseptör Substrat 2 Gen Polimorfizminin Serviks Kanseri İle İlişkisi. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, **2011**, 6 ,225-225.

Bekalp, İ. İnterlökin-6 Ve İnterlökin-18 Gen Polimorfizmlerinin Ve Plazma Düzeylerinin Kolorektal Kanseri İle İlişkisi. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **2014**, 7 , 35-46.

Sevim Karakaş-Çelik , Gülay Börekçi , Özlem Kandemir, Serap Yalın, Mehmet Berköz, **İrem Bekalp** , Ayşe Kubilay, Nurcan Aras. Kronik Hepatit C Hastalarında IL18 Promotor Bölge Polimorfizmi. *Gazi Medical Journal*. 2014; 25: 125-127.

Karakaş Çelik S, Börekçi G, Kandemir Ö, Yalın S. Berköz M., **Bekalp İ.**, Aras N, “IL18 -137 G/C ve -607 C/A Gen Polimorfizmleri İle Kronik Hepatit B Arasındaki İlişki” *ME.Ü. Sağlık Bilimleri Dergisi*, 7(1);2015

Bekalp İ, Arslan Mamur B, Derici Yıldırım D, Tamer L, Çolak T, Aras N. İnterlökin-6 ve İnterlökin-18 Gen Polimorfizmlerinin ve Plazma Düzeylerinin Kolorektal Kanseri ile İlişkisi. *Mersin Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Dergisi* (2015)

Derleme

Börekçi G., **Bekalp İ.**, Aras N., “Hepatit B Virüs Enfeksiyonlarında mikroRNA’ların Rolü.” Mersin Üniv Sağlık Bilim Derg, 6(3), (2013).

Uluslararası Bildiriler

Aras, N.; Börekçi, G.; Kandemir, Ö.; **Bekalp Yılmaz, İ.**; Çetinkaya, A., Investigation Of The Relationship Between Gene Polymorphisms Of Tnf A (-1031) And Chronic Hepatitis B Infection. *Viral Hepatitis*, 2017-03-03, 2017-03-04, İstanbul , Türkiye, 2017.

Börekçi, G.; **Aras, N.**; Kandemir, Ö.; Çetinkaya, A.; **Bekalp Yılmaz, İ.**, Investigation of The Relationship Between Gene Polymorphisms of The Interleukin-12a, 12b and Chronic Hepatitis B Infection. *Viral Hepatitis*, 2017-03-03, 2017-03-04, İstanbul, Türkiye, 2017.

Kandemir O, **Aras N**, Borekci G, Cetinkaya A, **Bekalp Yılmaz I**, Orekici Temel G. Association between IFN-gamma1874 polymorphisms and hepatitis C virus infection. 27th Annual Conference of APASL. March 14–18, 2018, New Delhi, India

Aras N, Borekci G, Kandemir O, Cetinkaya A, **Bekalp Yılmaz I**, Orekici Temel G. Investigation of the relationship between gene polymorphisms of TNF a (-1031) and chronic hepatitis C infection. 27th Annual Conference of APASL. March 14–18, 2018, New Delhi, India

KILIÇ, T.; ARSLAN, B.; YAŞ, G.; BEKALP, İ.; ARAS, N., Müsin-1 (MUC1) Ve Müsin-4 (MUC4) Genlerinin Farklı Üreme Dönemlerindeki Sıçanların Uterus Dokusunda Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması. 1. International Mediterranean Symposium, 2018-11-01, 2018-11-03, MERSİN, Türkiye,

Ulusal Bildiriler

Aras N, Arslan B, Demir M, Yaş U, Çetinkaya A, Özdemir SS, **Bekalp Yılmaz İ**, Yıldırım M, Türkegün M. “1800 mhz elektrik alana maruz bırakılan sıçanların mide dokularında hsp70 stres geninin ekspresyon düzeylerinin araştırılması” *Uluslararası Katkıli ‘Gevher Nesibe Tıp Günleri 2016’ ve Tıbbi Genetik ve Klinik Uygulamaları Kongresi 11 – 13 Şubat, Kayseri, 2016*,

Aslan, B., **Bekalp Yılmaz I.** 1800MHZ Cep Telefonu Radyasyonunun Sıçan Kardiyak Dokusunda Crybb1 Protein Düzeyine Etkisi . Ulusal Vasküler ve Moleküler Kardiyoloji Kongresi, 2018-11-03, 2018-11-04, adana, Türkiye, **2018**.

Poster ve özeti yayımlananlar

Yolal D, **Bekalp İ**, Arslan Mamur B, Özateş N.P, Topal H, Çayan F, **Aras N.** “Habitüel Abortus ve 46,XX,t(6;22)(p21;q13) Translokasyon Olgusu.” 11. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi. 24-27 Eylül, 2014, İSTANBUL.”

Topal H, Yolal D, **Bekalp İ**, Arslan Mamur B, Özateş N.P, Hallıoğlu, O., **Aras N.** “46,XX,del(18)(q21 qter) Delesyonu: Olgu Sunumu.” 11. *Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi*. 24-27 Eylül, 2014, İstanbul. 2014”

Arslan Mamur B, Özateş N.P, Topal H, Yolal D, **Bekalp İ**, Hallıoğlu, O., **Aras N.** “X Kromozomu Delesyonu ve Turner Sendromu.” 11. *Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi*. 24-27 Eylül, 2014, İstanbul., 2014”

Özateş N.P, **Bekalp İ**, Arslan Mamur B, Topal H, Yolal D, Çelik,Y., **Aras N.** “De novo 47,XY,t(4;10)(q35;q21)+21 Translokasyonu Taşıyan Down Sendromlu Bir Olgu Sunumu.” 11. *Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi*. 24-27 Eylül, 2014, İstanbul., 2014”

Bekalp İ, Karakaş Çelik S., Arslan Mamur B, Özateş N.P, Topal H, Hallıoğlu, O., **Aras N.** “10;15 Translokasyonu Taşıyan Down Sendromlu Bir Olgu Sunumu.” 11. *Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi*. 24-27 Eylül, 2014, İstanbul., 2014”