



**PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİNDE ADİPOZ KÖKENLİ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN CELL SHEET YÖNTEMİ İLE
UYGULANMASI: RAT ÇALIŞMASI**

Pınar TOKDEMİR ÇALIŞ

**DOKTORA TEZİ
HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2022

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Pınar TOKDEMİR ÇALIŞ
22/08/2022

PREMATÜR OVER YETMEZLİĞİNDE ADİPOZ KÖKENLİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN CELL SHEET YÖNTEMİ İLE UYGULANMASI: RAT ÇALIŞMASI

(Doktora Tezi)

Pınar TOKDEMİR ÇALIŞ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağustos 2022

ÖZET

Prematür over yetmezliği, 40 yaş öncesinde hipergonadotropik hipogonadizmin durumunun oluşmasıdır ve günümüzde kesin tedavisi yoktur. Öncü hayvan çalışmaları kök hücre tedavisini başarılı bulmuştur. Bu çalışmanın amacı, cell sheet ve intravenöz yolla verilen kök hücrenin tedavi etkinliğini, prematür over yetmezliği oluşturulmuş hayvan modelinde karşılaştırmaktır. Bu amaçla, Sprague Dawley cinsi ratlardan 4 grup oluşturulmuştur; 1.grup: Kontrol (SF), 2.grup: siklofosamid ile prematür over yetmezliği (200mg/kg), 3.grup: prematür over yetmezliği+ intravenöz kök hücre ve 4.grup: prematür over yetmezliği +cell sheet. 21 gün sonra laparotomi yapıp, tüm ratlar sakrifiye edilmiş, ooferektomi ve intrakardiyak kan alımı yapılmıştır. Alınan örneklerden histomorfolojik inceleme, folikül sayımı, immunohistokimyasal ve genetik analizler ile GDF-9 ve BMP-15 dağılımı ve östradiol ölçümü yapılmıştır. 2. grupta atretik foliküllerde artış gözlenirken 4. grupta folikülogenez normal ilerlediği gözlenmektedir. 3. grupta atrezinin kısmi olarak azaldığı izlense de, multi oositli foliküllerin varlığı dikkati çekmiştir. GDF-9 ve BMP-15 immunohistokimyasal tutulumları ve gen ekspresyonları 1 ve 4. grupta benzer gözlenmiştir. Bu çalışma, literatürde cell sheetin prematür over yetmezliği modelinde kullanıldığı ilk çalışmadır. Kök hücrelerin sistemik dolaşıma verilmemesi avantajı dışında cell sheet yöntemi, intravenöz uygulamaya göre prematür over yetmezliği tedavisinde daha başarılı bulunmuştur. Bu durum cell sheet yönteminin prematür over yetmezliği tedavinde yararlı ve yeterli yeni bir yaklaşım olabileceğini düşündürmektedir.

Bilim Kodu : 1033
Anahtar Kelimeler : Kök hücre, cell sheet, prematur over yetmezliğ, histoloji
Sayfa Adedi : 79
Danışman : Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU

ADIPOSE DERIVED MESENCHIMAL STEM CELL TREATMENT WITH CELL SHEET METHOD IN PREMATURE OVARIAN INSUFFICIENCY: A RAT MODEL

(Ph. D. Thesis)

Pınar TOKDEMİR ÇALIŞ

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

August 2022

ABSTRACT

Premature ovarian insufficiency is development of hypergonadotropic hypogonadism before the age of 40 and definitive treatment is absent. Preliminary animal studies suggest stem cell treatment. In the current study, we aimed to compare the efficacy of cell sheet method with intravenous application of stem cells in premature ovarian insufficiency among an animal model. By this way 4 group was generated from Spraque Dawley rats; 1stgroup: control-arm (SF), 2ndgroup: premature ovarian insufficiency arm generated by cyclophosphamide (200mg/kg), 3rdgroup: premature ovarian insufficiency+ intravenous-stem cell and 4thgroup: premature ovarian insufficiency +cell sheet method. 21days after the laparotomy, all rats were sacrificed, oophorectomy and intracardiac blood were performed. Histomorphologic examination, follicular count, immunohistochemical and genetic analysis of GDF-9 and BMP-15 distribution and estradiol were performed in samples. Atretic follicles was seen more in the 2nd arm whereas folliculogenesis represented normal distribution in the 4th arm. In the 3rd arm, although partially decreased atresia was apparent, multi oocytes follicles were the most remarkable finding. GDF-9 and BMP-15 involvement and gene expressions were similar between 1st and 4th arms. The current attempt represents a pioneer study in the literature in which cell sheet method was used for the first time in a POI model. Cell sheet method was more effective than IV-stem cell method plus not applying stem cells in the systemic circulation. Those results suggest that cell sheet method might be a feasible and efficient method for the stem cell treatment of models with POI and might be a new treatment approach in POI.

Science Code : 1033

Key Words : Stem cell, cell sheet, premature ovarian treatmen, histologyt

Page Number : 79

Supervisor : Prof. Gulnur TAKE KAPLANOGLU

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecim boyunca bende emeği geçen başta Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı olan Prof. Dr. Çiğdem ELMAS olmak üzere bütün hocalarıma,

Tüm eğitim sürecim ve doktora tez çalışmam boyunca bilgi ve tecrübeleri ile her zaman öğretici ve yol gösterici olan, tezimin yürütülmesi ve sonuçlandırılması boyunca hoşgörü, anlayış ve desteğini esirgemeyen, beni her zaman cesaretlendiren değerli hocam Prof. Dr. Gülnur TAKE KAPLANOĞLU'na,

Tez çalışmamın ihtiyaç duyduğum her aşamasında yönlendirmesi ve bilgisini benden esirgemeyen Prof. Dr. Menemşe Gümüşderelioğlu'na,

Tez çalışmamda titizlikle bana yardım eden canım arkadaşım Atiye Seda YAR SAĞLAM'a,

Tez çalışmamın özellikle deney sürecinde bana hep destek veren, tanımaktan ve çalışmaktan çok mutlu olduğum Gökçenur ARIK'a,

Çalışmada birlikte olduğum, bana yardım eden sevgili Dr. Ekin Özge TUNCAY ve sevgili Dr. Gökçe KAYNAK BAYRAK'a,

Bu çalışmayı ödüle layık bulup destek sunan TSRM (Üreme Sağlığı ve İnfertilite Derneği) ve TAJEV (Türk-Alman Jinekoloji Eğitim Araştırma ve Hizmet Vakfı) e,

Hayatımın her döneminde beni destekleyen, her zaman arkamda olduklarını bildiğim canım annem, babam ve kardeşime,

Beni her zaman destekleyen, cesaretlendiren, bilimsel konularda fikir alışverişinde bulunabildiğim sevgili eşim Doç. Dr. Mert ÇALIŞ'a, ve bu süreçte hoşgörülerini esirgemeyen canım kızlarıma,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Ovaryum Embriyolojisi.....	3
2.2. Ovaryum Histolojisi	4
2.3. Ovaryum Fizyolojisi.....	9
2.4. Kök Hücre Kavramı	11
2.5. Prematür Over Yetmezliği ve Kök Hücre	13
2.6. Hücre Tabaka Teknolojisi	15
2.7. Folikül Matürasyon Faktörleri	16
3. GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1. Deney Hayvanları, Gruplandırma ve Uygulama.....	19
3.1.1. Deney hayvanları ve gruplandırma	19
3.1.2. POY modeli uygulamaları.....	20
3.2. Kök Hücre Uygulamaları	21
3.2.1. CSlerin üretimi	21
3.2.2. CSlerin karakterizasyonu	21

	Sayfa
3.3. Deneyin Sonlandırılması	23
3.4. BrdU Immunboyama Yöntemi.....	23
3.5. Hematoksilen – Eozin Boyama	24
3.6. İmmunohistokimyasal İnceleme	24
3.6.1. H-Skor hesaplanması	25
3.7. Rat Ovaryum Dokusundan Total RNA’nın Elde Edilmesi	25
3.8. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi (RT-PCR)	26
3.9 RT-PCR için Otomatik Isı Döngüsü Programı	27
3.10. Gen ifade Düzeylerinin Real-Time PCR Yöntemi ile Değerlendirilmesi.....	27
3.11 GDF-9, BMP-15 ve ACTB Genleri için Real-Time PCR Tepkime Karışımı ...	28
3.12. Light-Cycler (LC) Deney Programı	29
3.13. E2 (Östradiol) Ölçümü	30
3.14. İstatistiksel Analiz Yöntemleri.....	30
4. BULGULAR	33
4.1. CS Karakterizasyon Bulguları.....	33
4.1.1. Makroskopisi.....	33
4.1.2. İmmünofloresan boyama.....	33
4.1.3. Canlı/Ölü hücre boyama	33
4.1.4. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi.....	34
4.2. BrdU Boyanma Sonuçları	34
4.3. Hematoksilen – Eosin Bulguları	35
4.3.1. Folikül sayıları	40
4.4. GDF-9 İmmünohistokimyasal Bulguları.....	40
4.5. BMP-15 Bulguları	45
4.5.1. H skoru bulguları	49
4.6. TUNEL Bulguları.....	50

	Sayfa
4.7. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi.....	52
4.7.1. Gen ifade düzeylerinin karşılaştırması.....	53
4.8. E2 Sonuçları	54
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	61
KAYNAKLAR	63
EKLER	73
EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi	74
ÖZGEÇMİŞ	76

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.1. cDNART-PCRtepkime karışımı.....	27
Çizelge 3.2. Otomatik ısı döngü cihazında uygulanan program.....	27
Çizelge 3.3. Gene özgü primer dizileri ve UPL prob numaraları	28
Çizelge 3.4. GDF-9, BMP-15 ve ACTB Real-time PCR tepkime karışımı	28
Çizelge 3.5. GDF-9, BMP-15 ve ACTB genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.	29



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 4.1. AKMKH tabaklarına ait a. İmmünofloresan boyama fotoğrafları (40X, bar 50 μ m ve 20X, bar 100 μ m), b. Canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları (10X, bar 200 μ m ve 20X, bar 100 μ m), ok ile ölü hücre çekirdeği gösterilmiştir. c. SEM analizi fotoğrafları (4,000X, bar 10 μ m ve 10,000X bar 5 μ m), ok ile artmış ECM içerisindeki fiber yapıları gösterilmiştir. d. CSlerin in vivo transplantasyon aşamasının şematik gösterimi.....	34
Şekil 4.2. Gruplardaki ortalama ve istatistiki anlamı gösteren grafik a.preantral folikül b.antral folikül, c.Graaf folikülve d.atretik folikül sayımları	40
Şekil 4.3. GDF-9 için a.preantral, b.antral ve c.Graaf foliküllerde gruplar arası H skoru gösteren grafik ve p değerleri.....	49
Şekil 4.4. GDF-9 için a.preantral, b.antral ve c.Graaf foliküllerde gruplar arası H skoru gösteren grafik ve p değerleri.....	50
Sekil 4.5. Gruplarda Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi.....	53
Şekil 4.6. Gruplar arası östrojen değerlerini ve istatistiki farkı gösteren grafik	54

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. a. Tıraşlama, batikonla temizlik ve steril örtünme ardından orta hat insizyon b. overin batına girildikten sonra bulunması. c. Hücre tabasının penset ile tutularak over yüzeyine yaklaştırılması d. CSnin over yüzeyine oturtulması e. Alttaki koruyucu yapı çıkartılarak CSnin over yüzeyine sarılması.	20
Resim 4.1. AKMKH tabaklarına ait a. İmmüno floresan boyama fotoğrafları (40X, bar 50 µm ve 20X, bar 100 µm), b. Canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları (10X, bar 200 µm ve 20X, bar 100 µm), ok ile ölü hücre çekirdeği gösterilmiştir. c. SEM analizi fotoğrafları (4,000X, bar 10 µm ve 10,000X bar 5 µm), ok ile artmış ECM içerisindeki fiber yapıları gösterilmiştir. d. CSlerin in vivo transplantasyon aşamasının şematik gösterimi.	34
Resim 4.2. BrdU boyama yöntemi ile kesitlerde kök hücre varlığının gösterilmesi. a. Kontrol grubu, b. POY grubu, c. POY + IV verilen AKMKH grubu, d. POY + Cell sheet ile verilen AKMKH grubu. (★): BrdU pozitif hücreler (BrdU-H X100).	35
Resim 4.3. Kontrol grubu over kesiti. a. küçük büyültmede panoromik görüntü, b. büyük büyültmede preantral folikül (PAF), c. büyük büyültmede antral folikül (AF), d. büyük büyültmede Graaf folikülü (GF). (PF): Primordiyal follikül, (FA): foliküler atrezi, (∞): kan damarları, (<): zona pellusida, (↓): granüloza katmanı, (↑): teka interna (H-E. a- X40, b,c- X400, d- X200)	36
Resim 4.4. Siklofosfomid ile POY oluşturulan grupta over kesiti. a. küçük büyültmede panoromik görüntü, b. büyük büyültmede atreziye uğramış (FA) preantral folikül, c. büyük büyültmede antral folikül (AF), d. büyük büyültmede Graaf folikülü (GF). (Δ): medullar damarlarda konjesyon, (◆): kan damarlarında dilatasyon, (K): perifoliküler alanda fibrosis, (»): zona pellusida duplikasyon, (^): apoptotik hücre, (←): invaze fibrotik doku, (κ): fibrotik teka, (⊖): antrumda şekilsel -deformasyon (H.E., a- X40, b-X400, cX200, d-X400)	37
Resim 4.5. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik intravenöz yolla sistemik olarak adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti a. küçük büyültmede panoromik görüntü, b. büyük büyültmede preantral folikül (PAF), c. farklı histomorfolojik özellik gösteren antral foliküller (AF), d. farklı histomorfolojik özellik gösteren Graaf folikülleri (GF). (◆): kan damarlarında dilatasyon, (K): fibrosis, (PF): primordiyal folikül (↓): granüloza katmanı, (*): granüloza katmanında ödem; (O): oosit, (<): zona pellusida, (»): zona pellusida duplikasyon, (»): zona pellusida kalınlık farkı (◀): bir folikül içerisindeki çok sayıda oosit, (^): apoptotik cisimcikler, (κ): Graaf folikülünde fibrotik teka, (⊖): antrum (H-E a-X40, bX400, c ve d – X200).....	38

Resim

Sayfa

- Resim 4.6. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik cell sheet yöntemi ile adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti a. küçük büyültmede panoromik görüntü, b. büyük büyültmede preantral folikül (PAF), c. büyük büyültmede antral folikül (AF), d. büyük büyültmede Graaf folikül (GF), (Δ): medullar damarlarda konjesyon, ($\blacklozenge$): kan damarlarında dilatasyon, (PF): Primordiyal folikül, (<): zona pellusida, ($\uparrow$): granüloza katmanı, ($\updownarrow$): teka katmanı (H-E, a- X100, b-c-d X400). 39
- Resim 4.7. Kontrol grubu over kesiti. a. küçük büyültmede panoromik görüntü b. büyük büyültmede preantral folikül (PAF), c. büyük büyültmede antral folikül (AF), d. büyük büyültmede Graaf folikülü (GF). (KL): korpus luteum, (∞): kan damarları, (O): oosit, ($\updownarrow$): granüloza katmanı, ($\wedge$): bazal membrana komşu hücre katmanlarında orta dereceli tutulum. (GDF-9. a-4X10, b,c-40X10,d-20X10). 41
- Resim 4.8. Siklofosfomid ile POY oluşturulan grupta over kesiti. a. küçük büyültmede panoromik görüntü b. büyük büyültmede preantral folikül (PAF), oositte kuvvetli tutulum (O), granüloza hücrelerinde zayıf tutulum ($\updownarrow$) c. büyük büyültmede antral folikül (AF), oositte kuvvetli tutulum (O), granüloza hücrelerinde zayıftan orta dereceye değişen tutulum ($\updownarrow$) d. büyük büyültmede Graaf folikülü (GF)ne ait oositte (O) orta dereceli, granüloza katmanında ($\updownarrow$) ise zayıf olduğu görüldü (GDF-9, a-4X10, b-40X10, c-40X10, d-20X10). 42
- Resim 4.9. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik intravenöz yolla sistemik olarak adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti a. küçük büyültmede panoromik görüntü, hem oosit (O) hem de granüloza katmanında kontrol grubuna yakın tutulum ($\updownarrow$) olduğu belirlendi b. büyük büyültmede preantral folikül (PAF), oosit (O) ve granüloza hücrelerinde ($\updownarrow$), orta dereceli GDF-9 immünreaktivitesi belirlendi, c. Folliküler atrezi (FA), oositlerde kuvvetli tutulum (O), granüloza katmanında zayıftan ortaya değişen tutulum ($\updownarrow$), antral folikülde (AF), ise oositte (O), orta dereceli, granüloza katmanında ise zayıf ($\updownarrow$) tutulum, apoptotik morfolojideki folliküllerde tutulumda azalma, ancak olası genetik anomali olan folliküllerde ise aynı grubun sağlıklı folliküllerde tutulumda ki artış d. PKOS' u taklit eden Graaf folikül (GF), geniş antrum ($\boxplus$) ve incelmış granüloza katmanı ($\updownarrow$) ve bu katmanda negatiftan zayıfa değişen tutulum (GDF-9, a-4X10, b,c,d-40X10, c-20X10). 43

Resim**Sayfa**

- Resim 4.10. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik cell sheet yöntemi ile adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti a. küçük büyültmede panoromik görüntü, b. büyük büyültmede preantral follikül (PAF), oositte kuvvetli tutulum (O), granüloza hücrelerinde orta dereceli tutulum ($\uparrow$), (GDF-9,) c. büyük büyültmede antral folliküllerde (AF) normal tutulum, oosit (O) ve granüloza hücre katmanında orta-kuvvetli tutulum ($\uparrow$), (GDF-9, 40X10) d. büyük büyültmede Graaf follikülde (GF), kontrol grubuna benzer tutulum (GDF-9, a-4X10, b,c-40X10 d-20X10). 44
- Resim 4.11. Kontrol grubu over kesiti. a. küçük büyültmede panoromik görüntü b. büyük büyültmede preantral foliküllerde (PAF) ve oositlerinde (O), kuvvetli tutulum c. büyük büyültmede Antral follikül (AF), granüloza hücre katmanında ortadan kuvvetliye değişen tutulum ($\uparrow$) d. büyük büyültmede Graaf foliküllerde (GF), ortadan kuvvetliye değişen tutulum, (S): Stroma (BMP15,a- 4X10 b,d-40X10, c-20X10). 45
- Resim 4.12. Siklofosfomid ile POY oluşturulan grupta over kesiti. a. küçük büyültmede panoromik görüntü, Foliküler atrezi (FA), Preantral follikül (PAF), antral follikül (AF), de kontrol grubuna göre yoğun tutulum b. Büyük büyütmede preantral follikülde (PAF), oositte (O) ve granüloza hücrelerinde ($\uparrow$), orta dereceli tutulum c. Büyük büyütmede Antral follikül (AF), granüloza hücrelerinde ($\uparrow$) zayıf-orta dereceli tutulum d. Büyük büyütmede Graaf follikül (GF), granüloza hücrelerinde zayıf-orta dereceli tutulum ($\uparrow$), kistik folliküllerde granüloza hücrelerinde negatif tutulum (Δ), kistik folliküler (Ω) (BMP15, a-4X10, b,c,d-40X10). 46
- Resim 4.13. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik intravenöz yolla sistemik olarak adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti a. küçük büyültmede panoromik görüntü, preantral folikül (PAF), antral follikül (AF), Graaf follikül (GF), ve negatif tutulum gösteren stroma (S) b. Büyük büyütmede preantral foliküller (PAF), oosit (O) ve granüloza hücre katmanında ($\uparrow$) orta dereceli reaktivite c. Büyük büyütmede Antral foliküllerde (AF), oosit düzeyinde (O) orta dereceli, granüloza hücre katmanında ($\uparrow$) ise orta- kuvvetli derece tutulum d. Büyük büyütmede Graaf follikül (GF),granüloza katmanında zayıf tutulum ($\uparrow$), kistik follikül (Ω) ve ince granüloza katmanı ($\uparrow$) ve bu katmanda deformasyonlar ($\leq$) (BMP-15,a- 4X10, b,d-40X10, c-20X10). 47

Resim**Sayfa**

- Resim 4.14. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik cell sheet yöntemi ile adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti a. küçük büyültmede panoromik görüntü, Preantral foliküller (PAF) ve antral foliküllerde (AF) ve Graaf follikülde (GF) kontrol grubuna benzer tutulum ve negatif tutulum gösteren stroma (S) b. büyük büyültmede PAF, oosit (O) ve granüloza hücre katmanında (↓) kuvvetli tutulum c. büyük büyültmede AF, O orta dereceli, (↓) ise ortadan kuvvetliye değişen tutulum d. büyük büyültmede GF, ↓, ortadan kuvvetliye değişen tutulum (BMP15, a-4X10, b,c,d-40X10)..... 48
- Resim 4.15. a. Kontrol grubu, tunnel pozitif hücreler (←), hematoksilen (20X10), b. Siklofosfoamid grubu, tunnel pozitif hücreler (←), foliküler atrezi; FA, pozitif teka interna hücreleri (↓), hematoksilen (20X10) c. Deneysel POY oluşturularak IV AKMKH uygulanan grup, pozitif teka interna hücreleri (↓), hematoksilen (20X10) d. Deneysel POY oluşturularak CS yöntemi ile AKMKH uygulanan grup, tunnel pozitif hücreler (←), foliküler atrezi; FA, negatif teka interna hücreleri (↓), hematoksilen (20X10)..... 51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
kD	Kilodalton
mg/kg	Miligram / kilogram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mMol/L	Milimol / litre
ng/ml	Nanogram / mililitre
rpm	Bir dakidaki dönüş
µm	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklama
AF	Antral Folikül
AkMKH	Adipoz dokudan elde edilen mezenkimal kök hücre
AMH	Anti-Müllerian Hormon
BMP	Bone morphogenic protein
BrdU	5-bromo 2-deoksiüridin
Cp	Crossing point
cDNA	Tamamlayıcı DNA
DAB	3,3 diaminobenzidine
DAPI	4,6 diamino 2 phenylindole
DHEA	dihidroepiandrostenon
E2	Östrodiol
ECM	Ekstraselüler matriks

Kısaltmalar	Açıklama
FA	Foliküler atrezi
FBS	Fetal sığır serumu
FGF	Fibroblast growth factor
FSH	Folikül uyarıcı hormone
GDF	Growth differentiation factor
GF	Graaf folikül
GnRH	Gonodotropin serbestleştirici hormone
H&E	Hematoksilen Eozin
hCG	İnsan koryonik gonadotropin
HGF	hepatosit büyüme faktörü
HMDS	hekzametildisilazon
HRT	Hormon replasman tedavisi
IGF-1	Insulin like growth factor-1
IV	İntravenöz
IVF	Invitro fertilizasyon
KITL	Kit Ligand
KL	Korpus luteum
LH	Luteinizan Hormon
MKH	Mezenkimal kök hücre
O	Oosit
OMI	Oosit maturasyon inhibitörü
PA	Primordial folikül
PAF	Preantral folikül
PAS	Periyodik asit shift
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PKOS	Polikistik over sendromu
POY	Prematür over yetmezliği
PVDF	Poliviniliden florür
RT-PCR	Ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu
S	Stroma

Kısaltmalar	Açıklama
SEM	Taramalı electron mikroskopisi
StAR	Stereidojenik akut regulatuar protein
SRY	Sex determining region on Y
TCPS	doku kültür polistiren
TGF B	Transforming growth factor beta
UPL	Universal probe library
VEGF	Vasküler endotelyal büyüme faktörü



1. GİRİŞ

Prematür over yetmezliği, diğer adıyla primer ovarian yetmezlik (POY); overlerin, foliküler disfonksiyon ya da folikülün miktarca azalmasına bağlı, 40 yaş öncesinde kısmi ya da total olarak reproduktif ve hormonal fonksiyonlarını kaybetmesi olarak tanımlanır [1, 2]. Bu durum günümüzde giderek sıklığı artan toplumsal bir sağlık sorunu haline gelmiştir. 20 yaş altında 10.000 de 1 kadını etkilerken, 30 yaş altı için bu durum 1000 de 1'e kadar yükselmektedir [1]. Bu oranlar az da olsa ırklara göre de değişmektedir. Tanı koyulabilmesi için temel üçleme; amenore, hipergonadotropizm ve hipoöstrojenizmdir [3, 4]. Her ne kadar sıcak basması, gece terlemesi, vajinal kuruluk gibi semptomlar sık görülse de, bu hastalarda yaş grubundan dolayı doktora başvurunun en sık nedeni infertilitedir [5].

POY nedenlerinin %90'ı bilinmemektedir [1]. Geri kalan %10'luk kısmını genetik nedenler, otoimmün hastalıklar, kemoterapi, radyoterapi, cerrahi ve çevresel nedenler oluşturmaktadır. Tedavide şikayetlere yönelik hormon replasman tedavisi, kemik koruyucu tedavi ve psikososyal tedavi önerilmektedir [6]. İnfertiliteye yönelik olarak da günümüzde yardımcı üreme teknikleri kullanılmaktadır. Ancak, POY hastalarında over rezervinin düşmesine bağlı olarak yardımcı üreme tekniklerinin başarısı da yüksek değildir [7].

Mezenkimal kök hücreler (MKH); osteoblast, kondrosit, miyosit, adiposit gibi pek çok hücreye farklanabilen ve bu sayede dokuların yenilenmesine katkıda bulunan multipotent, hematopoetik olmayan stromal hücrelerdir [8, 9]. Bu hücreler birçok memeli türünde yetişkin, yenidoğan ya da fötüsten elde edilebilir. Kemik iliği MKH'lerin en yoğun bulunduğu bölgedir ve bir kemik iliği aspiratında 1/10000 ile 1/100000 oranında MKH bulunmaktadır. Literatürde birçok dokunun rejenerasyonunda kullanıldığı belirtilen bu kök hücrelerin, çeşitli nedenlerle zarar görmüş over dokusunda, oosit rejenerasyonu için de tercih edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmalarda kök hücreler intravenöz (IV) yolla uygulanmıştır. Konuyla ilgili yapılan çalışmalar her geçen gün artsa da, sonuçlar beklenildiği kadar yüz güldürücü bulunmamıştır. Buna ek olarak, sistemik dolaşıma verilen kök hücrelerin uzun dönemde vücutta neden olabileceği diğer etkiler de bilinmemektedir [10].

Biyomühendislik alanında yeni bir yöntem olan 'hücre tabaka teknolojisi (cell sheet, CS)' son yıllarda gelişen, hücre iskeleti kullanmadan hücreler arası bağlantı kurulması sağlanarak,

ısı duyarlı bir yüzeyde tabaka oluşturulmasına dayanan bir teknolojidir. Bu şekilde hücreler istenilen dokuya direkt uygulanabilmektedir [11].

Bu çalışmada ratlarda siklofosfamid ile indüklenmiş deneysel POY modelinde, hem IV hem de yeni bir teknik olan CS yöntemi kullanılarak verilen adipoz kökenli MKH (AKMKH)'lerin, overdeki rejenerasyon kabiliyetlerinin immunohistokimyasal ve genetik analizlerle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu sayede sıklığı giderek artmakta olan ve henüz kesin tedavisi bulunmayan bir sağlık sorununa yeni bir tedavi yöntemi geliştirilmesi düşünülmektedir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Ovaryum Embriyolojisi

Kromozomal cinsiyet her ne kadar fertilizasyonda belli olsa da gonadların farklılaşması; intermediyer mezoderm, karın arka duvarını döşeyen kölom epiteli ve primordial germ hücrelerinin göçü nedenleriyle gebeliğin 7. haftasına kadar gerçekleşmez. Kromozomal olarak ise Y kromozomu kısa kolu üzerindeki Yp11.32'de SRY (Sex Determining Region on Y) geninin varlığı embriyonun cinsiyetinin erkek, yokluğu ise dişi yönünde farklılaşmasına neden olmaktadır [12-14].

Gonadlar, gelişimin 5. haftası sırasında mezonefrozun medial tarafında kölom epitelinin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla bir çift uzunlamasına genital ya da gonadal sırt halinde ortaya çıkarlar. Genital sırtlar içerisinde gelişimin 6. haftasına değin germ hücreleri bulunmaz. Epiblasttan köken alan ve primitif çizgi boyunca göç eden primordial germ hücreleri, 3. haftada vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasına yerleşirler. 4. haftada sonbarsağın mezenteriy boyunca ilerlerler. 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşırlar ve 6. haftada genital sırtı doldururlar. Primordial germ hücreleri genital sırtı ulaşmaz ise gonadlar gelişemez. Primordial germ hücrelerinin gonadların farklılaşması üzerine indükleyici etkileri bulunmaktadır [13, 14].

Primordial germ hücreleri primitif gonadlara ulaştıkları sırada, genital sırtı çevreleyen kölom epitel hücreleri proliferasyon olarak alttaki mezenşim içine gömülürler. Bu şekilde düzensiz kordonlar olan primitif cinsiyet kordonları oluşmuş olur. Bu evrede erkek ve dişi gonadların birbirinden ayırt edilmesi mümkün değildir. Bu evredeki gonada 'farklanmamış gonad' denir [13, 14].

XX kromozomu olan embriyonlarda, primitif cinsiyet kordonları düzensiz hücre kümelerine ayrılır. Bu kümeler primitif germ hücresi grupları içerir ve daha çok overin medullar bölgesine yerleşmişlerdir. Bu hücre kümeleri bir süre sonra yerini vasküler stromaya (ovaryan medulla) bırakır. Dişi gonadların yüzey epiteli, erkeklerin aksine proliferasyon olmaya devam eder. 7. haftada bu epitelten kortikal kordonlar gelişir. 4. ayda bu kordonlar izole hücre kümelerine ayrılır. Bu kümelerdeki hücreler proliferasyon olmaya devam eder ve her oogonyumun etrafını foliküler hücreler denilen bir epitel hücresi tabakasıyla sararlar. Foliküler hücreler oogonyumlar ile birlikte primordial folikülü meydana getirirler[14].

Gonadlar, gelişimin 5. haftası sırasında mezonefrozun medial tarafında kölom epitelinin proliferasyonu ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla bir çift uzunlamasına genital veya gonadal sırt halinde ortaya çıkarlar. Germ hücreleri gelişimin 6. haftasına kadar genital sırtlar içinde bulunmaz[13].

Genital sırttaki kölom epiteli hücreleri, primordiyal germ hücreler primitif gonadlara ulaşmadan önce ve ulaştıkları sırada, proliferasyon olarak altlarındaki mezenşimin içine gömülürler ve primitif cinsiyet kordonları denilen düzensiz kordonları oluştururlar. Farklanmamış gonad olarak adlandırılan bu evrede gonadlar erkek veya dişi gonad olarak ayırt edilemez[13, 14].

Oogonyumlar mitoz bölünme gerçekleştirirken, bir kısmı mayoz bölünmeye başlar ve 1. mayoz bölünmenin profaz aşamasında bölünmeyi durdurarak primer oosite dönüşürler. Ovaryum içindeki germ hücresi sayısı 5. ayda 7 milyon civarına ulaşır. Bu sırada başlayan hücre ölümüyle birlikte çok sayıda oogonyum ve primer oosit atreziye uğrar. Atreziye uğramayan primer oositler, 1. mayoz bölünmenin profaz evresine girer ve yassı foliküler epitel hücreleriyle sarılırlar. Bir primer oosit ve etrafındaki yassı folikül hücrelerinden oluşan bu yapıya primordial folikül denir. Yenidoğan ovaryumunda tümü 1. mayoz bölünmenin profaz evresini tamamlamış yaklaşık 2 milyon primer oosit bulunur. Puberteye ulaşıldığında ise bu sayı 40000'e kadar geriler. Primer oosit 1. mayoz bölünmeyi ovulasyondan hemen önce tamamlar. 1. mayoz bölünmenin sonunda oluşan sekonder oosit 2. mayoz bölünmeye girer. Ancak bir sperm tarafından dölleninceye kadar, 2. mayoz bölünmenin metafaz evresinde kalır. Puberteye ulaşıldığında 40000 civarında olan primer oositlerin sadece yaklaşık 400 tanesi olgunlaşır ve ovulasyonla atılır [13, 14].

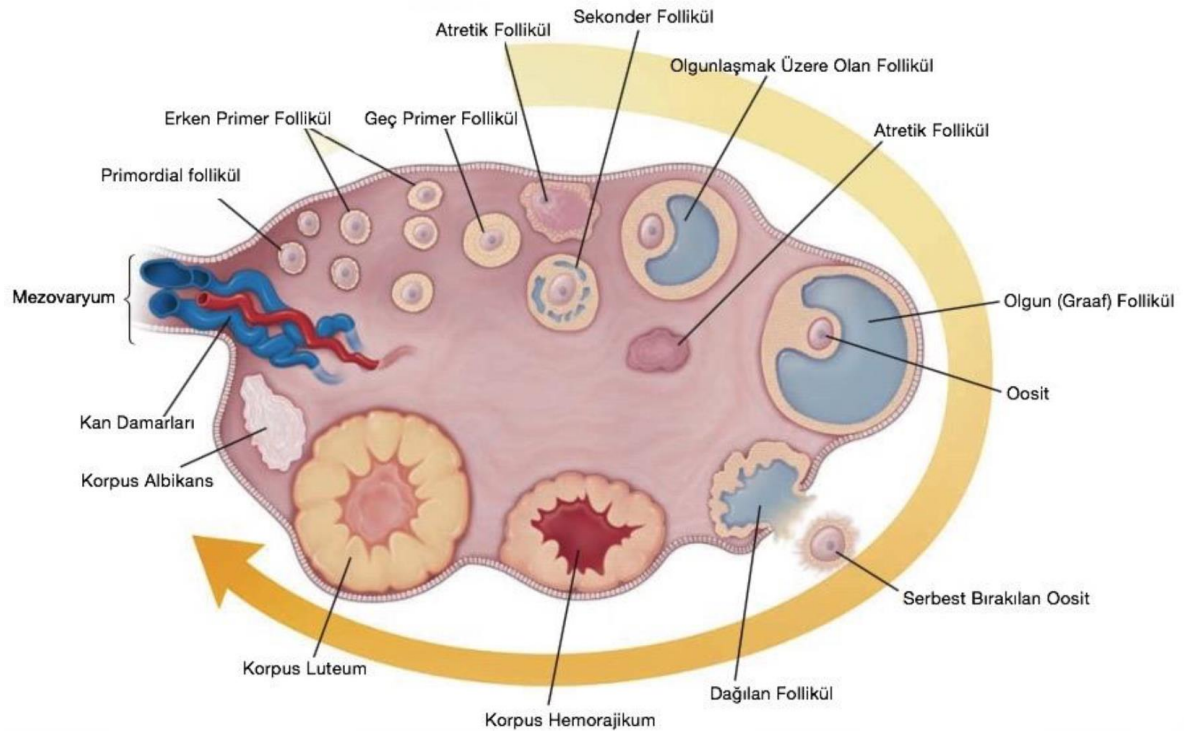
2.2. Ovaryum Histolojisi

Ovaryumlar, nulliparlarda bir çift badem şekilli, pembemsi beyaz renkli, 3 cm boyutunda, 1.5 cm eninde ve 1 cm kalınlığındaki organlardır. Hem ekzokrin hem de endokrin salgı üretme yetenekleri vardır. Serbest yüzü gençlerde tek katlı yassı, erişkin bir kadında ise tek katlı kübik epitel ile döşelidir. Germinal epitel olarak bilinen bu hücresel tabaka, mezovaryumu kaplayan mezepitelyum ile devamlılık göstermektedir. Primordial germ hücreleri, ekstragonadal kökenli olup embriyonik yolk kesesinden embriyonik gonadın korteksine göç edip burada ovaryumun farklılaşmasını indükler. Germinal epitel ile

korteksin arasında sıkı bağ dokusu tabakası olan tunika albugenia yer almaktadır. Bu tabaka ovaryuma açık renkli bir görünüm verir. Ovaryum aralarında kesin bir sınır bulunmayan korteks ve medulla bölgelerinden oluşur. Korteks, tunika albugenianın altında bulunup, medullanın etrafını sarar. Korteks; iç şekilli bağ dokusu hücreleri, kollajen lifler, elastik lifler ve retiküler lif ağlarından oluşan stroma ve bu stoma içine gömülü farklı gelişim aşamasındaki çok sayıda folikülden meydana gelir. Bunlara ek olarak stromada düz kas lifleri de bulunmaktadır. Ovaryum medullasında ise; kan damarları, lenf damarları, sinir demetleri, hiluma yakın kısımda düz kas lifleri ve bunların etrafını saran gevşek bağ dokusu bulunmaktadır [13, 15-17].

Ovaryum folikülleri korteks stroması içerisinde yer alır ve bir primer oosit ile onun etrafını saran tek katlı ya da çok katlı hücrelerden oluşur [17].

Gelişim evresine göre ovaryum folikülleri histolojik olarak; primordial foliküller, gelişmekte olan foliküller ve olgun (Graaf) foliküller olarak üç gruba ayrılır. Gelişmekte olan foliküller de kendi içerisinde; unilaminar primer folikül, multilaminar primer folikül ve sekonder (antral) folikül olmak üzere üçe ayrılır [17] (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Over kesitinin şematik çizimi [17]

Primordial foliküller ovaryum korteksinin en dış katmanında, tunika albugenianın hemen altında yer alırlar ve bir primer oosit ve onun etrafını saran tek katlı yassı-folikül hücrelerinden oluşurlar. Büyük ökromatik yapıda ve eksantrik çekirdeğe sahip olan oosit yaklaşık 25-30 μm büyüklüğündedir. Folikül hücreleri, etrafını saran bazal lamina ile stromadan ayrılır. Organeller çekirdeğe yakın yerleşim gösterme eğilimindedirler. Organel olarak zengin içeriğe sahiplerdir. Bunların başında; golgi kompleksi, endoplazmik retikulum, mitokondriyon, lizozom ve annuler lameller yer almaktadır. Bu organeller sitoplazmada yoğunlaşarak 'Balbiani cisimciği' adı verilen yapıları oluşturmaktadır. Fötal ovaryumda oluşan primordial foliküller menarşe kadar bir dinlenme evresine girerler. Puberte ile birlikte her menstrual siklusta 15-20 adet primordial folikül gelişim evresine girer [17-20].

Primer oosit, foliküler hücreler ve stromal dokudaki değişiklikler; primordial foliküllerin primer foliküllere gelişmesini sağlar. Germinal vezikül olarak adlandırılan büyük bir çekirdeğe sahip olan primer oositin boyutları 100-150 μm 'ye ulaşır. Granüllü endoplazmik retikulum ve ribozom açısından zenginleşir ve serbest ribozom miktarı artar. Folikül hücreleri tek katlı yassı halden kübiğe dönüşür ve unilaminer primer folikülü oluşturur. Oosit büyüdükçe özel proteinler salgılanır ve bu proteinler bir araya gelerek ekstraselüler bir örtü olan zona pellusidayı oluşturur. Zona pellusida oolemma ile folikül hücreleri arasında bulunur. İnsandaki zona pellusida, sülfatlı üç asidik zona pellusida glikoproteinleri tarafında oluşturulur. Bunlar, ZP-1, ZP-2 ve ZP-3 olarak adlandırılmaktadır. Bunlardan en önemlisi ZP-3'tür. Bu glikoprotein, spermatozoa bağlanma reseptörü ve akrozom reaksiyonu indükleyicisi olarak görev almaktadır. Bu glikoprotein tabaka, oosit tek tabakalı kübik ya da prizmatik folikül hücreleri tarafından çevrelendiğinde ve çapı 50-80 μm ulaştığında görülebilir [16-19].

Folikül hücreleri tabakalanmaya uğrar ve primer folikülün granuloza tabakasını oluşturur ve bu hücreler granuloza hücreleri olarak isimlendirilir. Bazal lamina ise folikül hücrelerinin en dış tabakası ile stroma arasında yer alır. Folikül büyümesi esnasında granuloza hücreleri arasında yaygın oluklu bağlantılar gelişir. Hızla proliferen olan folikül hücreleri çok katlı bir yapı oluşturur ve multilaminer primer folikül ya da preantral folikül adını alır. Aktivin, granuloza hücrelerinin proliferatif aktivitesinden sorumludur [16-19].

Bağ dokusu hücreleri primer folikülün teka tabakalarını oluşturur. Granuloza hücreleri proliferasyona uğrayınca folikülün hemen çevresindeki stromal hücreler teka folikülü denen bağ dokusu hücreleri kılıfı oluştururlar. Teka folikülü iki tabakaya ayrılır;

Teka interna: yüksek düzeyde vaskülerize, kübik hücrelerden oluşmuş iç tabakadır. Bu hücreler lüteinleştirici hormon (LH) reseptörlerine sahiptir. LH stimülasyonu ile birlikte östrojen prekürsörü olan androjenleri sentezler ve salgırlar.

Teka eksterna: dış bağ dokusu hücreleri tabakasıdır. Düz kas hücreleri ve kollajen lif demetleri içermektedir.

Teka eksterna ile onu çevreleyen stroma arasındaki sınır belirgin değildir. Buna karşılık, granuloza tabakası ile teka interna arasındaki bazal lamina belirgin bir sınır oluşturmaktadır [16, 17].

Oositin maturasyonu primer oositte meydana gelmektedir. Oosit olgunlaştıkça organellerin dağılımı değişir. Serbest ribozom, mitokondriyon, küçük veziküllerin, multiveziküler cisimciklerin ve granüllü endoplazmik retikulumun sayısı artar. Oositin perivitellin aralığa çok sayıda mikrovillus uzanır. Perivitellin aralık, oosit ile onu çevreleyen granuloza hücreleri arasında bulunur [16, 17].

Sekonder folikül sıvı içeren bir antrumla karakterizedir. Stratum granulozum 6-12 hücre tabakası kalınlığına ulaştığında granuloza hücrelerinin arasında sıvı dolu boşluklar oluşmaya başlar. Bu boşluklara likör folikülü adı verilir. Bu boşluklar hyaluronan bakımından zengin sıvı içeriğine sahiptir. Bu boşluklar birleşip tek hilal şekilli, antrum adı verilen büyük bir boşluk oluşturduğunda folikül sekonder ya da antral folikül adını alır. Oosit çapı 125 µm'ye ulaşmıştır, eksantrik yerleşimlidir ve daha fazla büyümmez. Büyümenin inhibisyonu granuloza hücreleri tarafından salgılanan oosit matürasyon inhibitörü (OMI) tarafından sağlanmaktadır. Sekonder folikülün boyutu ile OMI arasında direkt korelasyon bulunmaktadır [16, 17, 19].

Granuloza hücreleri oosit ile ilişkili olduğu bölgede kumulus ooforus adı verilen ve antruma doğru çıkıntı yapan bir tümsek oluşturur. Ovulasyonda oosit ile birlikte kalan kumulus ooforus hücrelerine korona radiata adı verilir. Granuloza hücreleri arasında PAS pozitif koyu boyanan 'Call Exner cisimcikleri' olarak adlandırılan ekstraselüler

materyal görülebilir. Bu cisimcikler hyaluronan ve proteoglikan içerip, granüloza hücrelerinden salgılanırlar [15, 17].

Graaf folikül çapı 10 mm'den fazladır. Ovaryum korteksinin boyunca uzanır ve yüzeyinde çıkıntı oluşturur. Folikül matürasyonu ilerledikçe teka interna hücrelerinin sitoplazmasında lipid damlacıkları ortaya çıkar. LH teka internayı östrojen prekürsörü olan androjenleri salgılatmak üzere uyarır. FSH ya yanıt olarak da granüloza hücreleri androjenlerin östrojenlere dönüşümünü indükler [16-19].

Ovaryum korteksinde gelişimin her evresinde atreziye uğramış foliküller bulunur. Yalnızca bir folikül olgunlaşmayı tamamlar, olgunlaşmayacak foliküller atreziye uğrar. Atrezide ilk olarak oosit ardında granüloza hücreleri dejenere olur. Granüloza hücreleri endonükleazların ve bazı hidrolitik enzimlerin üretimine başlar. Nötrofil ve makrofajlar tarafından istila edilir. Oluşan apoptotik cisimcikler fagosite edilir. Teka interna ile-granüloza hücreleri arasında bazal membran kalınlığı artar ve camsı hale gelir [16-19].

Ovulasyon sekonder oositin serbestleşmesiyle sonuçlanır. Ovulasyon 28 günlük menstrual periyodun 14. gününde meydana gelir ve bu süreç hipofizin anterior lobundan salgılanan LH'nin ani yükselişi ile başlar. Bu artış folikülde prostoglandin ve progesteronun sentezini uyarır. Proteolitik enzimler aktive olur ve folikül duvarı yırtılır. Kumulus hücreleri ve sekonder oosit periton boşluğuna atılır. Buradan fimbriyalar tarafından yakalanan oosit, spermiyum tarafından döllenirse (fertilizasyon), II. mayoz bölünme tamamlanır ve zigot oluşur. Eğer fertilizasyon gerçekleşmezse sekonder oosit 24-48 saat içerisinde dejenere olur. Ovulasyon sonrası folikülde geride kalan granüloza ve teka-hücreleri, ovaryum korteksinde korpus luteum ya da sarı cisim adı verilen geçici bir salgı bezi oluşturur [15, 16, 19].

Ovulasyon sonrası folikül içerisindeki iç basıncın düşmesiyle teka internadaki kapillerlerden sızan kan, folikül içerisini doldurur ve korpus hemorajikum (kırmızı cisim) oluşturur. Sonrasında kan pıhtısının yerini bağ dokusu ve kan pıhtısı artıkları alır. Granüloza hücreleri, korpus luteumun merkezinde yer alırlar ve steroid sentezlemek için gerekli olan düz endoplazmik retikulum, granüllü endoplazmik retikulum ve mitokondriyon gibi organellerin sayısı artar. Sitoplazmasında dağınık halde lipid damlacıkları bulunan bu hücrelere granüloza lutein hücreleri adı verilir. Bu hücreler progesteron üretiminden, teka lutein hücreleri tarafından üretilen androjenlerin östrojene dönüşümünden sorumludur. Korpus luteumun periferinde bulunan ve luteal hücrelerin %20'sini oluşturan teka interna hücreleri

hormon üretimi için değişim gösterir ve teka lutein hücreleri adını alır. Teka lutein hücreleri az miktarda östrojen, androjen ve progesteron üretiminden sorumludur. Eğer döllenme gerçekleşirse korpus luteum hücreleri büyür ve gebelik korpus luteumu (korpus luteum pregnansi) adını alır. Gebeliğin 4. ayına kadar işlev gören gebelik korpus luteumu bu zamandan sonra işlevini plasentaya bırakır. Eğer döllenme gerçekleşmezse korpus luteum 14 gün işlevsel kalır ve menstruasyon korpus luteumu olarak isimlendirilir. Sonrasında hücreler küçülür, damarlanma azalır, bağ dokusunda hyalinizasyon gerçekleşir ve korpus albicans olarak adlandırılan beyaz skar dokusu oluşur [15-19].

2.3. Ovaryum Fizyolojisi

Ovaryal fonksiyonlar 3 ana merkezin kontrolü altındadır. Bunlar hipotalamustan Gonadotropin Salgılayıcı Hormon (GnRH) salınımı, hipofiz bezinin anterior kısmının pars distalisinden gonadotropinlerin salınımı (FSH ve LH) ve ovaryumdan östrojen ve progesteron aracılığı ile sağlanır. Bu hormonlar siklusun değişik zamanlarında farklı miktarlarda salgılanır. Pubertede β -endorfin, serotonin, nörepinefrin ve dopaminin etkisiyle hipotalamustan GnRH pulsatil olarak salgılanır. Bu, ön hipofizden FSH ve LH hormonlarının salınmasını uyarır. Bu döneme kadar inaktif olan ovaryumlar FSH ve LH'nın etkisiyle folikül gelişimini başlatır. Ovaryan siklus menstruasyondan ovulasyona kadar süren foliküler dönem ve ovulasyon sonra başlayıp korpus luteum yıkımına kadar devam eden luteal dönem olarak ikiye ayrılır [21-23].

Foliküler dönemde 10-15 adet primordial folikül gelişmeye başlar. Bu evrenin sonunda bir ya da nadiren birkaç olgun folikül oluşur. Bu dönemde granüloza hücrelerinden östrojen salınımı yapılır. Ovulasyon sonrası östrojen ve progesteron üretiminden korpus luteum sorumludur. Erken foliküler dönemde FSH seviyesi yükselir ve bu durum granüloza hücrelerinde hücre çoğalmasına neden olarak—östrojen üretimini artırır. LH ise teka hücrelerine etki ederek, teka hücrelerinin çoğalmasını ve hücrelerden androjen sentezini uyarır. Difüzyonla granüloza hücrelerine giren androjenler, aromataz enzimi ile östrojene dönüştürülür [21-23].

2. haftanın başlangıcında FSH seviyesinin azalmasıyla gelişmekte olan foliküller dejenere olurken, içlerinden bir folikül dominant hale gelir. Dominant foliküldeki artan FSH ve LH reseptörleri folikülün canlılığının sürdürülebilmesini sağlar. Dominant folikülden daha fazla

salgılanan östrojen, gonadotropinlere negatif geri bildirim yaparak, FSH ve LH salınımını azaltır. Yine granüloza hücrelerinin salgıladığı inhibin, FSH seviyesinin LH'dan daha çok azalmasına sebep olur [21, 22].

Ovulasyondan hemen önce folikülün dış duvarındaki küçük bir alan dışarıya çıkıntı yapar. Foliküler kapsüldeki bu küçük alana *stigma* adı verilir. Bunun hemen ardından stigma delinir ve folikülün ortasındaki visköz sıvı dışarı drene olur. LH en son foliküler büyüme ve ovulasyon için gereklidir. Bu hormon olmadan, yüksek miktarda FSH olsa bile folikül ovulasyon düzeyine ulaşamaz. Ovulasyondan iki gün önce anterior hipofizden salgılanan LH hızlı bir şekilde artar ve 6-10 kat kadar yükselir. Ovulasyondan 16 saat öncesinde ise en yüksek seviyesine ulaşır. FSH da bu arada giderek artar ve FSH ve LH sinerjistik etki yaparak folikülün ovulasyondan önce hızlıca büyümesini sağlar. LH ayrıca teka ve granüloza hücrelerini progesteron üreten hücrelere dönüştürür. Bundan dolayı, ovulasyondan 1 gün önce östrojen miktarı düşer ve progesteron miktarı artar [21-23].

LH'nın ani yükselişi ile, oosit I. mayoz bölünmeyi tamamlar. Ovulasyon için gerekli iki olay meydana gelir: 1. Teka externa lizozomlardan proteolitik enzimler salgılar, bu da foliküler kapsül duvarın erimesine ve zayıflamasına, tüm folikülün büyüüp şişmesine ve stigmanın dejenere olmasına yol açar. 2. Foliküler duvarda yeni kan damarları oluşur ve foliküler dokulara prostoglandinler salgılanmaya başlar. Bunların sonucunda stigma dejenere olur ve folikül rüptüre olarak, ovum dışarı atılır [21-23].

Fertilizasyonun gerçekleşmemesi durumunda oluşan menstruasyon sonrasında korpus luteumunun işlevi az miktarda LH'nın etkisiyle devam eder. Menstruasyon korpus luteumundan bol miktarda progesteron, östrojen ve inhibin salgılanır. Progesteron luteal evrenin başlarında yüksek östrojen seviyesine rağmen büyük LH dalgalarının oluşmasına engel olur. Luteal evrede FSH salınımı ise inhibin konsantrasyonundaki artış ile baskılanır. Bu nedenle luteal evrede gonadotropin seviyeleri oldukça düşüktür [22, 23].

Gonadotropin salınımında artış olmaması, korpus luteumun ömrünü kısaltır ve gebelik meydana gelmezse korpus luteum 2 hafta içerisinde dejenere olur. Korpus luteumun dejenerasyonu ile birlikte plazma östrojen ve progesteron seviyeleri de düşer. Östrojen ve progesteronun inhibitör etkisinin ortadan kalkmasıyla hipofizden FSH ve LH salınımı artarak yeni bir döngü başlar [21-23].

2.4. Kök Hücre Kavramı

Kök hücreler somatik hücre grubundan olup, matür hücrelerden farklı olarak farklı hücre serilerine dönüşüm ve yenilenme yeteneğine sahip hücrelerdir. Temel olarak iki çeşit kök hücreden bahsedilebilir [24].

Bunlardan ilki embriyonik tip kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler implantasyon öncesi blastokistin iç tabakasında yer alır [25]. Bunlar pluripotent olup her üç hücre tabakasına farklılaşma yetenekleri vardır [26]. Rejeneratif özellikleri nedeniyle istenseler de onkolojik kaygılar, mevcut yasal düzenlemeler ve etik bazı sorunlar nedeniyle kullanımları sınırlıdır [24].

İkinci grup ise erişkin kök hücrelerdir. Bu kök hücreler vücut dokularında yer alan somatik hücrelerin farklılaşma potansiyeline sahip formudur. Bu kök hücre kaynaklarından en sık kullanılanı kemik iliğidir.

Kemik iliğinden köken alan iki farklı kök hücre grubu yer almaktadır:

1. Hematopoetik kök hücreler
2. Mezenkimal/stromal kök hücreler

Hematopoetik kök hücreler lökosit, eritrosit trombosit gibi kan elemanlarının gelişimden sorumlu iken, mezenkimal kök hücreler ise kemik, kıkırdak, kas ve yağ dokusu gibi çeşitli bağ dokusu elemanlarının hücresel gelişimini sağlar [24].

Mezenkimal kök hücreler (MKH), kemik iliğinde bulunan ilk keşfedilen erişkin tip kök hücrelerdir. Mezodermden köken alırlar ve neredeyse tüm bağ dokusu ve organların stromasına dağılırlar. Mezenkimal kök hücreler için kemik iliği başlıca kaynak gözükmeyle birlikte, elde edilmesindeki morbidite artışı ve sınırlı miktarda hücre elde edilebilmesi nedeniyle mezenkimal kök hücrelerin alternatif yollarla elde edilebilmesi çalışmalarını arttırmıştır. İlerleyen yıllarda bağ dokusu matrisinde mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi büyük heyecan uyandırmıştır [27, 28].

2.4.1. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre

Yüksek proliferatif potansiyele sahip ve adiposit, kondrosit ve osteoblastlara dönüşme yeteneğine sahiptirler. Tümör tedavisinde [29-31], kıkırdak tamirinde [32] ve myokard

infarktüsünde [33] pek çok çalışmada kullanılmışlardır. Enerjilerini primer olarak glikolizden alırlar. İn vivo ortamda doymuş yağ aside olan palmitat apoptozlarını indükler ve çoğalma hızlarını düşürür [34].

Literatürde POY modelinde tedavi amaçlı kullanılmış kemik iliği kökenli mezenkimal hücre çalışmaları bulunmaktadır. Yapılan bir fare çalışmasında kemoterapi verilmiş farelerde kemik iliği kökenli mezenkimal hücre sonrası germ hücre apoptozuna ve DNA hasarına karşı korucu olduğunu göstermiştir [35]. Yine başka bir çalışmada in vitro ortamda sisplatin denenli granulosa hücre apoptozunu engellediği kanıtlanmıştır. Ayrıca literatürdeki başka bir çalışmada kçk hücre uygulanmasından 30 gün sonra antral folkül sayısının, östrodiol (E2) ve anti Müllerian hormon (AMH) seviyesinin arttığı gözlenmiştir [36, 37].

Zuk ve arkadaşları 2002 yılında doku mühendisliği için bir çığır açak bir çalışmaya imza atmış ve insan yağ dokusundan mezenkimal kök hücre elde etmişlerdir [38]. Yağ dokusunun temel avantajları; insanda pek çok yerde bulunması, kolay ulaşılabilir olması ve ulşılırken morbiditesinin düük olmasıdır. Bu şekilde yağ dokusu mezenkimal kök hücreler için sık kullanılır bir kaynak haline gelmiştir [24, 39].

2.4.2. Adipoz dokusu ve mezenkimal kök hücreler

Adipoz dokusunda primer adipositler bulunmakla birlikte, adipositler haricinde preadipositler, fibroblastlar, perisitler ve adipoz kökenli mezenkimal kök hücre gibi birçok hücre tipi bulunmaktadır [40].

Embriyonik kök hücrelerin yasal ve etik tartışmalardan dolayı kullanılma kısıtlılıklarına karşın, AkMKH lerin embriyonik kök hücreye benzer nitelikte kas, kemik, yağ, kas ve sinir hücreleri gibi pek çok hücreye farklılaşabilmesi ile son yıllarda kök hücre çalışmalarında kullanımları sıklaşmıştır [38, 41].

AkMKH lerin pek çok yöne farklılaşma kapasiteleri olup, hasarlı dokuya yüksek göç kabiliyetleri vardır. AkMHH lerin düşük immunojenite ve fetal kök hücrelerle kıyasla daha az bioetik sorunları olduğundan klinik ve medikal biyomühendislik alanlarında sıklıkla kullanılmaktadır [42-44]. Günümüzde bu kök hücreler, kan, sinir, motor, kardiovasküler ve deriye ait bir takım hastalıklarda tedavide kullanılmakta ve başarılı sonuçlar elde edilmektedir [45].

En önemli avantajları bol ve kolay ulaşılabilir bir doku olan yağ dokusundan elde edilebilmeleridir. İnsan yağ dokusu, liposuction ya da abdominoplastide elde edilebilen subkutan bir dokudur. Kolay elde edilebilirliğine ek olarak yağ dokusu içinde mesenkimal kök hücrelerin bol miktarda bulunması uzun dönem kültüre gerek kalmamasına böylelikle oluşabilen kromozomal anormallik ihtimalini de düşürmektedir [46]. Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler ile kıyaslandığında, daha yüksek çoğalma ve kendini yenileme özelliğine sahiptir [47]. Tek bir belirteç içermez; CD34, CD 14 ve CD 45 ile işaretlenir. Prostaglandin E2 ve interferon -gama gibi pek çok çözünebilir mediatör salgılayarak T hücre proliferasyonunu engeller [48].

2.5. Prematür Over Yetmezliği ve Kök Hücre

POY günümüz şartlarında 30 yaş altında 1/1000 oranında görülen ve klinik insidansı giderek artan önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. İnsidansı yüksek olmasına rağmen, halen klinikte uygulanan yüz güldürücü bir tedavi bulunamamıştır. Buna karşılık; primer olması dışında kemoterapi, radyoterapi gibi sekonder nedenler de günümüzde çok sık gözlemlenmektedir [49].

POY tanılı hastaların %5-10 kadarı tedavisiz, spontan gebe kalabilmektedir [5]. 2016 senesinde yapılan bir çalışmaya göre klinikte kullanılan hiçbir tedavi yöntemi POY tanılı hastalarda fertilitiyi arttırmamaktadır. Günümüzde fertilitiy için bu hasta grubunda oosit donasyonu ya da evlat edinme önerilmektedir [7]. Bu alanda dehidroepiandrosteron (DHEA) kullanımı ile ilgili çalışmalar bulunsun da, 2018 senesinde yapılan bir çalışmaya göre 12 ay DHEA kullanımı over fonksiyonunu arttırmadığı görülmüştür [50].

2013 yılında Kawamura ve arkadaşları, over fragmantasyonu ve fragmanların *in vitro* fosfotidilinozitol 3-kinaz aktivatörleri muamelesi ile AKT yolağını aktive etmeye çalışmış ve aktivasyon sonucunda otograft yapmıştır. Bu yolla canlı gebelik elde edilmiştir. Buna karşılık, bu metod ile canlı gebelik oranı yüksek olmadığından, klinik kullanıma geçememiştir [51, 52].

Özellikle POY tedavisi için verilen hormon replasman tedavisinin kanser gibi yan etkileri olması sonucu ve diğer fertilitiy tedavilerinden yüz güldürücü yanıtlar alınamaması sonucu kök hücre tedavisi seçenekleri denenmeye başlanmıştır. Bunun için pek çok kök hücre türü

uygulanmıştır. Bunlardan ilki MKHlerdir. 2013 yılında Wang ve arkadaşları POY modeli olan farelere mezenkimal kök hücre vermiş ve kumulus hücre apoptozisinin azaldığını, seks hormonu seviyelerinin arttığını ve over fonksiyonlarının iyileştiğini gözlemlemiştir [53]. 2017’de yaptıkları bir çalışmada aynı şekilde Li ve arkadaşları da ratlara mezenkimal kök hücre verildikten sonra 14, 21 ve 28. günlerde deneklerin hormonlarına bakmış ve sonuçta FSH seviyesinin düştüğünü, E2 ve AMH seviyelerinin ise arttığını gözlemlemiştir. Bunlara ek olarak, ovaryal folikül sayısının da arttığı tespit edilmiştir [54].

MKH kullanımının haricinde amniyotik sıvı kökenli kök hücre kullanımı ile de ratlarda over rezervi düzeltilmeye çalışılmıştır. Ekstra amniyotik tabakadan alınmış amniyotik kök hücreler, multipotent olup hem erişkin ve hem de embriyonik kök hücre belirteçleri içermekte; mezenkimal kök hücrelerle kıyaslandığında çok daha hızlı çoğalmaktadırlar [55, 56]. 2014 yılında Xiao’nun yaptığı çalışmada amniyotik sıvı kök hücreleri transjenik farelere verilmiş, folikül atrezisini inhibie ettiği ve foliküler sağlığın iyileştiği tespit edilmiştir. Buna ek olarak, 2017 yılında Zhang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada insan amniyotik epitelyal hücreler prematür over yetmezliği olan farelerin tek taraflı ovaryumuna enjekte edilmiş ve bunun sonucunda o taraf ovaryumda sağlıklı, matür foliküller ve anjiogenezde, immün cevapta, hücre siklusunda ve apoptozisinde görev alan 109 farklı sitokin tespit edilmiştir [57].

Bunların haricinde, prematür over yetmezlikli farelerde tedavi amaçlı insan pluripotent kök hücreleri de kullanılmıştır. Overe direkt transplante edilen indüklenmiş bu hücreler, over ağırlığını, ile plazma E2 seviyeleri ile faredeki normal folikül sayılarını arttırmış olarak bulunmuştur [58].

Tüm verilen bu kök hücreler ya kan dolaşımına IV olarak verilmiş ya da direkt overe transfer edilmiştir. Literatürdeki tüm bu çalışmalarda hepsinin kısa dönemde her iki verilme yöntemi ile de over üzerine pozitif etkileri gözlemlenmiştir. Bu açıdan klinik kullanıma henüz geçmemiş olsa da, hem primer ve hem de kemoterapi gibi sekonder nedenlere bağlı prematür over yetmezliğinde kök hücre tedavileri yüz güldürücü görünmektedir.

2.6. Hücre Tabaka Teknolojisi

CS teknolojisi ilk defa Okano ve arkadaşları tarafından ortaya atılan ve günümüzde umut vadeden doku mühendisliği tekniklerinden bir tanesi–olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu teknik genel bir ifade ile sıcaklık uyarlı modifiye kültür kapları kullanılarak, 32°C'nin altındaki sıcaklıklarda 30 dakikadan daha kısa bir sürede enzim ya da şelatlayıcı ajan kullanılmasına gerek olmadan hücrelerin tabaka halinde elde edilmesi esasına dayanmaktadır [11]. CSsının içeriğini; hücre dışı matriks, iyon kanalları, büyüme faktörü reseptörleri ve diğer önemli hücre yüzey proteinleri oluşturur [59].

Enzimatik yöntemde hücreler arasındaki hücre-hücre ve hücre-ekstrasellüler matriks (ECM) bağlantıları enzimlerle parçalanarak, hücreler tek tek ve süspanse halde yüzeyden kaldırılırlar. CSsı teknolojisinde ise hücrelerin birbiri ile bağlantıları ve ECM yapısı korunarak ısı duyarlı bi şekilde yüzeyden kaldırılır. Bu şekilde enzimlere hassas hücreler (hepatosit, glial hücreler, vb) farklılaşmış fenotiplerini koruyabilmektedirler [59].

CSları yalnız başına ya da biyomalzemlerle birleştirilerek doku mühendisliği için kullanılabilir. Bu teknoloji kullanılarak; deri, kalp, kornea, kemik ve kıkırdak gibi dokuların rejenerasyonu için yapılan pek çok *in vitro* ya da *in vivo* çalışma bulunmaktadır [60-63].

CSlarının elde edilmesinde ısı duyarlı kültür kapları haricinde ek olarak çeşitli yöntemler de geliştirilmiştir. Bunlar; askorbik asit uygulaması, amniyotik membran, enzim takviyeleri, manyetik kuvvet uygulaması, elektrokimyasal-uyarılı pH değişimi, elektrokimyasal polarizasyon, iyonik çözünme, ışık etkisi, fibrin kaplı yüzeyler, yüksek hücre yoğunluğu ve serum etkisidir [60, 64].

CS teknolojisinin rejeneratif çalışmalarda sağladığı pek çok avantaj bulunmaktadır. Hücreler bu teknoloji kullanıldığında ECM, iyon kanalları, büyüme faktörü reseptörleri ve diğer önemli fonksiyonel yüzey proteinlerini kaybetmezler. Buna ek olarak, hücre süspansiyonu enjeksiyonuna göre minimum hücresel kayıp olması doğrudan hücre enjeksiyonuna karşı avantaj sağlar. CSlarının transplantasyonu hücre süspansiyonu enjeksiyonuna göre daha güçlü doku fonksiyonu, daha bütün doku rejenerasyonu ve daha güçlü terapötik etki sağlamaktadır [60, 62].

2.7. Folikül Matürasyon Faktörleri

Dönüştürücü Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β), hücre düzenleyici proteinlerinin geniş bir grubunu oluşturmaktadır. İlk olarak 1983 yılında keşfedilmiştir. Bu grubun alt grupları olarak; aktivin ve inhibin, kemik morfogenetik proteini (BMP), büyüme farklılaşma faktörü (GDF) ve sağ-sol belirleyici faktörler yer almaktadır. TGF- β , pek çok hücrede çoğalmayı ve farklılaşmayı kontrol eden multifonksiyonel bir peptid ailesidir [65].

BMP, büyüme hormonlarının bir alt ailesi olarak sınıflandırılmaktadır. Her ne kadar kemik ve kıkırdak yapımının uyarılmasında temel olarak yer alsın da, memelilerde dişi fertilitesinde de önemli görevler üstlenmektedirler. BMP-15, GDF-9, BMP-7 ve BMP-6 overlerden salgılanmakta ve erken luteinizasyonu engelleyerek, folikül gelişimini korumaktadır. Bununla birlikte; BMP-15, BMP-6 ve GDF-9 otokrin etki ile granüloza hücre çoğalmasını indüklemekte ve FSH-bağımlı folikül fonksiyonlarını düzenlemektedir [66].

Granüloza hücreleri üzerinde GDF-9, BMP-6 ve BMP-15'in bağlandığı Tip-I ve Tip -II reseptörleri bulunmaktadır. Bu şekilde anlaşılabilir ki, bu moleküllerin hedeflerinden biri de granüloza hücreleridir. BMP-15'in bağlandığı Tip-1 ve Tip-2 reseptörler primordial/ primer hücre geçişi itibarı ile BMP-15 yanıtı ile birlikte granüloza hücreleri tarafından ifadenmektedir [67].

BMP-15 geni X-bağımlı kalıtsal bir gen olup, sentezlediği protein primordial/primer evrede oosit tarafından sentezlenir [68]. GDF-9 ise 5. kromozomun uzun kolunda bulunan bir gen bölgesidir. GDF-9 mRNA'sı sadece primer tek katlı foliküler evreden ovulasyona kadar oositte sentezlenir [69]. Bu iki gen de kadın fertilitesinde önemli yere sahip olmasının kanıtı olarak, diğer TGF- β ailesi üyeleri ile kıyaslandığında, hızlı bir şekilde evrimleşmiş ve pozitif seleksiyona uğramıştır [70].

Yapılan bir çalışmada gösterilmiş ki; her iki proteinin mRNA'sı da dişi farelerin oositlerinde gösterilmiştir fakat ifadenmesi primordial foliküllerde çok az ya da hiç yokken, gelişen foliküllerin her evresinde kuvvetli ekspresyonu tanımlanmıştır. GDF-9 mRNA'sı aynı zamanda ovulasyona uğramış foliküllerde de tespit edilmiştir [71].

Diğer tüm TGF- β süper ailesinde olduğu gibi, GDF-9 da prepropeptid olarak sentezlenir ve furin benzeri proteazla matür aktif protein haline dönüşmesi gereklidir. GDF-9 ve BMP-15 yüksek derecede aminoasit homolojisine sahiptir ve benzer protein yapıları vardır. Her iki

proteinin de tanımlanma paternleri ve fonksiyonları oositte benzerdir ve birbirleriyle ilişki halindedirler. Birçok kanıt, bu iki proteinin sinerjistik bir ilişki içerisinde olduğunu ve oosit kalitesini arttırdığını savunmaktadır [72, 73].

Diaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda, hem GDF-9 hem de BMP-15'in folikülogenez ve oosit kalitesi üzerine etkilerini göstermişlerdir. Primer folikülün sekonder foliküle ilerlemesi aşamasında foliküler gelişimde GDF-9'un rolü gösterilmiştir [74].

Hashimoto ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada BMP-15, foliküler gelişimi primordial folikülün gonadotropin bağımsız fazından itibaren destekler, FSH'ya karşı granüloza hücre duyarlılığını ayarlar, granüloza hücre–apoptozisini engeller, bunlara ek olarak oosit gelişimde ve ovulasyonda görev alır [75].

Diaz ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre BMP-15 ve GDF-9 ovulasyon ve luteinizasyon için genlerin düzenlenmesinde rol oynarlar [76]. Yakın zamanda Ernst ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre folikül aktivasyon sisteminde gen ekspresyon çalışmalarının çok karmaşık modeller oluşturduğu–gösterilmiş ve GDF-9'un normal ve patolojik over fonksiyonundaki rolünü açıklığa kavuşturulmuştur [77].

Hem BMP-15 ve hem de GDF-9'un granüloza hücrelerinde bazı protein ekspresyonlarının düzenlenmesinde etkili oldukları gösterilmiştir. Bunların bir örneği de Kit Ligand'dır (KITL). KITL oosit büyümesinde temel olarak önemlidir ve bu proteinin ekspresyonu parakrin ve hormonal faktörler ile kontrol edilir. Gilchrist ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre GDF-9, KITL ekspresyonunu granüloza hücrelerini kullanarak inhibe ederken; BMP-15 ise bu ekspresyonu arttırmaktadır [78]. Tüm bunlara ek olarak, oositten kaynaklanan GDF-9 ve BMP-15-granüloza hücrelerinde glikoliz ve kolesterol sentezini düzenler [79].

BMP-15, sterojenik akut düzenleyici protein (StAR) ekspresyonunu baskılayarak progesteron üretimini inhibe eder ve böylece foliküler luteinizasyonu engellemiş olur. Buna ek olarak, GDF-9 da pituitar gonadotropinlerle etkileşime geçerek progesteron üretimini daha da azaltır. Ovulasyonun hemen sonrasında korpus luteumdaki bu oosit faktörlerinin azalması ile StAR ekspresyonu artar ve bu da progesteron üretimini artırır [80, 81].

Her ne kadar GDF-9 ve BMP-15 over fonksiyonlarını düzenlese de, türler arası bir takım farklılıklar bulunmaktadır. Bu fark daha çok mono ve poli ovulasyon olan memelilerden kaynaklanır [82]. Örnek olarak, BMP-15 mono ovulatuvar olan koyunda folikül gelişimi

açısından fareye (poli ovulatuar) göre daha önemli bir rol oynarken, GDF-9 folikül gelişimi açısından farede daha önemlidir[83, 84].

Sonuç olarak BMP-15 ve GDF-9, hem granüloza hücre farklılaşmasında ve hem de tüm oosit gelişimi ve embriyo kalitesine etkileri ile fertilité belirteçlerinde büyük bir öneme sahiptir. Foliküler sıvıda yüksek GDF-9 seviyeleri oosit nükleer matürasyon ve embriyo kalitesi ile ilgili olduğu görülmüştür [85]. Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde, BMP/GDF sisteminin; granüloza hücre gelişimi ve fonksiyonu kontrolünde, hücre-hücre haberleşmesinde, steroidogeneziste, oosit matürasyonunda, ovulasyonda ve luteolizde önemli bir yer aldığı gösterilmiştir.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları, Gruplandırma ve Uygulama

3.1.1. Deney hayvanları ve gruplandırma

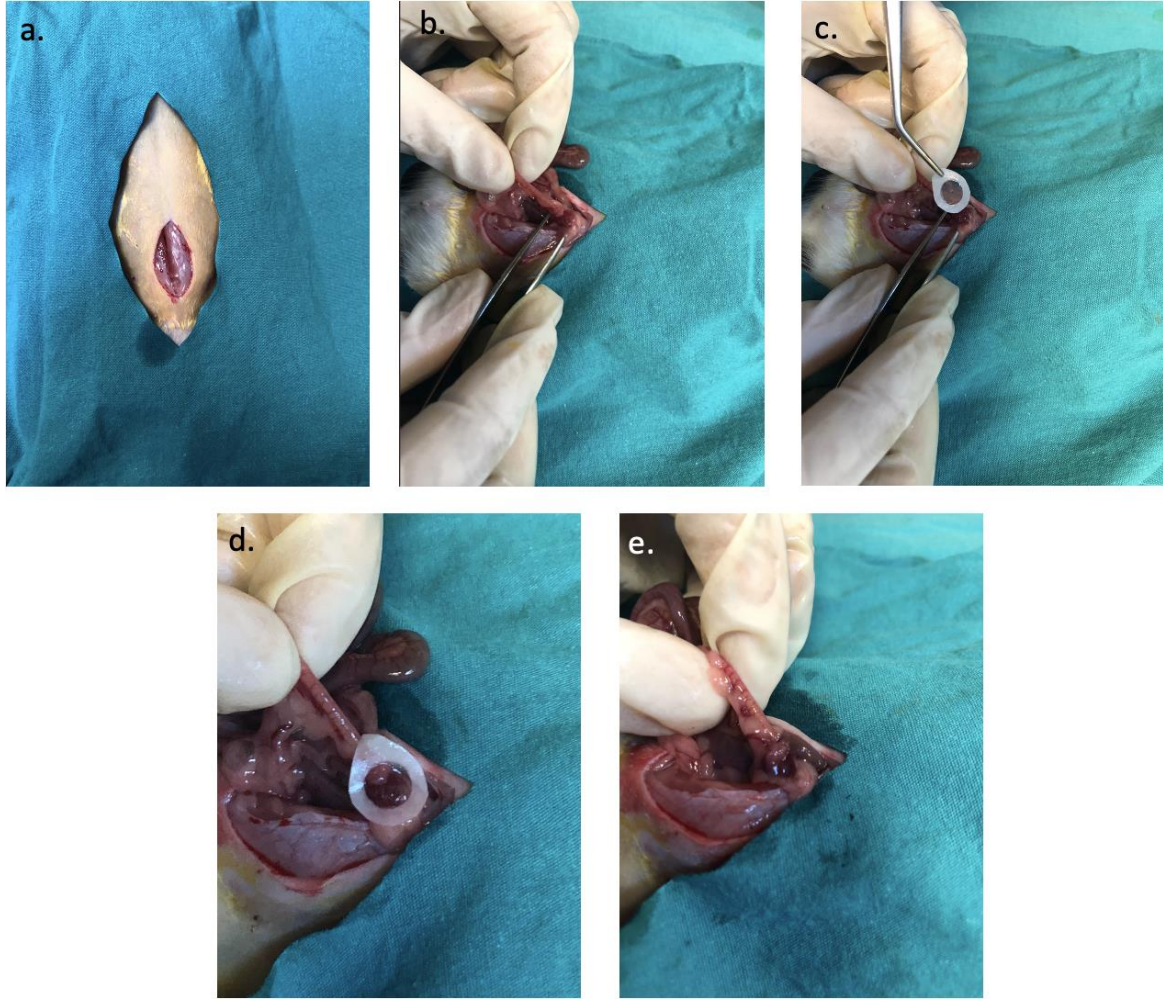
Bu çalışma için Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığından 21/12/2018-E.168939 tarih ve sayı ile etik kurulu onayı alındı. Deneyde kullanılan ratlar Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nden (GÜDAM) sağlandı. Gazi Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada 6-8 haftalık *Sprague Dawley* cinsi 40 adet fertil, dişi rat kullanıldı. Ratlar ortalama $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 12 saat aydınlık/karanlık döngüde, ad libitum içme suyu ve standart yem ile beslendi. Ratlardan rastgele seçim yapılarak aşağıda açıklanan 4 çalışma grubu oluşturuldu;

1.grup (Kontrol) (n=10): Intraperitoneal salin uygulandı, 1 hafta sonra laparotomi insizyonu yapıldı

2.grup (POY) (n=10): Intraperitoneal PBS içerisinde çözölmüş 200mg/kg siklofosfamid uygulandı, 1 hafta sonra laparotomi insizyonu yapıldı.

3.grup (POY+IV kök hücre) (n=10): Intraperitoneal PBS içerisinde çözölmüş 200mg/kg siklofosfamid uygulandı, 1 hafta sonra laparotomi insizyonu yapıldı ve kuyruk venlerinden 4×10^5 AKMKH hücre verildi.

4.grup (POY+CS) (n=10): Intraperitoneal PBS içerisinde çözölmüş 200mg/kg siklofosfamid uygulandı, 1 hafta sonra laparotomi insizyonu yapıldı, sağ overe 4×10^5 AKMKH den hazırlanan CS sarıldı. (Resim 3.1)



Resim 3.1. a. Tıraşlama, batikonla temizlik ve steril örtünme ardından orta hat insizyon b. overin batına girildikten sonra bulunması. c. Hücre tabasının penset ile tutularak over yüzeyine yaklaştırılması d. CSnin over yüzeyine oturtulması e. Altta ki koruyucu yapı çıkartılarak CSnin over yüzeyine sarılması.

3.1.2. POY modeli uygulamaları

POY oluşturmak için tek doz 200 mg/kg siklofosfoamid (Endoxan-Eczacıbaşı Baxter, Türkiye) serum fizyolojikte çözündükten sonra intraperitoneal olarak uygulandı [36]. POY oluşturduğumuzu gözlemlemek için uygulamadan 1 hafta sonra tüm ratlarda serum FSH düzeylerine bakıldı. Ayrıca her gruptan 1 er rat sakrifiye edilerek histolojik olarak POY kanıtlandı.

3.2. Kök Hücre Uygulamaları

3.2.1. CSlerin üretimi

CSlarının üretilmesinde askorbik asit uygulaması yöntemi kullanıldı (Yılmaz, 2020). CSlarında daha önce gerçekleştirilen bir çalışma kapsamında izole edilmiş ve karakterizasyon analizleri gerçekleştirilmiş AKMKH kullanıldı (Akdere ve ark., 2019). Hücreler izolasyon sonrasında TCPS kültür kaplarında %15 (v/v) fetal sığır serumu (FBS), %1 L-glutamin, %0,4 (v/v) penisilin/streptomisin (P/S), %0,2 (v/v) gentamisin ve %0,2 (v/v) amfoterisin B içeren α -MEM besi ortamında kültüre edildi. Ardından pasaj numarası 3/4 olan hücreler 12 gözlü kültür kaplarına 5×10^4 hücre/cm² yoğunlukta ekildi. Ertesi gün hücrelerin tabaka oluşumunu desteklemek için kültür ortamı 100 µg/mL L-askorbik asit 2-fosfat (AA2P) (Cayman Chem., USA) içeren ortam ile değiştirilerek kültüre devam edildi. Kültürün 4. gününde CSsı DPBS ile yıkama yapılarak kültür kabının kenarlarından başlanıp yüzeyden soyularak kaldırıldı ve basit pipetleme tekniği ile yeni 12 gözlü kültür kaplarına aktarıldı [86].

3.2.2. CSlerin karakterizasyonu

Üretilen CSlarının karakterizasyon çalışmaları kapsamında immünofloresan boyama analizleri ve canlı/ölü hücre boyama uygulamaları gerçekleştirildi.

İmmünofloresan boyama

Tabaka içerisindeki hücrelerin hücre iskeletindeki aktin filamentlerinin görüntülenmesi için immünofloresan boyama yöntemi kullanıldı. Boyama tekniğinde hücreler PBS ile 2 kez yıkandıktan sonra oda sıcaklığında %4 (w/v) paraformaldehite ile 30 dk etkin bırakılarak tespit edildi. Tespit sonrası 3 kez PBS ile yıkama yapıldı ve %0,1 (v/v) Triton X-100 (PBS içerisinde) ile 10 dk muamele yapılarak membran geçirgenliğinin arttırılması sağlandı. Ardından %1 (w/v) BSA çözeltisi (PBS içinde; PBS-A) ile 3 kez yıkama yapıldı, %1 (v/v) Alexa Fluor 488 Phalloidin konjuge anti-F-aktin antikoru ve %0,1 (v/v) DAPI içeren PBS-A çözeltisi ile karanlıkta 30 dk oda sıcaklığında inkübasyon yapıldı. Sonrasında antikor çözeltisi uzaklaştırıldı ve hücreler PBS-A ile 3 kez yıkanarak floresan mikroskop ile görüntüleme yapıldı.

Canlı/Ölü hücre boyama

CS yapısındaki kök hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi için etidyum homodimer-1 ve kalsein-AM boyaları kullanıldı. Hücrelerin kaldırma öncesi canlılıklarının incelenmesi için boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama prosedüründe hücreler oda sıcaklığında ve karanlıkta 2 μ M etidyum homodimer-1 ve 2 μ M kalsein-AM içeren boya çözeltisi (Ca^{+2} , Mg^{+2} içeren PBS içerisinde) ile 30 dk inkübe edildi. Ardından PBS ile yıkama yapılarak floresan mikroskop (Olympus, ABD) altında inceleme yapıldı.

Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi

Elde edilen CSlerin morfolojik yapılarının incelenmesi için SEM analizi gerçekleştirildi. Analiz öncesinde CSleri DPBS ile yıkandıktan sonra %2,5 (v/v) gluteraldehit çözeltisi ile 30 dakika tespit edilmeleri sağlandı. Ardından, örnekler 3 kez PBS ile yıkandıktan sonra analiz yapılana kadar 4°C'de %1 P/S içeren PBS içerisinde muhafaza edildiler. Analizden 1 gün önce örnekler etanol serisinde (sırası ile %10, %30, %50, %70, %90 ve %100, v/v) bekletilerek dehidrasyon işlemi gerçekleştirildi, ardından 5 dakika heksametildisilazan (HMDS) içerisinde bekletilen örnekler 1 gece boyunca çeker ocakta kurutuldu. Analiz günü örnekler altın-palladyum ile kaplandı ve görüntüleme gerçekleştirildi (Tescan, GAIA3+Oxford XMax 150 EDS).

CS lerin transplantasyona hazırlanması

Üretilen CSlerin deney hayvanına transplantasyonu sonrasında gerçekleştirilecek histolojik analizlerde belirlenebilmesi için hücrelerin 5-bromo-2'-deoksiüridin (BrdU) ile işaretlenmesi gerçekleştirildi. Bu amaçla transplante edilecek CSlerin üretilmesi aşamasında kültürün üçüncü gününde BrdU (BD Pharmingen, San Jose, CA) antikoru ile işaretleme yapıldı. BrdU stok çözeltisi 1/30 oranında hücre kültür ortamı ile seyreltilti. Sterilizasyon işlemi için çözelti 0.22 μ m filtreden geçirildi ve her bir CS üzerine 1250 μ L BrdU ilave edildi. Hücreler 37°C'de 3 saat BrdU ile inkübe edildikten sonra D-PBS ile yıkandı ve normal kültür ortamında kültüre devam edildi.

Transplantasyonun gerçekleştirileceği gün uygulanan cerrahi işlemler sonrası farelerin overleri açığa çıkarıldıktan sonra CSler PBS yıkaması ile yüzeyden kaldırıldı ve yeni steril 6 gözlü kültür kabına aktarıldı. Burada CSlerin over üzerine transplantasyonunu kolaylaştırmak için taşıyıcı destek membran kullanıldı. Poliviniliden florür (PVDF) membran filtre (Durapore®, Merck) CSyi kapsayacak boyutta kesildi, membranın orta bölümü CS serbest kalacak şekilde kesilerek çıkarıldı. Böylece CS membrandan kolay ayrılması için taşıyıcı membran halka formuna getirilmiş oldu. Transplantasyon sırasında destek membran, yüzeyden kaldırılan CSlerin üzerine dikkatlice yerleştirildi ve hücrelerin fiziksel olarak membrana yapışmaları için kısa süre bekletildi. Membran pens yardımı ile dikkatlice kaldırılarak CS farenin overi üzerine yerleştirilmiş oldu.

3.3. Deneyin Sonlandırılması

Süre bitiminde denekler 45 mg/kg, % 10'luk Alfamine (Seri no:1705176-01) ve 5 mg/kg, %2'lik Alfazyne (seri no:1610302-04, Hollanda) olacak şekilde anestezi uygulanarak intrakardiak kan alındı. Hormon analizi için alınan kan örnekleri -80°C'de ve ardından çıkarılan sağ over dokularının yarısı histolojik analizler için %10'luk nötral formaldehitte, yarısı da genetik analizler için -80°C'de saklandı.

3.4. BrdU Immunboyama Yöntemi

Deney gruplarına ait over dokusunda BrdU pozitif hücre varlığını göstermek için BrdU In-Situ Detection Kiti (BD Pharmingen™) kullanıldı. Deparafinizasyon sonrasında BD™ Retrieval A solüsyonu ile antijen retrieval işlemi gerçekleştirildi. Kesitler 5 dk 3' er kez PBS' de yıkandı, daha sonra anti-BrdU antikoru ile 1 saat inkübe edildi. Üç kez 2' şer dk PBS' de yıkanan kesitler, Streptavidin-HRP ile 40 dk inkube edildi. Tekrar PBS ile yıkandıktan sonra DAB ile muamele edilen dokular su ile yıkamaya alındı. Hematoksilen ile a boyandıktan sonra tekrar yıkanıp dehidrasyonun ardından ksilolde bekletildi. Kapama mediumu ile kapatılarak, Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli ışık mikroskopunda ve Leica Q Vin 3 (Germany) programında görüntüleme işlemi gerçekleştirildi.

3.5. Hematoksilen – Eozin Boyama

Ovaryumlarda gruplar arasında yapısal farklılıkları ışık mikroskopik düzeyde incelemek amacıyla, süre bitiminde alınan ovaryum dokuları % 10 nötral formalinde 72 saat tespit edildikten sonra rutin histolojik takip işlemlerinin geçirilerek parafin bloklar elde edildi. Hazırlanan parafin bloklardan 4-5 mikron kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler etüvde 63°C’de 2 saat deparafinize edildikten sonra % 100, % 96, % 80, % 70 % 50, azalan alkol serilerinden geçirildi. 10 dk akarsuda yıkandıktan ve alkol uzaklaştırıldıktan sonra Harris Hematoksilen solüsyonunda 10 dk tutuldu ve akar suya alındı. 10 dk akar suyun altında boyanın fazlası uzaklaştırıldı. Ardından % 1’lik HCl solüsyonunda 1-2 dip yapıldıktan sonra kesitler tekrar akar suda yıkandı. Lamlar fazla su uzaklaştırıldıktan sonra 10 dk Eozin solüsyonunda bekletildi. Fazla boyayı uzaklaştırmak için 10 dk akar suda yıkandıktan sonra kurutularak % 50, % 70, % 80, % 96, % 100 artan alkol serilerinden geçirildi ve suyun kesitlerden uzaklaştırılması sağlandı. 45 dk ksilolde bekletildikten sonra entellan ile kapatıldı. Elde edilen preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programı kullanılarak resimlendirildi.



3.6. İmmünohistokimyasal İnceleme

İndirekt immünohistokimya yöntemi kullanılarak folikülogenezisde önemli antikorların işaretlemesi yapıldı. Bu amaçla polilizinli lamlara alınan kesitler 1 gece 37°C deparafinize edildikten sonra etüv ısısı 57°C’ ye çıkarılarak 1 saat bekletildi. Camlar deparafinizasyonu tamamlamak için 2 kez 15’er dakika ksilolde tutulduktan sonra sırasıyla % 100’lük, % 96’lık, % 80’lik ve % 70’lik alkol serilerinden 10’ar dakika geçirilerek rehidratasyonları sağlandı. Ardından 2 kez 5’er dakika distile suda bekletilerek alkolden kurtarıldı. Doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak amacıyla mikrodalga fırında 1 M sitrat tamponunda (pH:6.0) (Thermo, ref: AP-9003-500, lot:MK17121, UK) 3x5 dk etkin bırakıldı ve oda ısısında 20 dk soğutulduktan sonra Pap pen ile kesitler sınırlandırıldı. Camlar % 3’lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılarak dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Daha sonra, camlar PBS, (Thermo, ref:AP-9009-10, lot:BB120127, UK) (pH: 7,4) ile yıkandı. Bundan sonraki aşamalara indirekt immünohistokimyasal kit (Novex Life Technologies, ref:859043, lot:1838146A, USA) ile devam edildi. Öncelikle özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi amacıyla Ultra V

Block uygulandı. Bloklama aşamasının ardından kesitler yıkanmadan anti-GDF 9 (1/200) (Bioss, 100 µl Rabbit Polyclonal Antibody, ref:bs-3759R, lot:980691W, USA), ve anti-BMP 15 (1/100) (Bioss, 100 µl Rabbit Polyclonal Antibody, ref:bs-6612R, lot: YE1214W, USA) primer antikorlarına bir gece +4⁰C’ da etkin bırakıldı. Süre sonunda dokular 3x3 dk PBS ile yıkandıktan sonra, 10dk biyotinli sekonder antikor uygulandı. Dokular, 3x3 PBS ile yıkanmasının ardından enzimin biyotine bağlanması amacıyla 10 dk streptavidin peroksidaz enzim kompleksine etkin bırakıldı. Lamlar tekrar 3x3 PBS ile yıkandıktan sonra kromojen DAB (3,3'diaminobenzidine) (ScyTek, ref:ACB060, lot:42454, USA) uygulanarak gözle görülebilen immün reaksiyonun açığa çıkması sağlandı. Zemin boyamasında Harris’in Hematoksileni (0B52Y092, Merck, Germany) kullanıldı. Sonrasında preparatlar hızlıca azalan alkol serilerinden geçirilerek kurutuldu ve 20 dk. ksilole etkin bırakılarak parlatılmaları sağlandı. Son olarak preparatlar entellan (Merck, lot:HX378130, Germany) ile kapatıldı. Hazırlanan preparatlar Leica DCM 4000 (Germany) bilgisayar destekli görüntüleme sisteminde, Leica Q Vin 3 programı kullanılarak resimlendirildi. İmmünohistokimyasal tutulumlar her bir antikor ve tüm denekler için değerlendirildi. H skor yöntemi ile gruplar arasındaki tutulum yoğunlukları hesaplandı. Gruplar arasındaki anlamlılık farkı ANOVA testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.

3.6.1. H-Skor hesaplanması

Ovaryum dokusundaki GDF-9 ve BMP-15 immünohistokimyasal tutulum yoğunluklarını belirlemek için, yarı-kantitatif immünohistokimya skorum yöntemi olan H-Skor kullanıldı; (0) immünreaktivite yok, (1) zayıf immünreaktivite, (2) orta şiddetli immünreaktivite (3) kuvvetli immünreaktivite, olarak kabul edildi. İki bağımsız gözlemci, protokole karşı kör olarak immünreaktiviteyi değerlendirerek ayrı şekilde skorladılar. Elde edilen sayısal veriler $H\text{-Skor} = \sum p_i (i + 1)$ formülü ile hesaplandı (i: immünreaktiviteyoğunluğu, P_i : immünreaktivite gösteren hücre yüzdesi).

3.7. Rat Ovaryum Dokusundan Total RNA’nın Elde Edilmesi

Deney sonunda steril bir şekilde çıkartılan ovaryum dokuları steril petri kabında, steril serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra, RNA izolasyonuna uygun (50mg- 100mg) büyüklüklerde

steril bistüri ile küçük parçalara ayrılarak, DNaz ve RNaz içermeyen 1.5 ml'lik ependorf tüplere alındı ve doku örnekleri hızlı bir şekilde sıvı azot içinde donduruldu. Ovaryum dokuları, analiz gününe kadar -80 °C'de saklandı. Doku örneklerinden RNA TRIzol kullanılarak aşağıda yazılı olan protokol ile total RNA eldesi gerçekleştirildi.

1.5 ml'lik ependorf tüp içinde bulunan 50-100 mg arasındaki ovaryum dokusu teflon uçlu homojenizatör yardımıyla homojenize edildi. Homojenizasyon işlemine 1000 µl TriFast ile devam edildi. Örnek hacminin, homojenizasyon sırasında kullanılan TriFast hacminin, %10'nu geçmemesine dikkat edildi. Örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra, 200 µl kloroform eklenerek 15 saniye boyunca vortekslendi ve 10 dakika oda sıcaklığında tutuldu. Ardından örnekler 11.000 rpm'de 5 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Santrifüj sonunda karışım, altta kırmızı faz (fenol kloroform fazı), ara faz ve üstte renksiz sıvı faz olmak üzere üç faza ayrıldı. Üst faz yeni bir steril 1.5 ml'lik ependorf tüpüne aktarıldı. 500 µl izopropanol eklenerek vortekslenen örnekler 10 dakika +4 °C'de bekletildi. 11.500 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildikten sonra, pelete dokunulmadan üstte kalan süpernatant atıldı. 1000 µl %75'lik alkol eklenerek, 12.000 rpm'de 10 dakika +4 °C'de santrifüj edildi. Pelete dokunulmadan üstte kalan süpernatant atıldı. Pelet kurumaya bırakıldıktan sonra üzerine 30-50 µl RNaz içermeyen steril distile su eklendi. Elde edilen RNA'ların miktarları ve saflığı "NanoDrop ND-1000 Spektrofotometre" cihazında ölçülerek RT-PCR'da kullanılabilecek kadar -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.8. Tamamlayıcı DNA (cDNA) Sentezi (RT-PCR)

Primer olarak Random Hekzamerler kullanılarak cDNA sentez kiti ile total RNA'dan cDNA sentezi gerçekleştirildi (cDNA sentezi sırasında kullanılan kimyasallar ve miktarları Çizelge 3.1'de verilmiştir). cDNA sentezi için Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) karışımı ince çeperli 0.2 ml'lik tüplere dağıtıldıktan sonra üzerlerine saflaştırılan total RNA eklendi.

Çizelge 3.1. cDNA RT-PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
Steril H ₂ O-PCR grade	-	RNA miktarına göre değişken
Reaksiyon Tamponu	1x (8mM MgCl ₂)	4 µl
dNTP	1mM	2 µl
Random hegzamer primeri	60 µM	2 µl
RNaz inhibitörü	20 ünite	0.5 µl
Ters Transkriptaz	10 ünite	0,5 µl
Total RNA	1 µg	1 µg olacak şekilde

3.9 RT-PCR için Otomatik Isı Döngüsü Programı

Otomatik ısı döngü cihazı, Çizelge 3.2’de belirtilen programa ayarlanarak elde edilen RNA’lardan cDNA sentezi elde edildi. Reaksiyon sonucunda elde edilen cDNA örnekleri Real-Time PCR’da kullanılıncaya kadar -20°C’lik derin dondurucuda saklandı.

Çizelge 3.2. Otomatik ısı döngü cihazında uygulanan program

	Sıcaklık	Zaman	Döngü sayısı
Primer Bağlanması	25 °C	10 dk	1 döngü
Ters transkripsiyon	50 °C	60 dk	1 döngü
İnaktivasyon	85 °C	5 dk	1 döngü
Soğutma	4 °C	-	1 döngü

3.10. Gen ifade Düzeylerinin Real-Time PCR Yöntemi ile Değerlendirilmesi

GDF-9 ve BMP-15 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin kantitatif değerlendirmesi Real-time PCR yöntemi ile Light Cycler™ (LC) cihazı kullanılarak belirlendi. Amplifikasyonlar 10 µl toplam tepkime hacmi içerisinde, cDNA, mRNA'ya özgü primerler, universal probe library (UPL) probu ve LC Probe Master karışımı kullanılarak gerçekleştirildi. GDF-9 ve BMP-15 gen ifadenme miktarlarını normalize etmek için elde edilen cDNA örnekleri, beta actin (ACTB) genine özgü primer ve UPL probu kullanıldı ve ACTB mRNA düzeyi referans olarak alındı. Seçilen genler ile ilgili özgün primer ve UPL prob listesi Çizelge 3.3’de

verilmiştir. Kullanılan problemler Roche Diagnostic'ten temin edilmiştir. Tüm cDNA örnekleri her bir gen için en az üçer tekrarlı olacak şekilde çalışılmıştır.

Çizelge 3.3. Gene özgü primer dizileri ve UPL prob numaraları

Gen adı	Forward Primer	Reverse Primer	UPL Prob Numarası
GDF-9	5'- ATACCGTCCGGCTCTTCAG -3'	5'- TTAAATAGCAGGTCCACCATTG -3'	3
BMP-15	5'- GCAATGAGGCTTCTCAGAGGT -3'	5'- AGTTGATGGCGGTAGACCA -3'	21
ACTB	5'-CCCGCGAGTACAACCTTCT-3'	5'CGTCATCCATGGCGAACT-3'	17

3.11 GDF-9, BMP-15 ve ACTB Genleri için Real-Time PCR Tepkime Karışımı

GDF-9, BMP-15 ve ACTB genlerine uygun verilen primer ve problemler kullanılarak Real-time PCR tepkimesi LC cihazında gerçekleştirildi. Tepkime karışımını hazırlamak için kullanılan bileşenler Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.4. GDF-9, BMP-15 ve ACTB Real-time PCR tepkime karışımı

	Son konsantrasyon	Hacim
dH ₂ O	-	6.2 µL
MgCl ₂ (25 mM)	4 mM	1.2 µL
Primer F (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µL
Primer R (10 pmol/µl)	2.5 pmol	0.25 µL
TaqMan prob (100 pmol/µl)	10 pmol	0.1 µL
LC TaqMan karışımı (10x)	1x	1 µL
cDNA	-	1 µL

3.12. Light-Cycler (LC) Deney Programı

Real-time PCR karışımları hazırlandıktan sonra kapiller tüplere dağıtıldı ve üzerine cDNA'lar eklendi. Kapiller tüpler 3000 rpm'de 10 sn santrifüj edildi. Tüpler cihaza yerleştirildikten sonra LC cihazında Çizelge 3.5'de belirtilen amplifikasyon programı kullanılarak PCR tepkimesi gerçekleştirildi. GDF-9, BMP-15 ve ACTB genleri için aynı PCR programı kullanıldı.

Çizelge 3.5. GDF-9, BMP-15 ve ACTB genlerinin ifade düzeylerinin belirlenmesi için kullanılan Real Time PCR tepkime programı.

Program 1. Ayrılma (Denatürasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	95	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10:00 dk	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	
Program 2. Primer Bağlanması ve Uzama (Hibridizasyon ve Polimerizasyon)		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	50	
Analiz Modu	Çoğalma	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	Kısım 2
Hedef Sıcaklık (°C)	95	60
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	10 sn	20 sn
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	10.0
Program 3. Soğutma		
Program Verisi	Değer	
Döngüler	1	
Analiz Modu	-	
Sıcaklık Hedefleri	Kısım 1	
Hedef Sıcaklık (°C)	40	
İnkübasyon zamanı (s:dk:sn)	30 sn	
Sıcaklık Geçiş Hızı (°C/sn)	20.0	

Reaksiyon sonucu deney gruplarına ait GDF-9, BMP-15 ve ACTB genlerinin mRNA ifade düzeylerini gösteren Crossing point (Cp) değerleri kullanılarak Pfaffl matematiksel metodu ile gruplar arasında mRNA ifade düzeylerindeki değişimler belirlendi. ACTB mRNA ifade düzeyi GDF-9 ve BMP-15 gen ifade düzeylerini normalize etmek amacı ile kullanıldı.

3.13. E2 (Östradiol) Ölçümü

Serum E2 düzeylerinin ölçümü için kan örnekleri; separator jel içeren, 13x100mm, 5mL'lik tüplere alınmıştır. Rat'lara ait tüpler santrifüj öncesinde 30 dk bekletildikten sonra 3000rpm'de 20 dakika boyunca soğuk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında elde edilen serumlar ependorfa aktarılarak analiz edildikleri güne kadar -80°C de saklanmıştır.

Çalışmada E2 düzeyleri ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) yöntemi ile ölçülmüştür. ELISA analizinde gerçekleştirilen yıkama işlemleri BİOTEK marka yıkama cihazı (ELx50 Bioelisa Washer, Bio-Tec. Instruments, Inc) ile, absorbans okumaları ise BİOTEK marka okuyucu (ELx800 UV Universal Microplate Reader, Bio-Tec. Instruments, Inc.) ile yapılmıştır.

Serum E2 düzeylerinin ölçümü Sunred marka Rat E2 ELISA Kit (Cat. No: 202301 Lot No: 202207) kullanılarak sandviç ELISA yöntemiyle yapılmıştır. Kitin alt ölçümü 3,112 ng/L, aralığı 5ng/L-900ng/L; kite ait CV değeri çalışma içi (Intra-assay): CV <9%, çalışmalar arası (Inter-Assay) CV<11% olarak verilmiştir.

Çalışma kit prospektusundaki talimatlar dikkate alınarak gerçekleştirilmiştir. Standart ve numunelere ait absorbanslar 450 nm dalga boyunda ölçülmüştür. Standartların konsantrasyonları ve absorbans değerleri ile çizilen standart eğrisinden elde edilen formül kullanılarak numunelerdeki konsantrasyonlar hesaplanmıştır. Daha sonra standart eğrisinden elde edilen konsantrasyonlar sonuç olarak E2 için ng/L cinsinden sunulmuştur.

3.14. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Verilen normal dağılıma sahip olup olmadıkları Shapiro-Wilk testi ile incelendi. Folikül sayılıralı ve H skoru için gruplar ANOVA testi ile karşılaştırıldı. Grupların ikili

karşılaştırılmaları student t-test ile yapıldı. Normal dağılım göstermeyen E2 verilerinin gruplar arası karşılaştırılması Mann Whitney U testi ile yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verildi. İstatistiksel analizler IBM SPSS statistics 21 (IBM, Corp, NA, USA) programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasında değişen GDF-9 ve BMP-15 mRNA ifade düzeylerindeki farklılıklar “Relative Expression Software Tool (REST; Qiagen, 2009 V2.0.13)” istatistik programı ile karşılaştırıldı [87]. 0.05’den küçük olan p değerleri ($p < 0.05$) istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi.





4.BULGULAR

4.1. CS Karakterizasyon Bulguları

4.1.1. Makroskopisi

CSlerin makroskopik fotoğrafı Şekil 4.1d’de verilmiştir. Hücreler bir yüzeye tutunmadan serbest formda bulunduklarında TCPS yüzeyine yayıldıkları gibi geniş alan kaplamazlar, 3 boyutlu küresel formlarına dönerler. Bu nedenle fotoğrafta görüldüğü gibi CS üretildiği kültür kabının yüzeyinden kaldırıldığında kültür kabının yüzey alanından daha küçük bir tabaka oluşturmaktadır.

4.1.2. İmmünofloresan boyama

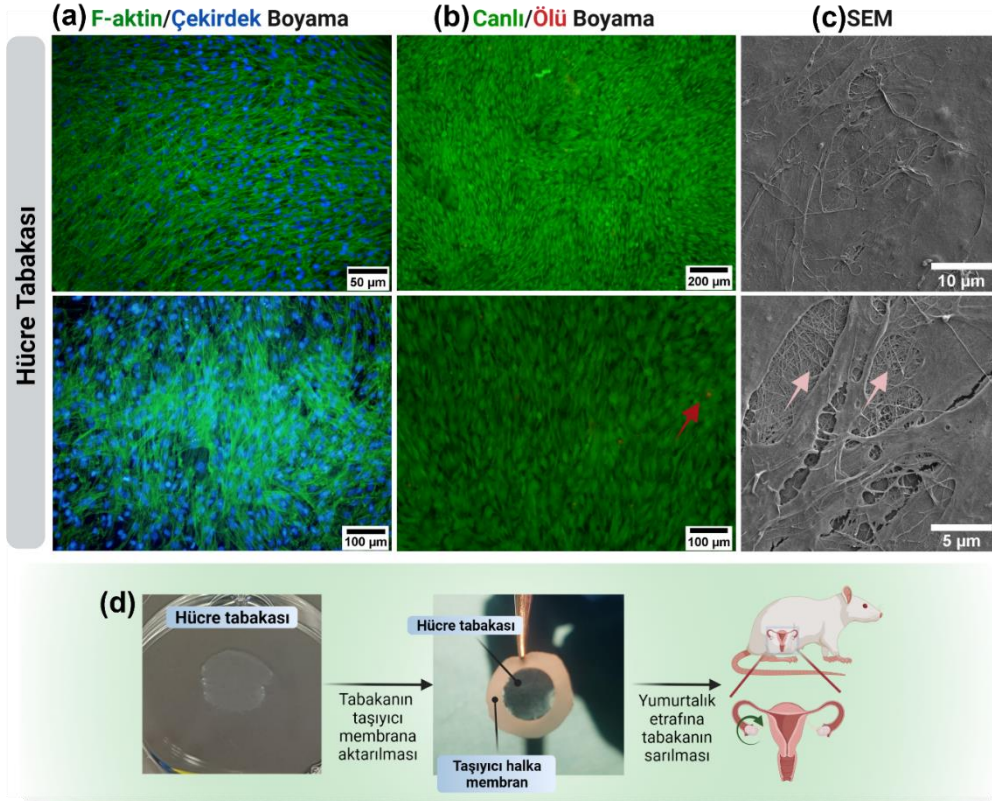
CSyi oluşturan AKMKH’lerin çekirdek ve hücre iskeletindeki F-aktin yapısının incelenmesi için gerçekleştirilen immünofloresan boyama sonuçları Şekil 4.1a’da gösterilmiştir. Fotoğraf incelendiğinde hücrelerin çekirdeklerinin mavi, F-aktin filamentlerinin ise yeşil renkli işaretlendiği görülmektedir. Yoğun DAPI boyanması hücrelerin tabaka içerisinde fazla miktarda çoğalmış olduklarını göstermektedir. F-aktin boyamaları ise hücre iskeletinin tabaka içerisindeki yönelimini göstermektedir.

4.1.3. Canlı/Ölü hücre boyama

CS yapısındaki hücrelerin canlılıklarının belirlenmesi için gerçekleştirilen analizde canlı hücrelerin sitoplazmaları yeşil, ölü hücrelerin çekirdekleri ise kırmızı renkte gözlenmektedir (Şekil 4.1b). Kullanılan boyalardan kalsein AM, canlı hücre bünyesinde esterase aktivitesi ile kalseine dönüşmekte ve yeşil floresan ışıma vermektedir. Etidyum homodimeri ise ölü hücrelerdeki membran bütünlüğünün bozulması sonucu nükleik asitlere bağlanıp kırmızı floresan ışıma vermektedir. Fotoğraflar incelendiğinde hücrelerin tabaka içerisinde canlılıklarını yüksek oranda korudukları belirlenmiştir. Ölü hücre çekirdeği kırmızı ok ile belirtilmiştir.

4.1.4. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizi

Üretilen tabakların morfolojik özelliklerinin incelenmesi için gerçekleştirilen SEM analizi sonucunda alınan fotoğraflar Şekil 4.1c’de verilmiştir. Fotoğraflar detaylı incelendiğinde hücrelerin birbirleri ile olan yakın etkileşimleri gözlenmektedir. Yüksek büyütmede artan ECM yapısı ile hücrelerin ürettiği kollajen fibril yapıları oklar ile gösterilmiştir.

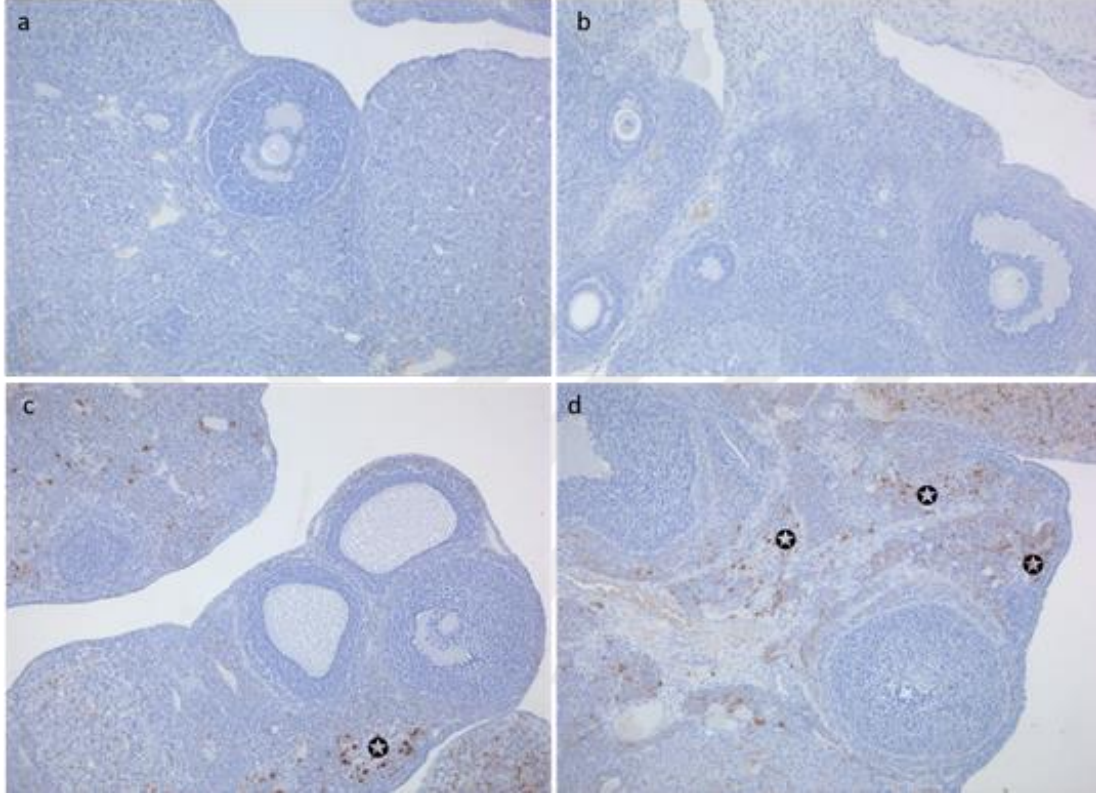


Şekil 4.1. AKMKH tabaklarına ait **a.** İmmüno Floresan boyama fotoğrafları (40X, bar 50 µm ve 20X, bar 100 µm), **b.** Canlı/ölü hücre boyama fotoğrafları (10X, bar 200 µm ve 20X, bar 100 µm), ok ile ölü hücre çekirdeği gösterilmiştir. **c.** SEM analizi fotoğrafları (4,000X, bar 10 µm ve 10,000X bar 5 µm), ok ile artmış ECM içerisindeki fiber yapıları gösterilmiştir. **d.** CSlerin in vivo transplantasyon aşamasının şematik gösterimi.

4.2. BrdU Boyanma Sonuçları

Verilen kök hücrelerin over dokusunda varlıkları ve lokalizasyonlarını göstermek amacıyla yapılan BrdU boyamasında kontrol ve POY gruplarında, beklenildiği üzere, hiçbir tutulma görülmemiş olup, tutulum IV ve CS gruplarında belirgin olarak saptanmıştır (Resim 4.2). Tüm over kesitlerinde yapılan histolojik gözlemde CS uygulanan grupta kök hücre sayısının IV grubuna kıyasla göreceli fazla olduğu düşünülmüştür. Bu bulgu direkt over yüzeyinden

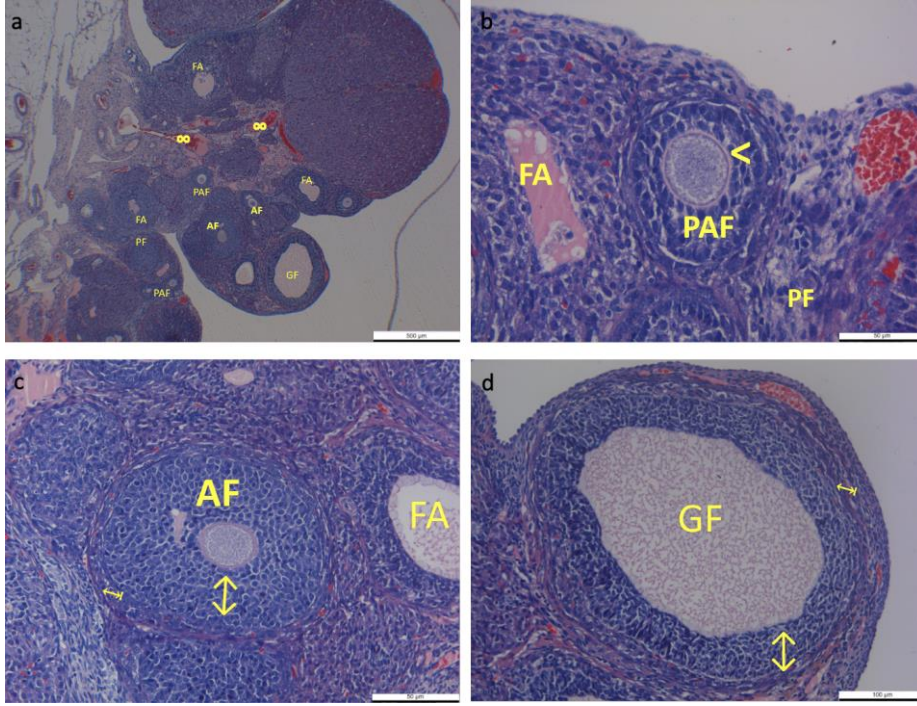
yapılan uygulamanın kök hücre yoğunluğu açısından sistemik uygulamaya karşın daha etkin olduğunu düşündürmüştür. Kök hücre verilen her iki grupta da kök hücrelerin stromada dağılım gösterdiği belirlenmiştir. Bu sonuç, kök hücrelerin parakrin mekanizma ile folikülogenezi etkilemiş olabileceği hipotezini desteklemektedir.



Resim 4.2. BrdU boyama yöntemi ile kesitlerde kök hücre varlığının gösterilmesi. a. Kontrol grubu, b. POY grubu, c. POY + IV verilen AKMKH grubu, d. POY + Cell sheet ile verilen AKMKH grubu. (★): BrdU pozitif hücreler (BrdU-H X100).

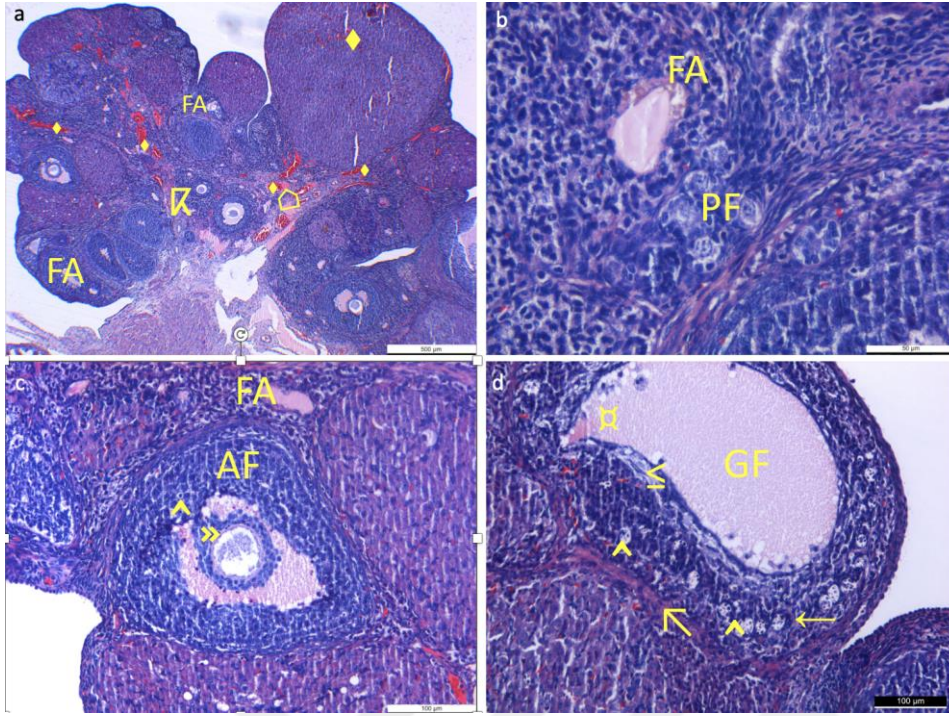
4.3. Hematoksilen – Eosin Bulguları

Kontrol grubu over dokusunda yapılan ışık mikroskopik incelemede küçük büyültmede kortekste farklı gelişim aşamalarındaki foliküller normal yapıları ile izlendi. Medulla bol kan damarı içeren bağ doku karakterindeydi (Resim 4.3a). Büyük büyültmeli incelemelerde tek katlı yassı folikül hücreleri ile çevrili primordiyal folikül ile, zona pellusidası düzenli ve belirgin olan preantral folikül ve gelişim sırasındaki fizyolojik süreçte atreziye giden folliküller izlendi (Resim 4.3b). Antral ve Graaf foliküllerinde de granüloza katmanı normal görünümde ayırt edildi, teka katmanları belirgin şekilde izlendi (Resim 4.3c-d).



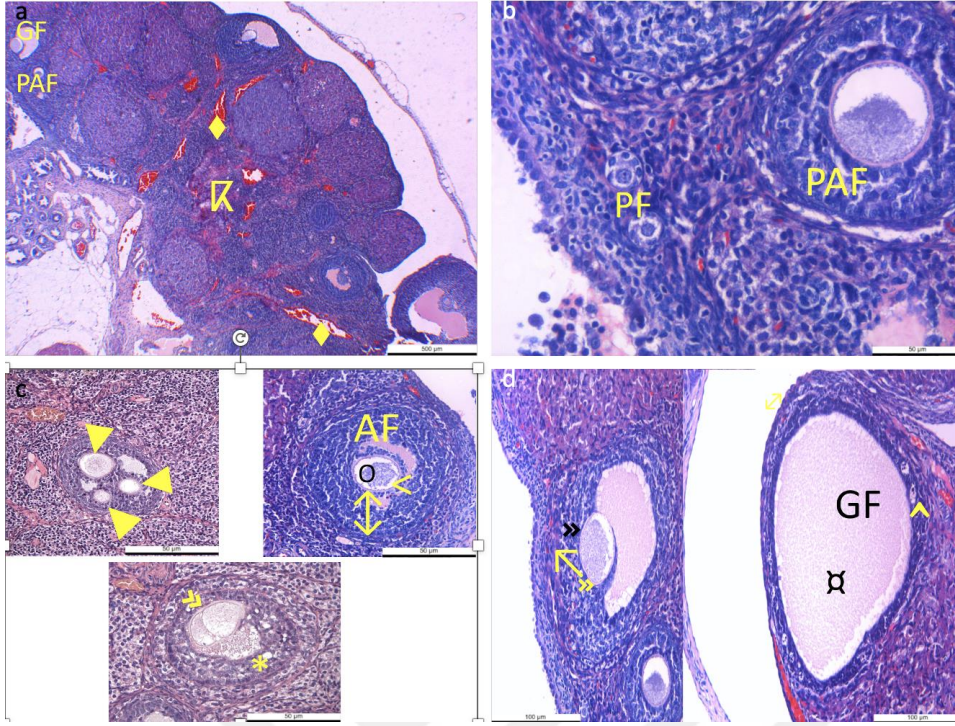
Resim 4.3. Kontrol grubu over kesiti. **a.** küçük büyültmede panoramik görüntü, **b.** büyük büyültmede preantral folikül (PAF), **c.** büyük büyültmede antral folikül (AF), **d.** büyük büyültmede Graaf folikülü (GF). (PF): Primordiyal follikül, (FA): foliküler atrezi, (∞): kan damarları, (<): zona pellusida, ($\updownarrow$): granüloza katmanı, ($\uparrow$): teka interna (H-E. a- X40, b,c- X400, d- X200)

Siklofosfamid ile POY oluşturulan grupta over dokusunda yapılan küçük büyültmeli incelemelerde en belirgin değişim kan damarlarında yoğun dilatasyon olarak izlendi; damarların kortekste interfoliküler alanda ve korpus luteum içinde dilate görünüşleri oldukça dikkat çekiciydi, ek olarak medular damarlarda konjesyon belirgindi. Küçük büyültmede dahi ayırt edilebilen foliküler atrezi bu grubun diğer önemli morfolojik bulgusuydu; antral ve Graaf foliküllerinin büyük çoğunluğunda atrezi ile uyumlu morfolojik değişimler ayırt edildi. Perifoliküler alanda fibrozis de dikkati çekti (Resim 4.4a). Büyük büyültmeli incelemelerde primordial foliküllerin normal histomorfolojik özellikte olduğu görülürken, preantral foliküllerde atrezi belirgin olarak izlendi (Resim 4.4b). Benzer şekilde antral foliküllere ait zona pellusidada duplikasyon ve foliküler katmanda apoptotik hücrelerin varlığı ile atrezi görüldü (Resim 4.4c). Bu grupta Graaf folikülleri değerlendirildiğinde, kesitlerde gözlenenlerin tümünde histomorfolojik deformasyonlar ilgiyi çekti. Çoğunun atreziye gittiği belirlenirken, atretik olmayan foliküllerde de antrumun düzeninin bozulduğu, folikül şeklinin dairesel formda olmadığı dikkati çekti. Granüloza katmanına invaze fibrotik yapı belirgindi. Foliküler katmanda yoğun apoptotik cisimler ile fibrotik teka yapısı atrezinin göstergesi olarak izlendi (Resim 4.4d).



Resim 4.4. Siklofosfomid ile POY oluşturulan grupta over kesiti. **a.** küçük büyültmede panoromik görüntü, **b.** büyük büyültmede atreziye uğramış (FA) preantral folikül, **c.** büyük büyültmede antral folikül (AF), **d.** büyük büyültmede Graaf folikülü (GF). (△): medullar damarlarda konjesyon, (◆): kan damarlarında dilatasyon, (K): perfoliküler alanda fibrosis, (»): zona pellusida duplikasyon, (^): apoptotik hücre, (←): invaze fibrotik doku, (^): fibrotik teka, (⊠): antrumda şekilsel -deformasyon (H.E., a- X40, b-X400, cX200, d-X400)

Siklofosfamid ile POY oluşturulan ve teröpatik IV yolla sistemik olarak AKMKH uygulanan grupta over dokusunda yapılan küçük büyültmeli incelemede çeşitli gelişim evresindeki foliküller izlendi. Damar dilatasyonu ve fibrozisin bu grupta da devam ettiği belirlendi (Resim 4.5a). Büyük büyültmeli incelemelerde primordiyal foliküller ile preantral foliküller olağan histomorfolojik özellikleri ile izlendi (Resim 4.5b). Antral foliküllerde histomorfolojik özellikleri farklı foliküller belirlendi; bir grup antral folikülde granüloza hücre katmanı, oosit ve zona pellusida normal yapıda izlenirken, bir grubunda zona pellusidada duplikasyon ve granüloza katmanında ödem ilgiyi çekti. Bu grupta en belirgin bulgu çoklu oosit gözlenen antral foliküldü. Genetik materyalin değişim gösterdiği bu tip folikül bu gruba özgü olarak saptandı. Bu bulgu mutasyon sorusunu akla getirdi. (Resim 4.5c). Graaf foliküllerinde ise histomorfolojik görünüm POY oluşturulan gruba benzerdi; zona pellusidada kalınlık farkı, foliküler katmanda apoptotik cisimcikler ve fibrotik teka oldukça dikkat çekiciydi Bu grupta bir grup Graaf folikülü PKOS'u taklit eder şekilde geniş antrum ve incelmış granüloza katmanı ile ayırt edildi (Resim 4.5d).

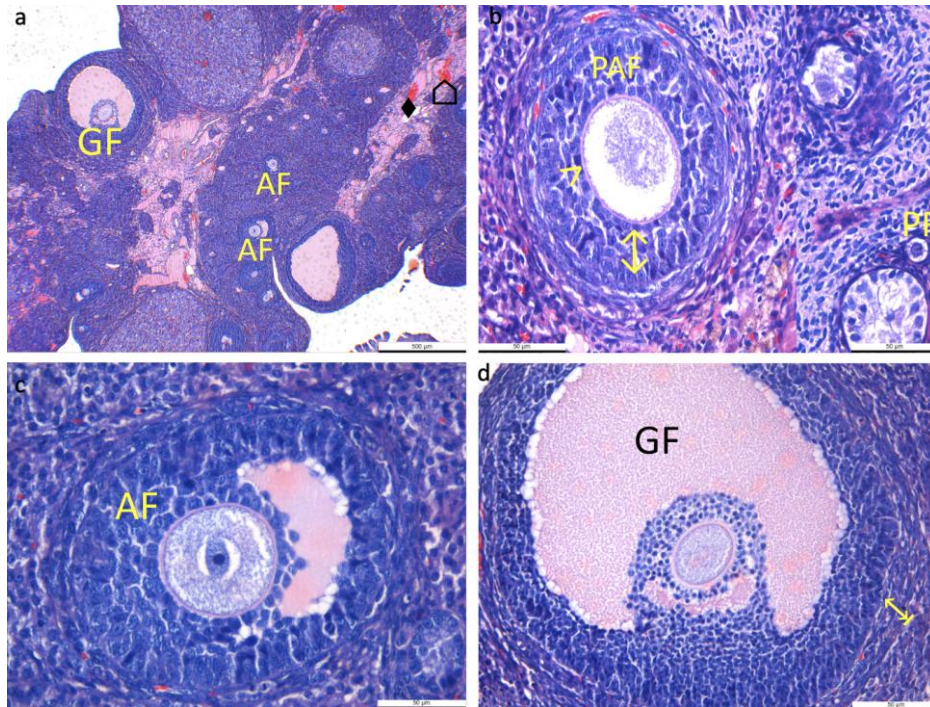


Resim 4.5. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik intravenöz yolla sistemik olarak adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti **a.** küçük büyültmede panoramik görüntü, **b.** büyük büyültmede preantral folikül (PAF), **c.** farklı histomorfolojik özellik gösteren antral foliküller (AF), **d.** farklı histomorfolojik özellik gösteren Graaf folikülleri (GF). (♦): kan damarlarında dilatasyon, (K): fibrosis, (PF): primordiyal folikül (↓): granüloza katmanı, (*): granüloza katmanında ödem; (O): oosit, (<): zona pellusida, (»): zona pellusida duplikasyon, (»): zona pellusida kalınlık farkı (◀): bir folikül içerisindeki çok sayıda oosit, (△): apoptotik cisimcikler, (↖): Graaf folikülünde fibrotik teka, (⊖): antrum (H-E a-X40, bX400, c ve d – X200).

Siklofosfamid ile POY oluşturulan ve teröpatik CS ile lokal olarak AKMKH verilen grupta over dokusunda yapılan küçük büyültmeli incelemelerde çeşitli gelişim evresindeki foliküller olağan görünüşleri ile izlenirken, özellikle medullada dilatasyon ve konjesyon ilgiyi çekti. Morfolojik anomalisi olan foliküllere ve fibrotik stroma yapısına bu grupta rastlanmadı (Resim 4.6a). Büyük büyültmeli incelemelerde primordiyal foliküller normal histomorfolojik yapıda izlenirken, preantral foliküllerin geneli de normal zona pellusida ve foliküler hücre katmanı ile olağan morfolojide saptandı (Resim 4.6b). Antral (Resim 4.6c) ve Graaf folikülleri (Resim 4.6d) büyük büyültmede incelendiğinde, tüm bileşenleri ile foliküllerin olağan yapıda oldukları ve teka katmanlarının belirgin olduğu ayırt edildi.

Hematoksilen-Eozin boyama yöntemi ile yapılan ışık mikroskopik değerlendirmelerde, siklofosfamid ile POY oluşturulan grupta, kontrol grubuna karşın yaygın foliküler atrezi en dikkat çekici bulguydu. Preantral ve antral foliküllerin çoğunda atrezi ile uyumlu

histopatolojik değişiklikler izlendi. Graaf foliküllerinde ek olarak teka katmanında fibrozis belirgindi. Medullar damarlarda konjesyon ve dilatasyon belirgindi. Deneysel POY grubuna IV AKMKH uygulanan grupta, foliküler atrezinin göreceli azaldığı; özellikle preantral foliküllerde yaygın olmadığı ilgiyi çekti. Ancak bu grupta çoklu oosit içeren antral foliküller belirgindi. Graaf foliküllerindeki fibrotik teka görünümü de bir önceki grup ile aynıydı. Medullar damarlarda konjesyon ve dilatasyon bu grupta da belirgindi. Deneysel POY grubuna CS yöntemi ile AKMKH uygulanan grupta tüm foliküllerin genel olarak normal histomorfolojik yapıya sahip oldukları ve az sayıda preantral folikülde atrezinin olduğu izlenirken, fibrotik teka katmanına bu grupta rastlanmadı.

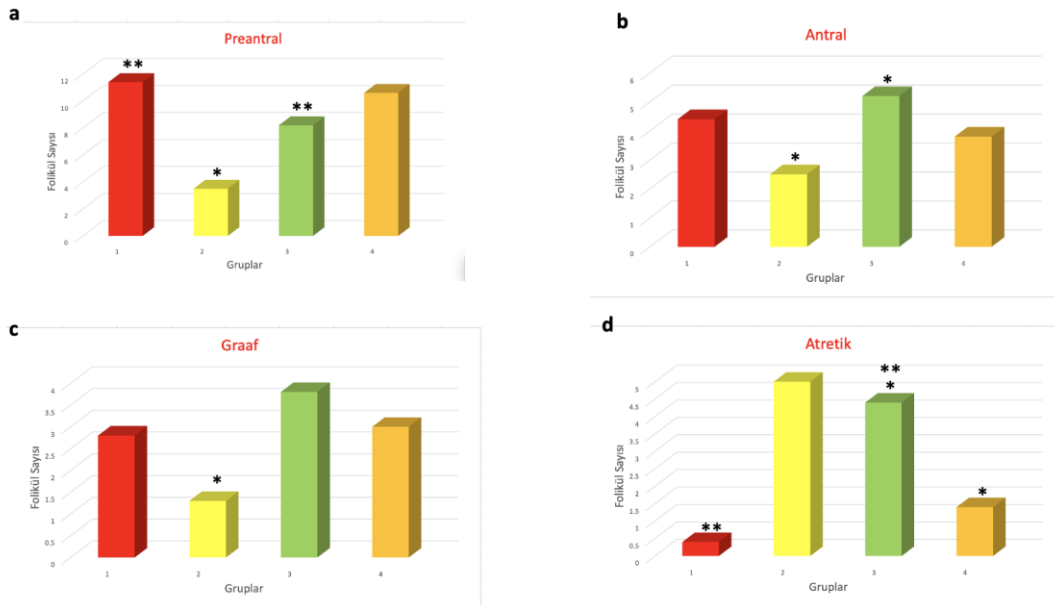


Resim 4.6. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik cell sheet yöntemi ile adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti **a.** küçük büyültmede panoromik görüntü, **b.** b y  k büyültmede preantral folikül (PAF), **c.** b y  k büyültmede antral follikül (AF), **d.** b y  k büyültmede Graaf follikül (GF), ( ): medullar damarlarda konjesyon, ( ): kan damarlarında dilatasyon, (PF): Primordiyal folikül, (<): zona pellusida, ( ): granüloza katmanı, ( ): teka katmanı (H-E, a- X100, b-c-d X400).

Son   olarak deneysel POY modelinde tüm deneklerin ovaryum foliküllerinde preantral ve antral evrede yaygın atrezi izlendi. IV AKMKH ile uygulanan kök hücre tedavisinin atreziiyi kısmen gerilet tiği izlenirken, çoklu oositli foliküller belirlendi. CS yöntemi ile kök hücre uygulanan grupta ise foliküllerin genelinde normal yapı görüldü.

4.3.1. Folikül sayıları

Gruplar arasında preantral folikül sayımı açısından POY grubu ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). Aynı istatistiki fark kontrol grubu ile POY+IV MKH tedavisi alan grup arasında bulunsa da ($p=0.014$), kontrol grubu ile CS grubu arasında preantral folikül sayıları benzer bulunmuştur. Antral folikül için POY grubunda sayı en düşük bulunmuş olup, istatistiki açıdan tek fark POY grubu ile POY+IV MKH arasında tespit edilmiştir ($p=0.01$). Graaf folikül açısından her ne kadar POY grubunda en düşük folikül sayısı bulunsa da, istatistiki açıdan tek fark POY grubu ile diğer gruplar arası bulunmuştur ($p<0.05$). Atretik foliküller için, en fazla atrezi POY grubunda tespit edilmiş, sonrasında POY+IV MKH bulunmuştur. Kontrol grubu ile POY+CS grubu arasında fark bulunmamıştır (Şekil 4.2).



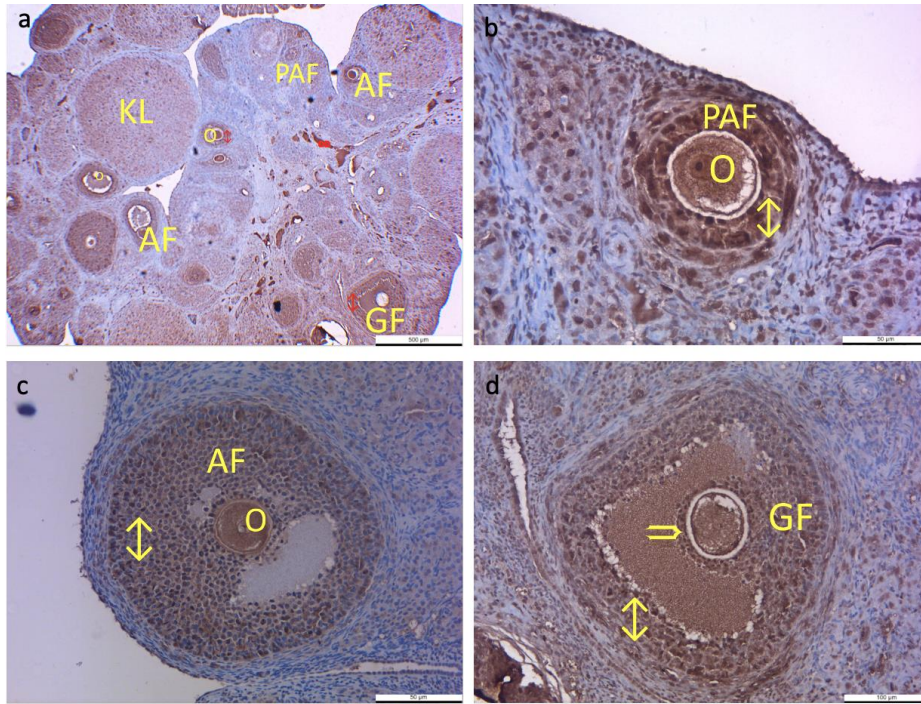
*, ** $p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir

Şekil 4.2. Gruplardaki ortalama ve istatistiki anlamı gösteren grafik a. preantral folikül b. antral folikül, c. Graaf folikülve d. atretik folikül sayıları

4.4. GDF-9 İmmünohistokimyasal Bulguları

Kontrol grubunda yapılan immünohistokimyasal değerlendirmeye ait küçük büyültmeli incelemelerde ovaryumda korteks ve medulla normal histomorfolojik yapısıyla ayırt edildi. Kortekste preantral, antral ve Graaf folikülleri ile korpus luteum yapıları izlenirken, medulla içerdiği bol kan damarları ile olağan görünümdeydi. GDF-9 immünreaktivitesi tüm aşamadaki

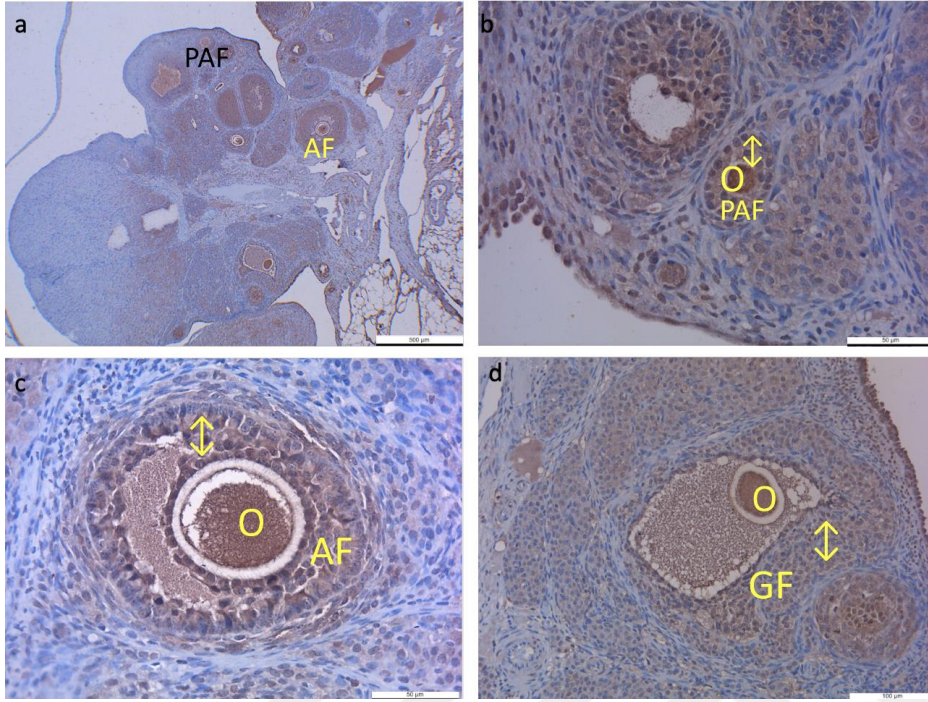
folliküllerde; hem oosit hem de granüloza katmanında belirgindi (Resim 4.7a). Büyük büyültmeli incelemelerde preantral foliküllerde; oosit ve granüloza hücrelerinde kuvvetli tutulum izlendi (Resim 4.7b). Antral foliküllerde oositte orta dereceli tutulum izlenirken, granüloza katmanında zayıftan ortaya değişen GDF-9 reaktivitesi ilgiyi çekti (Resim 4.7c). Graaf foliküllerinde ise oositte kuvvetli GDF-9 reaktivitesi belirlenirken, granüloza katmanında tutulumun değişkenlik gösterdiği; korona radiatada yoğunken, özellikle bazal membrana komşu hücre katmanlarında orta dereceli olduğu saptandı. (Resim 4.7d).



Resim 4.7. Kontrol grubu over kesiti. **a.** küçük büyültmede panoramik görüntü **b.** büyük büyültmede preantral folikül (PAF), **c.** büyük büyültmede antral folikül (AF), **d.** büyük büyültmede Graaf folikülü (GF). (KL): korpus luteum, (∞): kan damarları, (O): oosit, ($\updownarrow$): granüloza katmanı, ($\wedge$): bazal membrana komşu hücre katmanlarında orta dereceli tutulum. (GDF-9. a-4X10, b,c-40X10,d-20X10).

Siklofosfamid ile POY uygulanan grupta yapılan GDF-9 immünohistokimyasal değerlendirmesinde tutulum tüm gelişim aşamasındaki folliküllerde görülürken, yoğunluğun kontrol grubuna karşın daha düşük olduğu gözlemlendi (Resim 4.8a). Bu gruba ait büyük büyültmeli incelemede preantral folliküllerde oosit tutulumunun kuvvetli olduğu ayırt edilirken, granüloza katmanında GDF-9 immünreaktivitesinin kontrol grubuna karşın daha az olduğu gözlemlendi; orta dereceli reaktivitenin varlığı belirgindi (Resim 4.8b). Antral folliküllerde oosit tutulumu kuvvetli iken, özellikle bazal membran üzerine oturan granüloza hücrelerinde zayıf, diğer katman hücrelerinde ise orta dereceli GDF-9 tutulumu ayırt edildi

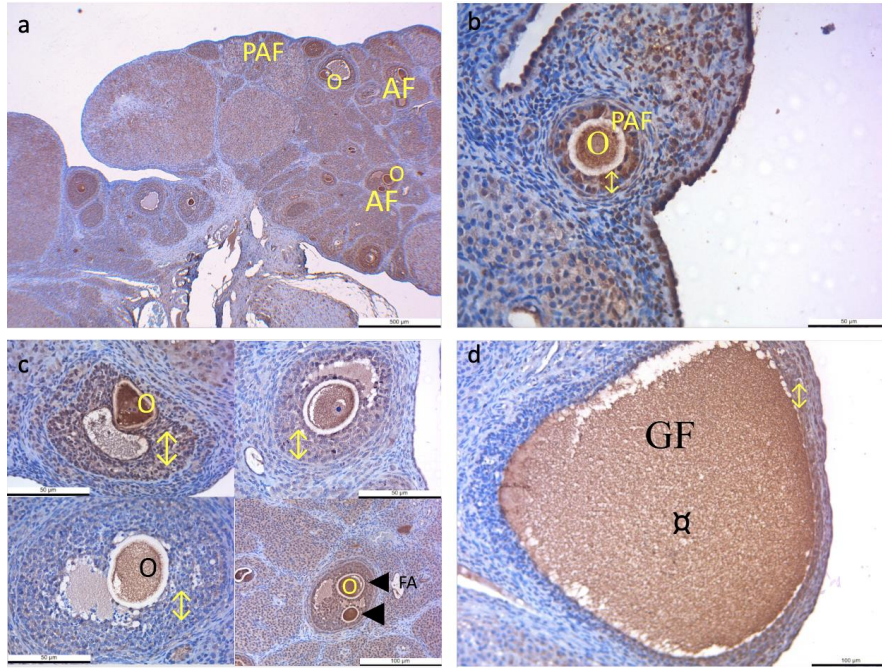
(Resim 4.8c). GDF-9 immünreaktivitesinin Graaf follikülüne ait oositte orta dereceli, granüloza katmanında ise zayıf olduğu görüldü (Resim 4.8d).



Resim 4.8. Siklofosfomid ile POY oluşturulan grupta over kesiti. **a.** küçük büyültmede panoramik görüntü **b.** büyük büyültmede preantral folikül (PAF), oositte kuvvetli tutulum (O), granüloza hücrelerinde zayıf tutulum ($\updownarrow$) **c.** büyük büyültmede antral folikül (AF), oositte kuvvetli tutulum (O), granüloza hücrelerinde zayıftan orta dereceye değişen tutulum ($\updownarrow$) **d.** büyük büyültmede Graaf folikülü (GF)ne ait oositte (O) orta dereceli, granüloza katmanında ($\updownarrow$) ise zayıf olduğu görüldü (GDF-9, a-4X10, b-40X10, c-40X10, d-20X10).

Siklofosfamid ile POY oluşturulan ve IV AKMKH uygulanan grupta yapılan küçük büyültmeli incelemede genel olarak kortekste foliküller ve medullada normal yapıda bağ dokusu izlendi. GDF-9 tutulumunun kontrol grubuna yakın, foliküllerin genelinde hem oosit hem de granüloza katmanında olduğu belirlendi (Resim 4.9a). Yapılan büyük büyültmeli incelemede preantral foliküllerde oosit ve granüloza hücrelerinde orta dereceli GDF-9 immünreaktivitesi belirlendi (Resim 4.9b). Bu grupta antral foliküllerde değişik histomorfolojik görünüm ilgiyi çekti. Kesitlerde gözlenen antral foliküllerin antruma yakın apoptotik cisimcikler içeren granüloza katmanına sahip oldukları, bu tip foliküllerde oositte orta dereceli GDF-9 tutulumu belirlenirken, granüloza katmanında negatiften zayıfa değişen bir immünreaktivite izlendi. Bir grup folikülde çift oosit, ya da oositte çift nukleolus izlendi. Bu tip olası genetik deformite içeren foliküllerde oositlerde tutulum kuvvetli iken, granüloza katmanında zayıftan ortaya değişiyordu. Normal histomorfolojiye sahip az sayıda antral

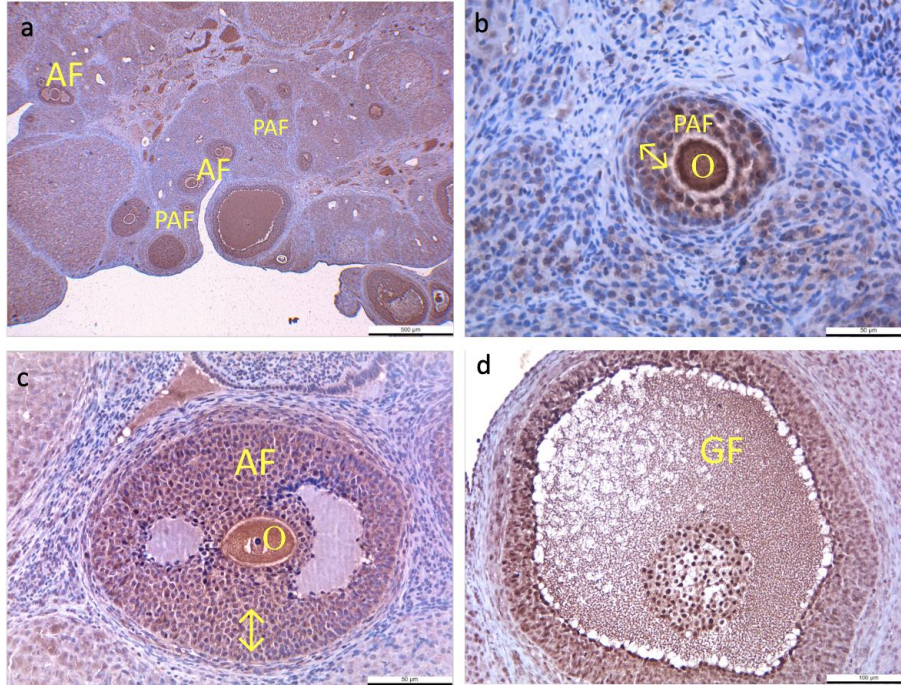
folikülde ise GDF-9 immünreaktivitesi oositte orta dereceli, granüloza katmanında ise zayıf olarak belirlendi. Bu bulgular ışığında apoptotik morfolojideki foliküllerde GDF-9 ekspresyonunun azaldığı, ancak olası genetik anomali olan foliküllerde ise aynı grubun sağlıklı foliküllerine göre arttığı sonucuna varıldı (Resim 4.9c). Bu grupta Graaf folikülleri PKOS'u taklit eder şekilde geniş antrum ve incelmış granüloza katmanı ile ayırt edildi. Oosit tutulumu da diğer foliküllere eşdeşti. Granüloza katmanında GDF-9 ekspresyonu negatiften zayıfa değişiyordu. (Resim 4.9d).



Resim 4.9. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik intravenöz yolla sistemik olarak adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti **a.** küçük büyültmede panoromik görüntü, hem oosit (O) hem de granüloza katmanında kontrol grubuna yakın tutulum (⇕) olduğu belirlendi **b.** büyük büyültmede preantral folikül (PAF), oosit (O) ve granüloza hücrelerinde (⇕), orta dereceli GDF-9 immünreaktivitesi belirlendi, **c.** Folliküler atrezi (FA), oositlerde kuvvetli tutulum (O), granüloza katmanında zayıftan ortaya değişen tutulum (⇕), antral folikülde (AF), ise oositte (O), orta dereceli, granüloza katmanında ise zayıf (⇕) tutulum, apoptotik morfolojideki foliküllerde tutulumda azalma, ancak olası genetik anomali olan foliküllerde ise aynı grubun sağlıklı foliküllerde tutulumda ki artış **d.** PKOS' u taklit eden Graaf folikül (GF), geniş antrum (α) ve incelmış granüloza katmanı (⇕) ve bu katmanda negatiften zayıfa değişen tutulum (GDF-9, a-4X10, b,c,d-40X10, c-20X10).

Siklofosfamid ile POY oluşturulan ve CS yöntemi ile AKMKH uygulanan grupta yapılan küçük büyültmeli incelemede ovaryum korteksinde gelişim aşamalarındaki foliküller ve medulla normal yapılarında izlendi. GDF-9 ekspresyonu foliküllerin tümünde izlendi,

tutulum yoğunluğu kontrol grubuna eşdeğer görünümdeydi (Resim 4.10a). Preantral foliküllerde oosit tutulumu kuvvetli iken, granüloza katmanında orta dereceli reaksiyon dikkati çekti (Resim 4.10b). Antral foliküllerin büyük büyültmeli incelemelerinde histomorfolojik yapı ve şekil açısından normal görünüm izlendi. Oosit ve granüloza hücre katmanında ortadan kuvvetliye değişen GDF-9 ekspresyonu ilgiyi çekti (Resim 4.10c). Bu grupta Graaf folikülleri morfolojik olarak da normal görünümdeydi. Bu foliküllerde GDF-9 tutulumunun kontrol grubu Graaf folikülleri ile tamamen eşdeğer düzeyde ve kuvvetli olduğu izlendi (Resim 4.10d).

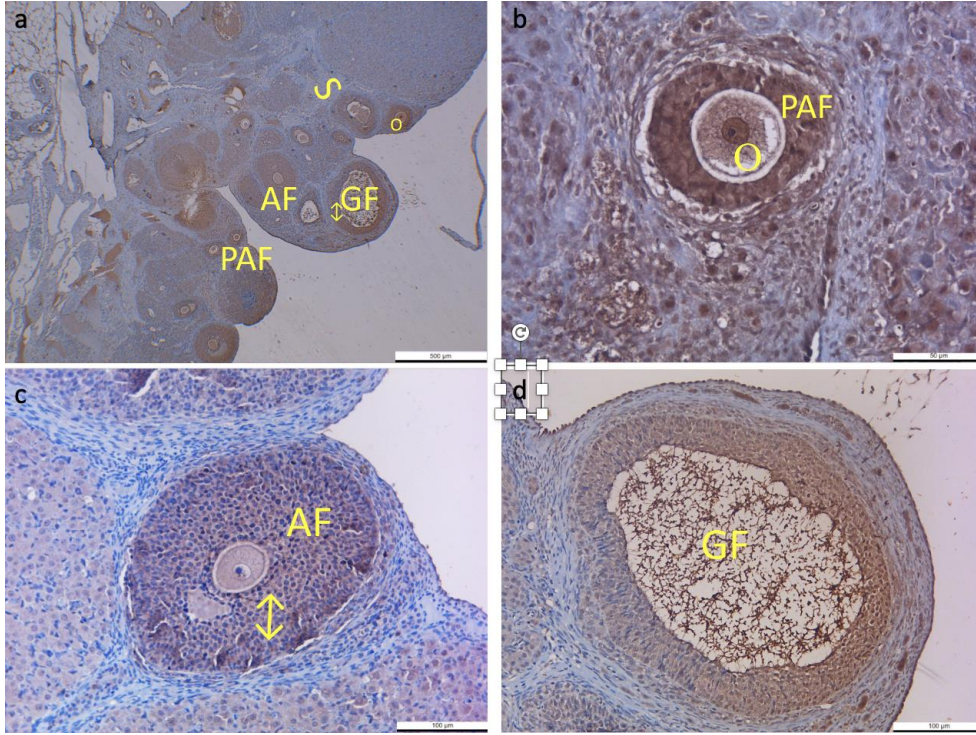


Resim 4.10. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik cell sheet yöntemi ile adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti **a.** küçük büyültmede panoramik görüntü, **b.** büyük büyültmede preantral follikül (PAF), oositte kuvvetli tutulum (O), granüloza hücrelerinde orta dereceli tutulum ($\updownarrow$), (GDF-9,) **c.** büyük büyültmede antral folliküllerde (AF) normal tutulum, oosit (O) ve granüloza hücre katmanında orta-kuvvetli tutulum ($\updownarrow$), (GDF-9, 40X10) **d.** büyük büyültmede Graaf follikülde (GF), kontrol grubuna benzer tutulum (GDF-9, a-4X10, b,c-40X10 d-20X10).

Sonuç olarak GDF-9 immünreaktivitesi gruplar arasında değerlendirildiğinde, kontrol grubuna karşın deneysel POY oluşturulan grupta tüm foliküllerde immünreaktivitenin azaldığı, IV AKMKH uygulanan grupta ise, genel olarak POY oluşturulan gruba benzer yoğunlukta GDF-9 ekspresyonunun varlığı ilgiyi çekti. POY oluşturulan ve CS yöntemi ile lokal kök hücre uygulanan grupta ise GDF-9 tutulumunun kontrol grubuna benzer yoğunlukta olduğu belirlendi.

4.5. BMP-15 Bulguları

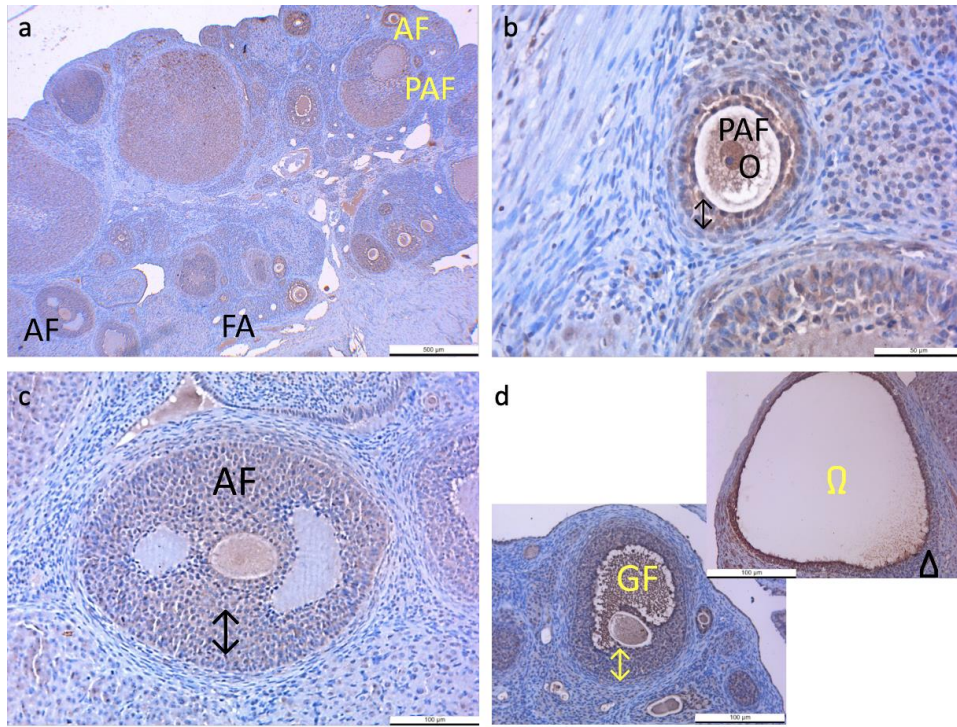
Kontrol grubu ovaryum kesitlerinde yapılan BMP-15 immünohistokimyasal boyamalarında yapılan küçük büyültmeli incelemelerde gelişimin farklı aşamalarındaki foliküllerde, oosit ve granüloza hücrelerinde tutulum gözlemlendi. Stromada immünreaktivite gözlenmedi (Resim 4.11a). Büyük büyültmeli incelemelerde preantral foliküllerde ve bu foliküllere ait oositlerde, kuvvetli BMP-15 tutulumu izlendi (Resim 4.11b). Antral foliküllerde oosit tutulumu orta dereceli olarak izlenirken, granüloza hücre katmanında ortadan kuvvetliye değişen immünreaktivite saptandı (Resim 4.11c). Graaf foliküllerindeki tutulum da antral foliküllere benzer özellikte; ortadan kuvvetliye değişir düzeydeydi (Resim 4.11d).



Resim 4.11. Kontrol grubu over kesiti. **a.** küçük büyültmede panoromik görüntü **b.** büyük büyültmede preantral foliküllerde (PAF) ve oositlerinde (O), kuvvetli tutulum **c.** büyük büyültmede Antral follikül (AF), granüloza hücre katmanında ortadan kuvvetliye değişen tutulum ($\updownarrow$) **d.** büyük büyültmede Graaf foliküllerde (GF), ortadan kuvvetliye değişen tutulum, (S): Stroma (BMP15,a- 4X10 b,d-40X10, c-20X10).

Deneyisel POY modelinde yapılan küçük büyültmeli incelemelerde BMP-15 immünreaktivitesi tüm gelişim aşamasındaki foliküllerde, kontrol grubuna karşın daha az yoğunlukta izlendi. Stromada tutulum görülmedi (Resim 4.12a). Çoğu folikülün atretik hale geldiği bu grupta, göreceli normal histolojik yapıdaki preantral foliküllerde BMP-15

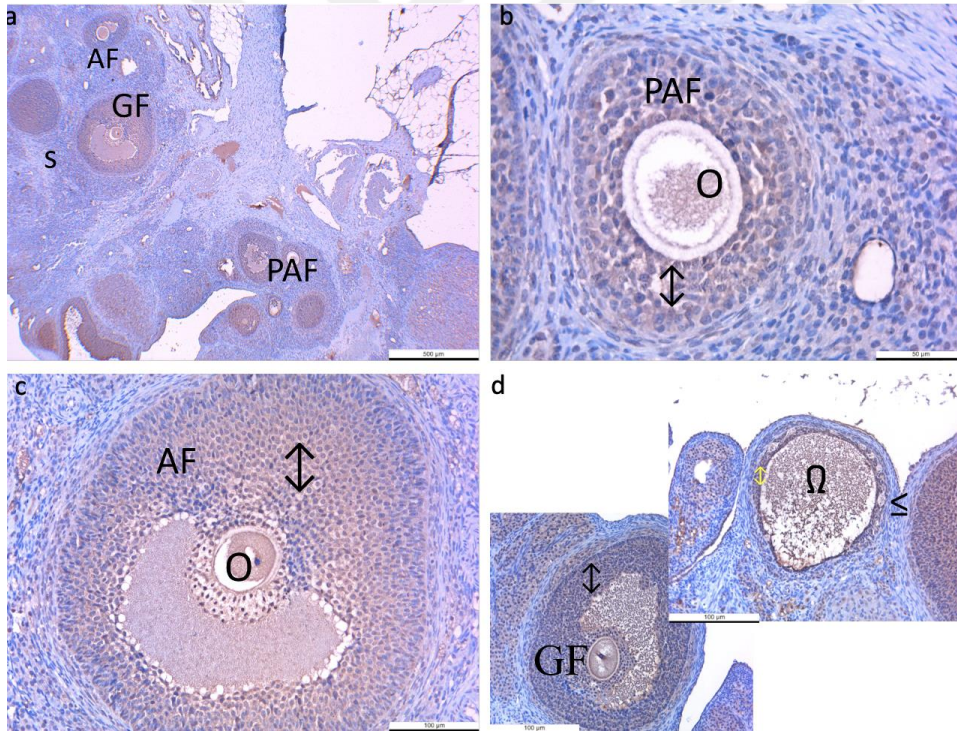
immünreaktivitesinin oosit ve granüloza hücre katmanında, kontrol grubuna göre azaldığı, orta dereceli olduğu belirlendi (Resim 4.12b). Antral foliküllerde yapılan büyük büyültmeli incelemelerde oositteki BMP-15 tutulumunun, kontrol grubuna benzer olarak orta dereceli olduğu izlenirken, granüloza hücre katmanında tutulumun kontrol grubuna karşın azaldığı, zayıftan ortaya değiştiği ilgiyi çekti (Resim 4.12c). Bu grup Graaf folikülleri incelendiğinde, BMP-15 immünreaktivitesinin, antral folikülere benzer özellikte zayıftan ortaya değiştiği, kistik görünümdeki foliküllerde ise tutulum düzeninin değişkenlik gösterip, bazı hücrelerde negatif, diğer grubunda ise kuvvetli olduğu gözlemlendi. Bu bulgu dejenere granüloza hücrelerinde membran yapısının bozulmasına bağlı, tutulum spesifitesinin bozulduğu şeklinde yorumlandı (Resim 4.12d).



Resim 4.12. Siklofosfomid ile POY oluşturulan grupta over kesiti. **a.** küçük büyültmede panoramik görüntü, Foliküler atrezi (FA), Preantral follikül (PAF), antral follikül (AF), de kontrol grubuna göre yoğun tutulum **b.** Büyük büyütmede preantral follikülde (PAF), oositte (O) ve granüloza hücrelerinde ($\Updownarrow$), orta dereceli tutulum **c.** Büyük büyütmede Antral follikül (AF), granüloza hücrelerinde ($\Updownarrow$) zayıf-orta dereceli tutulum **d.** Büyük büyütmede Graaf follikül (GF), granüloza hücrelerinde zayıf-orta dereceli tutulum ($\Updownarrow$), kistik folliküllerde granüloza hücrelerinde negatif tutulum (Δ), kistik folliküller (Ω) (BMP15, a-4X10, b,c,d-40X10).

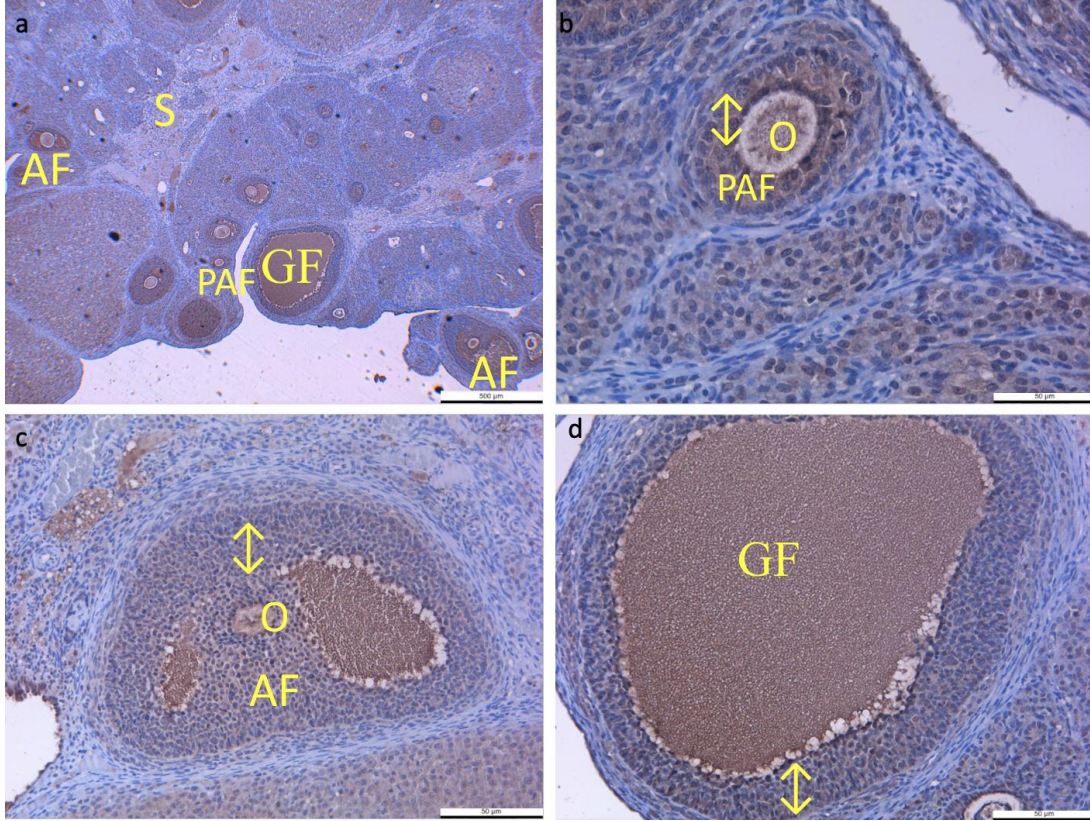
Deneyssel POY modelinde IV AKMKH uygulanan grupta ovaryumda yapılan BMP-15 immün boyamasında yapılan küçük büyültmeli incelemelerde, kortekste bulunan değişik

gelişim aşamasındaki foliküllerde BMP-15 tutulumu görülürken, tutulum yoğunluğunun göreceli olarak POY grubuna benzer olduğu dikkati çekti. Stromada tutulum gözlenmedi (Resim 4.13a). Preantral foliküllerde yapılan büyük büyültmeli incelemelerde, deneysel POY grubuna benzer, oosit ve granüloza gücre katmanında orta dereceli BMP-15 immünreaktivitesi görüldü (Resim 4.13b). Antral foliküllerde BMP-15 immünreaktivitesinin oosit düzeyinde orta dereceli olduğu, granüloza hücre katmanında ise ortadan kuvvetliye değiştiği belirlendi. Bu bulgu kontrol grubuna benzerlik gösteriyordu (Resim 4.13c). Bu grupta en belirgin boyanma özelliği Graaf foliküllerinde ayırt edildi; bu foliküllerde granüloza hücre katmanında zayıf immünreaktivite görülürken, yer yer varlık gösteren folikül kistlerinde ince granüloza hücre katmanında hücre yapısının bozulmasına paralel kuvvetli BMP-15 immünreaktivitesi dikkati çekti (Resim 4.13d).



Resim 4.13. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik intravenöz yolla sistemik olarak adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti **a.** küçük büyültmede panoramik görüntü, preantral folikül (PAF), antral follikül (AF), Graaf follikül (GF), ve negatif tutulum gösteren stroma (S) **b.** Büyük büyütmede preantral foliküller (PAF), oosit (O) ve granüloza hücre katmanında ($\updownarrow$) orta dereceli reaktivite **c.** Büyük büyütmede Antral foliküllerde (AF), oosit düzeyinde (O) orta dereceli, granüloza hücre katmanında ($\updownarrow$) ise orta- kuvvetli derece tutulum **d.** Büyük büyütmede Graaf follikül (GF),granüloza katmanında zayıf tutulum ($\updownarrow$), kistik follikül (Ω) ve ince granüloza katmanı ($\updownarrow$) ve bu katmanda deformasyonlar ($\leq$) (BMP-15,a- 4X10, b,d-40X10, c-20X10).

Deneysel POY modelinde CS yöntemi ile AKMKH uygulanan grupta over dokusunda yapılan BMP-15 immünboyamasının küçük büyültmeli incelemesinde, çeşitli gelişim aşamasındaki foliküllerde kontrol grubuna benzer yoğunlukta BMP-15 immünreaktivitesi izlendi. Stromada tutulum yoktu (Resim 4.14a). Preantral foliküllerde yapılan büyük büyültmeli incelemelerde, oosit ve granüloza hücre katmanında kuvvetli BMP-15 immünreaktivitesi belirlendi (Resim 4.14b). Antral foliküllerde BMP-15 immünreaktivitesinin yine kontrol grubuna benzer olarak oositte orta dereceli, granüloza hücre katmanında ise ortadan kuvvetliye değişen yoğunlukta olduğu görüldü (Resim 4.14c). Graaf folikülerinde de kontrol grubuna benzer, ortadan kuvvetliye değişen BMP-15 tutulumu izlendi (Resim 4.14d).

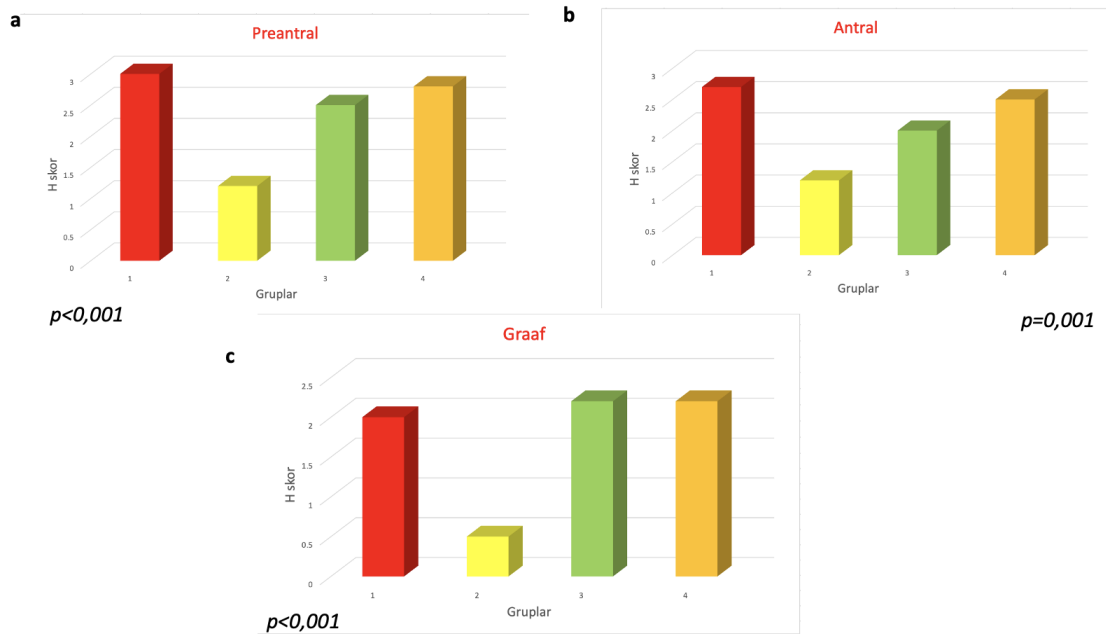


Resim 4.14. Siklofosfomid ile POY oluşturulan ve teröpatik cell sheet yöntemi ile adipoz kökenli mezenkimal kök hücre uygulanan grupta over kesiti **a.** küçük büyültmede panoramik görüntü, Preantral foliküller (PAF) ve antral foliküllerde (AF) ve Graaf follikülde (GF) kontrol grubuna benzer tutulum ve negatif tutulum gösteren stroma (S) **b.** büyük büyültmede PAF, oosit (O) ve granüloza hücre katmanında ($\updownarrow$) kuvvetli tutulum **c.** büyük büyültmede AF, O orta dereceli, ($\updownarrow$) ise ortadan kuvvetliye değişen tutulum **d.** büyük büyültmede GF, $\updownarrow$, ortadan kuvvetliye değişen tutulum (BMP15, a-4X10, b,c,d-40X10).

Gruplar arası BMP-15 tutulumu değerlendirildiğinde, deneysel POY modelinde IV AKMKH uygulanan grupta BMP-15 immünreaktivitesinin özellikle granüloza hücre katmanında azaldığı, CS yöntemi ile uygulanan AKMKH grubunda ise BMP-15 dağılımının kontrol grubuna benzer olduğu saptandı. 2 ve 3. gruplarda gözlenen bu durumun oositin salgılanan BMP-15'in granüloza hücrelerine aktarılamaması, ya da bu hücreler tarafından alınamamasına neden olduğu kanısına varıldı. Sonuçta da foliküler sağ kalım ve steroidogenezisin olumsuz etkilenmiş olabileceği düşünüldü.

4.5.1. H skoru bulguları

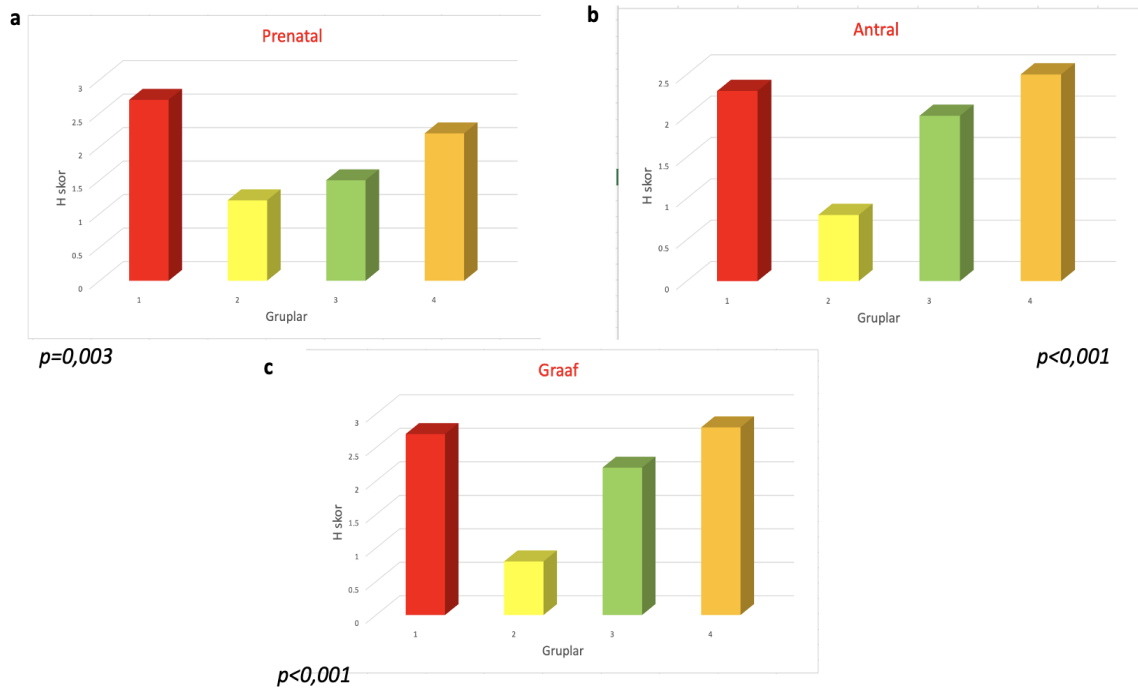
GDF-9 için H skoru bulgularında, en yüksek H skoru kontrol grubunda en düşük H skoru ise POY grubunda tespit edilmiştir. POY+CS grubu göreceli olarak POY+IV grubundan GDF-9 H skorlarında daha yüksek bulunmuştur (Şekil 4.3). Bakılan tüm H skorları gruplar arasında istatistiki anlamlı olarak tespit edilmiştir.



$p < 0.05$ anlamlı kabul edilmiştir

Şekil 4.3. GDF-9 için a. preantral, b. antral ve c. Graaf foliküllerde gruplar arası H skoru gösteren grafik ve p değerleri

BMP-15 için H skoru bulgularında, her ne kadar tüm foliküllerde en düşük H skoru POY grubunda bulunsa da, tedavi grupları arasında H skoru kontrol grubuna en yakın olan tüm folikül gruplarında CS grubu olarak gösterilmiştir (Şekil 4.4). Bakılan tüm H skorları gruplar arasında istatistiki anlamlı olarak tespit edilmiştir.

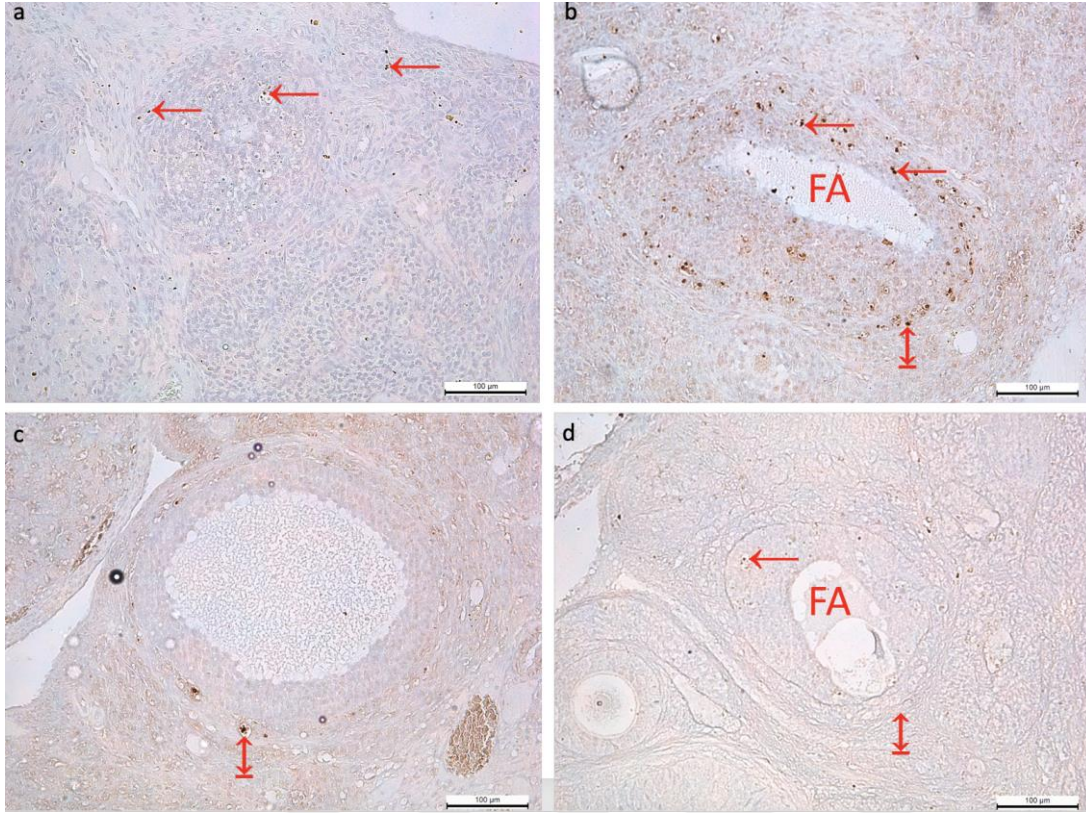


$p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir

Şekil 4.4. GDF-9 için a. preantral, b. antral ve c. Graaf foliküllerde gruplar arası H skoru gösteren grafik ve p değerleri

4.6. TUNEL Bulguları

Kontrol grubunda yapılan incelemede, az sayıdaki atretik folikülde TUNEL pozitif hücreler gözlenirken, doku geneli negatif olarak izlendi (Resim 4.15a).



Resim 4.15. **a.** Kontrol grubu, tunnel pozitif hücreler ($\leftarrow$), hematoksilen (20X10), **b.** Siklofosfoamid grubu, tunnel pozitif hücreler ($\leftarrow$), foliküler atrezi; FA, pozitif teka interna hücreleri ($\Downarrow$), hematoksilen (20X10) **c.** Deneysel POY oluşturularak IV AKMKH uygulanan grup, pozitif teka interna hücreleri ($\Downarrow$), hematoksilen (20X10) **d.** Deneysel POY oluşturularak CS yöntemi ile AKMKH uygulanan grup, tunnel pozitif hücreler ($\leftarrow$), foliküler atrezi; FA, negatif teka interna hücreleri ($\Downarrow$), hematoksilen (20X10).

Siklofosfamid ile deneysel POY oluşturulan grupta ise çok sayıda TUNEL pozitif hücre içeren atretik foliküllerin arttığı, bu foliküllerde pozitif hücre sayısının da göreceli olarak kontrol grubuna karşın çok olduğu ilgiyi çekti. Atretik foliküllerin genellikle antral folikül düzeyinde olduğu ve granüloza hücrelerine ek olarak bu grupta teka interna hücrelerinin de TUNEL pozitif olduğu görüldü (Resim 4.15b).

Deneysel POY oluşturularak IV AKMKH uygulanan grupta TUNEL pozitif hücreleri içeren folikül miktarının göreceli olarak kontrol grubuna benzer olduğu saptanırken, bu gruba ait antral foliküllerin teka interna hücrelerinde TUNEL pozitif hücrelerin halen var olduğu dikkati çekti (Resim 4.15c).

Deneysel POY oluşturularak CS yöntemi ile AKMKH uygulanan grupta ise 2. ve 3. gruba benzer şekilde atretik foliküllerin antral folikül düzeyinde olduğu gözlemlenirken,

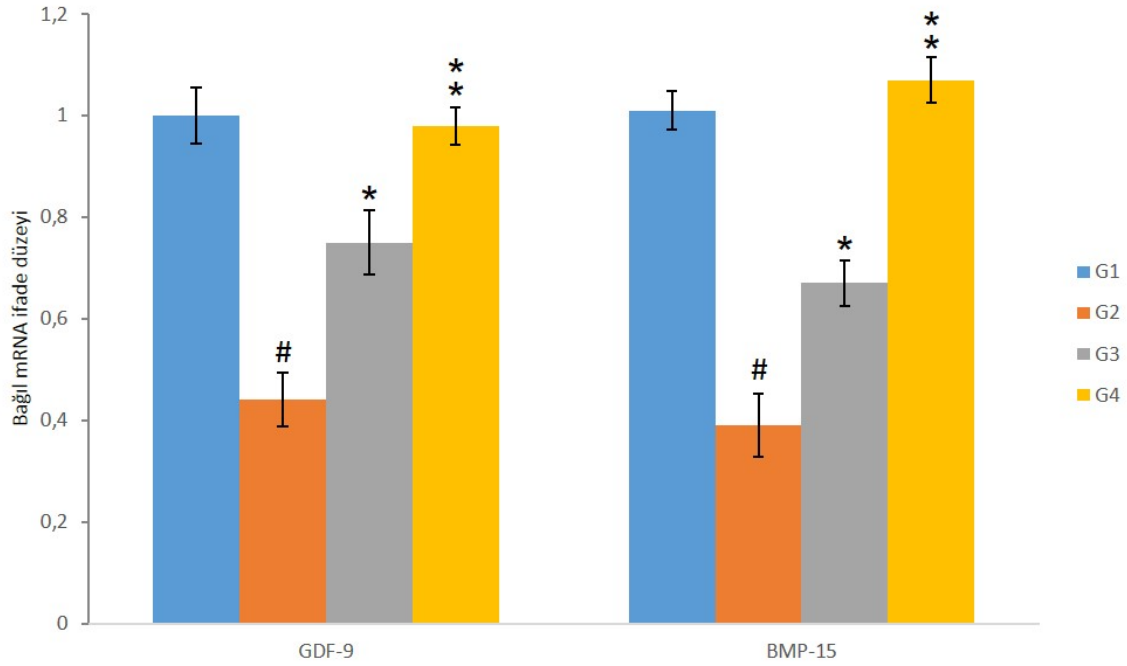
kontrol grubuna benzer olarak bu grupta da atreziye giden antral foliküllerin granüloza hücrelerinde TUNEL pozitif hücreler ayırt edilirken, teka interna hücreleri negatif olarak izlendi (Resim 4.15d).

Sonuç olarak gruplar arası apoptozis düzeyleri değerlendirildiğinde; en yaygın apoptozisin siklofosfamid ile deneysel POY oluşturulan grupta; atreziye giden antral folikül düzeyinde ve granüloza ile teka interna hücrelerinde olduğu izlendi. Deneysel POY oluşturularak AKMKH uygulanan grupta apoptozise giden atretik foliküllerin göreceli olarak azaldığı, ancak teka interna hücrelerindeki apoptozisin devam ettiği ilgiyi çekti. CS yöntemi ile kök hücre uygulanan grupta ise apoptozis oranı kontrol grubuna benzerdi. Sonuç olarak; IV AKMKH uygulanan grupta teka interna hücrelerindeki apoptozisin devam etmesi bu grupta östrojen sentezini olumsuz etkileyerek endometriyumun implantasyona hazırlanmasını sekteye uğratacağı, CS ile kök hücre uygulamasının ise teka interna hücrelerinin intact kalmasını sağlayarak sağlıklı implantasyon için gerekli östrojen düzeyini koruyacağı kanısına varıldı.

4.7. Gen İfade Düzeylerinin Kantitatif Değerlendirilmesi

GDF-9 ve BMP-15 genlerinin ifade düzeyinin kantitatif değerlendirilmesi için Light Cycler 480 cihazı kullanıldı. Rat uterus dokularından elde edilen GDF-9, BMP-15 ve bu genlerin ifadenmesini normalize etmek için ACTB genlerine özgül primerler ve UPL problemleri kullanılarak çalışıldı.

Gen ifadenmesinin Pfaffl matematiksel yöntemi ile hesaplanabilmesi için gerekli olan ACTB geninin mRNA düzeyinde ifadenmesini kantitatif olarak gösteren Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi şekil 4.5’de gösterildi.



Sekil 4.5. Gruplarda Real-Time PCR tepkimesine ait amplifikasyon eğrisi

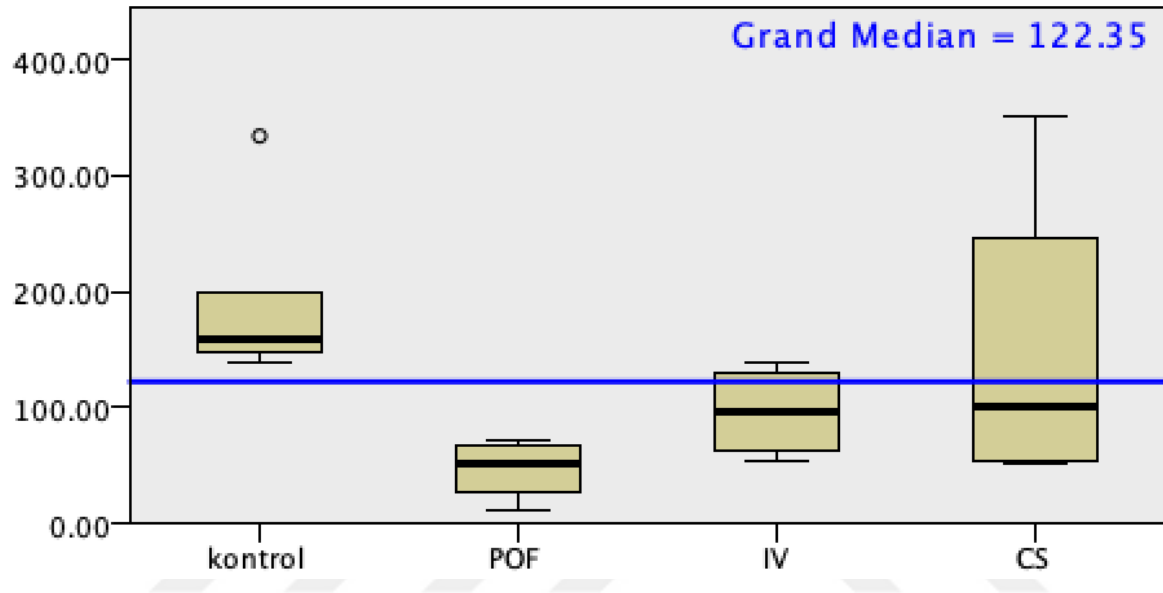
4.7.1. Gen ifade düzeylerinin karşılaştırması

Real Time PCR yönteminde ilgili hedef genin ortamdaki derişimi primerlerin ilgili gen dizileri ile bağlanması ile doğru orantılıdır. Hedef gene ait mRNA ortamda ne kadar çok bulunursa eşleşmeyle doğru orantılı seyreden amplifikasyonlar ışımanın o kadar erken gerçekleşmesine neden olur. Bu bilgiler ışığında, GDF-9 ve BMP-15 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin karşılaştırmalı değerlendirmeleri yapıldı. Bu genlerin mRNA ifade düzeylerini belirlemek için kantitatif Real-time PCR yöntemi kullanıldı. İfade düzeylerinin karşılaştırmalı analizi Qiagen-REST-2009 (Relative Expression Software Tool, [87]) programı ile birlikte Qiagen-RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5 programı kullanılarak eş zamanlı olarak gerçekleştirildi.

Rat ovaryum dokularında GDF-9 ve BMP-15 genlerinin mRNA ifade düzeyleri incelendiğinde; kontrol grubuna kıyasla 2.grupta anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p < 0.05$). Buna karşın 3. ve 4. gruplarda ise 2.gruba kıyasla GDF-9 ve BMP-15 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ($p < 0.05$). Ancak GDF-9 ve BMP-15 genlerinin mRNA ifade düzey artışının en yüksek 4.grupta olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

4.8. E2 Sonuçları

POY grubunda tüm diğer gruplara kıyasla E2 daha düşük bulunmuştur (P..). CS ve IV grup kendi içerisinde kıyaslandığında her ne kadar IV grup POY grubuna göre daha yüksek E2 ortalamasına sahipse de, CS grubunun E2 miktarı bu iki gruptan da yüksek ve kontrol grubuna en yakın bulunmuştur (Şekil 4.6).



$p=0.02$

$p<0.05$ anlamlı kabul edilmiştir

Şekil 4.6. Gruplar arası östrojen değerlerini ve istatistiki farkı gösteren grafik

5. TARTIŞMA

POY, insidansı günümüzde giderek artan ciddi bir sağlık problemi haline gelmiştir. Bu durumun %10 kadarının nedeni bilinse de %90 nedeni henüz bilinmemektedir. Özellikle tüm dünyada ve ülkemizde evlilik ve çocuk doğurma yaşının ileri yıllara ertelenmesi nedeniyle, POY'a bağlı özellikle infertilite şikayeti ile doktora başvuru sıklığı artmıştır. Her ne kadar bu hasta popülasyonunda %5 kadar spontan gebelik ihtimali bulunsa da bu oran çocuk sahibi olmak isteyen çiftler için düşük olarak değerlendirilmektedir [5]. Hastalığın diğer bulgularından olan hipoöstrojenizme bağlı semptomlar (sıcak basması, kemik erimesi gibi) semptomatik tedavi ile giderilebilir ancak, infertilite için henüz klinikte uygulanan yüz güldürücü bir çözüm bulunmamaktadır.

POY kaynaklı infertilite için klinikte aktif kullanılan tedavi, yardımcı üreme teknikleri olan IVF tir. Buna karşın, bu hasta grubunda over rezervi ciddi oranda azaldığından IVF in başarısı da yüksek değildir. Bunun yanı sıra, ülkemizde etik nedenlerden dolayı yasal olmasa da, dünyada 'oosit donasyonu' da başarı şansı yüksek tedavi seçeneklerinden biridir.

2016 yılında Kawamura ve arkadaşlarının POY için yaptığı çalışma büyük ilgi uyandırmış ve bu alanda çığır açacağı düşünülmüştür. Bu çalışmaya göre POY olan hastaların overi alınıp küçük parçalar halinde özel bazı kimyasallarla muamele edildiğinde PI3K/Akt/mTOR sinyal yolağının aktive olduğu ve sonrasında bu parçaların tekrar transplante edilmesi ile foliküler gelişim ve gebeliğin oluştuğu, küçük bir hasta serisinde gösterilmiştir [88]. Buna karşın, çalışma bu kadar yüz güldürücü olmasına rağmen klinik uygulamada beklenen başarıya ulaşamamıştır.

Bütün bu tedavilerin yanı sıra, günümüzde henüz çalışma aşamasında kullanılan fakat yüz güldürücü sonuçların bulunduğu kök hücre tedavileri bulunmaktadır. MKH ler kemik iliğinde keşfedilen ilk erişkin tip kök hücredir [89]. Kemik iliği MKH leri yüksek proliferatif potansiyelleri olup pek çok hücreye dönüşme kapasiteleri bulunmaktadır. Dönüştürdükleri hücreler arasında osteoklastlar, myositler, makrofajlar, adipositler sayılabilir [90]. Kemik iliğinden köken almış MKH ler kemoterapi ile oluşturulmuş POY modelinde tedavide ilk kullanılan kök hücrelerdir [91] ve bu konu ile ilgili literatürdeki tüm çalışmalarda MKHler IV uygulanmıştır.

2014 yılında Kılıç ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada kemik iliği kökenli MKH lerin germ hücre apoptozuna ve DNA hasarına karşı koruyucu etkisi gösterilmiştir (Fu 35). Bunun yanı sıra, 2014 yılında Liu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sisplatin ile indüklenmiş POY modeli oluşturduğu ratlarla yaptığı çalışmada, kemik iliği kökenli MKH lerin in vitro ortamda granuloza hücrelerine göç ettiği ve apoptozu engellediği gösterilmiştir [37]. Bunlara ek olarak, 2019 yılında Beşikçioğlu ve arkadaşlarının yaptığı, ratlarda kemoterapi ile oluşturulmuş POY modelinde MKH verildikten 30 gün sonra AMH, östrodiol ve FSH seviyelerinde kontrol grubuna göre düzelme olduğu kanıtlanmıştır [92]. 2018 yılında Mohamed ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, POY oluşturulmuş farelere MKH uygulanması sonucu folikülogenezin indüklendiği gösterilmiştir. Albino ratlarla yapılan başka bir çalışmada gösterilmiş ki; MKH ler hasarlı overin stromasında yer almış ve overde insülin benzeri büyüme faktörü ve tümör nekrozis faktörü (TNF- α) artmıştır [93]. 2020 yılında Yang ve arkadaşlarının ratlarla yaptığı çalışmada kemoterapi ile indüklenmiş POY modelinde verilen MKH lerden üretilen eksozomların miR-144-5p taşıyarak over folikül atrezisini engellediği gözlenmiştir. Aynı zamanda miR-144-5p ün PTEN üzerinden granuloza hücre apoptozunu engellediği de gösterilmiştir [94]. Her ne kadar POY modelinde kemik iliği kökenli kök hücrelerin pozitif etkileri gözlene de, tedavi için yeterli etki gözlenmemiştir. Bahsedilen çalışmaların çoğunda pozitif bir etki gözlene de Yang ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada yeterli etki gözlenememesinin muhtemel nedeninin verilen MKHlerin sistemik dolaşıma katılması ve bir kısmının sistemik dolaşımda kaybolması olarak düşünülmüştür [95]. Bu nedenle bizim yaptığımızda bu etkiyi daha net kanıtlayabilmek için kök hücre deney gruplarından birinde literatüre benzer olarak IV olarak uygulanmış diğerinde ise yeni bir teknoloji ile direkt over yüzeyine kılıf olarak sarılmıştır.

Literatürde POY modelinde AKMKH kullanılarak yapılan çalışmalar da bulunmaktadır. AKMKH ler kolay elde edilebilmeleri, yüksek miktarda üretilibilmeleri, otolog ya da allojenik kullanıma uygun olmaları ve yüksek farklılaşma kapasiteleri nedeniyle sık tercih edilen hücrelerdir [96]. 2018 de farelerle yapılan bir çalışmaya göre insan AKMKH ler POY hasta grubunda uygulanmış ve POY hasta grubunda bu kök hücrelerin SMAD sinyal yolağını kullanarak hCG proliferasyonunu arttırdıkları ve hCG apoptoz hızını inhibe ettikleri gözlemlenmiştir [97]. Buna ek olarak, AK MKH, VEGF ve plateletten zengin plazmanın kombine tedavisinde, ratlarda siklofosamid ile indüklenmiş POY modelinde over fonksiyonunda anlamlı bir artış saptanmıştır. Aynı zamanda ratlarda BMP4, IGF-1, TGF- β düzeylerinde artış olduğu bildirilmiştir [98]. 2019 da Ling ve arkadaşlarının ratlarla

yaptığı başka bir çalışmada verilen AKMKH lerin overin daha çok interstisyumuna yerleştikleri ve FGF2, IGF-1, HGF ve VEGF salgıladıkları tespit edilmiştir. Bu kök hücrelerin verilmesinin bir miktar da olsa over fonksiyonundaki düzeltmeyi parakrin mekanizmalarla sağladıkları kanıtlanmıştır [99]. Yapılan başka bir çalışmaya göre bu kök hücrelerin fibrozisi ve inflamasyonu azalttıkları gösterilmiştir [100].

AKMKHlerin otolog kullanım için kolay elde edilebilir olması ve elde edilişi sırasında morbiditesinin, kemik iliği kökenli MKH lere göre çok daha az olması nedeniyle, ileri klinik çalışmalar düşünülerek bu çalışmada AKMKH başarısını da değerlendirmek için bu tip kök hücre kullanımı uygun bulunmuştur.

Buna karşın, AKMKH ile yapılan çalışmalarda, literatürdeki çoğu çalışma gibi MKH ler IV olarak farenin ya da ratın kuyruk veninen uygulanmış, dolayısıyla sistemik dolaşıma verilmiştir. Bu durum hem kök hücrenin hasarlı dokuya direkt uygulama ile kıyasla daha az ulaşabileceği ihtimalini doğurmakta hem de sistemik dolaşıma verilen multipotent bir hücrenin uzun dönemde yaratabileceği yan etki ihtimalini arttırmaktadır. Literatürde MKH lerin IV verilmesinin yanı sıra intra-ovarian uygulayan çalışmalar da bulunmaktadır. 2018 yılında Mohamed ve arkadaşlarının farelerle yaptığı çalışmada MKH ler intraovaryan uygulanmış ve sonuçları kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Yapılan karşılaştırma sonucunda intraovarian uygulanan kök hücre sonrasında folikül sayısı anlamlı olarak artmış, AMH anlamlı olarak yükselmiş, FSH ise anlamlı olarak düşük bulunmuştur ($p<0.05$) [92]. Buna karşın, intraovaryan kök hücre verilmesi overin travması ile sonuçlanabilecek bir işlemdir. Aynı zamanda bu işlemde kök hücreler overin sadece birkaç noktasına ya da sadece bir hat halinde verilebilmekte ancak tüm ovare eşit şekilde uygulanamamaktadır. Bizim çalışmamızda kök hücreler yeni bir method olan CS ile direkt over yüzeyine uygulanmıştır. Bu işlem ile kök hücreler hem IV uygulamadaki gibi sistemik dolaşıma verilmemiş hem de overi travmaya maruz bırakmadan tüm over dokusuna eşit yoğunlukta uygulanabilmiştir.

Günümüzde doku mühendisliğinin yeni yaklaşımlarından birisi de hücre enjeksiyonu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için kullanılan ‘hücre tabaka teknolojisi’dir. Bugüne kadar kalp doku mühendisliğinde miyokardit ve akut myokard infatüsü sonrası, plastik cerrahi de sinir ve kemik rekonstrüksiyonunda kök hücrelerle birlikte kullanılmıştır. CSsı yaklaşımında, doku iskelesi kullanılmadığı için buna bağlı meydana gelebilecek fibrozis ve inflamasyon engellenmiş olur. Bunun yanı sıra, kolay üç boyutlu yapı oluşturulabilmesi ve

kolay manupule edilebilmesi, bu sayede alıcı dokuya kolay transplante edilebilmesi en büyük avantajlarını oluşturur[101, 102].

Tüm bunlardan yola çıkarak çalışmamızda, kadın hastalıkları alanında ilk kez, CS yöntemini POY tedavisinde kullanmayı amaçladık. Bu sayede siklofosfamid ile POY modeli oluşturulmuş ratlarda; hem direkt overe kök hücrelerin herhangi bir travma oluşturmadan homojen olarak verilmesi, hem de sistemik dolaşıma verilemeden direkt dokuya uygulanması, sağlandı. Bu grubun sonuçlarını, literatürde sıklıkla kullanılmış ve kontrol grubuna göre anlamlı iyileşme bulunmuş olan IV verilen AKMKH grubu ile kıyaslamak istedik. Hipotezimiz; CS sistemindeki avantajlar nedeniyle CS grubunun IV grubuna göre over fonksiyonlarını iyileştirmek bakımından daha başarılı olacağıdır.

Literatürde en sık kullanılan kök hücre uygulama methodu olan IV yol ile CS yöntemini kıyaslama amaçlı, yapılan çalışmada hem IV hem de CS yönteminde verilen kök hücre miktarı eşitlenmiştir (4×10^5). Bu şekilde BrdU ile işaretlenmiş kök hücreler her iki yöntemi kıyaslama amaçlı sakrifikasyon sonrası overde sayılmıştır. Buna göre CS yönteminde IV yola kıyasla over stromasında göreceli daha fazla kök hücre tespit edilmiştir. Bu şekilde IV verilen kök hücrelerin sistemik dolaşımında bir kısmının başka dokulara gittiği ve overe gelemediği düşünülmüştür.

Literatüre benzer olarak, kök hücre miktarı dışında çalışmada tüm gruplarda preantral, antral, Graaf ve atretik folikül sayımları da hesaplanmıştır. Buna göre siklofosfamid uygulanan grupta (2. grup) preantral folikül sayısının istatistiksel anlamlı olarak diğer gruplara göre azaldığı tespit edilmiştir ($p < 0.001$). Bunun yanı sıra, her ne kadar kök hücre tedavisi verilen gruplarda (3.ve 4.grup) POY grubuna göre preantral folikül sayısı daha fazla olsa da, kontrol grubuyla kıyaslanınca IV verilen kök hücre grubunda hala istatistiksel olarak foliküllerin daha az olduğu tespit edilmiş, ancak CS grubunda kontrol grubuyla arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durum tedavide CS grubunun daha başarılı olduğunu göstermektedir. Bunun yanı sıra IV grubunda incelenen foliküllerin multiple oositli olduğu görülmüştür. Bu durum her ne kadar bir folikül gelişimi olsa da gelişen foliküllerin sağlıklı olmadığını ve fekundabiliteye katkısı olmayabileceğini göstermektedir. Atretik foliküller açısından da kontrol grubu ile CS grubu arasında istatistiksel fark bulunmazken, IV kök hücre grubunda atretik foliküller hem kontrol grubuna göre hem de CS grubuna göre istatistiki olarak fazla bulunmuştur ($p < 0.001$). Bu durumda IV verilen kök hücrelerin foliküler atreziyi engelleyemedi saptanmıştır. Kök hücre uygulamasının parakrin etkilerle

overde uyuyan folikül havuzunu etkinleştirdiği ve foliküler aktiviteyi arttırdığı düşünülmektedir. Literatürde her ne kadar IV verilen kök hücrelerin foliküler havuzu arttırdığı ve atreziyi engellediğine ait yayınlar bulunsada [92] bizim çalışmamızda CS grubunun atreziyi IV grubuna göre daha fazla engellediği ve folikül havuzunu kontrol grubuna benzer oranda arttırdığı kanıtlanmıştır. Buradan yola çıkılarak, CS yöntemi ile uygulanan kök hücrelerin IV yönteme göre overde göreceli daha fazla bulunması ve bu kök hücrelerin özellikle folikül çevresinde lokalize olması, CS yöntemi ile uygulanan kök hücrelerin parakrin etki ile foliküler aktivasyonu daha fazla uyarmış olabileceğini düşündürmüştür.

İmmunohistokimyasal olarak foliküler aktivasyonu kanıtlamak amaçlı over dokusu GDF9 ve BMP15 ile boyanmış ve sonuçlar H skoru ile değerlendirilmiştir; POY grubuna göre her iki antikor için de kök hücre verilen gruplarda H skor sonuçları istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.001$). Literature benzer olarak sadece siklofosamid grubuna göre hem IV hem CS grubunda GDF-9 ve BMP-15 tutulumu daha yoğun görünse de, bu iki grup kendi arasında kıyaslandığında özellikle BMP-15 in immunohistokimyasal boyanması IV grubuna göre CS grubunda daha belirgin gözlenmiştir; ancak istatistiki bir anlama ulaşmamıştır. Buradan yola çıkarak, CS grubunda oluşturulan parakrin etkinin özellikle antral foliküllerin Graaf foliküle ilerlemesinde rol oynadığını düşündürmektedir. GDF-9 ve BMP-15 gen ekspresyonları değerlendirildiğinde POY grubuna göre kök hücre gruplarında gen ekspresyonları istatistiki anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Gruplar kendi içerisinde kıyaslandığında CS grubundaki GDF-9 ve BMP-15 gen ekspresyonu kontrol grubuna benzer olarak tespit edilmiş, IV grubuna göre de istatistiki olarak anlamlı bulunmuştur. CS ve IV grupları arasında istatistiki anlamlı olmayan immunohistokimyasal bulgu farklılığının, gen ekspresyonunda anlamlı bulunması, genin transkripsiyona uğramadığı şeklinde yorumlanmıştır.

Çalışmamızda apoptozisi göstermek için TUNEL boyaması da yapılmıştır. Bao ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kemoterapi ile POY oluşturulmuş farelerde kemik iliği kökenli kök hücre tedavisi IV olarak uygulandıktan sonra yapılan TUNEL boyamasında kök hücre verilen grupta sadece POY grubuna göre apoptozisin azaldığı gösterilmiştir [103]. Bizim çalışmamızda buna ek olarak, IV grup ile CS grubu kıyaslanmış, IV kök hücre verilen grupta POY grubuna göre apoptoz belirgin azalsa da, IV grubu ile CS grubu kıyaslandığında IV grupta teka interna hücrelerinde apoptozun devam ettiği gözlemlenmiştir. Bu bulgu, IV grubunda kök hücre tedavisinin foliküllerdeki apoptozu engellediğini gösterse de teka

internada sure gelen apoptoz nedeniyle, östrojen üretiminde bozukluk olacağı ve, bu durumun da endometriumun implantasyona hazırlanamaması ve implantasyon başarısızlığına neden olabileceği düşünülmüştür. Bu açıdan IV kök hücre tedavisine göre CS yöntemi, POY grubuna göre apoptozisi önleme açısından daha başarılı bulunmuştur.

Bunun yanı sıra çalışmamızda, literature paralel olarak bir tek histolojik ve gen ekspresyonu olarak inceleme yapılmamış aynı zamanda dokular alınmadan tüm deneklerden intrakardiyak kan alınarak E2 düzeylerine bakılmıştır. Bu değerler literatürdeki pek çok çalışmaya benzer olarak [99, 103, 104] kök hücre tedavisi almış gruplarda, kemoterapi grubuna göre anlamlı olarak E2 değerleri yüksek olarak gözlenmiştir ($p=0.02$). Buna karşın, kök hücrelerin IV uygulanan grupta olan yükselişi CS grubundan daha düşük bulunmuştur. Bu sonuçlar histomorfolojik, immunohistokimyasal ve genetik sonuçları destekler şekilde görülmüştür. CS yöntemiyle verilen kök hücrelerin bir tek histolojik olarak folikül sayısını arttırmadığı aynı zamanda bu foliküllerin işlevsel olup östrojen miktarını da arttırdığı düşünülmüştür.

Sonuç olarak ratlarda deneysel POY modelinde, histokimyasal, immünohistokimyasal ve genetik analizler sonucunda AKMKHlerin IV uygulanmasına kıyasla CS yöntemi ile uygulanmasının over histopatolojisinde, foliküler sağ kalımında ve gelişiminde daha etkin olduğu belirlendi. Bu etkinin CS yöntemi ile kök hücrelerin direkt overe verilmesi ve parakrin yolakla olduğunu düşündüğümüz etkisini daha belirgin olarak göstermesi nedeniyle olduğu kanısına varıldı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Literatürde bir ilk olarak bu çalışmada POY modelinde CS yöntemi ile kök hücre uygulanması incelendi ve literatürde sık kullanılan bir tedavi şekli olan IV yöntemle kıyaslandı. Çalışma sonuçları aşağıda maddeler halinde belirtildi.

- BrdU boyamalarında CS grubunda kök hücrelerin göreceli olarak IV uygulanan gruba göre daha yoğun olduğu belirlendi. Bu bulgu direkt uygulamanın olumlu etkisi olarak yorumlandı.
- Histomorfolojik incelemede deneysel POY modelinde tüm deneklerin over foliküllerinde preantral ve antral evrede yaygın atrezi izlendi. IV uygulanan kök hücre tedavisinin atrezinin kısmen geriletmediği izlenirken, multi oositli foliküller belirlendi. CS yöntemi ile kök hücre uygulanan grupta ise foliküllerin genelinde normal yapı görüldü. Bu bulgu IV kök hücre uygulamasının folliküler yapı ve sağ kalımını olumsuz etkilediğini düşündürdü.
- Foliküler sayım olarak, POY grubunda diğer gruplarla kıyaslandığında preantral, antral ve Graaf folikül sayılarının anlamlı olarak azaldığı ($p<0.001$), atretik folikül sayımının ise anlamlı olarak arttığı gözlemlendi ($p<0.001$). Folikül sayımında CS grubunun kontrol grubuna en yakın folikül sayısına sahip olduğu görüldü. Bunun haricinde IV grubunda atretik foliküllerin CS grubuna göre anlamlı olarak arttığı izlendi ($p<0.001$). Bu durum IV kök hücre tedavisinin atrezini anlamlı ölçüde azaltmadığı buna karşın CS nin bu konuda çok daha etkin olduğu belirlendi.
- Gruplar arasında GDF-9 immünreaktivitesi değerlendirildiğinde, kontrol grubuna karşın deneysel POY oluşturulan grupta tüm foliküllerde azaldığı, IV kök hücre uygulanan grupta ise, kısmen artan yoğunlukta GDF-9 ekspresyonunun varlığı ilgiyi çekti. POY oluşturulan ve CS yöntemi ile lokal kök hücre uygulanan grupta ise GDF-9 tutulumunun kontrol grubuna benzer yoğunlukta olduğu izlendi.
- Deneysel POY grubunda, IV grubunda BMP-15 immünreaktivitesinin özellikle granüloza hücre katmanında azaldığı, CS grubunda ise BMP-15 dağılımının kontrol grubuna benzer olduğu saptandı. 2 ve 3. gruplarda gözlenen bu durumun oositin salgılanan BMP-15'in granüloza hücrelerine aktarılamaması, ya da bu hücreler

tarafından alınamaması nedeniyle olduğu kanısına varıldı. Sonuçta da foliküler sağ kalım ve sterediogenezin olumsuz etkilenmiş olabileceği düşünüldü.

- TUNEL bulguları da immünohistokimyasal bulguları destekler nitelikteydi. IV kök hücre uygulanan grupta teka interna hücrelerindeki apoptozun devam etmesi bu grupta östrojen sentezini olumsuz etkileyerek endometriyumun implantasyona hazırlanmasını sekteye uğratacağı, CS ile kök hücre uygulamasının ise teka interna hücrelerinin intakt kalmasını sağlayarak sağlıklı implantasyon için gerekli östrojen düzeyinin koruyacağı kanısına varıldı.
- Rat ovaryum dokularında GDF-9 ve BMP-15 genlerinin mRNA ifade düzeyleri incelendiği zaman kontrol grubuna kıyasla POY grubunda anlamlı düzeyde azaldığı belirlendi ($p<0.05$). Buna karşın IV ve CS gruplarında ise POY grubuna kıyasla GDF-9 ve BMP-15 genlerinin mRNA ifade düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttığı gözlemlendi ($p<0.05$). Ancak GDF-9 ve BMP-15 genlerinin mRNA ifade düzey artışının en yüksek CS grubunda olduğu belirlendi ($p<0.05$). İmmünohistokimyasal çalışmada IV ve CS grupları arasında istatistiki bu farkın gözlenmemesi, genin transkripsiyona uğrayamadığını düşündürdü.

Çalışmanın zayıf yönleri; her ne kadar foliküler gelişim çalışmada gruplar arası gözlenirse de gelişen foliküllerin işlevselliğinin gösterilmesi amaçlı ilerleyen çalışmalarda foliküllerin fertilizasyon kapasitelerinin incelenmesi gerekmektedir. Bunun yanı sıra, POY modeli elde etme sırasında, verilen kemoterapatin yüksek toksisiteye sahip olmasından dolayı gruplardaki deney hayvanı sayısı azalmıştır. İlerleyen çalışmalarda daha fazla denekle çalışmanın tekrarlanması sonuçları daha değerli kılacaktır. Son olarak, yapılan bir hayvan deneyi modeli olduğundan, bu sonuçlar ışığında aynı yöntemin insan modelinde de araştırılması çalışmayı daha değerli hale getirecektir.

KAYNAKLAR

1. Martin, L. A., Porter, A. G., Pelligrini, V. A., Schnatz, P. F., Jiang, X., Kleinstreuer, N., Hall, J. E., Verbiest, S., Olmstead, J., Fair, R., Falorni, A., Persani, L., Rajkovic, A., Mehta, K., Nelson, L. M., Rachel's Well Primary Ovarian Insufficiency Community of Practice, G. (2017). A design thinking approach to primary ovarian insufficiency. *Panminerva Medicine*, 59(1), 15-32.
2. Nelson, L. M. (2009). Clinical practice. Primary ovarian insufficiency. *New England Journal of Medicine*, 360(6), 606-614.
3. European Society for Human, R., Embryology Guideline Group on, P. O. I., Webber, L., Davies, M., Anderson, R., Bartlett, J., Braat, D., Cartwright, B., Cifkova, R., de Muinck Keizer-Schrama, S., Hogervorst, E., Janse, F., Liao, L., Vlaisavljevic, V., Zillikens, C., Vermeulen, N. (2016). ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction*, 31(5), 926-937.
4. Zhang, C. (2020). The Roles of Different Stem Cells in Premature Ovarian Failure. *Current Stem Cell Research Therapy*, 15(6), 473-481.
5. van Kasteren, Y. M., Schoemaker, J. (1999). Premature ovarian failure: a systematic review on therapeutic interventions to restore ovarian function and achieve pregnancy. *Human Reproduction Update*, 5(5), 483-492.
6. Tiosano, D., Mears, J. A., Buchner, D. A. (2019). Mitochondrial Dysfunction in Primary Ovarian Insufficiency. *Endocrinology*, 160(10), 2353-2366.
7. Ikkena DE, R. J. (2016). *Primary Ovarian Insufficiency A Clinical Guide to Early Menopause*. Springer.
8. Ankrum, J. A., Ong, J. F., Karp, J. M. (2014). Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*, 32(3), 252-260.
9. Mahla, R. S. (2016). Stem Cells Applications in Regenerative Medicine and Disease Therapeutics. *International Journal of Cell Biology*, 2016, 6940283.
10. Du, L., Rachul, C., Guo, Z., Caulfield, T. (2016). Gordie Howe's "Miraculous Treatment": Case Study of Twitter Users' Reactions to a Sport Celebrity's Stem Cell Treatment. *JMIR Public Health Surveill*, 2(1), e8.
11. Tang, Z., Okano, T. (2014). Recent development of temperature-responsive surfaces and their application for cell sheet engineering. *Regenerative Biomaterials*, 1(1), 91-102.
12. Eberghard, P. (2000). *Renkli Genetik Atlası*. Nobel Tıp Kitabevleri, 324-331.

13. MooreKeith L., P. T. V. N. (2009). *Embriyoloji ve Doğum Defektlerinin Temelleri*. Güneş Tıp Kitabevleri, 162-189.
14. Sadler, T. W. (2011). *Langman's Medikal Embriyoloji*. Plame Yayinlari, 246-264.
15. Erdoğan D., H. M. T., Görgün M., Ilgaz C. (2007). *Özel Histoloji*. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi, 174-187.
16. Junqueira L.C., Carniero J. *Temel Histoloji*, (Çev. S.Solakoğlu ve Y.Aytekin) 435-454.
17. Ross M.H., P. (2011). *Histology A Text and Atlas*. (6th). Lippincot Williams & Wilkins, 830-895.
18. Gartner L.P., H. J. L. (2007). *Color Textbook of Histology*. (3. Edition). USA:: Elsevier's, 463-488.
19. Kierszenbaum A.L. *Histoloji ve Hücre Biyolojisi Patolojiye Giriş*. (Çev.Ramazan Demir) Palme Yayınları, 529-605.
20. Tanyolaç, A. (1999). *Özel Histoloji*. Ankara: Yorum Basımevi, 144-152.
21. F.W., G. (2002). *Tıbbi Fizyoloji*. (20. baskı). Nobel Tıp Kitabevi, 419-433.
22. Guyton AC, H. E. J. (2000). *Medical Physiology*. (10th Edition). WB. Saunders company, 929-944.
23. Widmaier E.P, R. H., Strang K.T. (Çev. S. Demirgören) (2010). *Vander İnsan Fizyolojisi*. (10.Baskı). Güven Kitabevi, 668-678.
24. Hedrick MH, D. E. (2003). The use of adult stem cells in regenerative medicine. *Clinics in plastic surgery*, 30, 499-505.
25. GR, M. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78, 7634-7638.
26. Woodbury, D., Schwarz, E. J., Prockop, D. J., Black, I. B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *Journal of Neuroscience Research*, 61(4), 364-370.
27. Warejcka, D. J., Harvey, R., Taylor, B. J., Young, H. E., Lucas, P. A. (1996). A population of cells isolated from rat heart capable of differentiating into several mesodermal phenotypes. *Journal of Surgical Research*, 62(2), 233-242.

28. Young, H. E., Mancini, M. L., Wright, R. P., Smith, J. C., Black, A. C., Jr., Reagan, C. R., Lucas, P. A. (1995). Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Developmental Dynamics*, 202(2), 137-144.
29. Chen, B., Yu, J., Wang, Q., Zhao, Y., Sun, L., Xu, C., Zhao, X., Shen, B., Wang, M., Xu, W., Zhu, W. (2018). Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Promote Gastric Cancer Growth via Regulating c-Myc. *Stem Cells International*, 2018, 9501747.
30. Jiang, S., Mo, C., Guo, S., Zhuang, J., Huang, B., Mao, X. (2019). Human bone marrow mesenchymal stem cells-derived microRNA-205-containing exosomes impede the progression of prostate cancer through suppression of RHPN2. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 495.
31. Lu, L., Chen, G., Yang, J., Ma, Z., Yang, Y., Hu, Y., Lu, Y., Cao, Z., Wang, Y., Wang, X. (2019). Bone marrow mesenchymal stem cells suppress growth and promote the apoptosis of glioma U251 cells through downregulation of the PI3K/AKT signaling pathway. *Biomedical Pharmacotherapy*, 112, 108625.
32. Shiraishi, K., Kamei, N., Takeuchi, S., Yanada, S., Mera, H., Wakitani, S., Adachi, N., Ochi, M. (2017). Quality Evaluation of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair. *Stem Cells International*, 2017, 8740294.
33. Mohanty, S., Jain, K. G., Nandy, S. B., Kakkar, A., Kumar, M., Dinda, A. K., Singh, H., Ray, A. (2018). Iron oxide labeling does not affect differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells exhibited by their differentiation into cardiac and neuronal cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 448(1-2), 17-26.
34. Fillmore, N., Huqi, A., Jaswal, J. S., Mori, J., Paulin, R., Haromy, A., Onay-Besikci, A., Ionescu, L., Thebaud, B., Michelakis, E., Lopaschuk, G. D. (2015). Effect of fatty acids on human bone marrow mesenchymal stem cell energy metabolism and survival. *PLoS One*, 10(3), e0120257.
35. Kilic, S., Pinarli, F., Ozogul, C., Tasdemir, N., Naz Sarac, G., Delibasi, T. (2014). Protection from cyclophosphamide-induced ovarian damage with bone marrow-derived mesenchymal stem cells during puberty. *Gynecological Endocrinology*, 30(2), 135-140.
36. Besikcioglu, H. E., Saribas, G. S., Ozogul, C., Tiryaki, M., Kilic, S., Pinarli, F. A., Gulbahar, O. (2019). Determination of the effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells and ovarian stromal stem cells on follicular maturation in cyclophosphamide induced ovarian failure in rats. *Taiwaniese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 58(1), 53-59.
37. Liu, J., Zhang, H., Zhang, Y., Li, N., Wen, Y., Cao, F., Ai, H., Xue, X. (2014). Homing and restorative effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on cisplatin injured ovaries in rats. *Molecules and Cells*, 37(12), 865-872.

38. Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P., Hedrick, M. H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279-4295.
39. Aksu, A. E., Rubin, J. P., Dudas, J. R., Marra, K. G. (2008). Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Annals of Plastic Surgery*, 60(3), 306-322.
40. Tholpady, S. S., Llull, R., Ogle, R. C., Rubin, J. P., Futrell, J. W., Katz, A. J. (2006). Adipose tissue: stem cells and beyond. *Clinical Plastic Surgery*, 33(1), 55-62, vi.
41. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211-228.
42. Badawy, A., Sobh, M. A., Ahdy, M., Abdelhafez, M. S. (2017). Bone marrow mesenchymal stem cell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model. *International Journal of Womens Health*, 9, 441-447.
43. Mu, Y., Wu, X., Hao, Z. (2018). Comparative evaluation of mesenchymal stromal cells from umbilical cord and amniotic membrane in xeno-free conditions. *BMC Cell Biology*, 19(1), 27.
44. Pers, Y. M., Rackwitz, L., Ferreira, R., Pullig, O., Delfour, C., Barry, F., Sensebe, L., Casteilla, L., Fleury, S., Bourin, P., Noel, D., Canovas, F., Cyteval, C., Lisignoli, G., Schrauth, J., Haddad, D., Domergue, S., Noeth, U., Jorgensen, C., Consortium, A. (2016). Adipose Mesenchymal Stromal Cell-Based Therapy for Severe Osteoarthritis of the Knee: A Phase I Dose-Escalation Trial. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(7), 847-856.
45. Zaher, W., Harkness, L., Jafari, A., Kassem, M. (2014). An update of human mesenchymal stem cell biology and their clinical uses. *Archives of Toxicology*, 88(5), 1069-1082.
46. Uzbass, F., May, I. D., Parisi, A. M., Thompson, S. K., Kaya, A., Perkins, A. D., Memili, E. (2015). Molecular physiognomies and applications of adipose-derived stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(2), 298-308.
47. Neri, S., Bourin, P., Peyrafitte, J. A., Cattini, L., Facchini, A., Mariani, E. (2013). Human adipose stromal cells (ASC) for the regeneration of injured cartilage display genetic stability after in vitro culture expansion. *PLoS One*, 8(10), e77895.
48. DelaRosa, O., Lombardo, E., Beraza, A., Mancheno-Corvo, P., Ramirez, C., Menta, R., Rico, L., Camarillo, E., Garcia, L., Abad, J. L., Trigueros, C., Delgado, M., Buscher, D. (2009). Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Engineering Part A*, 15(10), 2795-2806.

49. Foyouzi N, G. L., Camper SA. (2016). *Primary Ovarian Insufficiency A Clinical Guide to Early Menopause*. Springer, 19-35.
50. Wong, Q. H. Y., Yeung, T. W. Y., Yung, S. S. F., Ko, J. K. Y., Li, H. W. R., Ng, E. H. Y. (2018). The effect of 12-month dehydroepiandrosterone supplementation on the menstrual pattern, ovarian reserve markers, and safety profile in women with premature ovarian insufficiency. *Journal of Assisted Reproduction of Genetics*, 35(5), 857-862.
51. Ferreri, J., Fabregues, F., Calafell, J. M., Solernou, R., Borrás, A., Saco, A., Manau, D., Carmona, F. (2020). Drug-free in-vitro activation of follicles and fresh tissue autotransplantation as a therapeutic option in patients with primary ovarian insufficiency. *Reproductive Biomedicine Online*, 40(2), 254-260.
52. Kawamura, K., Cheng, Y., Suzuki, N., Deguchi, M., Sato, Y., Takae, S., Ho, C. H., Kawamura, N., Tamura, M., Hashimoto, S., Sugishita, Y., Morimoto, Y., Hosoi, Y., Yoshioka, N., Ishizuka, B., Hsueh, A. J. (2013). Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proceedings of National Academy of Sciences of U S A*, 110(43), 17474-17479.
53. Wang, S., Yu, L., Sun, M., Mu, S., Wang, C., Wang, D., Yao, Y. (2013). The therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice premature ovarian failure. *Biomed Research International*, 2013, 690491.
54. Li, J., Mao, Q., He, J., She, H., Zhang, Z., Yin, C. (2017). Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem Cell Research Therapy*, 8(1), 55.
55. De Coppi, P., Bartsch, G., Jr., Siddiqui, M. M., Xu, T., Santos, C. C., Perin, L., Mostoslavsky, G., Serre, A. C., Snyder, E. Y., Yoo, J. J., Furth, M. E., Soker, S., Atala, A. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, 25(1), 100-106.
56. Xiao, G. Y., Liu, I. H., Cheng, C. C., Chang, C. C., Lee, Y. H., Cheng, W. T., Wu, S. C. (2014). Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One*, 9(9), e106538.
57. Zhang, Q., Bu, S., Sun, J., Xu, M., Yao, X., He, K., Lai, D. (2017). Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage. *Stem Cell Research Therapy*, 8(1), 270.
58. Liu, T., Huang, Y., Zhang, J., Qin, W., Chi, H., Chen, J., Yu, Z., Chen, C. (2014). Transplantation of human menstrual blood stem cells to treat premature ovarian failure in mouse model. *Stem Cells and Development*, 23(13), 1548-1557.
59. Ducheyne P. (2015). *Comprehensive biomaterials*. Amsterdam: Elsevier. 315-328.

60. Chen, G., Qi, Y., Niu, L., Di, T., Zhong, J., Fang, T., Yan, W. (2015). Application of the cell sheet technique in tissue engineering. *Biomedical Reports*, 3(6), 749-757.
61. Kirby, G. T. S., Micheltore, A., Smith, L. E., Whittle, J. D., Short, R. D. (2018). Cell sheets in cell therapies. *Cytotherapy*, 20(2), 169-180.
62. Owaki, T., Shimizu, T., Yamato, M., Okano, T. (2014). Cell sheet engineering for regenerative medicine: current challenges and strategies. *Biotechnology Journal*, 9(7), 904-914.
63. Toyoda, E., Sato, M., Takahashi, T., Maehara, M., Okada, E., Wasai, S., Watanabe, M., Iijima, H., Nonaka, K., Kawaguchi, Y. (2019). Transcriptomic and Proteomic Analyses Reveal the Potential Mode of Action of Chondrocyte Sheets in Hyaline Cartilage Regeneration. *International Journal of Molecular Science*, 21(1).
64. Nakamura, A., Akahane, M., Shigematsu, H., Tadokoro, M., Morita, Y., Ohgushi, H., Dohi, Y., Imamura, T., Tanaka, Y. (2010). Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model. *Bone*, 46(2), 418-424.
65. Meng, X. M., Nikolic-Paterson, D. J., Lan, H. Y. (2016). TGF-beta: the master regulator of fibrosis. *Nature Reviews Nephrology*, 12(6), 325-338.
66. Shimasaki, S., Moore, R. K., Otsuka, F., Erickson, G. F. (2004). The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocrine Reviews*, 25(1), 72-101.
67. Moore, R. K., Otsuka, F., Shimasaki, S. (2003). Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(1), 304-310.
68. Dube, J. L., Wang, P., Elvin, J., Lyons, K. M., Celeste, A. J., Matzuk, M. M. (1998). The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. *Molecular Endocrinology*, 12(12), 1809-1817.
69. Incerti, B., Dong, J., Borsani, G., Matzuk, M. M. (1994). Structure of the mouse growth/differentiation factor 9 gene. *Biochimica Biophysica Acta*, 1222(1), 125-128.
70. Otsuka, F., Yao, Z., Lee, T., Yamamoto, S., Erickson, G. F., Shimasaki, S. (2000). Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry*, 275(50), 39523-39528.
71. McGrath, S. A., Esquela, A. F., Lee, S. J. (1995). Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology*, 9(1), 131-136.

72. Mottershead, D. G., Sugimura, S., Al-Musawi, S. L., Li, J. J., Richani, D., White, M. A., Martin, G. A., Trotta, A. P., Ritter, L. J., Shi, J., Mueller, T. D., Harrison, C. A., Gilchrist, R. B. (2015). Cumulin, an Oocyte-secreted Heterodimer of the Transforming Growth Factor-beta Family, Is a Potent Activator of Granulosa Cells and Improves Oocyte Quality. *Journal of Biological Chemistry*, 290(39), 24007-24020.
73. Peng, J., Li, Q., Wigglesworth, K., Rangarajan, A., Kattamuri, C., Peterson, R. T., Eppig, J. J., Thompson, T. B., Matzuk, M. M. (2013). Growth differentiation factor 9:bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian functions. *Proceedings of National Academy of Sciences of U S A*, 110(8), E776-785.
74. Diaz, F. J., Wigglesworth, K., Eppig, J. J. (2007). Oocytes are required for the preantral granulosa cell to cumulus cell transition in mice. *Developmental Biology*, 305(1), 300-311.
75. Hashimoto, O., Moore, R. K., Shimasaki, S. (2005). Posttranslational processing of mouse and human BMP-15: potential implication in the determination of ovulation quota. *Proceedings of National Academy of Sciences of U S A*, 102(15), 5426-5431.
76. Diaz, F. J., Wigglesworth, K., Eppig, J. J. (2007). Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *Journal of Cell Science*, 120(Pt 8), 1330-1340.
77. Ernst, E. H., Franks, S., Hardy, K., Villesen, P., Lykke-Hartmann, K. (2018). Granulosa cells from human primordial and primary follicles show differential global gene expression profiles. *Human Reproduction*, 33(4), 666-679.
78. Gilchrist, R. B., Lane, M., Thompson, J. G. (2008). Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Human Reproduction Update*, 14(2), 159-177.
79. Sugiura, K., Su, Y. Q., Diaz, F. J., Pangas, S. A., Sharma, S., Wigglesworth, K., O'Brien, M. J., Matzuk, M. M., Shimasaki, S., Eppig, J. J. (2007). Oocyte-derived BMP15 and FGFs cooperate to promote glycolysis in cumulus cells. *Development*, 134(14), 2593-2603.
80. Chang, H. M., Cheng, J. C., Klausen, C., Leung, P. C. (2013). BMP15 suppresses progesterone production by down-regulating StAR via ALK3 in human granulosa cells. *Molecular Endocrinology*, 27(12), 2093-2104.
81. Chang, H. M., Qiao, J., Leung, P. C. (2016). Oocyte-somatic cell interactions in the human ovary-novel role of bone morphogenetic proteins and growth differentiation factors. *Human Reproduction Update*, 23(1), 1-18.

82. Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P., Juengel, J. L., Jokiranta, T. S., McLaren, R. J., Luiro, K., Dodds, K. G., Montgomery, G. W., Beattie, A. E., Davis, G. H., Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, 25(3), 279-283.
83. Knight, P. G., Glister, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction*, 132(2), 191-206.
84. Otsuka, F., McTavish, K. J., Shimasaki, S. (2011). Integral role of GDF-9 and BMP-15 in ovarian function. *Molecular Reproduction and Development*, 78(1), 9-21.
85. Gode, F., Gulekli, B., Dogan, E., Korhan, P., Dogan, S., Bige, O., Cimrin, D., Atabey, N. (2011). Influence of follicular fluid GDF9 and BMP15 on embryo quality. *Fertil Steril*, 95(7), 2274-2278.
86. Irmak, G., Demirtas, T. T., Gumusderelioglu, M. (2019). Highly Methacrylated Gelatin Bioink for Bone Tissue Engineering. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, 5(2), 831-845.
87. Pfaffl MW, H. G., Dempfle L. (2002). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. . *Nucleic Acids Research* 30(9), e36.
88. Kawamura, K., Kawamura, N., Hsueh, A. J. (2016). Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? *Current Opinion Obstericst Gynecoogyl*, 28(3), 217-222.
89. Li, Z., Zhang, M., Tian, Y., Li, Q., Huang, X. (2021). Mesenchymal Stem Cells in Premature Ovarian Insufficiency: Mechanisms and Prospects. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 718192.
90. Neshati, V., Mollazadeh, S., Fazly Bazzaz, B. S., de Vries, A. A. F., Mojarad, M., Naderi-Meshkin, H., Neshati, Z., Mirahmadi, M., Kerachian, M. A. (2018). MicroRNA-499a-5p Promotes Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells to Cardiomyocytes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 186(1), 245-255.
91. Fu, X., He, Y., Xie, C., Liu, W. (2008). Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy*, 10(4), 353-363.
92. Mohamed, S. A., Shalaby, S. M., Abdelaziz, M., Brakta, S., Hill, W. D., Ismail, N., Al-Hendy, A. (2018). Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. *Reproductive Science*, 25(1), 51-63.

93. Gabr, H., Rateb, M. A., El Sissy, M. H., Ahmed Seddiek, H., Ali Abdelhameed Gouda, S. (2016). The effect of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on chemotherapy induced ovarian failure in albino rats. *Microscopy Research and Technique*, 79(10), 938-947.
94. Yang, M., Lin, L., Sha, C., Li, T., Zhao, D., Wei, H., Chen, Q., Liu, Y., Chen, X., Xu, W., Li, Y., Zhu, X. (2020). Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-144-5p improves rat ovarian function after chemotherapy-induced ovarian failure by targeting PTEN. *Lab Investigation*, 100(3), 342-352.
95. Chen, X., Wang, Q., Li, X., Wang, Q., Xie, J., Fu, X. (2018). Heat shock pretreatment of mesenchymal stem cells for inhibiting the apoptosis of ovarian granulosa cells enhanced the repair effect on chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Stem Cell Research Therapy*, 9(1), 240.
96. Chiu, LL., Radistic M. (2013). *Current Opinion in Chemical Engineering* 2. 41-52.
97. Huang, B., Lu, J., Ding, C., Zou, Q., Wang, W., Li, H. (2018). Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells improve ovary function of premature ovarian insufficiency by targeting SMAD. *Stem Cell Research Therapy*, 9(1), 216.
98. Vural, B., Duruksu, G., Vural, F., Gorguc, M., Karaoz, E. (2019). Effects of VEGF (+) Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on Inbred Rat Ovarian Functions in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Insufficiency Model. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15(4), 558-573.
99. Ling, L., Feng, X., Wei, T., Wang, Y., Wang, Y., Wang, Z., Tang, D., Luo, Y., Xiong, Z. (2019). Human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation improves ovarian function in rats with premature ovarian insufficiency (POI) at least partly through a paracrine mechanism. *Stem Cell Research Therapy*, 10(1), 46.
100. Liu, J., Ren, J., Su, L., Cheng, S., Zhou, J., Ye, X., Dong, Y., Sun, S., Qi, F., Liu, Z., Pleat, J., Zhai, H., Zhu, N. (2018). Human adipose tissue-derived stem cells inhibit the activity of keloid fibroblasts and fibrosis in a keloid model by paracrine signaling. *Burns*, 44(2), 370-385.
101. Masuda, S., Shimizu, T., Yamato, M., and Okano, T. (2008). *Advanced Drug Delivery Reviews* 60. 277-285.
102. Chaudhuri, R., Ramachandran, M., Moharil, P., Harumalani, M. and Jaiswal, A.K. (2017). *Materials Science and Engineering*. 950-957.
103. Bao, R., Xu, P., Wang, Y., Wang, J., Xiao, L., Li, G., Zhang, C. (2018). Bone marrow derived mesenchymal stem cells transplantation rescues premature ovarian insufficiency induced by chemotherapy. *Gynecological Endocrinology*, 34(4), 320-326.

104. Mohamed, S. A., Shalaby, S., Brakta, S., Elam, L., Elsharoud, A., Al-Hendy, A. (2019). Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells as an Infertility Treatment for Chemotherapy Induced Premature Ovarian Insufficiency. *Biomedicines*, 7(1).





EK-1. Etik Kurul Onay Belgesi

Evrak Tarih ve Sayısı: 21/12/2018-E.168939



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı



Sayı : 66332047-604.01.02-
Konu : Değerlendirme ve Onay

Sayın Prof. Dr. Gülnur KAPLANOĞLU (TAKE)
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı - Öğretim Üyesi

Araştırmacı grubu Gülnur Take KAPLANOĞLU, Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU, Pınar TOKDEMİR ÇALIŞ, Atiye Seda YAR SAĞLAM, Handan KAYHAN, Ekin Özge TUNCAY, Gökçe KAYNAK BAYRAK, Gökçe NUR YÜCEL'den oluşan G.Ü.ET-18.099 kod numaralı ve "*Prematur Over Yetmezliğinde Adipoz Kökenli Mezenşimal Kök Hücrelerin Cell Sheet Yöntemi ile Uygulanması: Rat Çalışması*" başlıklı araştırma öneriniz incelenmiş ve Gazi Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesindeki ilkelere uygun olduğu saptanarak onaylanmasına oybirliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

It is unanimously approved that the research project numbered G.Ü.ET-18.099 and entitled "*Applying Adipose Derived Mesenchimal Stem Cells by Cell Sheet Method in Prematur Ovarian Insufficiency:Rat Model*" is in compliance with Gazi University Animal Experiments Local Ethics Committee regulations.

With my best regards.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Abdulkadir BEDİRLİ
Kurul Başkanı

Hayvan Türü : Rat Wistar Albino
Hayvan Sayısı : 40

Ek:1 Liste



Ankara
Tel:0 (312) 202 20 57 - 0 (312) 2... Faks:0 (312) 202 38 76
e-Posta :hadyek@gazi.edu.tr İnternet Adresi :http://hadyek.gazi.edu.tr/

Bilgi için :Esengül BOŞNAK
Genel Evrak Sorumlusu
Telefon No:03122022666

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1 (Devam). Etik Kurul Onay Belgesi

GAZİ ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU TOPLANTI KATILIM LİSTESİ	
TOPLANTI TARİHİ :14.12.2018	TOPLANTI SAYISI : 11
ADI-SOYADI	İMZA
Prof.Dr.Abdulkadir BEDİRLİ (Başkan)	
Doç.Dr.Mürşide Ayşe DEMİREL (Başkan Yrd.)	
Prof.Dr.Suna ÖMEROĞLU	
Prof.Dr.Tuncay PEKER	
Prof.Dr.Fatma AKAR	
Prof.Dr.Emin Ümit BAĞRIAÇIK	
Prof.Dr.Mecit Orhan ULUDAĞ	
Doç.Dr.Emre BARIŞ	
Doç.Dr.İpek SÜNTAR	
Doç.Dr.Neşet Volkan ASAR	
Öğr.Gör.Dr.Şeyda DİKER	
Öğr.Gör.Dr.Burcu EKİM	
Vet.Hek.Burcu AVCI	
Osman İÇ	

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler:

Soyadı, adı : TOKDEMİR ÇALIŞ, Pınar

Uyruğu :T.C.

Eğitim:

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora Uzmanlık	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	Devam ediyor 2014
Lisans	Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi	2009
Lise	TED Ankara Koleji Özel Lisesi	2003

İş Deneyimi:

Yıl	Yer	Görev
2015-Halen	Gazi Üniversitesi	Araştırma Görevlisi
2015-2018	Gazi Üniversitesi	Yandal Araştırma Görevlisi
2009-2014	Hacettepe Üniversitesi	Araştırma Görevlisi

Yabancı Dil:

İngilizce

Yayınlar:

1. **Calis P**, Karcaaltincaba D, Isik G, Buyuktasgin F, Bayram M, Karabacak O. A cross-sectional study in non-anaemic pregnant women in Turkey to assess necessity of iron supplementation. *East Mediterr Health J* 2020 Oct 13;26(10):1227-1232. doi: 10.26719/emhj.20.021.
2. Karcaaltincaba D, Ozek MA, Ocal N, **Calis P**, Inan MA, Bayram M. Prevalences of subclinical and overt hypothyroidism with universal screening in early pregnancy. **Arch Gynecol Obstet** 2020 Mar;301(3):681-686. doi: 10.1007/s00404-020-05462-0.
3. Erkan Yurtcu, Deniz KarÇaaltincaba, Hasan HÜseyin Kazan, Halis Özdemir, Meral Yirmibeş Karaoğuz, **Pinar Tokdemir Çaliş**, Gülsüm Kayhan, Sezen Güntekin Ergün, Ferda Emriye PerÇin, Merih Bayram, Mustafa Necmi İlhan, Gamze Bilgili Dedeoğlu, Tuğrul Kaymak, Mehmet Ali Ergün. Is Cervical Swab an Efficient Method for Developing a New Non-Invasive Prenatal Diagnostic Test for Numerical and Structural Chromosome Anomalies? *Turk J Med Sci* 2020 Dec 14.doi: 10.3906/sag-2009-347
4. **Calis P**, Seymen M, Soykan Y, Delen K, Aral BS, Take Kaplanoglu G, Karcaaltincaba D. Does Exposure of Smart Phones during Pregnancy Affect the Offspring's Ovarian Reserve? A Rat Model Study. *Fetal Pediatr Pathol.* 2019 Dec 10:1-11. doi: 10.1080/15513815.2019.1692112.
5. **Calis P**, Erturk N, Bozdog G. Reply to: "Is there any correlation with adnexal torsion and fecundability?" *J Chin Med Assoc.* 2019 Dec;82(12):965. doi: 10.1097/JCMA.0000000000000204
6. Kayhan G, **Calis P**, Karcaaltincaba D, Tug E. 'Prenatal diagnosis of campomelic dysplasia due to SOX9 deletion.' *J Obstet Gynaecol.* 2019 Nov;39(8):1175-1176. doi: 10.1080/01443615.2019.1601165.
7. Beksac MS, Fadiloglu E, Cakar AN, Gurbuz RH, Atilla P, Onbasilar I, Beksac K, Katlan DC, Mumusoglu S, **Calis P**, Beksac M. 'Fetal Cell Microchimerism; Normal and Immunocompromised Gestations in Mice. *Fetal Pediatr Pathol.*' 2019 Aug 22:1-11. doi: 10.1080/15513815.2019.1651803
8. **Pinar Calis**, Nergis Erturk, Gurkan Bozdog: ` Does Ischemia Reperfusion Affect Fecundability In A Rat Model?`, *J Chin Med Assoc.* 2018 Sep.

9. **Calis P**, Karcaaltincaba D., Ozek A., Bayram M. 'Successful Term Pregnancy with Placental Implantation on Uterine Septum: Case Report' Vol 29, No 2 (2018): Gazi Medical Journal
10. **Calis P**, Karcaaltincaba D., Ozek A., Bayram M. 'Successful Term Pregnancy with Placental Implantation on Uterine Septum: Case Report' Vol 29, No 2 (2018): Gazi Medical Journal
11. **Calis P.**, Karcaaltincaba D., Bayram M. 'Effect of Single Layer and Double Layer Uterine Closure on Uterine Niche Volume in 3D Ultrasound in Patients with First C-section' Gazi Med Jour, Nov 2018
12. Karcaaltincaba D, **Calis P**, Ocal N, Ozek A, Altug Inan M, Bayram M., 'Prevalence of gestational diabetes mellitus evaluated by universal screening with a 75-g, 2-hour oral glucose tolerance test and IADPSG criteria.', Int J Gynaecol Obstet. 2017 Aug;138(2):148-151.
13. Ozek MA, **Calis P**, Bayram M, Karcaaltincaba D., 'Fetal intraabdominal umbilical vein varix: antenatal diagnosis and management.' J Matern Fetal Neonatal Med. 2017 Jan 17:1-9
14. Bozdag G, **Calis P**, Zengin D, Tanacan A, Karahan S., 'Age related normogram for antral follicle count in general population and comparison with previous studies.', Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2016 Sep 20;206:120-124.
15. **Calis P**, Yuce K, Basaran D, Salman MC, 'Assessment of Cervicovaginal Cancer Antigen 125 Levels: A Preliminary Study for Endometrial Cancer Screening.', Gynecol Obstet Invest. 2016 Feb 13
16. **Calis P**, Bozdag G, Karakoc Sokmensuer L, Kender N., 'Does ischemia-reperfusion injury affect ovarian reserve and follicle viability in a rat model with adnexal torsion?', Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2015
17. Basaran D, Salman MC, **Calis P**, Ozek A, Ozgul N, Usubütün A, Yuce K., 'Diagnostic accuracy of intraoperative consultation (frozen section) in borderline ovarian tumours and factors associated with misdiagnosis.', J Obstet Gynaecol. 2014
18. Bozdag G, Demir B, **Calis P**, Zengin D, Dilbaz B., 'The impact of adnexal torsion on antral follicle count when compared with contralateral ovary', J Minim Invasive Gynecol. 2014

19. Salman MC, **Calis P**, Deren O., `Uterine Rupture with Massive Late Postpartum Hemorrhage due to Placenta Percreta Left Partially In Situ.` , Case Rep Obstet Gynecol. 2013
20. Vaizoglu F, Yuce K, Salman MC, Basaran D, **Calis P**, Ozgul N, Usubutun A., `Lymphovascular space involvement is the sole independent predictor of lymph node metastasis in clinical early stage endometrial cancer.` , Arch Gynecol Obstet. 2013 Jun
21. Bozdog G., **Tokdemir Calis P.**, `Ovarian hyperstimulation syndrome:an update for prediction, prevention and treatment`, Journal of Turkish Society of Obstetrics and Gynecology, (J Turk Soc Obstet Gynecol), 2012; Vol: 9, Issue: 4, Pages: 177- 85
22. **Calis P**, Ozkutlu S, Beksac S, `Fetal Arrhythmia; Maternal Systemic Lupus Erythematosus`, Gynecol Obstet Reprod Med, 17, 3 (2011)

Hobiler:

Tenis, Piyano



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..