

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**OVARYUM DOKUSUNUN, VİTRİFİKASYON VE YAVAŞ SOĞUTMA
TEKNİKLERİYLE KORUNURLUĞUNUN HİSTOPATOLOJİK YÖNDEN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Ferda TOPAL

HİSTOLOJİ-EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Esra ATABENLİ ERDEMLİ

ANKARA

2010

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**OVARYUM DOKUSUNUN, VİTRİFİKASYON VE YAVAŞ SOĞUTMA
TEKNİKLERİYLE KORUNURLUĞUNUN HİSTOPATOLOJİK YÖNDEN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Ferda TOPAL

HİSTOLOJİ-EMBRYOLOJİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Esra ATABENLİ ERDEMLİ

**Bu tez Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından
10B-3330003 proje numarasıyla desteklenmiştir.**

ANKARA

2010

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji...ve...Embriyoloji.. Anabilim/Bilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan

Ovaryum dokusunun...vitrifikasyon...ve...yavaş...soğutma (slow freezing)
teknikleriyle..korunurluğunun..histopatolojik yönden karşılaştırılması başlıklı,
Dr.....Ferda...TAPAL.....'e ait bu çalışma aşağıdaki jüri
tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30/09/2010

Ünvanı, Adı, Soyadı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji...Embriyoloji... Anabilim/Bilim Dalı

Jüri Başkanı

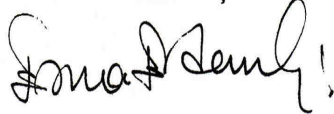


Ünvanı, adı, soyadı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji-Embriyoloji.. Anabilim/Bilim Dalı

Tez Danışmanı



Ünvanı, adı, soyadı

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji-Embriyoloji.. Anabilim/Bilim Dalı

Üye



ÖNSÖZ

Kanser tedavilerinin geliştirilmesiyle toplumlarda buna bağlı mortalite oldukça azalmaktadır. Kanser yada başka hastalıkların tedavilerinde kullanılan radyo/kemoterapi sonrası verilen ilaçlar kadınlarda infertiliteye neden olabilmektedir. Fertilitiyi korumak için ovosit, embriyon veya ovaryum dokusu dondurularak saklanabilir. Ovosit ve embriyon saklanması klinikte uygulanan rutin metodlardır. Ovaryum dokusu kriyoprezervasyonu, tedavisine hemen başlanması gereken kadın hastalarda, prepubertal kız çocuklarında ve partneri olmayan kadın hastalarda uygulanabilir tek seçenek olmasına rağmen hala deneysel düzeydedir. Bu yöntemde yavaş dondurma ve hızlı dondurma teknikleri kullanılır. Çalışmalar devam ederken, biz de araştırmamızla bu konuya katkı yapacağımızı ve ileriki çalışmalara ışık tutacağımızı düşünmekteyiz.

Uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde büyük emekleri geçen, bilgi ve birikimlerini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Canan Akbay'a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmalarımda ve her konuda bana bilgi, destek ve anlayışla yaklaşan, deneyimleriyle her zaman ön açıcı olan değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Esra Atabeni Erdemli'ye vermiş olduğum emekten dolayı minnetlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca emeği geçen, destek ve yardımlarıyla yanımda olan kıymetli hocalarım sayın Prof. Dr. Cengiz Güven, sayın Prof. Dr. Nursen Saraç, sayın Prof. Dr. Alp Can, sayın Prof. Dr. Bizden Sabuncuoğlu, sayın Prof. Dr. Belgin Can, sayın Prof. Dr. Oya Evirgen, sayın Yrd. Doç. Dr. Deniz Billur'a; Yard. Doç. Dr. Sibel Serin Kılıçoğlu, Uzm. Dr. Sinan Özkavukçu, Uzm. Dr. Özgür Çınar, Dr. Hilal Göktürk, Dr. Hande İlkay, Bio. Deniz Balcı, Bio. Nazlı Hayırlı'ya; Nezihe Akçakaya, Hüseyin Solmaz, Erdoğan Çalışkan, Remzi Ata, Kerim Dilbaz, İlkay Bektaş'a teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalında görev yapan sayın Zeynep Bıyıklı'ya yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Bu günlere gelmemde her türlü emeği ve sabrı gösteren anne ve babama, iyi ve zor zamanlarımda hep yanımda hissettiğim sevgili nişanlım Erdiç Çelikkan'a teşekkür ederim.

Bu tez Ankara Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından 10 B-3330003 proje numarasıyla desteklenmiştir.

Dr. Ferda Topal

Ankara- 2010

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

Kabul ve Onay.....	iii
Önsöz	iv
İçindekiler	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Tablolar Dizini	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Ovaryumun Anatomisi	3
2.2. Ovaryumun Embriyolojisi	4
2.3. Ovaryum Histolojisi	7
2.4. Ovaryum Doku Kriyopreservasyonu.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	24
3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Dokuların Elde Edilmesi	24
3.2. Ovaryum Dokusu Dondurma Teknikleri.....	24
3.3. Ovaryum Dokusu Çözme İşlemleri	26
3.4. Işık Mikroskopisi İçin Yapılan Çalışmalar.....	26
3.5. Konfokal Mikroskop İçin Yapılan Çalışmalar	29
3.6. Elektron Mikroskop İçin Yapılan Çalışmalar	29
3.7. İstatistik	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. İstatistiksel Bulgular	32
4.2. Işık Mikroskopik Bulgular	35
4.3. Konfokal Mikroskopik Bulgular	47
4.4. Elektron Mikroskopik Bulgular	48
5. TARTIŞMA	62
6. SONUÇLAR	67
ÖZET.....	68
SUMMARY	69
KAYNAKLAR	70
EKLER.....	75
EK 1.	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SRY	: Cinsiyet belirleyici Y bölgesi
TBF	: Testis belirleyici faktör
ZP	: Zona Pellusida
PAS	: Periodic acid- Schiff
LH	: Lüteinize edici hormon
FSH	: Folikül stimüle edici hormon
IGF-I	: İnsülin benzeri büyüme faktörü-I
OMI	: Ovosit inhibe edici peptid
IVF	: Canlı dışında fertilizasyon
ICSI	: Sitoplazma içine sperm enjeksiyonu
IVM	: Canlı dışında olgunlaşma
PFA	: Paraformaldehit
EG	: Etilen glikol
DMSO	: Di-metil sülfoksit
BSA	: Dana serum albumini
FBS	: Fötal dana serumu
NaOH	: Sodyum hidroksit
TUNEL	: Terminal deoksiribonükleotidil transferaz aracılı dUTP-digoksinin işaretleme ve etiketleme
PBS	: Fosfat tamponlu solüsyon
TEM	: Geçirimli elektron mikroskobu
PdF	: Primordiyal folikül
PrF	: Primer folikül
S	: Sekonder folikül
L15	: Leibovitz's 15
µm	: Mikrometre
M	: Molar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1. Ovaryumların şematik olarak gösterilen anatomik yapısı	3
Şekil 2.2. Ovaryumun farklanması.....	4
Şekil 2.3. Primordiyal germ hücrelerinin göçü	5
Şekil 2.4. Ovaryumların embriyolojik gelişimi	6
Şekil 2.5. Folikül gelişimi	10
Şekil 2.6. Ovaryum korteksinde primordiyal foliküller	11
Şekil 2.7. Ovaryumda tek katlı primer ve çok katlı primer folikül	13
Şekil 2.8. Sekonder (antral) ve Graaf folikül	15
Şekil 2.9. Hipofiz-ovaryum aksı.....	16
Şekil 4.1. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. Korteks bölgesinde epitelyum germinativumun altında tüm folikül tipleri izlenmekte.....	37
Şekil 4.2. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. Sağlam primordiyal foliküller	38
Şekil 4.3. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti.....	38
Şekil 4.4. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	40
Şekil 4.5. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	41
Şekil 4.6. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	42
Şekil 4.7. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	42
Şekil 4.8. Hızlı dondurma ovaryum dokusu kesiti	43
Şekil 4.9. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti	44
Şekil 4.10. Üç gruba ait ovaryum dokusu kesitleri	45
Şekil 4.11. Üç gruba ait ovaryum dokusu kesitleri	46
Şekil 4.12. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesitleri. TUNEL (-) ve (+) kontroller	47

Şekil 4.13. Üç gruba ait ovaryum dokusu kesitlerinde sekonder folikülde TUNEL boyama	47
Şekil 4.14. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti	48
Şekil 4.15. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti	49
Şekil 4.16. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti.....	49
Şekil 4.17. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti	50
Şekil 4.18. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti	50
Şekil 4.19. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti.....	51
Şekil 4.20. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti	52
Şekil 4.22. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	52
Şekil 4.22. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti	53
Şekil 4.23. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	53
Şekil 4.24. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	54
Şekil 4.25. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	54
Şekil 4.26. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	55
Şekil 4.27. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	55
Şekil 4.28. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	56
Şekil 4.29. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	57
Şekil 4.30. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	58
Şekil 4.31. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti	58
Şekil 4.32. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	59
Şekil 4.33. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	59
Şekil 4.34. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	60
Şekil 4.35. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	60
Şekil 4.36. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	61
Şekil 4.37. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti.....	61

TABLolar DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 3.1. Kontrollü dondurma sisteminde oluşturulan program çizelgesi.	25
Tablo 4.1. Kontrol, hızlı dondurma ve yavaş dondurma grubunda sayılan foliküllerin sayı ve yüzdeleri.....	32
Tablo 4.2. Kontrol, hızlı ve yavaş dondurma gruplarında sayılan primordiyal, primer ve tüm foliküllerin sağlam olanlarının yüzdelerinin Ki-kare testine göre istatistiksel sonuçları.	33
Tablo 4.3. Kontrol grubu ve yavaş dondurma grubunda sayılan sağlam primordiyal folikül yüzdelerinin Ki-kare testine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması.	33
Tablo 4.4. Yavaş dondurma ve hızlı dondurma grubunda sağlam primordiyal ve tüm foliküllerin toplam sayılarının Ki-kare testine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması.	34

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No:

- Grafik 4.1. Her üç grupta sayılan tüm foliküllerin yüzdelerinin Ki-kare testiyle istatistiksel olarak karşılaştırılması33
- Grafik 4.2. Her üç grupta sayılan sağlam primordiyal foliküllerin yüzdelerinin Ki-kare testiyle istatistiksel olarak karşılaştırılması34
- Grafik 4.3. Her üç grupta sayılan sağlam primer foliküllerin yüzdelerinin Ki-kare testiyle istatistiksel olarak karşılaştırılması35

1. GİRİŞ

Günümüzde artan kanser insidansına karşılık geliştirilen tedaviler sonrasında sağkalım belirgin olarak artmıştır ancak kullanılan ilaçlar ve radyoterapi uygulamalarının en önemli yan etkisi gonadal yetmezlik olarak ortaya çıkmaktadır. Özellikle alkile edici ajanların bu konuda etkili olduğu bilinmektedir. Kanser tedavisinin yanı sıra birçok sistemik ve otoimmün hastalığın tedavisinde, kemik iliği/kök hücre nakli öncesinde verilen ilaçlar ve yapılan her türlü jinekolojik cerrahi, kadınlarda infertiliteye yol açabilmektedir. İnfertilite sorunuyla karşılaşan hastalarda doğurganlığın korunması için tedavi seçeneklerine ihtiyaç vardır. Ovositlerin, embriyonların veya ovaryum dokusunun dondurularak saklanması bu seçeneklerden bazılarıdır ancak embriyon ve ovositin dondurulmasının uygulanamayacağı bazı durumlar aşağıda belirtilmiştir:

- Embriyon saklanması uygulanamayacağı haller:
 - Yeterli süre olmaması
 - Stimülasyon tedavileri
 - Hastanın bekar olması
 - Hastanın prepubertal dönemde olması
- Ovosit saklanması uygulanamayacağı haller:
 - Ovositin, hassas bir hücre olması,
 - Ovosit elde edilmesi için hastanın indüklenmesi gerekliliği,

Ovaryumun kriyoprezervasyonu, doğurganlığın korunmasının gerektiği bazı koşullarda tartışmasız tek seçenektir. Günümüzde ovaryum kriyoprezervasyonu sonrası canlı doğumlar bildirilmişse de yöntem, dokunun korunması ve tekrar canlıya nakli için yeterince uygulanabilir ve rutin değildir. Bu nedenle kemo/radyoterapi almış ya da alacak bir çok hasta bu tedavilere yönlendirilememekte, ya da bu tedavilere yeterince güvenilmemektedir. Bu kapsamda güvenli, uygulanabilir,

maliyetsiz bir tekniğe ihtiyaç duyulmaktadır. Dondurarak saklama ve sonrasında hastaya tekrar transplante etme yoluyla ovaryum dokusu canlı olarak korunabilir. Ovaryum dokusu iki yöntemle dondurulabilir. Bunlar vitrifikasyon (hızlı dondurma) ve yavaş dondurmadır. Genellikle ovaryumun kriyoprezervasyonunda yavaş dondurma tekniği kullanılmıştır. Vitrifikasyon, soğutma hızının çok yüksek olduğu bir dondurma yöntemidir. Bu yöntemle buz kristal oluşumu engellenmeye ve sıvıların doğrudan camsı bir yapıya geçerek donmasına imkan verir.

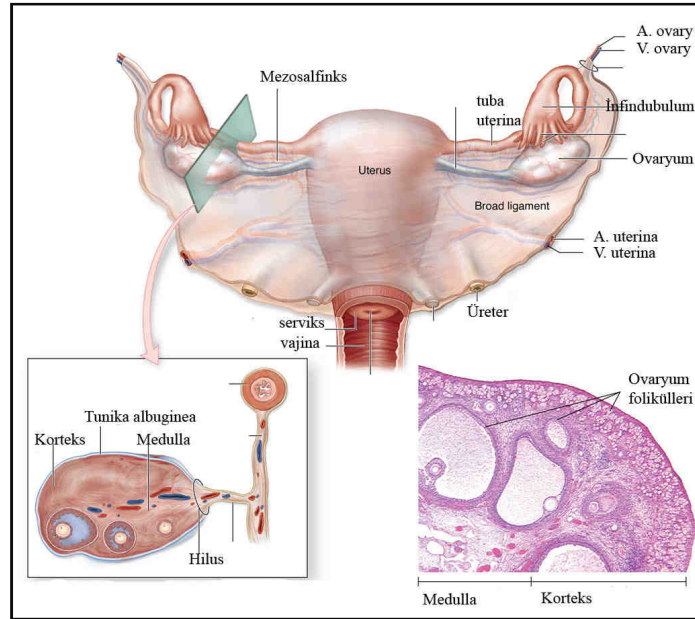
Çalışmamızda, farelerin ovaryumlarında bu iki yöntemi uygulayarak, yöntemlerin birbirine olan farklılıklarının ince yapı düzeyinde çeşitli görüntüleme yöntemleriyle ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. OVARYUMUN ANATOMİSİ

Ovaryum doğum yapmamış kadınlarda 3 cm uzunlukta, 1,5 cm genişlikte, 1 cm kalınlıktadır ve küçük pelvisin yan duvarlarında bulunan fossa ovarica adı verilen çukurcuklarda yer alır. Ovaryumların ön kısımlarında kan damarlarının ve sinirlerin girdiği hilus adı verilen bölge bulunur. Mezovaryum (posterior), kan damarlarını ovaryumlara ileten bir periton kıvrımı olup ovaryumu uterusun yan kenarlarından uzanan broad ligamentine bağlar. Ovaryumun üst kutbu suspansory ligamentle pelvik duvara, alt kutbu ise ovarian ligament ile uterusu tutunur (Şekil 2.1).

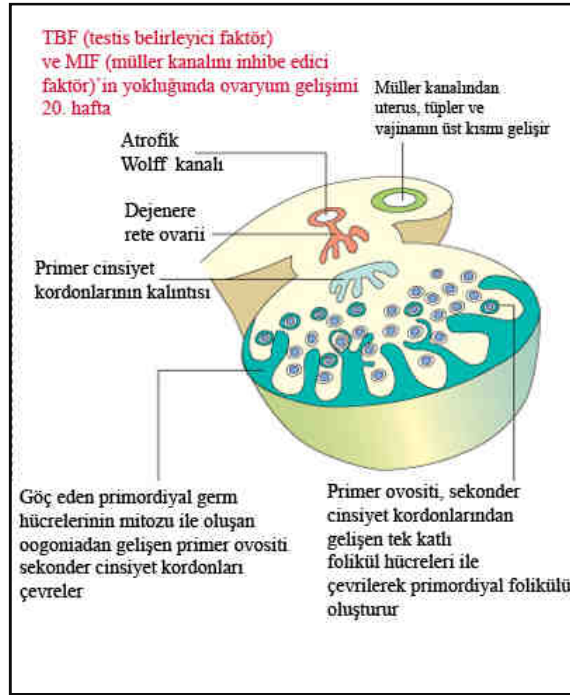
Pubertal dönemden önce ovaryumun yüzeyi düz bir yapıdadır. Üreme çağında ise tekrarlayan ovulasyonlar nedeniyle skarlı ve düzensiz bir hal alır. Postmenapozal dönemde, ovaryum boyutları üreme çağındakinin dörtte biri büyüklüğe iner (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molacular Biology, 2006*).



Şekil 2.1. Ovaryumların şematik olarak gösterilen anatomik yapısı (Junqueira, L.C., and Carniero J., *Temel histoloji*'den alınmıştır).

2.2. OVARYUMUN EMBRİYOLOJİSİ

Cinsiyetin farklanması, bazıları otozomal çok sayıda genin rol oynadığı kompleks bir süreçtir. Seksüel dimorfizmin anahtarı, kısa kolunda (Yp11) SRY genini taşıyan Y kromozomudur. Bu genin eksprese ettiği protein, cinsiyet organlarının kaderini belirleyen genleri harekete geçiren bir transkripsiyon faktörüdür. SRY proteini testis belirleyici faktördür (TBF). Bu faktörün varlığıyla fetüsün cinsiyeti erkek tipinde, yokluğunda da kadın tipinde gelişir (*Langman Medikal Embriyoloji, 2005*) (Şekil 2.2).



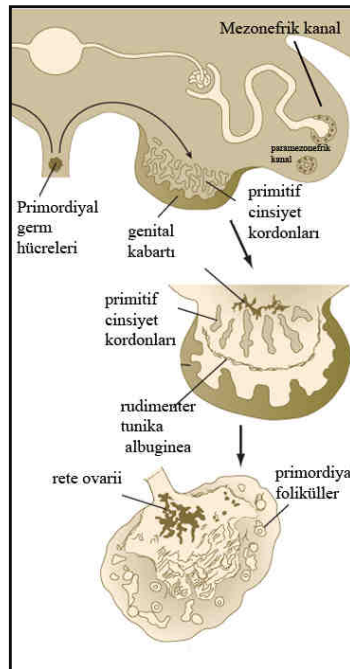
Şekil 2.2. Ovaryumun farklanması (Kierszenbaum A.L. *Histoloji ve hücre biyolojisi*'nden alınmıştır)

Gonada gelen hücrelerden erkek yada dişi gamet gelişmesi, gonadaki somatik hücrelerin çevresel koşullarına bağlıdır, kendi genetik içeriklerine bağlı değildir. Kadın gonadına transplante edilen XY primordiyal germ hücrelerinden ovosit, erkek gonadına transplante edilen XX hücrelerinden spermatogonia gelişir.

Ovaryumun farklanmasına neden olan moleküler faktörler günümüzde tam olarak aydınlatılamamıştır. Bir hipoteze göre; Wnt-4, FGF-9 ekspresyonunu inhibe ederek SOX-9 un azalmasına neden olur. Bu azalma testis gelişimini inhibe eder,

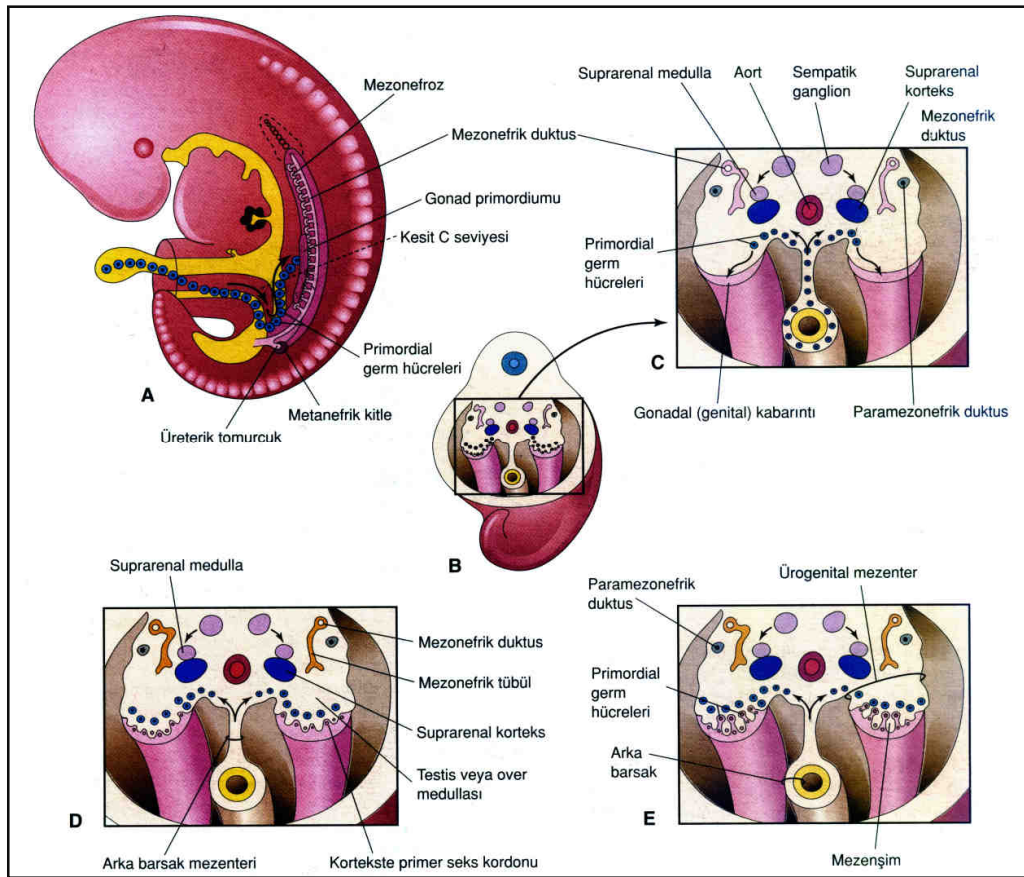
ovaryumun gelişimine yol açar. Testisin tersine, canlı germ hücrelerinin varlığı, ovaryumun farklılaşması için önemlidir. Primordiyal germ hücreleri genital tüberküle ulaşmaz ise yada anormal, dejenere yapıdaysa (XO gibi) gonad gerileri ve “streak ovaryum” meydana gelir. Primordiyal germ hücreleri gelişecek olan ovaryuma girdikten sonra dış kortikal bölge yada kortikomedullar sınıra yakın bir yerde yoğunlaşırlar.

Primordiyal germ hücreleri, gelişimin erken evrelerinde vitellus kesesinin allantoise yakın duvarındaki endoderm hücreleri arasında belirirler. Son bağırsağın dorsal mezenteriy boyunca ameboid hareketlerle ilerleyerek, 5. haftanın başında primitif gonadlara ulaşır, 6. haftada da genital kabartıyı işgal ederler (*Langman Medikal Embriyoloji, 2005*) (Şekil 2.3). Yeni oluşan gonaddan sekrete edilen kemotaktik faktörler de bu hücrelerin göçünü etkiliyor olabilir. Yaklaşık 1000-2000 kadar hücre genital kabartıya ulaşır. Buraya ulaşan hücrelerin göç davranışları son bulur (*Human Embryology and Developmental Biology, 2009*). Bu hücreler genital kabartıya ulaşamazsa gonadlar gelişemez. Gonadların over ve testise farklılaşmasında primordiyal germ hücrelerinin indükleyici etkisi vardır.



Şekil 2.3. Primordiyal germ hücrelerinin göçü (Carlson M.B., *Human Embryology and Developmental Biology*’ den alınmıştır).

Primordiyal germ hücrelerinin primitif gonadlara ulaşmasından hemen önce ve ulaşması sırasında, genital kabartı epitel proliferer olur ve epitel hücreleri altlarındaki mezenşimin içine ilerler (Şekil 2.4). Bunlar burada primitif cinsiyet kordonları denilen belirgin bir düzeni olmayan kordonları oluştururlar. Hem erkek hem de dişi embriyolarda bu kordonlar yüzey epiteline bağlıdır ve bu dönemde erkek veya dişi gonadlarının birbirinden ayırt edilebilmesi mümkün değildir. İşte bu devredeki gonad farklanmamış gonad olarak bilinir (*Langman Medikal Embriyoloji, 2005*).



Şekil 2.4. Ovaryumların embriyolojik gelişimi (Moore L.K., Persaud T.V.N. *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*).

Ovaryum folikülünü oluşturan folikül epitel hücrelerinin köken aldığı üç bölge tahmin edilmektedir:

1. Sölm epitel (sekonder cinsiyet kordonları)
2. Mezenefrik primitif cinsiyet kordonları
3. İlk iki seçeneğin kombinasyonu

Son olasılık erken foliküler epitel içindeki açık- koyu boyanan iki belirgin hücre tipinin varlığıyla da uyumludur. Bu evrede oogonia olarak adlandırılan primer germ hücreleri, 4. ayın başına gelene kadar mitozla çoğalır. Sonrasında oogonialar mezonefrozun sekrete ettiği retinoik etkisi altında ovaryumun iç medulla bölgesinde I. mayozun profaz safhasına girerler. Bu etki de mezonefrik hücre kümelerinden oluşan rete ovarii olarak adlandırılan epitelyum ile ilişkili olabilir. Ovosit olarak adlandırılan mayotik oogoniumlar foliküler hücreler ile ilişki içerisindedirler ve primordiyal folikülü oluştururlar. Bu sırada, ovaryumun kortikal bölgesindeki oogoniumlar mitoz bölünmelerine devam ederler. Oogonium ve erken ovositler gelişimlerinde senkronizasyonu sağlayan hücreler arası sitoplazmik köprülerle bağlıdır. 22. haftaya kadar foliküler gelişim tüm ovaryumda gerçekleşir. Ovositler I. mayoz bölünmenin profaz aşamasında diploten safhasına ulaşana kadar bölünmelerini sürdürürler. Mayoz durur ve blokaj kalkana kadar ovositler bu safhada kalır. Adölesan dönemde, ovulasyondan önce tüm ovositler bu şekildedirler (*Human Embryology and Developmental Biology, 2009*).

Yüzey epiteli, korteksteki foliküllerden, tunika albuginea adı verilen, ince bir fibröz kapsülle ayrılır. Overler, gerileyen mezonefrozdan ayrıldıktan sonra, mezenteri olan, mezovarium ile bağlanırlar (*Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi, 2002*).

2.3. OVARYUM HİSTOLOJİSİ

Kadın gonadı olarak ovaryumun birbiriyle ilişkili iki fonksiyonu vardır: gametlerin (gametogenezis) oluşturulması ve steroid hormon üretimi (steoidogenezis). Kadında gamet üretimi oogenezis adını alır. Ovaryumdan östrojen ve progesteron olmak üzere iki ana hormon sekrete edilir.

Östrojen: iç ve dış genital organların gelişimini indükler ve pubertede kadın cinsiyet özelliklerinden sorumludur, ayrıca meme dokusunda kanalların ve yağ dokusunun oluşumuna önemli katkısı vardır.

Progesteron: başta uterus olmak üzere iç genital organların gelişimini indükler. Gebelik için endometriumda sekretuar değişiklikleri sağlar. Progesteron ayrıca lobüler çoğalmayı başlatarak meme bezini laktasyon için hazırlar.

İki hormon da fertilize ovositin uterusu implantasyonunu sağlamak için menstrüel siklusa önemli rol oynar. İmplantasyon gerçekleşmezse uterus endometriumu dejenere olur ve menstrüasyon siklusu devam eder (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology, 2006*).

Ovaryum korteks ve medulladan oluşan bir organdır. Medulla, gevşek bağ dokusu, geniş kıvrılmış kan damarları, lenf damarları ve sinirler içeren ovaryumun orta bölgesidir. Korteks ise medullanın etrafını çevreleyen periferik ovaryum bölgesidir. Zengin hücreli bağ dokusu içine gömülü ovaryum folikülleri burada yer alır. Folikül çevresinde düz kas hücreleri bulunur. Korteks ve medulla sınırı belirgin değildir (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology, 2006*).

Ovaryum yüzeyi basit yassı ya da kübik epitel ile kaplıdır; bu epitel germinal epitel olarak adlandırılır (*Temel histoloji, 2003*). Mezovaryumu çevreleyen mezotel ile devam eder. Geçmişte, embriyonik gelişimde germ hücrelerinin buradan köken aldığı düşünülerek bu ad verilmiştir. Ancak bugün primordiyal germ hücrelerinin ekstragonadal yerleşimli olduğu ve farklılaştıkları embriyonik gonadın korteksine vitellus kesesinden göç ettiği bilinmektedir (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology, 2006*). Ovaryumun beyazımsı rengini veren tunika albuginea, germinal epitel ve korteks arasında sıkı bağ dokusu katmanı olarak bulunur (*Temel histoloji, 2003*).

Ovaryum folikülleri ovosit gelişimi için bir mikroçevre sağlar. Ovaryum folikülleri, primer ovosit içeren, her biri farklı büyüklükte, korteks stroması içine dağılmış yapılardır. Folikül çapları gelişen ovositin evresini gösterir. Fetal hayat boyunca oluşan oogenezin erken safhalarında mitotik bölünmeyle oogoniyum sayısı artar. Ovositler doğumda I. mayoz bölünmenin profaz safhasında duraklamış olarak bulunurlar. Puberte boyunca çok az folikül büyür ve olgunlaşır. Folikül olgunlaşması, ovulasyon bir süre sonra menstrüel siklus ile paralel hale gelir.

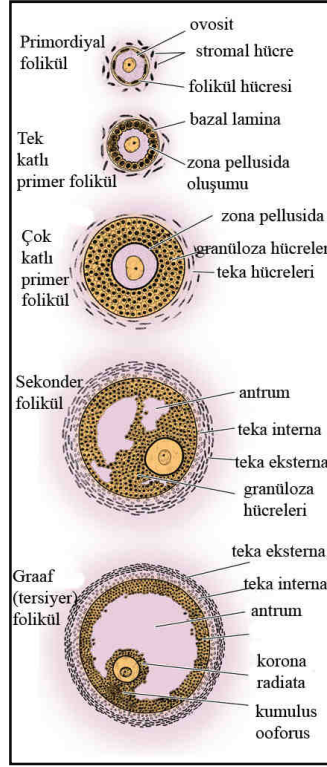
Normalde her sıklusta tek ovosit tam olgunluğa ulaşır ancak birden fazla ovositin atıldığı durumlar çoklu zigot oluşumuna neden olabilir (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology, 2006*). Her menstrüel siklus döngüsünde (ortalama 28 gün) genellikle tek bir ovosit serbest bırakılır. Kadının doğurganlık çağı yaklaşık 30-40 yıl sürer ve yalnızca 450 kadar ovosit atılmış olur (*Temel histoloji, 2003*). Tüm üreme çağı boyunca bir kadın yaklaşık 400 olgun ovosit üretir. Doğumda 600.000 ile 800.000 arasında olan primer ovositlerin hepsi maturasyonunu tamamlayamaz ve atreziye gider. Bu süreç fetal hayatın 5. ayında başlar ve ovosit çevresindeki hücreler de apopitozis ile bu duruma eşlik eder. Primer ovosit sayısı atreziye doğuma kadar %20'ye iner. Menapoz sürecinde ise ovositler birkaç yıl içinde dejenere olur (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology, 2006*)

2.3.1. Folikül Gelişimi

Kadında bir menstrüel siklus üç evreden oluşur; foliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre. Foliküler evrede primordiyal folikülden olgun folikül ya da Graaf folikülü gelişir (*Histoloji ve hücre biyolojisi, 2006*) (*Şekil 2.5*).

- Primordiyal foliküller
- Gelişen foliküller
- Olgun yada Graaf follikülleri

Gelişen folliküller, primer ve sekonder folikül olarak iki kategoriye ayrılır. Ovaryumda tüm evrelerde foliküller bulunur ancak primordiyal folikül sayısı daha fazladır.



Şekil 2.5. Folikül gelişimi (Junqueira, L.C., and Carniero J., *Temel histoloji*'den alınmıştır)

2.3.1.1. Primordiyal Folikül

Folikül, gelişiminin erken aşamasıdır. İlk olarak fetal gelişimin 3. ayında ortaya çıkar. Primordiyal folikül gelişiminin erken evreleri gonadotropin etkisinden bağımsızdır. Olgun ovaryumda primordiyal foliküller korteks stromasında tunika albugineanın altında bulunurlar (Şekil 2.6). Tek katlı yassı folikül hücreleri ovositi çevreler. Folikül hücrelerinin dış yüzü bazal membran ile sınırlandırılmıştır. Foliküldeki ovosit çapı yaklaşık 30 µm çapındadır ve büyük, iyi dağılmış kromatin içeren asentrik çekirdeği ve bir yada birden fazla çekirdekçisi vardır. Ovosit sitoplazmasında Golgi vezikülleri, endoplazma retikulumu, mitokondriyon ve lizozom kümelerinin oluşturduğu Balbiani cisimciği bulunur.



Şekil 2.6. Ovaryum korteksinde primordiyal foliküller (Junqueira, L.C., and Carniero J., *Temel histoloji*'den alınmıştır).

2.3.1.2. Primer Folikül

Ovositte, folikül hücrelerinde ve komşu stromada değişiklikler meydana gelir. İlk olarak ovosit genişler, çevresindeki yassı folikül hücreleri çoğalır ve kübik hale gelir. Gelişen bu foliküle primer folikül adı verilir (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology, 2006*). Ovositler kalın, amorf bir örtü olan ve asidofil boyanan zona pellusida (ZP) ile çevrilidir ve bu katman en az üç farklı glikoprotein içerir (*Temel histoloji, 2003*). Folikül hücreleri tek katlı kübik yada prizmatik olup ovosit çapı 50-80 μm 'e ulaştığında, ZP ışık mikroskopunda görülebilir (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology, 2006*).

Glikozaminoglikanlar, glikoproteinlerden zengin ve periyodic acid- Schiff (PAS) reaksiyonu ile boyanan ZP' nin sentezine hem ovositlerin hem de folikül hücrelerinin katkıda bulunduğu düşünülmektedir (*Temel histoloji, 2003*).

Primer foliküller iki tipe ayrılır;

1. Tek katlı primer foliküller. Bunların etrafında tek sıralı kübik veya prizmatik foliküler hücreler bulunur (Şekil 2.7).

2. Çok katlı primer foliküller. Çok katlı ve çoğalan kübik hücrelerle çevrilidir. Foliküler hücreler, kendilerini ovaryumun stromasından ayıran bir bazal lamina tarafından desteklenir (*Histoloji ve hücre biyolojisi, 2006*) (*Şekil 2.7*).

Tek katlı folikül hücreleri hızlı mitotik çoğalmayla çok katlı folikül hücreleri haline gelir ve granüloza hücreleri olarak tanımlanır. Foliküler gelişim sırasında, granüloza hücreleri arasında çok sayıda gap junction oluşur. Granüloza hücrelerinin bazal katı zonula okludens denilen sıkı bağlantılara sahip değildir, bu nedendir ki kan-folikül bariyeri yoktur.

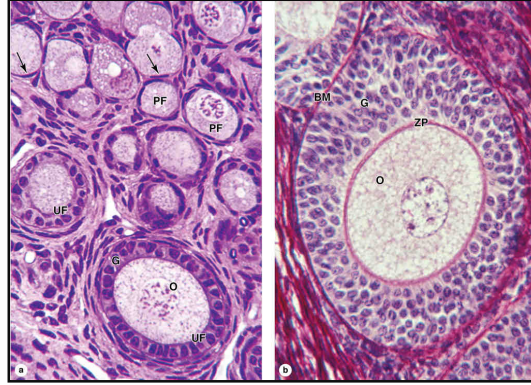
Granüloza hücrelerinin çevresindeki stroma hücreleri kılıf şeklinde folikülü sarar. Bu yapıya teka folikülü adı verilir. Daha sonra iki tabakaya ayrılır; teka interna ve teka eksterna. Teka interna damardan zengin bir yapıya sahiptir. Buradaki hücreler steroid üreten hücrelerin ince yapı özelliklerine ve çok sayıda Lüteinize edici hormon (LH) reseptörlerine sahiptir. LH stimülasyonu ile östrojen prekürsörü olan androjenlerin sentez ve salınımı artar. Teka internada sekretuar hücelere ek olarak fibroblast, kollajen fibrilleri ve endokrin organlarda olduğu gibi iyi gelişmiş bir damar ağı mevcuttur.

Teka eksterna ise bağ dokusunun dış katmanıdır. Ana olarak, düz kas hücreleri ve kollajen lifleri içerir.

Teka tabakaları arasındaki ayırım belirgin değildir. Ancak bazal lamina, granüloza hücre tabakası ile teka interna arasında belirgin bir sınır çizer. Bu yapı teka internadaki zengin damar yatağı ile avasküler granüloza katını ayırır.

Ovosit olgunlaşırken organel dağılımı da değişir. Serbest ribozomların, mitokondriyonların, küçük veziküllerin ve düz endoplazma retikulumlarının sayısı artar. Seyrek olarak yağ damlacıkları ve lipokrom pigmentine de rastlanabilir. Memelilerdeki ovositlerde kortikal granüller adı verilen sekretuar veziküller bulunur. Ovosit membranının hemen altında yer alırlar. Ovosit, sperm tarafından aktive edildiğinde bu granüllerin proteaz içerikleri ekzositozla salıverilir. Perivitellin aralıkta çok sayıda mikrovillus, ovosit ve ZP çevresindeki granüloza hücreleri

arasında uzanır. Bu uzantılar sayesinde membranlar arasında temas sağlanır ancak sitoplazmik devamlılık saptanmamıştır (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology, 2006*).



Şekil 2.7. Ovaryumda tek katlı primer ve çok katlı primer folikül (Junqueira, L.C., and Carniero J., *Temel histoloji*'den alınmıştır).

2.3.1.3. Sekonder folikül

Antrumdaki sıvı içeriği ile karakterizedir. İlk olarak primer folikül kortikal stromanın derinlerine doğru gider. Granüloza hücrelerinin mitozla çoğalması sonucu folikülün boyutu artar. Ovosit ve folikül hücrelerinin gelişimi için birçok faktör gerekir;

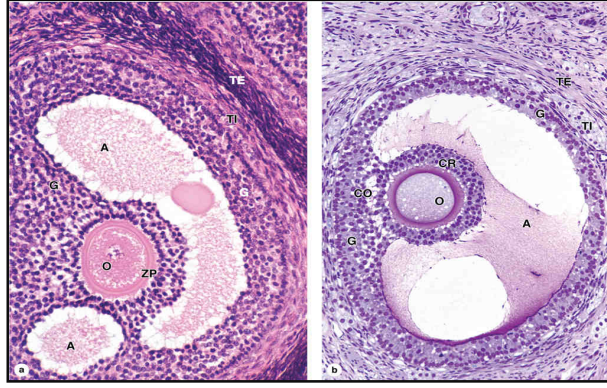
- Folikül stimüle edici hormon (FSH)
- Büyüme faktörleri; epidermal büyüme faktörleri, insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I)
- Kalsiyum iyonu (Ca^{2+})

Sekonder folikül: Granüloza hücre tabakası 6-12 hücre katına ulaştığında, hücreler arasını sıvı dolu bir kavite ortaya çıkar (Şekil 2.8). Hyalüronandan zengin, folikül sıvısı olarak adlandırılan bu sıvı granüloza hücreleri arasında birikmeye devam eder. Kaviteler birleşerek tek, yarım ay şeklinde, antrum adı verilen bir boşluğa dönüşür. Bu foliküle sekonder yada antral folikül adı verilir. Asentrik çekirdekli ovositin çapı yaklaşık 125 μm 'ye ulaşır ve daha fazla büyümmez. Granüloza

hücrelerinden antral sıvıya salınan ovosit maturasyonunu inhibe edici peptit (OMI), ovositin büyümesini duraklatır. Sekonder folikülün boyutu ve OMI konsantrasyonu arasında direkt bir bağlantı vardır. Konsantrasyonu küçük folikülde en az, olgun folikülde en fazladır. Folikül sıvısının ilk ortaya çıktığı erken sekonder folikül evresinde folikül çapı 0,2 mm, olgun folikül evresinde ise 10 mm yada daha fazla çapa ulaşır.

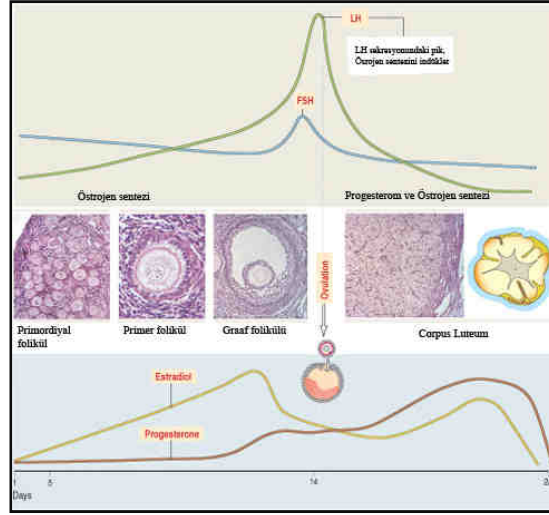
Sekonder folikülün boyutu arttığında, atrum da genişler ve çevresinde birkaç kat granüloza hücresi bulunur. Ovositle bağlantılı olduğu kutup hariç granüloza hücre katının kalınlığı her yerde aynıdır. Granüloza hücrelerinin ovositle ilişkili olduğu yerde, granüloza hücreleri antruma doğru uzanan kumulus ovoforus adı verilen tepeciği oluştururlar. Ovositi çevreleyen kumulus ovoforus hücreleri korona radiata adını alırlar ve ovulasyonda ovosit ile birlikte atılırlar. Korona radiata hücrelerinin mikrovillusları zona pellusidayı geçerek gap junctionları aracılığıyla ovositle bağlantı kurarlar. Foliküler olgunlaşma sürecinde, granüloza hücrelerindeki mikrovillus ve antral yüzdeki LH reseptör sayısının arttığı gözlenir. Hücreler arası aralıkta yoğun boyanan, PAS (+) materyal Call-Exner olarak adlandırılır. Bu cisimcik granüloza hücreleri tarafından salgınır, hyalüronan ve proteoglikan içerir.

Graaf folikülü olgun primer ovosit içerir. 10 mm ya da daha fazla çapa sahiptir. Folikülün boyutu nedeniyle, ovaryum kortesinin kalınlığı artar ve bulunduğu ovaryum yüzeyinde bir şişkinlik oluşturur. Folikül maksimum boyuta ulaştığında granüloza hücrelerinin mitotik aktivitesi azalır. Antrum boyutu artarken granüloza hücre tabakası incelikir. Ovulasyona hazırlanırken, granuloza hücreleri arasındaki boşluklar genişler, ovosit ve kumulus hücreleri ile geriye kalan granüloza hücreleri arasındaki bağlar gevşer (Şekil 2.8). Ovulasyonda ovositin çevresinde sadece tek katlı korona radiata hücre katı vardır.



Şekil 2.8. Sekonder (antral) ve Graaf folikül (Junqueira, L.C., and Carneiro J., *Temel histoloji*'den alınmıştır).

Folikül gelişimi sırasında teka hücre tabakası belirginleşir. Teka interna hücrelerinin sitoplazmasında yağ damlacıkları görülmeye başlar. LH uyarısıyla teka interna hücrelerinden östrojen prekürsörü olan androjenler salınır. Androjenlerin bazıları granüloza hücrelerinin düz endoplazma retikulumlarına taşınır. Granüloza hücreleri FSH etkisi ile androjenlerin östrojenlere dönüşümünü katalizler. Granüloza hücreleri, östrojenlerin doğrudan üretimi için gerekli olan enzimlere sahip değildir. Bu nedenle foliküler hücreler folikülogenez sırasında steroid prekürsörlerini üretemezler (*Histoloji ve hücre biyolojisi, 2006*). Östrojen granüloza hücrelerinin çoğalmasını ve böylece folikül boyutunun artmasını sağlar. Folikül ve sistemik kaynaklı artmış östrojen seviyesi ile gonadotrop hücrelerin gonadotropin serbestleştirici hormona duyarlılığı arasında korelasyon vardır (Şekil 2.9). FSH yada LH salınımının dalgalanması adenohipofizi ovulasyondan 24 saat önce indükler. LH dalgalanması, granüloza hücreleri üzerindeki reseptörleri duyarsızlaştırır ve LH yüksekliğine rağmen granüloza hücreleri östrojen üretmezler. Bu dalgalanmanın kesilmesi ile primer ovosit I. mayozunu tamamlar. Bu olay LH pikinden 12-24 saat sonra olur, sekonder ovosit ve I. polar cisimcik oluşumu ile sonuçlanır. Granuloza ve teka hücreleri lüteinize olur ve progesteron üretmeye başlar.



Şekil 2.9. Hipofiz-ovaryum aksı ((Kierszenbaum A.L. *Histoloji ve hücre biyolojisi*'nden alınmıştır).

2.3.2. Ovulasyon

Ovulasyon, Graaf folikülünden sekonder ovositin atılması sürecidir. Her menstrüel siklusun başlangıcında birçok primer folikülden biri ovulasyon için önceden belirlenir.

Menstrüel siklusun ortasında sekonder ovositin atılmasından hormonal değişiklikler ve enzim etkileri gibi faktörler sorumludur. Bu faktörlerin bazıları;

- Folikül sıvısının hacim ve basıncının artması
- Plazminojen aktivasyonu ile foliküler duvarda enzimatik proteoliz
- Ovosit-kumulus kompleksi ve granüloza hücreleri arasındaki glikozaminoglikan birikiminin hormonal etkiyle kaldırılması
- Teka eksterna tabakasındaki düz kas hücrelerinin kasılması (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology, 2006*).

Ovulasyondan hemen önce, olgun folikül ovaryum yüzeyinden dışarıya doğru stigma denilen bir çıkıntı yapar (*Histoloji ve hücre biyolojisi, 2006*). Bu alanda kan akımı durur ve ovulasyonda buradan yırtılma olur (*Histology A Text And Atlas with*

Corralated Cell and Molecular Biology, 2006). LH düzeyinin artması sonucu uyarılan teka eksterna ve tunika albuginea içindeki proteolitik etkinlik, olgun folikülün yırtılmasını kolaylaştırır. Dışarıya atılan gamet, ovaryuma çok yaklaşmış olan tuba uterinanın fimbriaları tarafından yakalanır (*Histoloji ve hücre biyolojisi, 2006*). Ovosit, ovulasyondan 24 saat sonrasına kadar canlı kalır. Eğer fertilizasyon gerçekleşmezse, sekonder ovosit tüplerde dejenere olur. Normalde her siklusta tek ovosit olgunlaşıp atılırken, bazı sikluslarda aynı anda iki ovosit olgunlaşıp atılarak çoklu zigot oluşumuna neden olabilir.

Primer ovosit, embriyonal yaşamda primordiyal folikül içerisinde mayoz bölünmenin profaz safhasında duraklar. I. mayoz bölünmenin profaz safhası ovulasyona kadar tamamlanmaz. Ovosit bu aşamada 12 den 50 yıla kadar kalabilir. Bu uzun periyotta primer ovosit çevresel etkenlere maruz kalarak mayozu hatalı tamamlayabilir. Bu hatalar nedeniyle anomalili zigotlar ortaya çıkabilir.

I. mayoz, olgunlaşan follikülde tamamlanır. Primer ovositte her kardeş kromatin eşit dağıtılır ancak biri sitoplazmanın çoğunu alarak sekonder ovosit oluşur. Bu aşamada ovosit 150 µm çapındadır. Diğer ovosit, minimal sitoplazma ile birlikte kalarak I. polar cisimcik adını alır.

Ovosit, birinci mayoz bölünmeyi tamamlar tamamlamaz ikinci mayoz bölünmeye başlar. Bu bölünmede metafazda duraklar, yalnızca sekonder ovosit spermle fertilize olduğunda ikinci mayoz tamamlanır. II. polar cisimcik de bu sırada oluşur. Polar cisimcik bölünemeyeceği için, fertilize ovosit II. polar cisimciğin oluşmasıyla tanınır.

Ovulasyondan sonra ilk olarak teka internadaki kılcal damarlardan çıkan kanla ortada bir pıhtı oluşur. Bu yapıya korpus hemorajikum adı verilir. Stromadaki bağ dokusu foliküler kavitenin içini işgal eder. Folikül duvarında kalan granüloza ve teka hücreleri folikülün içine yayılır ve içleri lipit damlacıklarıyla dolarak lüteinize olurlar. İnce yapı düzeyinde izlenen tübüler kristal mitokondriyonları, bol düz endoplazma retikulumlarıyla steroid sekrete eden hücrelerin özelliğini ortaya koyarlar.

Kortekste yer alan, yüksek vaskularize bu yapı progesteron ve östrojen salgılar. Bu hormonlar zigotun implantasyonu için uterusunda endometriyumun gelişim ve sekretuar aktivitesini indükler. Fertilizasyon ve implantasyon olmaz ise korpus luteum yalnızca 14 gün aktif kalır. Hormon düzeylerinin azalması ile ovulasyondan 12 gün sonra korpus luteum dejenere olur. Hücreler lipit ile dolar, boyutları küçülür ve otoliz başlar. Dejenere hücreler üzerine hiyalin çöker ve beyaz bir skar halini alır ve birkaç ay sonra kaybolur. Bu yapıya korpus albicans adı verilir (*Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology, 2006*).

Gelişiminin herhangi bir aşamasındaki folikül (primordiyal, primer, preantral ve antral) atreziye uğrayabilir. Bu süreç, granüloza hücrelerinde mitoz bölünmenin durması, granüloza hücrelerinin bazal laminadan ayrılması ve ovositin ölümü ile belirginleşir. Hücre ölümünden kalıntıları fagosite etmek üzere folikülü makrofajlar istila eder. Daha ileri bir evrede, fibroblastlar folikülün bulunduğu alanı kaplar ve kolajen içeren bir nedbe (yara iyileşme dokusu) oluşturur; bu doku uzun süre kalabilir. Folikül atrezisi doğum öncesinden menapozun birkaç yıl sonrasına kadar görülmesine rağmen, özellikle yoğun olduğu bazı dönemler vardır. Anne hormonlarının etkisinin ortadan kalktığı doğumdan hemen sonraki dönem ile nitelik ve nicelik açısından hormonal değişikliklerin görüldüğü ergenlik (puberte) ve gebelik sırasında oldukça belirginleşir (*Temel histoloji, 2003*).

2.4. OVARYUM DOKU KRİYOPRESERVASYONU

2001'de Amerika'da 625.000 den fazla kadın invaziv kanser tanısı almıştır. Bu kadınların yaklaşık %8'i 40 yaş altındadır. Agresif kemoterapi, radyoterapi ve kemik iliği transplantasyonu dahil şimdiki tedavi protokolleri ile bazı kanserlerin tedavi oranları %90'a kadar artmıştır. Amerika'da 2010'a kadar yapılan çalışmalar, çocukluk kanserlerinin 1/200 oranında yaşadığını göstermiştir (Blatt, 1999). Artmış yaşam beklentisiyle birlikte yaşam kalitesi de önemli hale gelmiştir (Partridge ve ark., 2004).

Çocuk sahibi olmak, gonadlara toksikliği kanıtlanmış kemo ve radyoterapiden sonra kanser hastaları için zor olabilir. Antikanser tedavisinden sonra prematür ovaryum yetmezliği görülür ve sonuçta birçok kadın kanser hastası kemo/radyoterapi nedeniyle follikül kayıplarından etkilenir (Meirow ve ark., 2001). Üreme çağındaki çoğu kanser hastasının fertilitelerini korumak için uygulanan uygun bir yardımcı üreme tekniği yoktur.

Günümüzde kanser tedavisinden önce fertilitenin korunması kanserle yada kanser tedavisi ile indüklenmiş infertilitenin üstesinden gelmek için önemli bir tercihtir. Kadın kanser hastalarının fertilitesi çeşitli araçlarla korunabilir. Örneğin; pelvik radyasyondan korunmak için ovaryumların periton altındaki yeri değiştirilebilir (Tulanti, 1998).

Ancak bu uygulama kemoterapi alacak hastalar için uygun değildir. Yardımcı üreme, kontrollü ovaryum stimülasyonuna gidecek hastalarda fertilitayı korumak için diğer bir yaklaşımdır. Toplanan ovositler, eşinin spermeleriyle IVF (in vitro fertilizasyon) yada ICSI (intra sitoplazmik sperm enjeksiyonu) yoluyla döllenebilir ve oluşan embriyolar dondurulabilir. Hastalar kanserleri tedavi edildikten sonra bu embriyoları kullanabilirler ancak bu uygulamada bazı sorunlar olabilir. Bunların ilki; hastaların tanı- tedavi ve yardımcı üreme tekniği uygulaması arasında yeterli zaman olmayabilir. İkinci olarak; puberte öncesi genç kızlar ve partneri olmayan hastalar genellikle yardımcı üreme tekniği uygulanmasına uygun değildir. Üçüncü olarak; ovaryum stimülasyonunda kullanılan gonadotropinler östrojen-duyarlı kanserler için uygun değildir. Ovosit kriyoprezervasyonu bazı merkezlerde başarılı doğum sonuçları vermiştir ancak bu konudaki deneysel çalışmalar ve teknik henüz yeterli değildir. Ovosit vitrifikasyonu sonrası yaşam oranı yüksek olmasına rağmen, ovositlerin yavaş dondurma işlemi birçok merkezde altın standarttır. Ovositler, östrojen duyarlı olmayan kanser hastalarında gonadotropin stimülasyonundan sonra elde edilebilir. İmmatür ovositler de toplanabilir ve kriyoprezervasyondan sonra in vitro olgunlaşmaya indüklenir. Alternatif olarak ovositler, izole edilebilir ve kriyoprezerve edilmiş tüm ovaryum yada ovaryum doku biyopsisinden sağlanabilir. Eğer hastanın eşi var ise, IVM (in vitro maturasyon) den sonra bu ovositler fertilize edilebilir ve sonuçta ortaya çıkan embriyolar dondurulabilir (Revel ve ark., 2004)

(Prasath ve ark., 2008) ancak, gebelik şansı saklanan embriyo ve ovosit sayısı ile sınırlıdır. Buna ek olarak etik ve kanuni konularda bazı problemler ortaya çıkabilir. Ovosit ve embriyo kriyoprezervasyonu yapılırsa, ovaryumda birçok primordiyal follikül boşa harcanmış olur.

Ovaryumda küçük, inaktif, farklılaşmasını tamamlamamış, zonası oluşmamış, immatür ovositler içeren yüzlerce primordiyal follikül vardır (Kim, 2006). Bu olgunlaşmamış ovositler, zona pellusidanın ve kortikal granüllerin yokluğu nedeniyle kriyoprezervasyonu tolere edebilir (Kim ve ark., 2001). Kanseri tedavi prosedüründe gecikme olmadan, evlilik durumu ve yaşı hesaba katılmaksızın, herhangi bir kanser hastasından ovaryum korteksi sağlanabilir. Amorim ve ark. Dondurulmuş ovaryumda, hormonal ve doku korunmasının iyi olduğunu göstermişlerdir. Tüm bu avantajlar, kadın fertilitésinin korunması için ovaryum doku kriyoprezervasyonunu diğer yöntemlerden daha iyi bir seçenek yapar.

2.4.1. Hayvanlarda Ovaryum Dokusu Korunması

Ovaryum dokusu kriyoprezervasyonu 1950' lerin başından beri uygulanmaktadır (Kim, 2006). Parrot, farelerde dondurulup çözülmüş ovaryum dokusunda ortotopik greftlemeden sonra fertilizasyonun yeniden düzenlenmesinin mümkün olduğunu göstermiştir (Parrot, 1960). Gosden ve ark. ise koyun ovaryum dokusunun dondurulup- çözümlenerek transplante edilmesiyle meydana gelen canlı doğum rapor etmişlerdir (Gosden ve ark., 1994). Benzer raporlar, rat ve tavşanlarda da bildirilmiştir (Wang ve ark., 2002; Almodin ve ark., 2004). Hayvanlardaki bu başarılı çalışmalar, ovaryum dokusunun kriyoprezervasyonunun insan için mümkün olan bir uygulama ve fertilité korunmasının uygulanabilir bir aracı olduğunu kanıtlar.

2.4.2. İnsanlarda Ovaryum Doku Kriyoprezervasyonu

Parrot ve ark. nin fare ovaryum çalışmasından yaklaşık 30 yıl sonra, iki farklı grup insan ovaryum dokusu kriyoprezervasyonunda başarılı sonuçlar bildirmişlerdir.

Hovatta ve ark., insan ovaryum doku kriyoprezervasyonunun uygulanabilir olduğunu gösterdi (Hovatta ve ark., 1996). Onlar, 19 hastadan ovaryum dokusunu 2 farklı kriyoprotektan protokolü kullanarak dondurdular. iki dokuda da follikül ve ovosit morfolojisinde farklılığa rastlanmamıştır. İkinci grup; Newton ve ark., 8 donörden ovaryum korteksi olarak 4 farklı kriyoprotektanla 2 ay sonra immün baskın farelere transplante etmiş (Newton ve ark., 1997) ve histolojik değerlendirmede folliküllerin %14-84 oranında canlı olduğunu göstermiştir. Hovatta ve ark, kriyoprezerve ovaryum dokusundaki folliküllerin 10-15 güne kadar canlılığını koruduğunu göstermiştir (Hovatta ve ark., 1997). İnsanda ovaryum korteksinin kriyoprezervasyonundan sonra ovaryum fonksiyonunun in vivo geri dönüşümü ilk olarak Oktay ve Karilkaya tarafından gösterilmiştir (Oktay ve ark., 2000). Bu ortotopik transplantasyon, menapozal gonadotropin stimülasyonuna cevaben sol periton altına laparoskopik yolla greftlenen ovaryum doku parçalarında follikül gelişimi ile sonuçlanmıştır. Oktay ve ark. devam eden ileriki çalışmalarında ovaryum korteksini ön kola transplante ederek iki hastada foliküler gelişimin ve endokrin fonksiyonların geri geldiğini göstermişlerdir (Oktay ve ark., 2001). Bu hastalardan birinden, gonadotropin stimülasyonundan sonra perkütanöz ovosit elde edilmiştir. Alınan 3 ovositten ikisi postmatür, biri metafaz I evresindedir. İn vitro olgunlaştırılan ovosite ICSI yapılmasına rağmen, fertilizasyon gerçekleşmemiştir. 2004' ün sonlarında aynı grup, akciğer kanserli bir hastadan alınan ovaryum kortikal bantlarının dondurulup çözüldükten sonra karın derisine transplante edilmesi sonrası elde edilen ovositlerden normal bir embriyon gelişimi sağlamıştır (Oktay ve ark., 2004). Otolog ortotopik transplantasyondan sonra dondurulup çözülen ovaryum korteksinden elde edilen ilk canlı doğum, Donnez başkanlığındaki Belçikalı bir grup tarafından rapor edilmiştir (Donnez ve ark., 2004). Başka bir araştırmada Hodgking lenfomalı hastanın ovaryumu, kanser tedavisinden önce kriyoprezervasyonla dondurulmuş, çözülen kortikal bantlar inaktif sağ ovaryum hilumuna peritoneal bir pencere açılarak transplante edilmiştir. Bu, spontan bir gebelik ve Tamara adında bir kız çocuğunun doğumu ile sonuçlanmıştır. Oktay ve Tilly, bu gebeliğin kaynağının, transplante edilen doku mu, inaktif ovaryum mu olduğu konusunda şüpheye düşmüşlerdir (Oktay ve ark., 2004). Donnez ve arkadaşları, endokrinolojik, laparoskopik ve ekografik olarak gebeliğin transplante edilen tarafta gelişen

follikülden kaynaklandığını göstererek bu soru işaretlerini cevaplamışlardır. Diğer bir spontan gebelik dondurulup çözülmüş ovaryum dokusunun ortotopik transplantasyonundan elde edilerek bildirilmiştir (Demeestere ve ark., 2006). Dondurulup çözülmüş ovaryum dokusunun transplantasyonundan sonra IVF ile oluşan gebelik, canlı doğum ile sonuçlanmıştır (Meirow ve ark, 2005). Canlı doğumlarla sonuçlanan araştırmalar, bu tedavi seçeneğini erken ovaryum yetmezliği olan kadınlar için umut verici hale getirmiştir.

2.4.3. Ovaryum Doku Kriyoprezervasyonu İçin Endikasyonlar ve Yaş Sınırları

Ovaryum doku kriyoprezervasyonu için potansiyel olasılıkları birçok yazar listelemiştir (Poirot ve ark., 2002; Hovatto, 2003; Practice committee of ASRM and SART, 2004). Akciğer kanseri, serviks kanseri, lösemi, lenfoma, Hodgkin hastalığı, sarkom, ovaryum yada endometriyum kanseri, otoimmün hastalıklar, nöroblastom ve diğer iyi ve kötü huylu hastalığı tanısı alan hastalara radyo yada kemoterapiden önce ovaryum doku kriyoprezervasyonu önerilir. Kemik iliği yada kök hücre transplantasyonuna giden hastalar transplantasyondan önce ovaryum yetmezliği ile sonuçlanan yüksek doz kemo yada radyoterapi almaları nedeniyle ovaryum doku kriyoprezervasyonu için potansiyel adaydırlar (Meirow, 2000). Ovaryum doku kriyoprezervasyonu Turner sendromu gibi kanser olmayan vakalara önerilebilir (Hovatta, 2003; Huang ve ark., 2008) ancak, ovaryumda kanser saptanan hastalara ototransplantasyon için ovaryum doku dondurulması önerilmemelidir (Oktay ve ark., 2004). Bu nedenle, ovaryum kriyoprezervasyonu önerilmeden önce, ovaryumun metastaz için taranması gereklidir. Akciğer kanserli hastalarda, ovaryum metastazı ekarte edilmelidir çünkü akciğer kanserinde BRCA gen mutasyonu varlığında ovaryum kanseri ve ovaryum metastazı riski artmaktadır (Leide ve ark., 2002; Perrotin ve ark., 2001). Eğer erken ovaryum yetmezliği için monozigotik ikizlerden diğerine ovaryum doku şeritleri transplante edilirse normal gebelik ve canlı doğum mümkündür (Silber ve ark., 2005; 2007). Ovaryum doku kriyoprezervasyonu, ovaryum kanseri hariç, fertilitesi korunacak ve düzenlenecek her kadın hastaya önerilebilir. Ovaryum kanserli hastalarda, ovaryum çıkarıldıktan sonra IVF

laboratuvarında invitro mature edilen ovositlerden üç tanesi eşinin spermeleri ile fertile edilebilir. Fertilize ovositler, dört hücreli embriyo haline gelince hasta tedavisini tamamlayana kadar dondurulabilir. Bu uygulama, eşi olmayan kadınlarda ve prepubertal dönemdeki hastalarda uygulanamaz.

Ovaryum kriyoprezervasyonu, fertilitenin korunması için umut vadeden bir yöntemdir. Dondurulmuş ve transplante edilmiş ovaryumdan spontan gebelik bildirilmesine rağmen, tekniğin hala deneysel olduğu düşünülmektedir. Kanıtlar transplantasyon lehinde olmasına rağmen, gebeliğin kaynağının transplante edilen ovaryum dokusundan mı düzelen menapozal ovaryumdan mı olduğu henüz açıklığa kavuşmuş değildir. Ovaryum doku kriyoprezervasyonu ile ilgili etik problemler, tekniğin araştırılmasını geleceğe ertelemektedir (Prasath, 2008).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. KULLANILAN HAYVANLAR VE DOKULARIN ELDE EDİLMESİ

Bu çalışma, deney hayvanları kullanılarak A.Ü. Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 11.02.2009 tarih ve 2009-36-166 karar no.su ile onay alındıktan sonra yapılmıştır. Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarından 18 adet, yaklaşık 8 haftalık, ağırlıkları 25-30 gr. arasında, BALB-C türü dişi fareler sağlandı. Menstrüel siklusu başlamış, aynı yaşta fareler kullanıldı. Ketamin ve Xylazin anestezisi ile uyutulan hayvanların ovaryumları laparotomi ile çıkarıldı. Dokular, hayvan laboratuvarından bölümümüzdeki kriyobiyoloji laboratuvarına HEPES li L-15 kültür mediumu içerisinde taşındı. Kontrol grubu için 6 adet ovaryum dokusu ayrıldı; kalan ovaryumlar her hayvanda biri hızlı dondurma diğeri yavaş dondurma tekniği ile dondurulmak üzere kriyoprotektanlara alındı.

Kontrol grubu: Taze dokular alındıktan sonra hiçbir işlem yapılmadan tespit edildi. Işık mikroskobisi için Bouin solüsyonu, elektron mikroskobisi için %2,5 gluteraldehit ve apopitoz incelenmesi için %3,5 PFA solüsyonuna alındı.

3.2. OVARYUM DOKUSU DONDURMA TEKNİKLERİ

3.2.1. Hızlı dondurma (vitrifikasyon) metodu

Dokular, ilk olarak L 15 içinde %5 EG (etilen glikol), %5 DMSO (dimetil sülfoksit), 0,2 M sükroz ve %5 BSA (bovin serum albumin) içeren solüsyonda 5 dakika tutuldu. Takiben 5 dakika %10 EG, %10 DMSO ve 0,4 M sükroz içeren kriyoprotektandan geçirilerek son aşamada %20 EG, %10 DMSO ve 0,4 M sükroz içeren solüsyonda 5 dakika tutularak bakır grid üzerinde sıvı azot içine daldırmak

suretiyle vitrifiye edildi. Sıvı azot içinde dondurma tüplerine (kriyovial) koyularak saklandı.

3.2.2. Yavaş dondurma (slow freezing) metodu

Fare ovaryumları 1,5 M DMSO, %20 FBS (fetal bovin serum), 0,1 M sükröz içeren kriyoprotektana aktarılarak 1,8 ml dondurma tüpleri içinde 4°C’de 30 dakika süreyle çalkalanarak bekletildi. Dengelenme sonrasında dondurma tüpleri (kriyovial) bilgisayar programlı yavaş dondurma cihazına alındı. Yavaş soğutma 0 °C de başlamak üzere doku -7 °C ye 2 °C/dk hızla indirildi, 10 dakika -7 °C de tutuldu ve manuel ya da otomatik seeding yapılarak buz kristalleşmesi kontrollü bir şekilde gerçekleştirildi. Takiben 0,3 °C/dk hızla -40 °C ye getirildi. Son olarak -140 °C ye 10 °C/dk hızla soğutuldu. Dondurma tüpleri saklanmak üzere sıvı nitrojene transfer edildi.

Tablo 3.1. Kontrollü dondurma sisteminde oluşturulan program çizelgesi.

YAVAŞ DONDURMA PROGRAMI		
	End Temp (°C)	Slope (°C/min)
1	5.00	
2	0.00	-1.00
3	0.00	0,00
4	-5.40	-1,04
5	-43.00	-57,85
6	-20.00	8,52
7	-17.00	2,00
8	-40.00	-0,30
9	-80.00	-5,00
10	-120.00	-10,00

3.3. OVARYUM DOKUSU ÇÖZME İŞLEMLERİ

3.3.1. Hızlı dondurma için çözme işlemi

Ovaryum parçaları, 0,6 M sükröz, %5 DMSO, %5 EG, %5 BSA (bovin serum albumin) solüsyonuna konulur. 5 dakikalığına 37 °C de ısıtılır, ardından sırasıyla 0,4 M sükröz (+ %10 DMSO + %10 EG), 0,2 M sükröz (+ %5 DMSO + %5 EG) ve 0,1 M sükröz (+ %0 DMSO + %0 EG) içeren solüsyona 5'er dakika konulur. Son olarak dokular, L-15 içerisinde 5 dakika tutularak fiksatif çözeltilerine aktarılır.

3.3.2. Yavaş dondurma için çözme işlemi

Ovaryumların bulunduğu dondurma tüpleri sıvı nitrojenden çıkarılır. 20 saniye oda ısısında tutulur, 20-30 saniye 37 °C deki su banyosuna transfer edilir. Dondurma tüpleri 0,1 M sükröz + 1 M DMSO içeren L-15 mediumuna alınır, burada 5 dakika bekletilir ve sonra sırasıyla 0,5 M DMSO + 0,1 sükröz, 0 DMSO + 0,05 M sükröz içeren solüsyonlarda her birinde 5 dakika tutulur. Son olarak dokular L-15 kültür medyumunda tutularak fiksatif çözeltilerine aktarılır.

3.4. IŞIK MİKROSKOBİSİ İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR

Kontrol, hızlı ve yavaş dondurulup çözülen ovaryum dokuları Bouin solüsyonuna alındı. En fazla 24-48 saat Bouinde fikse olan dokular histolojik takip işlemleri başlatıldı.

Bouin solüsyonu hazırlanışı:

- Suda doymuş pikrik asit, 300 cc
- %10 luk formalin, 100 cc
- Gliasiyal asetik asit, 20 cc (Solüsyon kullanılacağı zaman eklenmelidir)
(Krajian AA ve ark., 1952)

3.4.1. Bouin Solüsyonu İçin Uygulanan Takip Protokolü

- %50'lik etanol, 2x 1 saat
- %70'lik etanol içine 3 damla lityum karbonat çözeltisi damlatıldı, 2 saat
- %70'lik etanol, 3 saat
- %80'lik etanol, 2 saat
- %95'lik etanol, 1 gece
- %100'lük etanol, 1.5 saat

Dehidratasyon işleminden sonra ksilen ile şeffaflaştırılan dokular iki değişim sıvı parafınle 60 °C de 3 saat inkübe edildi. Parafin infiltrasyonundan sonra dokular sert parafin bloklara gömüldü.

Bloklar +4 derecede buzdolabında bekletildi. Kesitler alınmadan önce birkaç saat derin dondurucuda bekletilen örneklerden Leica RM 2125RT model mikrotom kullanılarak 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Lam üzerine alınan kesitler 60 °C'lik etüvde parafin erimesi için 1,5 saat bırakıldı. Histolojik boyamaya hazır hale getirilen doku kesitlerine, Hematoksilen Eozin, Mallory Azan, Schiff'in Periyodik Asit Boyası (PAS) uygulandı. Uygulanan boyama yöntemlerinin hazırlanışı ve protokolleri şu şekildedir:

3.4.2. Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96, %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Yıkama (çeşme suyunda)
- Hematoksilen solüsyonu (1 dakika)
- Yıkama (çeşme suyunda)
- Eozin solüsyonu (2 dakika)
- Yıkama (çeşme suyunda)
- %75, %96, %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan kullanarak lamelle kapama

3.4.3. Mallory Azan Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96, %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Yıkama (çeşme suyunda)
- % 0,1 Azokarmin G solüsyonu (60 °C etüvde 1 saat)
- Yıkama (çeşme suyunda)
- %1 anilin alkolde farklandırma
- %1 asetik alkolde durulama
- %5 fosfofungistik asitle mordanlama
- Yıkama (çeşme suyunda)
- % 0,25 anilin mavisi- %1 orange G solüsyonu (1 saat)
- Yıkama (çeşme suyunda)
- %75, %96, %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan kullanarak lamelle kapama

3.4.4. Periyodik Asit Schiff Boyama Protokolü

- Ksilen ile deparafinizasyon
- %100, %96, %75 etanol serisi ile hidratasyon
- Yıkama (çeşme suyunda)
- Periyodik asit solüsyonu (10 dakika)
- Yıkama (çeşme suyunda)
- Schiff solüsyonu (15 dakika)
- Metabisülfid solüsyonu (3 er şale, 3 er dakika)
- Yıkama (çeşme suyunda)
- %75, %96, %100 etanol serisi ile dehidratasyon
- Ksilen ile şeffaflandırma
- Entellan kullanarak lamelle kapama

Boyanan preparatlar, Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskopuyla incelendi ve fotoğraflandı.

3.5. KONFOKAL MİKROSKOP İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR

Kontrol, yavaş ve hızlı dondurulup- çözülen ovaryum dokuları %4 paraformaldehide alınarak 24 saat oda ısısında tespit edildikten sonra;

- %20 sükröz içerisinde 1 gün boyunca
- %30 sükröz içerisinde 1 gün boyunca, dokular dibe çökene kadar takip edildi.

Dokular kriyomatriks içerisine gömüldü. Çalışma ısısı -20°C ayarlanmış kriyomikrotomda $10\ \mu\text{m}$ 'lik kesitler poli-L-lizin kaplı lamlara alındı. TUNEL boyaması yapıldı.

3.5.1. TUNEL Boyama Protokolü

- PBS ile yıkama (2x 5 dakika)
- TUNEL (45 μl boya ve 5 μl enzim solüsyonu) (Roche,1684795, Germany) (1 saat, oda ısında)
- PBS ile yıkama (3x 5 dakika)
- Hoechst ile kapama (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst-33258 içeren 1:1 PBS/gliseroil ile)

3.6. ELEKTRON MİKROSKOP İÇİN YAPILAN ÇALIŞMALAR

Kontrol ve dondurulup çözülen ovaryum dokuları için tespit ve takip işlemleri yapıldı.

- *1. tespit:* Ovaryum dokuları 0.1 M fosfat tamponu içinde %2.5 glutraldehit ve %2 paraformaldehit içeren pH'sı 7.2-7.4 arasında tutulan solüsyonda ($+4^{\circ}\text{C}$ 'de 2-4 saat)
- *1. yıkama:* 0.1 M fosfat tamponunda (2x 15 dakika, rotatorda)
- *Postfiksasyon (2. tespit):* 0.1 M fosfat tamponu içinde %1 OsO_4 (rotatorda ve karanlıkta, 2 saat)
- *2. yıkama:* 0.1 M fosfat tamponunda (3x 20 dakika)

- Distile su ile yıkama
- *Blok boyama*: %70 etanolde %0,5 uranil asetat ve %1 fosfotungistik asitle (rotatorda , karanlıkta 2 saat)
- *Dehidratasyon*: %70, %96, %100 alkol, propilen oksit
- 1:1 propilen oksit / Araldite (rotatorda 1 saat)
- Araldite (2 saat)
- *Bloklama*: kapsül içine ovaryum dokuları kondu. Araldite parçaların üzerine eklendi.
- *Polimerizasyon*: Araldite blokları 80 °C'de (1 gece) tutuldu, sonrasında etüv kapatıldı ve bloklar kendi halinde soğumaya bırakıldı.

3.6.1. Yarı İnce Kesit Boyama Protokolü

- Ultramikrotomla 800- 1000 nm kalınlığında kesitler alındı
- Kesitler ısıtıcıda kurutuldu
- Distile su içinde %1 boraks, %1 toluidin mavisi, %1 Azur II içeren toluidin mavisi/azur II boyasıyla boyandı (50- 60 °C ısıtıcıda boya kuruyana kadar)
- Distile su ile yıkandı
- Kesitler tekrar ısıtıcıya kondu
- Kesitler kurutuldu ve soğutulduktan sonra ksilene kondu
- Entellanla kapatıldı

Boyanarak hazırlana preparatlar, kurumalarının ardından Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobuyla incelendi ve fotoğrafları çekildi.

3.6.2. İnce Kesit Boyama Protokolü

- Ultramikrotomla 80- 90 nm kalınlığında kesitler alındı
- Kesitler boyama setine yerleştirildi
- Distile suda 1-2 dakika

- %8 'lik uranil asetatda 45 dakika
- 0.1 N NaOH içerisinde yıkandı
- % 0,7 kurşun sitrat, % 0,9 sodyum sitrat içeren solüsyonda 20 dakika
- 0.1 N NaOH içerisinde yıkandı
- Distile suda 1-2 dakika yıkandı

Boyanan gridler kurutma kağıdında suları alındıktan sonra grid kutusuna yerleştirildi. Görüntülemeler LEO 906 E TEM (60 kV) 'de incelenerek fotoğraflandı.

3.7. İSTATİSTİK

Her ovaryum bloğundan 5 kesitte bir follikül sayımı için preparat hazırlandı. Her bir bloktan 3 kesit değerlendirildi. Hematoksilen Eozin ile boyanmış preparatlar ışık mikroskopunda incelenerek her bir gruptaki sağlam ve atretik foliküller sayıldı. Foliküller sayılırken, çekirdeği olan ovositlerin folikülleri değerlendirmeye alındı.

Foliküller değerlendirilirken; hücrelerin çekirdek özellikleri, sitoplazma asiditesi, ZP yapısı, hücre- hücre bağlantılarının durumu dikkate alındı.

Foliküller sağlamlık yüzdelerine göre karşılaştırıldı ve değerlendirme Ki-kare testine göre yapıldı.

4. BULGULAR

4.1. İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Kontrol grubu, yavaş dondurma ve hızlı dondurma gruplarında primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer foliküllerin hem sağlam hem de atretik olanları sayıldı ve Ki-kare testi ile değerlendirildi (Tablo 4.1). Tersiyer foliküller, sadece yavaş soğutmada, az sayıda ve atretik olarak gözlemlendiği için değerlendirmeye alınmadı. Kontrol grubunda primordiyal foliküllerde %98,9 oranında, hızlı dondurma grubunda %78,9 oranında, yavaş dondurma grubunda %98 oranında sağlam folikülere rastlandı. Primordiyal sağlam folikül yüzdeleri her üç grupta karşılaştırıldığında; kontrol grubu ve yavaş dondurma grubu arasında anlamlı bir fark bulunamazken (Tablo 4.3; Grafik 4.1), diğer grup anlamlı olarak farklı izlendi (Tablo 4.2). Primer foliküle her üç grupta değerlendirildiğinde deney gruplarında kontrol grubundan anlamlı olarak artmıştı (Tablo 4.1; Grafik 4.2). İki deney grubu birbiriyle kıyaslandığında kontrol grubunda %77, yavaş dondurma grubunda %49 oranında sağlıklı folikül oranı gözlemlendi, yine yavaş dondurmanın hızlı dondurmaya göre anlamlı olarak primer folikülleri koruduğu görüldü. Tüm foliküller her üç grupta incelendiğinde kontrol grubunda %93,8, yavaş dondurma grubunda %86,1, hızlı dondurma grubunda %68,2 olarak korunma görüldü ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu tespit edildi (Tablo 4.2; Grafik 4.3).

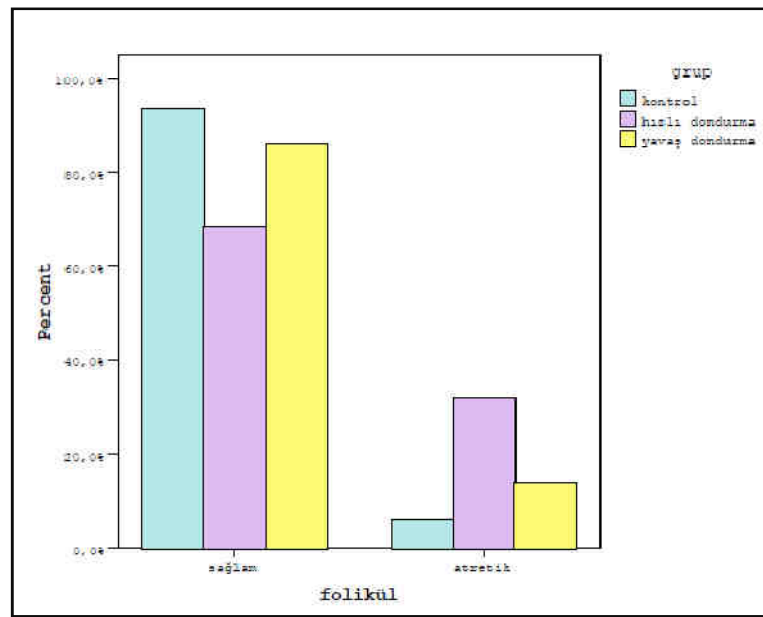
Tablo 4.1. Kontrol, hızlı dondurma ve yavaş dondurma grubunda sayılan foliküllerin sayı ve yüzdeleri.

	Primordiyal folikül				Primer folikül				Sekonder folikül			
	Sağlam		Atretik		Sağlam		Atretik		Sağlam		Atretik	
	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde	Sayı	Yüzde
Kontrol Grubu	390	% 98,9	4	% 1,1	84	% 77	25	% 23	23	%85	4	%15
Hızlı Dondurma Grubu	356	% 78,9	95	% 21,1	52	%36,3	91	% 3,7	0	%0	4	%100
Yavaş Dondurma Grubu	450	% 98	9	% 2	75	%49	68	%51	0	%0	4	%100

Tablo 4.2. Kontrol, hızlı ve yavaş dondurma gruplarında sayılan primordiyal, primer ve tüm foliküllerin sağlam olanlarının yüzdelerinin Ki-kare testine göre istatistiksel sonuçları.

	Primordiyal folikül	Primer folikül	Toplam foliküller
Kontrol grubu	p: 0,000		
Hızlı dondurma grubu			
Yavaş dondurma grubu			

($p < 0,05$: fark var, $p > 0,05$: fark yok)
p değerleri Ki-kare testinden elde edilmiştir.



Grafik 4.1. Her üç grupta sayılan tüm foliküllerin yüzdelerinin Ki-kare testiyle istatistiksel olarak karşılaştırılması.

Tablo 4.3. Kontrol grubu ve yavaş dondurma grubunda sayılan sağlam primordiyal folikül yüzdelerinin Ki-kare testine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması.

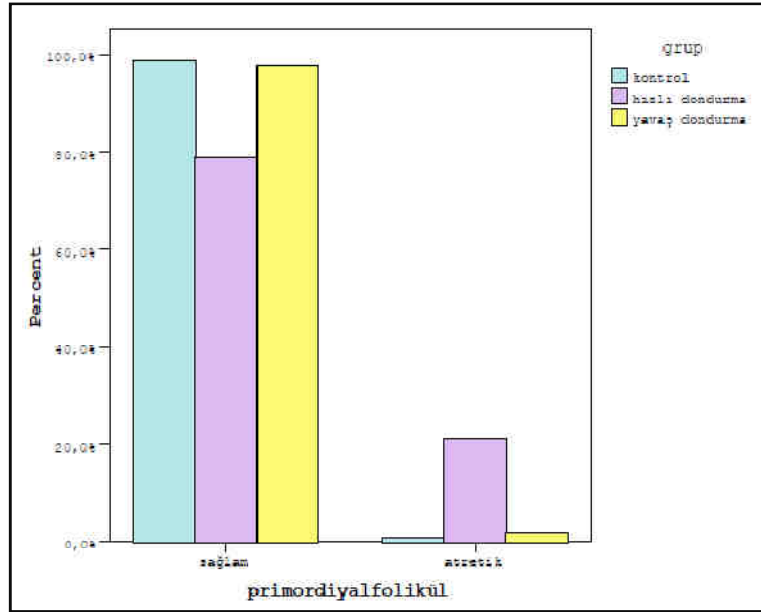
	Primordiyal folikül
Kontrol grubu	p: 0,261
Yavaş dondurma grubu	

($p < 0,05$: fark var, $p > 0,05$: fark yok)

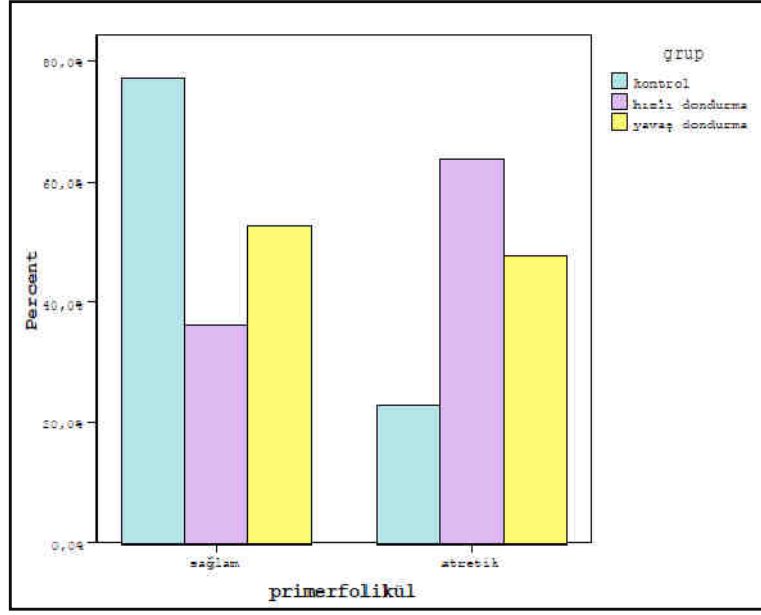
Tablo 4.4. Yavaş dondurma ve hızlı dondurma grubunda sağlam primordiyal ve tüm foliküllerin toplam sayılarının Ki-kare testine göre istatistiksel olarak karşılaştırılması.

	Primordiyal folikül	Toplam foliküller
Yavaş dondurma metodu	p: 0,006	p: 0,000
Hızlı dondurma metodu		

(p<0,05: fark var, p>0,05: fark yok)



Grafik 4.2. Her üç grupta sayılan sağlam primordiyal foliküllerin yüzdelерinin Ki-kare testiyle istatistiksel olarak karşılaştırılması.



Grafik 4.3. Her üç grupta sayılan sağlam primer foliküllerin yüzdelerinin Ki-kare testiyle istatistiksel olarak karşılaştırılması.

4.2. IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR

Fare ovaryum dokusunun farklı histolojik teknikler kullanılarak boyanan kesitlerinde; primordiyal, primer, sekonder, Graaf folikülleri değerlendirildi. Ovaryum korteksinde bulunan foliküller, folikülü oluşturan hücreler ve folikül bütünlüğü incelendi.

Işık mikroskobu incelemeleri: Ovaryum dokusunda kortekste değişik gelişme aşamalarını gösteren, içlerinde primer ovositleri barındıran foliküller gözlemlendi.

Sağlam folikülde, ovosit çekirdeği ökromatin, iri ve genellikle çekirdekçiği belirgin olarak saptandı. Granüloza hücreleri ve bu hücre ile ovosit arasındaki temasın kopmamış olduğu dikkati çekti.

Üç grupta her aşamada folikülde atrezi görüldü. Atretik folikülde ovosit çekirdeğinde kromatin yoğunlaşması, sitoplazmasında asidofil hale gelmesi, ovosit ve folikül hücreleri arasında vakuolizasyon, zona pellusida dalgalanması, granüloza hücrelerinin ovositle bağlantılarının bozulduğu ve apoptozise giden granüloza hücrelerin varlığı izlendi.

4.2.1. Kontrol grubu bulguları

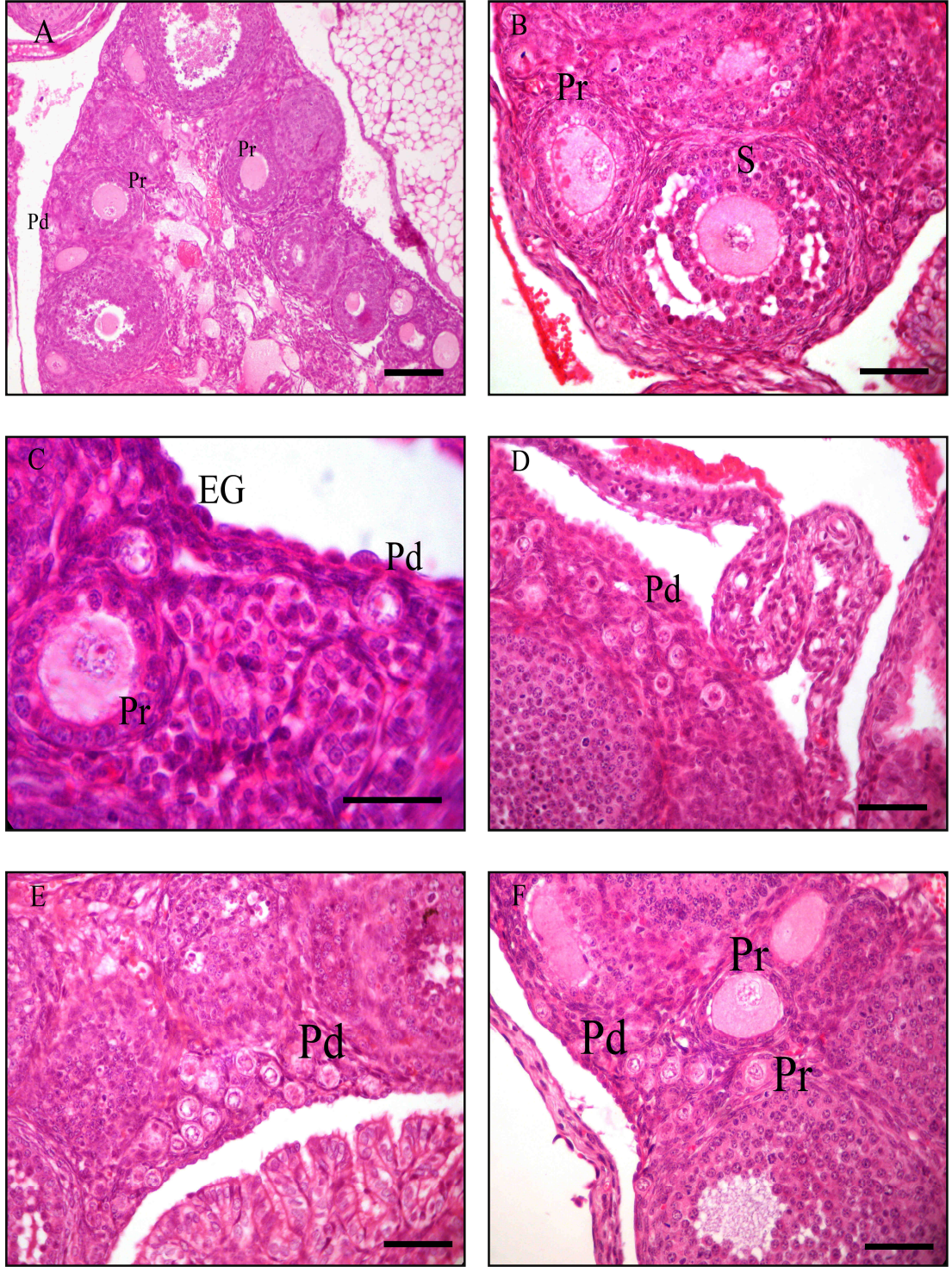
Kontrol grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde epitelyum germinativum altında normal görünümde yassı epitel hücreleriyle çevrili primordiyal ve tek katlı prizmatik epitelle çevrili primer foliküller gözlemlendi (Şekil 4.1A-C, F; Şekil 4.3 A; Şekil 4.2 A-C). Büyük bir hücre olan ovosit, geniş sitoplazması ve ökromatin çekirdeği ile folikül içerisinde sağlıklı olarak izlendi.

Sağlıklı sekonder foliküllere rastlanırken (Şekil 4.1 A, B) atretik sekonder folikülde ovolemanın ondüle bir hal alması dikkat çekti. Atretik folikülde granüloza hücreleri arasındaki bağlantıların da gevşediği izlendi (Şekil 4.1 B).

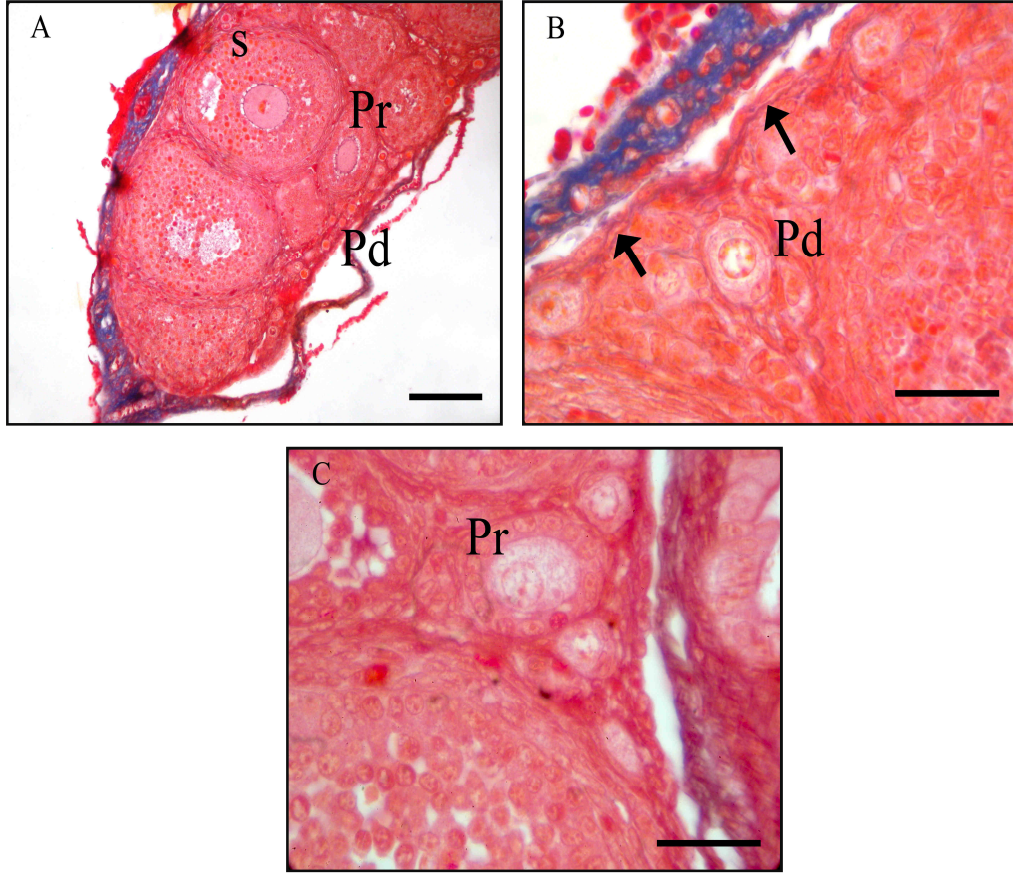
Ovaryum dokusu kesitlerinin Mallory Azan boyamalarında interstisyumda bulunan kolajen tellerin boya içeriğindeki anilin mavisi ile mavi renkte boyanmış olarak gözlemlendi (Şekil 4.2).

Ovaryum dokusunun ince yapı düzeyinde incelenmesinin ön çalışması olarak EM bloklarından alınan yarı ince kesitlerin boyanmasında ovositlerin ve folikül hücrelerinin normal yapıda oldukları gözlemlendi (Şekil 4.3 A). Ovaryumu çevreleyen epitelyum germinativum belirgin olarak ayırt edildi. Bu bölgelerden alınan ince kesitler EM da incelendi.

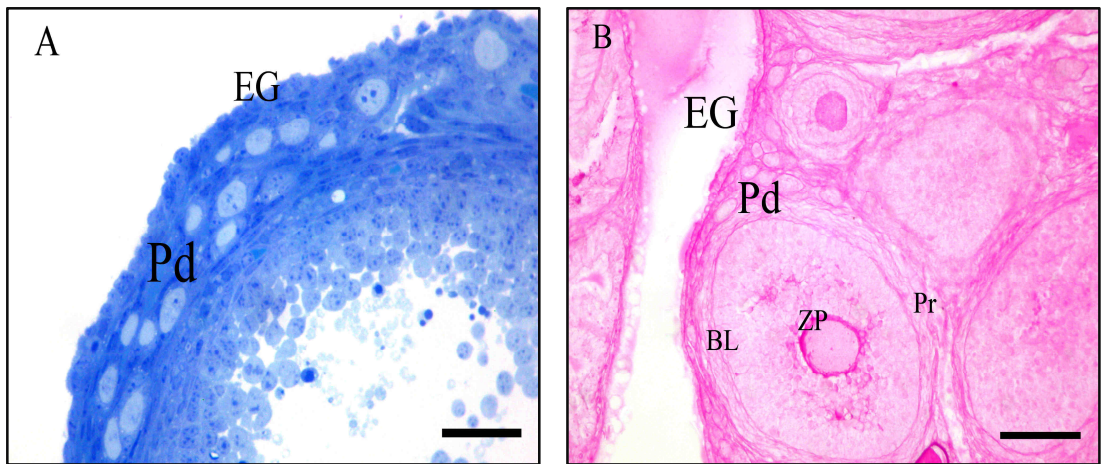
PAS ile boyanan ovaryum dokusunda bazal lamina ve ZP lerin Schiff reaksiyonuna yanıt verdiği gözlemlendi (Şekil 4.3 B).



Şekil 4.1. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. Korteks bölgesinde epitelyum germinativumun altında tüm folikül tipleri izlenmekte. Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül, S: sekonder folikül, EG: germinal epitel. Hematoksilen- Eozin, bar A: 100 µm; B, D, E ,F: 50 µm; C: 30 µm



Şekil 4.2. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. Sağlam primordiyal foliküller. Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül, S: sekonder folikül, ok: tunika albuginea. Mallory Azan, bar A: 100 μ m; B, C: 30 μ m



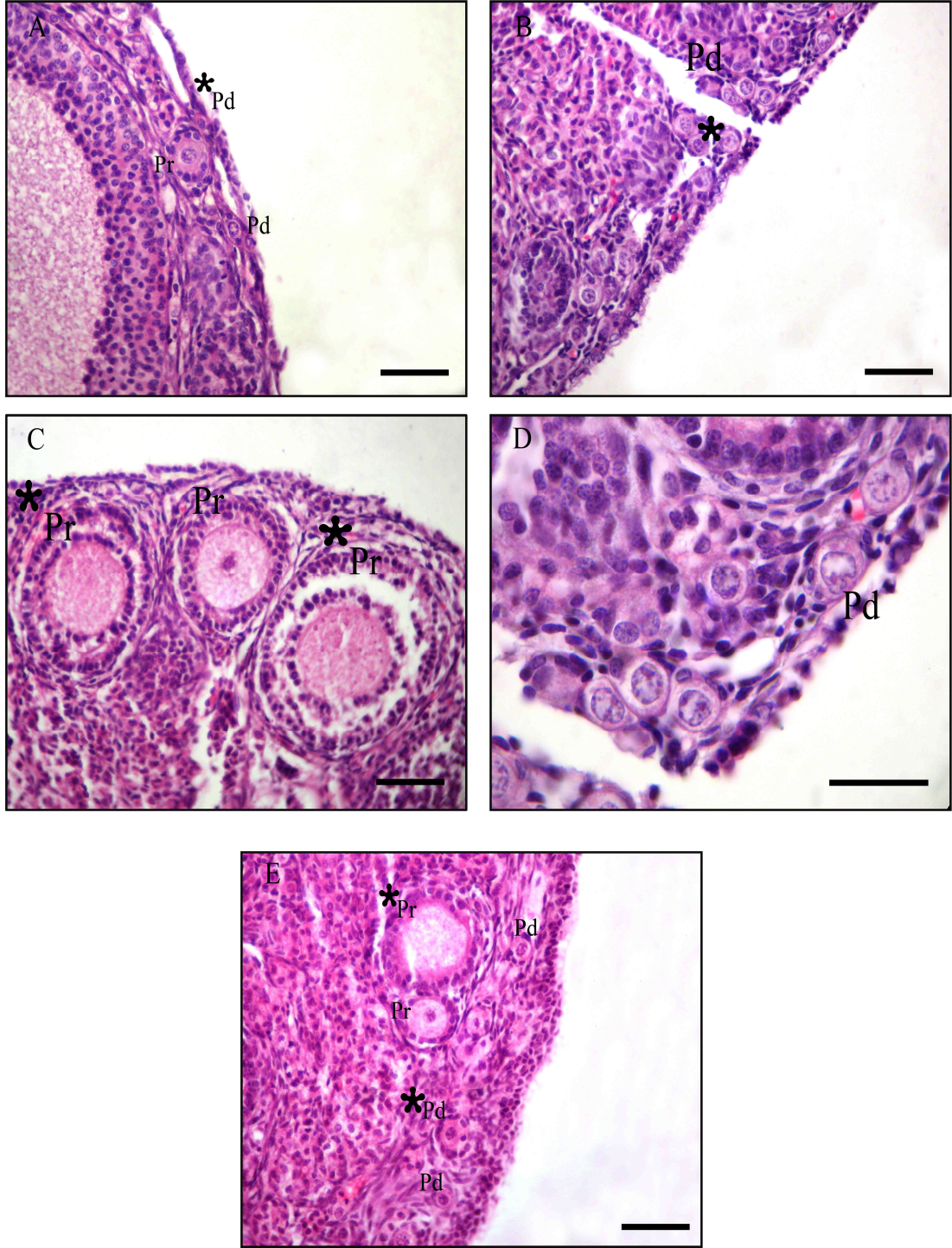
Şekil 4.3. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. EG: germinal epitel, Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül, BL: bazal lamina, ZP: zona pellusida. Toluidin mavisi- Azur II, PAS, bar A: 50 μ M; B: 100 μ m

4.2.2. Yavaş dondurma grubu bulguları

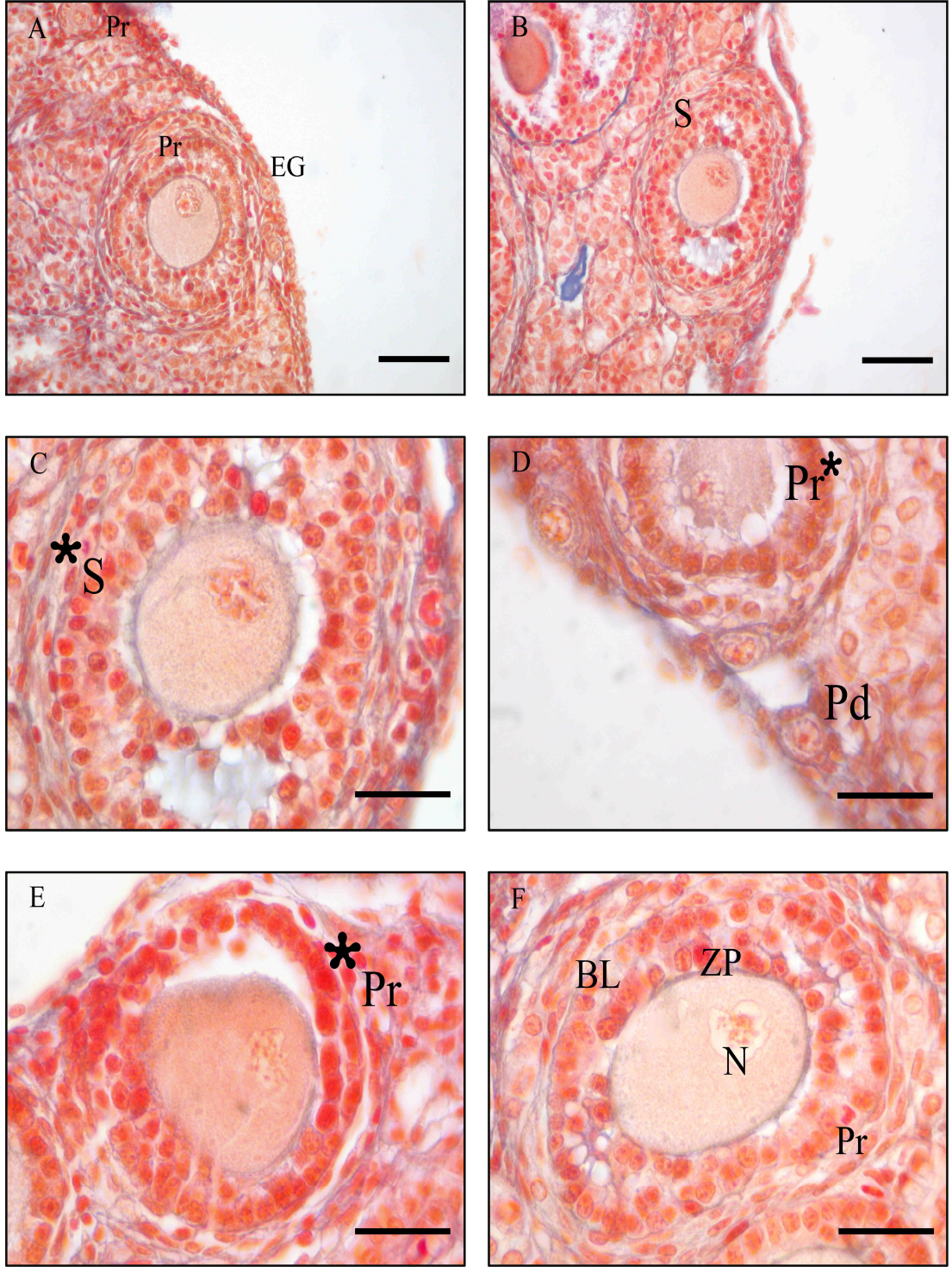
Yavaş dondurma grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde sağlam görünümde primordiyal ve primer foliküller gözlemlendi (Şekil 4.4 A, B, D, E; Şekil 4.5 A, F; Şekil 4.6 A). Ovosit sitoplazması ve çekirdeğinin normal olduğu, ovositle granüloza hücreleri arasındaki bağlantıların ayrılmamış olduğu fark edildi. Dondurma işlemi hasarı nedeniyle ovaryum dokusunda yarıklar izlendi (Şekil 4.4 B)

Yavaş dondurma grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde sağlam yapıda foliküllerin yanında atretik foliküllere rastlandı (Şekil 4.4 C, E; Şekil 4.5 B-E). Bu foliküllerde ovosit çekirdeği, ovolemma, ZP ve granüloza hücreleri değerlendirildiğinde ovosit çekirdeğinin piknotik olduğu ve sitoplazmasının asidofilik bir hal aldığı, ovolemmmanın ve ZP' nin düzenli yapısını kaybettiğini, granüloza hücrelerinin birbirleriyle olan bağlarını kopardıklarını gözlemledik.

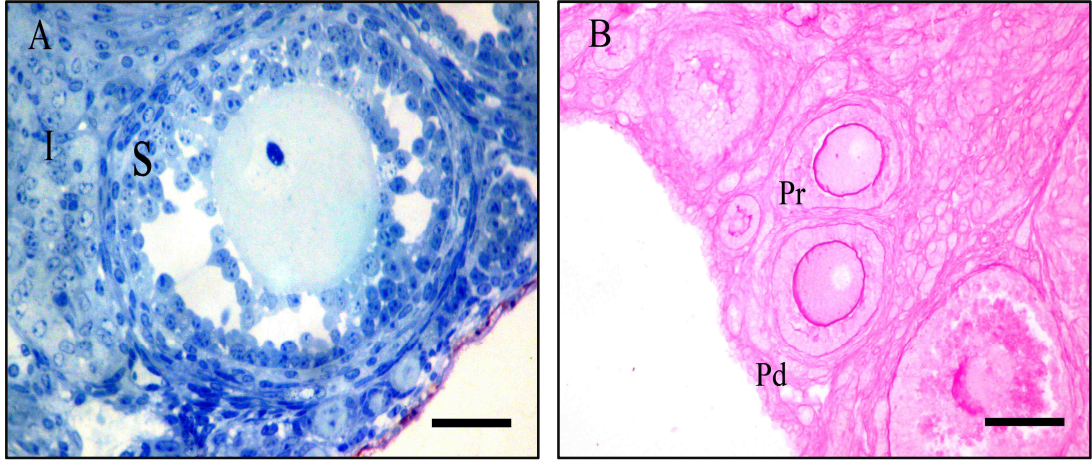
PAS ile boyanan preparatlarda foliküllerde ZP ve bazal lamina izlendi (Şekil 4.6 B).



Şekil 4.4. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül, S: sekonder folikül, yıldızlı foliküller: atretik. Hematoksilen Eozin, bar A, B, C, E: 50 µm; D: 30 µm



Şekil 4.5. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül, S: sekonder folikül. N: çekirdek, ZP: zona pellusida, BL: bazal lamina, yıldızlı foliküller: atretik. Mallory-Azan, bar A, B: 50 µm; C, E, F: 30 µm

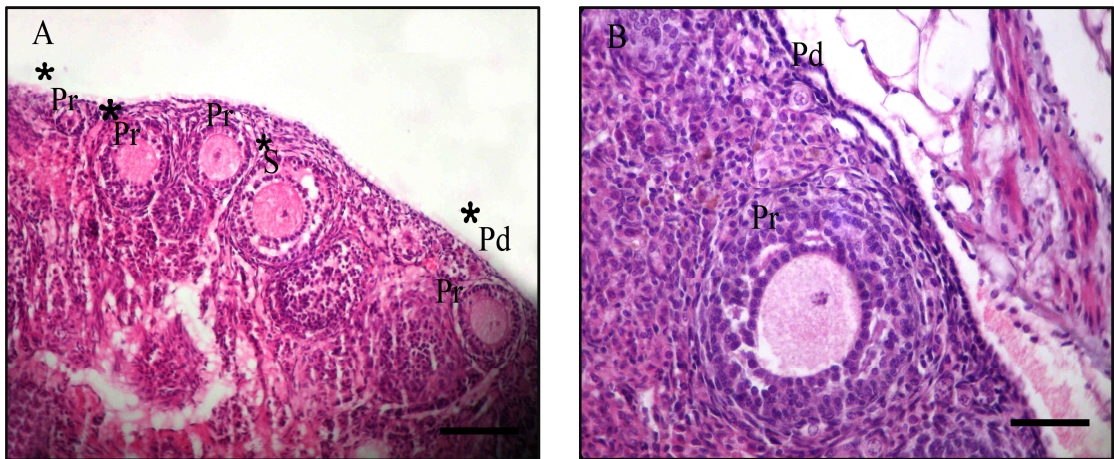


Şekil 4.6. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Pd: primordiyal folikül, Pr: Primer folikül, S: sekonder folikül, I: interstiyum. Toluidin mavisi- Azur II, PAS, bar A: 50 μ m: B: 100 μ m

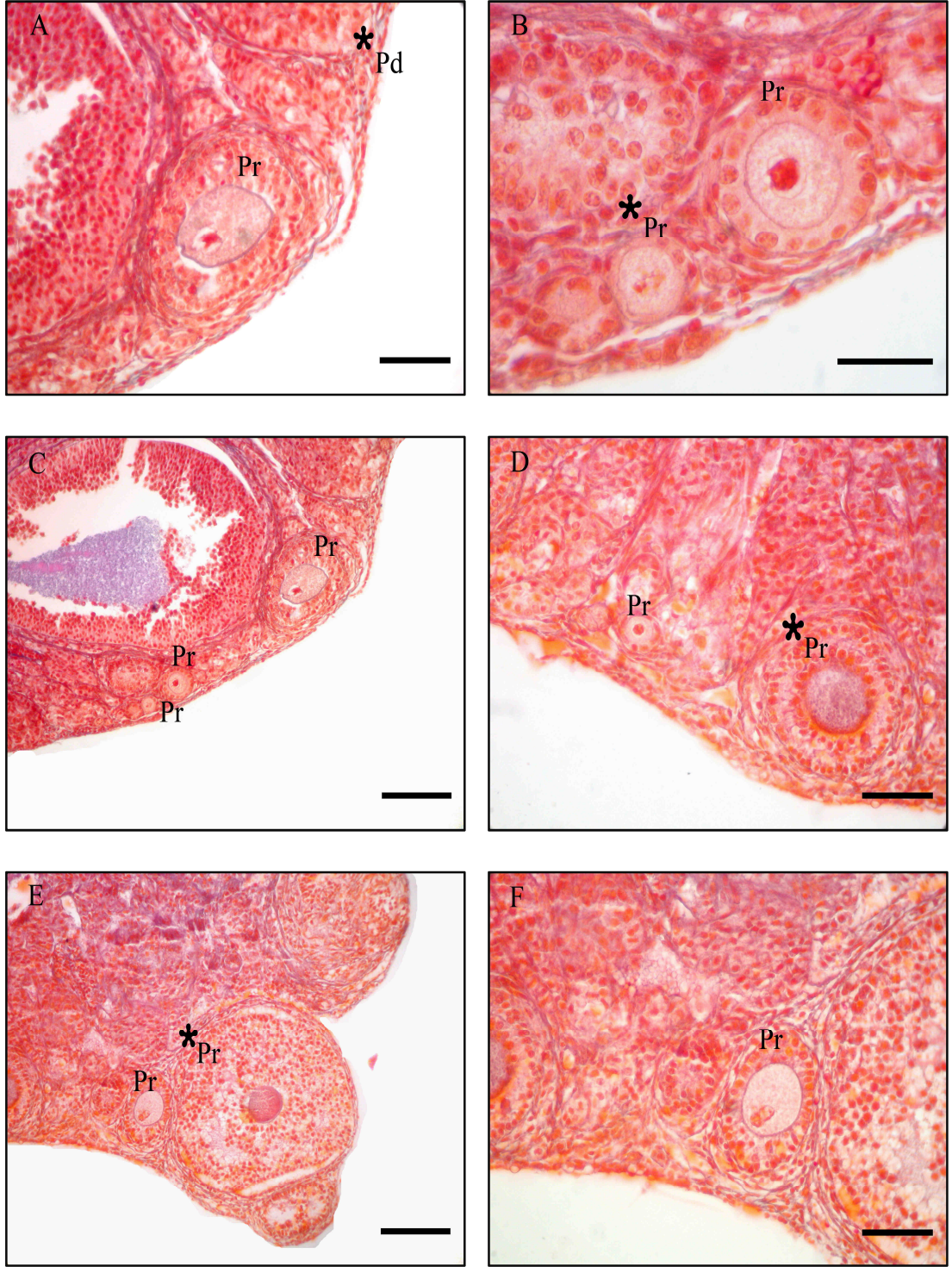
4.2.3. Hızlı dondurma grubu bulguları

Hızlı dondurma grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde sağlıklı primordiyal ve primer foliküller izlendi (Şekil 4.7 A, B; Şekil 4.8 A-C, F). Bunun yanında diğer gruplarla karşılaştırıldığında atretik foliküller daha yoğun olarak bulundu (Şekil 4.7A; Şekil 4.8. C, D; Şekil 4.9 A, B).

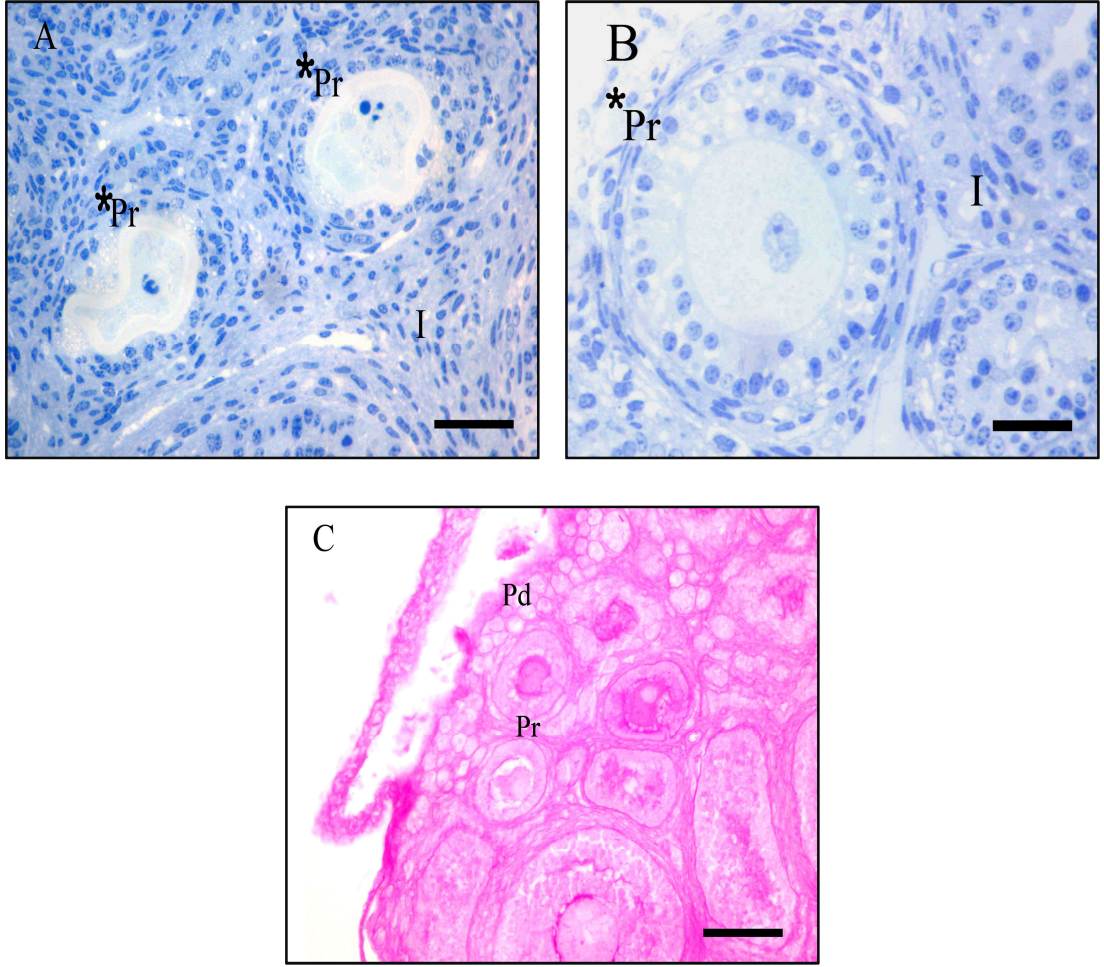
PAS ile boyanan kesitler ZP (zona pellusida) ve BL (bazal lamina) belirgin olarak ayırd edildi (Şekil 4.9 C).



Şekil 4.7. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül, S: sekonder folikül, yıldızlı foliküller: atretik. Hematoksilin Eozin, bar A: 100 μ m; B: 50 μ m



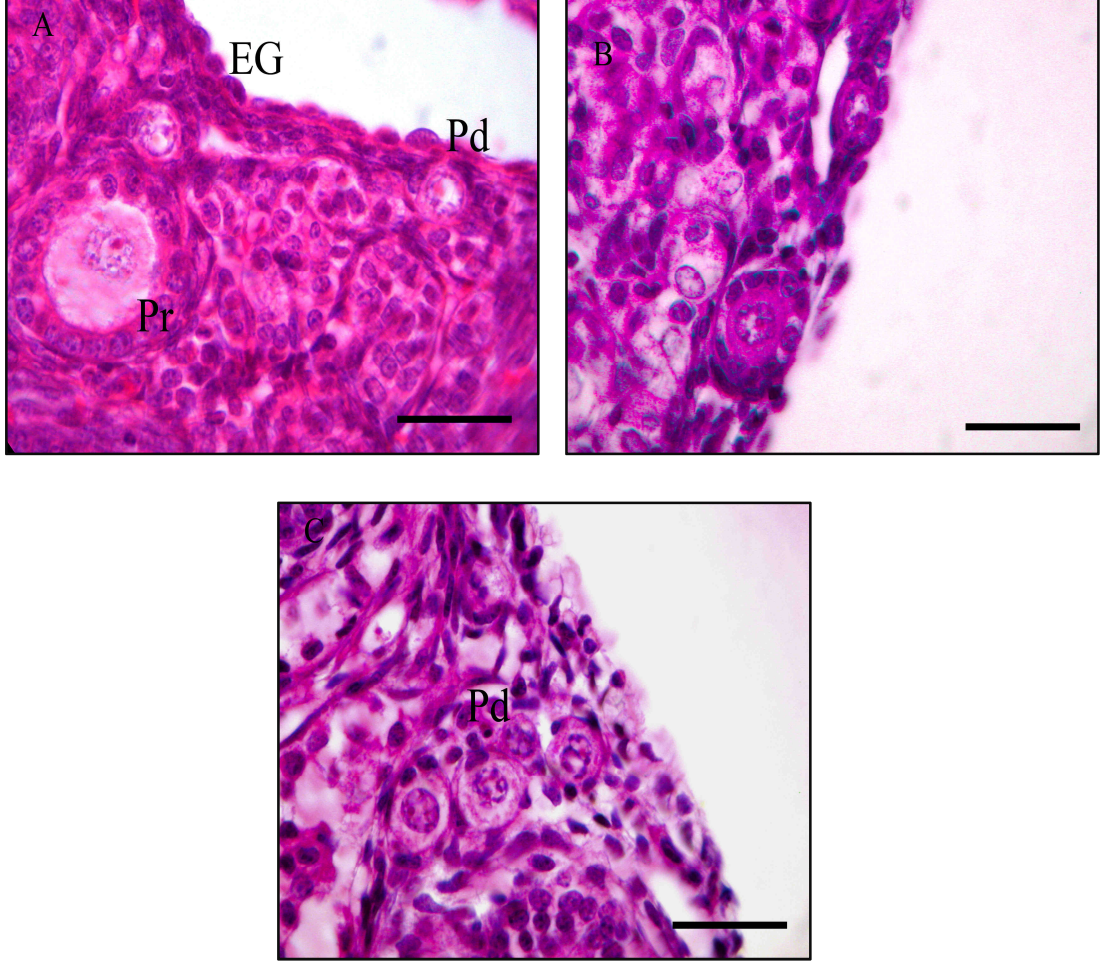
Şekil 4.8. Hızlı dondurma ovaryum dokusu kesiti. Pd. primordiyal folikül, Pr: primer folikül, yıldızlı foliküller: atretik. Mallory-Azan, bar A, D, E, F: 50 μ m; B: 30 μ m; C: 100 μ m



Şekil 4.9. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül, I: intertisyum. Toluidin mavisi- Azur II, PAS, bar A, B: 50 μm ; C: 100 μm

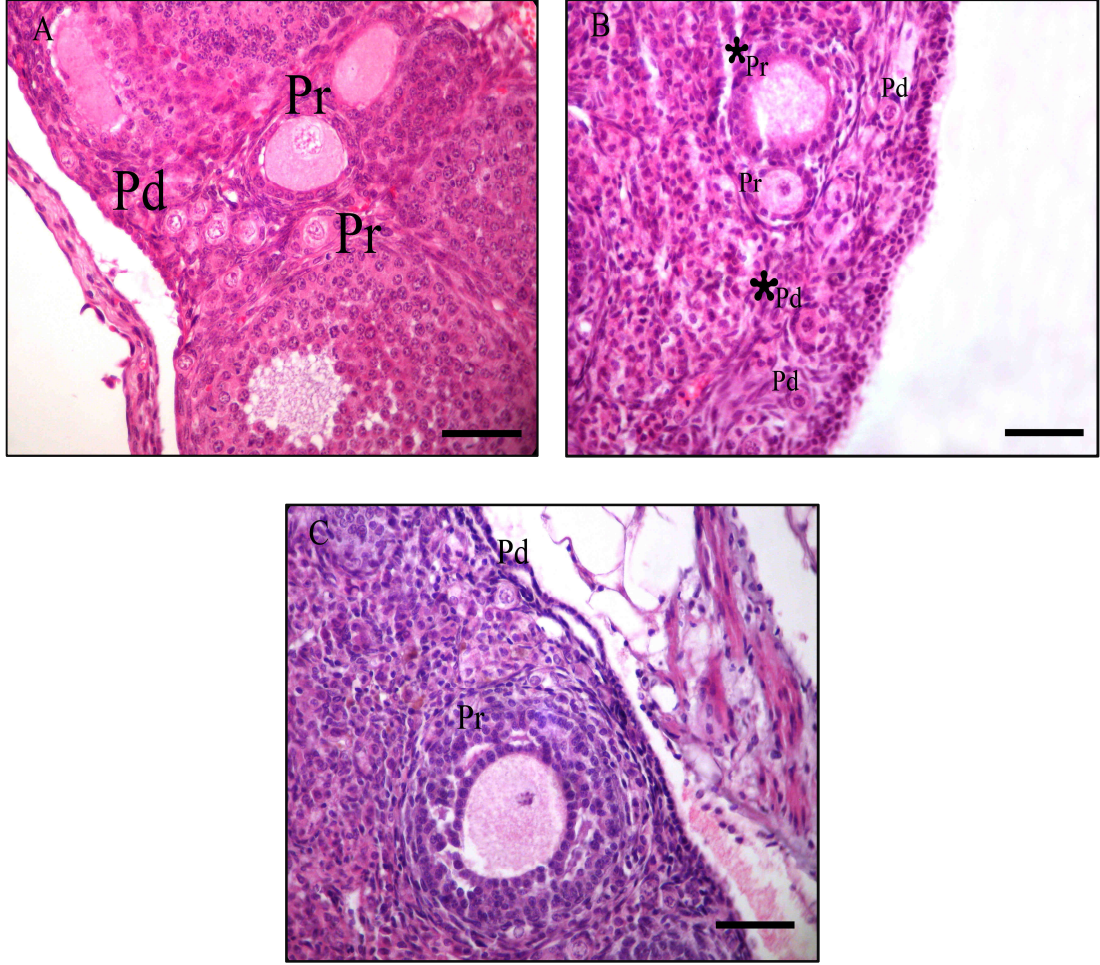
4.2.4 Üç grup ovaryum dokusu karşılaştırılması

Üç gruba ait ovaryum dokusu kesitlerinde sağlam primordiyal foliküller gözlemlendi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Üç gruba ait ovaryum dokusu kesitleri. Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül. A: Kontrol grubu, B: Yavaş dondurma grubu, C: Hızlı dondurma grubu. Hematoksilen Eozin, bar A, B, C: 30 µm

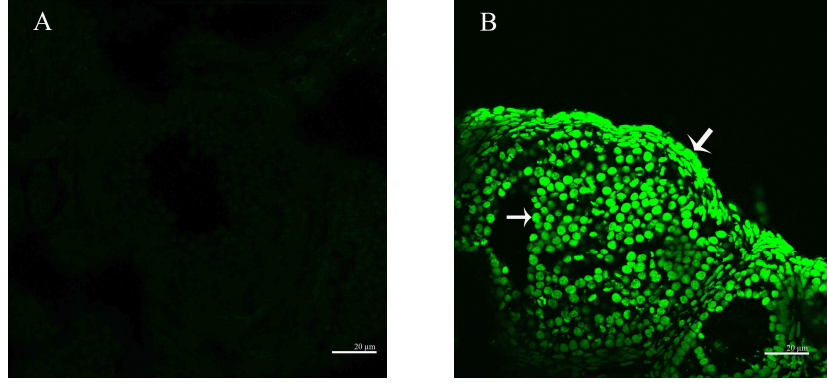
Üç gruba ait ovaryum dokusu kesitlerinde sağlam primer foliküller gözlemlendi (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Üç gruba ait ovaryum dokusu kesitleri. Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül. A: Kontrol grubu, B: Yavaş dondurma grubu, C: Hızlı dondurma grubu. Hematoksilen Eozin, bar A, B, C: 50 µm

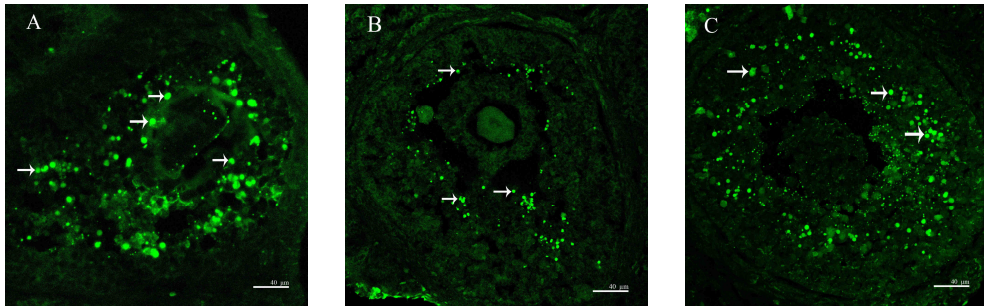
4.3. KONFOKAL MİKROSKOBİK BULGULAR

Kontrol grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde TUNEL (-) ve (+) boyama yapıldı. Negatif kontrolde hiç boyanma gözlenmedi. Pozitif kontrolde tüm hücreler boyanma gösterdi (Şekil 4.12 A, B).



Şekil 4.12. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesitleri. TUNEL (-) ve (+) kontroller. Ok: apoptotik hücre, bar A, B: 20 µm

Normal ovaryum dokusunda foliküllerde apoptozis olağandır (Şekil 4.13. A, B, C). Çalışmamızda her üç grup arasında anlamlı farklılık izlenmemiştir. Apoptozis yönünden değerlendirme yapılmaktan vazgeçilmiştir.



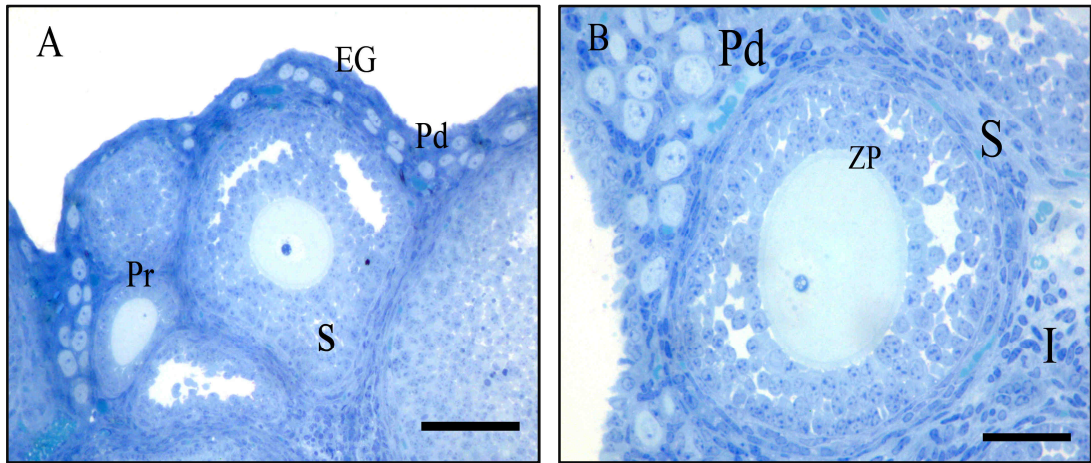
Şekil 4.13. Üç gruba ait ovaryum dokusu kesitlerinde sekonder folikülde TUNEL boyama. Ok: apoptotik hücre, A: Kontrol grubu, B: Yavaş dondurma grubu, C: Hızlı dondurma grubu, bar A, B, C: 40 µm

4.4. ELEKTRON MİKROSKOBİK BULGULAR

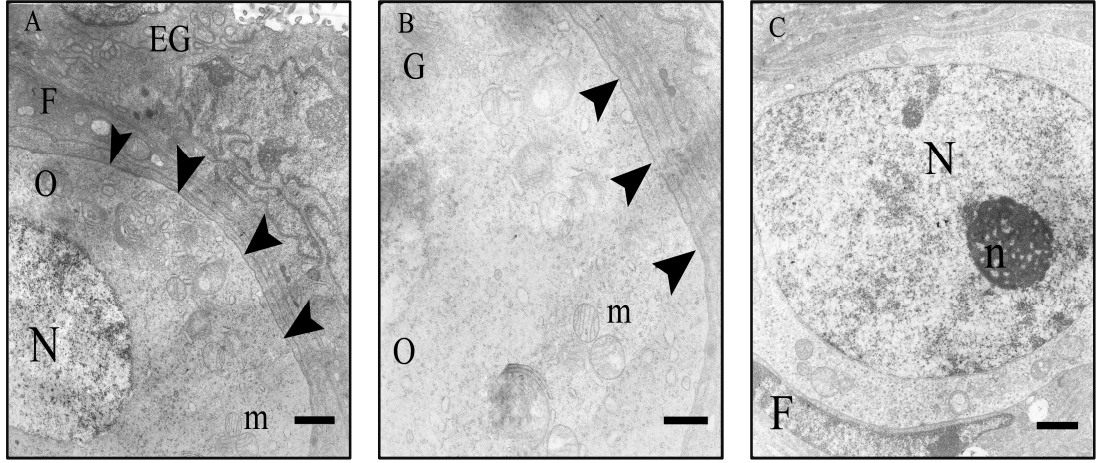
4.4.1 Kontrol Grubu TEM Bulguları

Kontrol grubuna ait ovaryum dokusu yarı ince kesitlerinde sağlam primordiyal, primer folikül ve sekonder foliküller izlendi (Şekil 4.14 A, B). Foliküllerde ovositlerin ökromatin çekirdek içerdiği, ZP yapılarının düzenli olduğu, granüloza hücrelerinde ayrılma olmadığı, teka ve intertisyum hücrelerinin sağlam olduğu gözlemlendi.

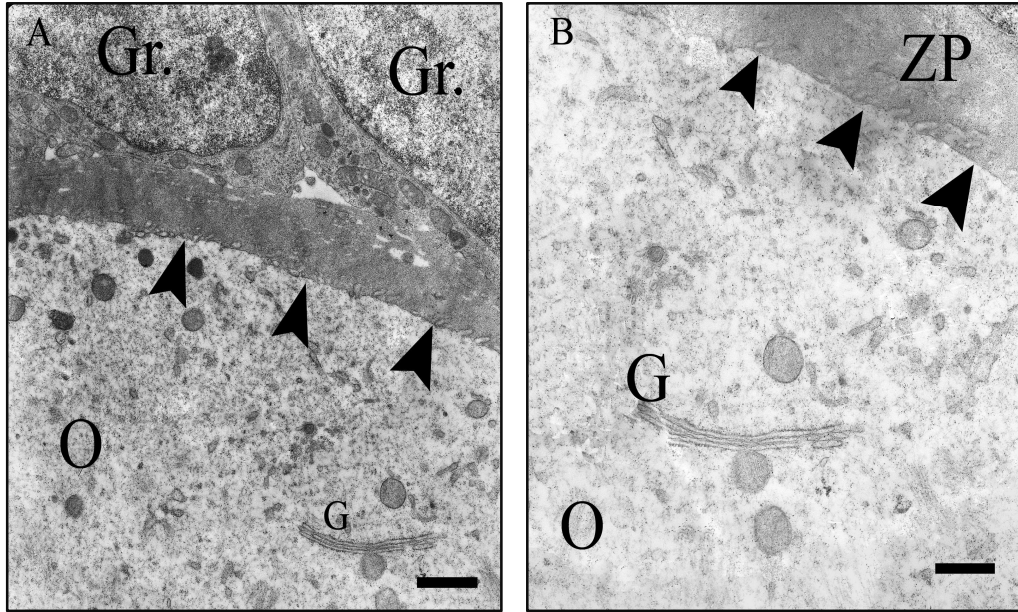
Ovaryum dokusu ince kesitlerinde elektron mikroskobu incelemesinde normal folikül yapılarını gözlemledik (Şekil 4.15 A, B; Şekil 4.16 A, B; Şekil 4.17 A, B; Şekil 4.18 A, B). Ovosit çekirdeği ve sitoplazma dağılımı normal yapıda bulundu (Şekil 4.15 C). Sitoplazmada mitokondriyon membranlarının ve kristallarının sağlam olduğu dikkati çekti (Şekil 4.15 B), Golgi kompleksinin yapısını koruduğu, sarnıçlarda bir harabiyet olmadığı gözlemlendi (Şekil 4.16 A, B). Ovosit- granüloza hücre bağlantılarının (Şekil 4.16 A; Şekil 4.17 B) ve granüloza hücreleri arasındaki bağlantıların korunduğu ince yapı düzeyinde de izlendi (Şekil 4.17 A, B; Şekil 4.18). Damar yapısında endotel hücrelerinin birbirleriyle olan temaslarında bir ayrılma olmadığı gösterildi (Şekil 4.19 A, B).



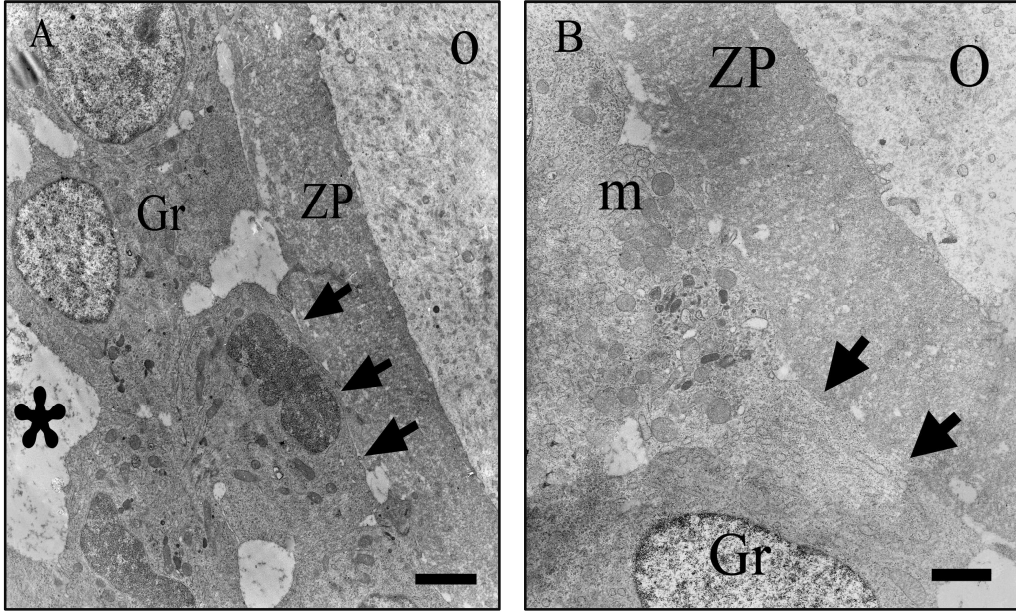
Şekil 4.14. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül, S: sekonder folikül, EG: epitelyum germinativum, ZP: zona pellucida, I: intertisyum. Toluidin mavisi-Azur II boyama, bar A, B: 100 μ m



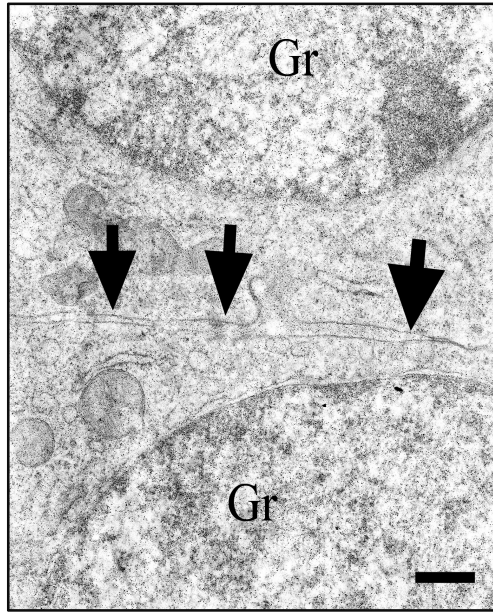
Şekil 4.15. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. O: ovosit, N: nükleus, n: nükleolus, F: folikül hücresi. G: Golgi kompleksi, m: mitokondriyon, ok başları: ovosit- folikül hücresi arasındaki bağlantılar. TEM, bar A: 1,56 μm ; B: 0,93 μm ; C: 2,01 μm



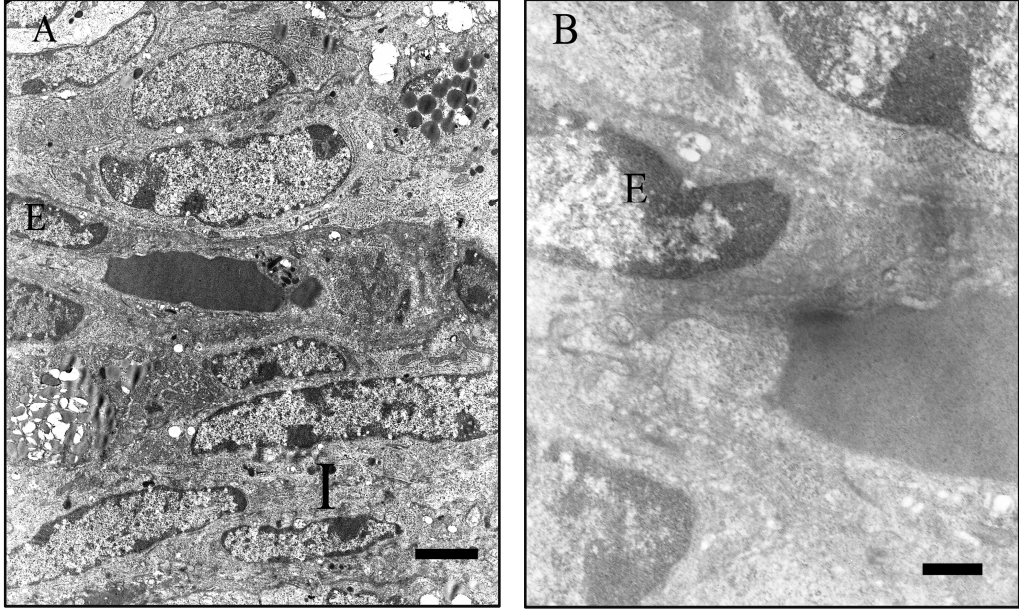
Şekil 4.16. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. O: ovosit, Gr: granuloza hücresi, G: Golgi kompleksi, ZP: zona pellusida, ok başları: ovosit- granuloza hücresi arasındaki bağlantılar. TEM, bar A: 1,56 μm ; B: 0,93 μm



Şekil 4.17. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. O: ovosit, Gr: granüloza hücresi, ZP: zona pellusida, m: mitokondriyon, yıldız: hücreler arası alanda boşluklar. TEM, bar A: 3,36 μm ; B: 2,60 μm



Şekil 4.18. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. Gr: granüloza hücreleri, ok başı: granüloza hücre bağlantıları. TEM, bar: 0,72 μm



Şekil 4.19. Kontrol grubu ovaryum dokusu kesiti. Damar yapısı. E: endotel hücresi, I: intertisyel hücreler. TEM, bar: A: 3,36 μm ; B: 0, 93 μm

4.4.2 Yavaş Dondurma Grubu TEM Bulguları

Yavaş dondurma grubuna ait TEM kesitlerinde sağlam foliküllerde ovosit çekirdeğinin olağan görünümde olduğu, organellerin korunduğu gözlemlendi (Şekil 4.22). Folikül hücreleri arasında ve bu hücrelerin ovositle aralarındaki hücre bağlantılarının korunduğu dikkat çekti.

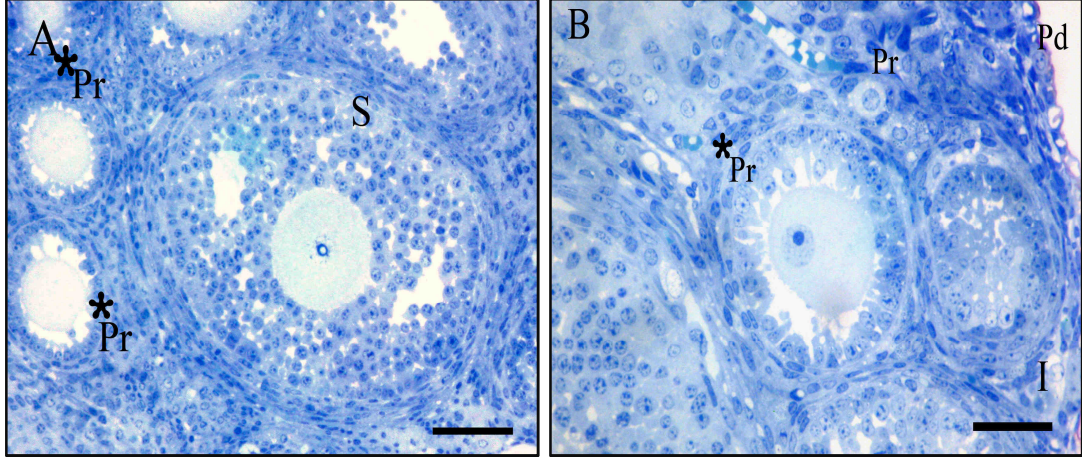
Ovositin çevresinde glikoprotein yapıda bulunan Zona Pellusida (ZP) nın yapısını korunduğunu izlendi.

Yavaş dondurma grubunda büyük foliküllerde sağlıklı granüloza hücreleri ve korunmuş bağlantıları gözlemlendi (Şekil 4.20 A).

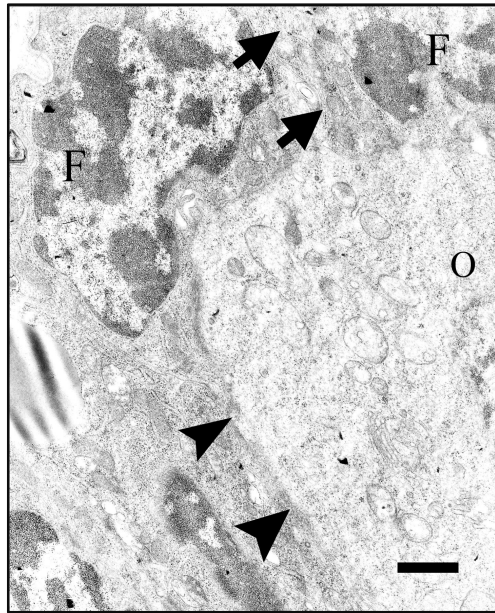
Yavaş dondurma grubuna ait ovaryum dokusu kesitlerinde, damar yapılarının korunduğu dikkati çekti (Şekil 4.24 A). Epitel hücreleri arasındaki bağlantıların devam ettiği gözlemlendi (Şekil 4.24 B).

Granüloza ve teka hücreleri arasındaki bazal laminanın düzenli yapıda olduğu gösterildi (Şekil 4.23 A).

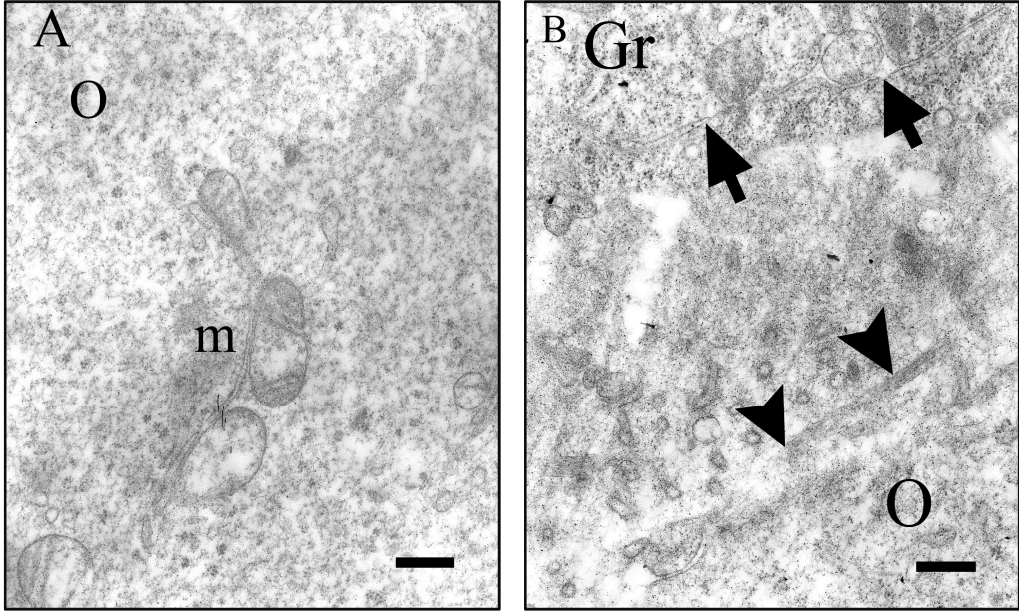
Atretik foliküllerde ovosit hücre zarının bütünlüğünü kaybettiğini gözledik (Şekil 4.27 A). Granüloza hücrelerinde apoptoz gösterildi (Şekil 4.27 A). Hücreler arası alanda boşluklar meydana geldiği, granüloza hücre sitoplazmasında vakuolizasyonlar oluştuğu dikkati çekti (Şekil 4.27 A, B; Şekil 4.28 A, B).



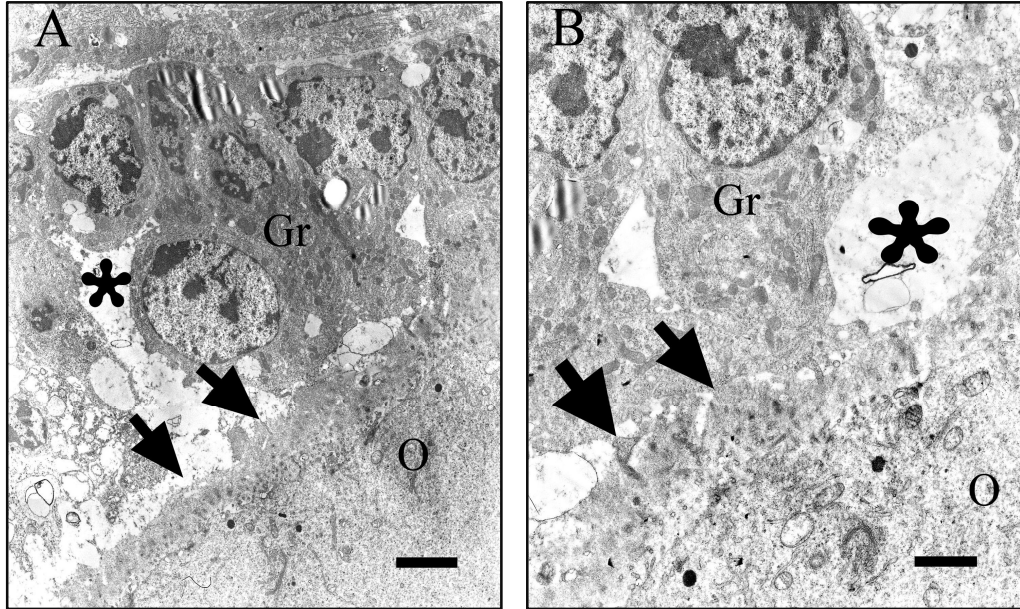
Şekil 4.20. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Pd: primordiyal folikül, Pr: primer folikül, S: sekonder folikül, I: interstisyum. Toluidin mavisi-Azur II, bar A: 100 µm; B: 50 µm



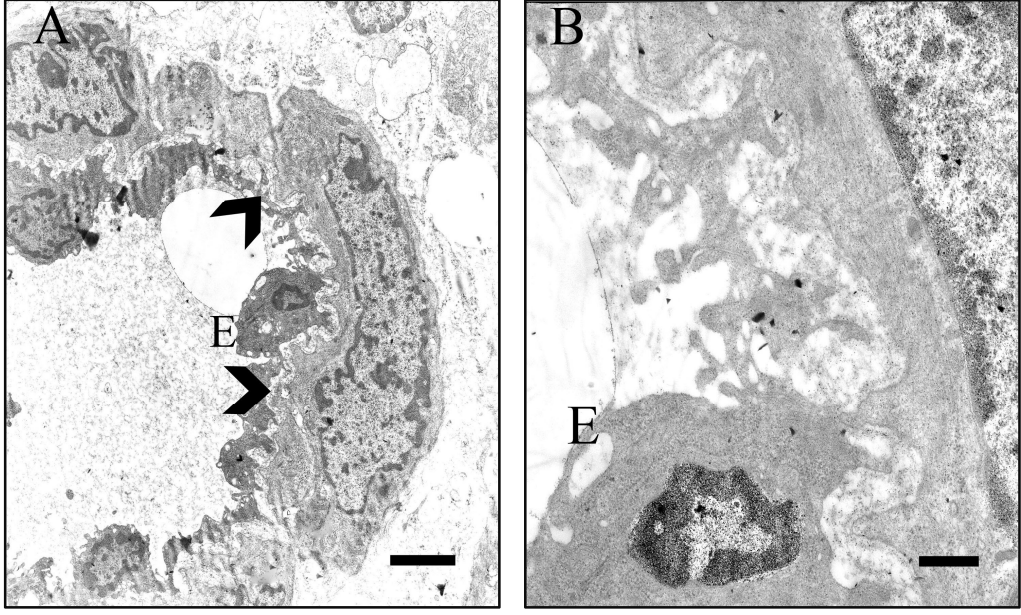
Şekil 4.21. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. O: ovosit,, F: folikül hücresi, ok başı: ovosit-granüloza hücreleri arasındaki bağlantılar, kalın ok: folikül hücreleri arasındaki temas. TEM, bar: 1,21 µm



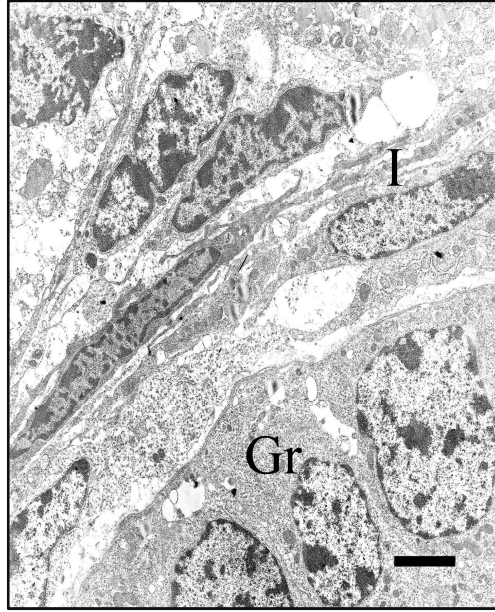
Şekil 4.22. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. O:ovosit sitoplazması, Gr: granüloza hücresi, ok başı: ovosit-granüloza hücreleri arasındaki bağlantılar, kalın ok: folikül hücreleri arasındaki temas. TEM, bar A: 0,72 μm ; B: 0,56 μm



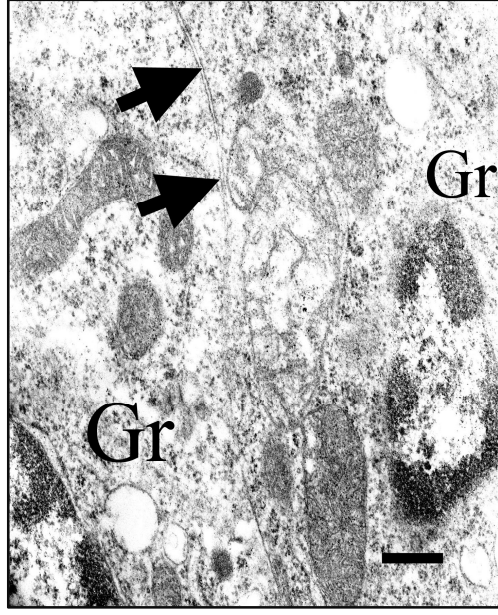
Şekil 4.23. Yavaş dondurma grubu ovaryum kesiti. O: ovosit, Gr: granüloza hücresi, m: mitokondriyon, kalın ok: ovosit-granüloza bağlantıları, ok başı: ovositin zar yapısını gösteriyor. TEM, bar A: 4,34 μm ; B: 2,01 μm



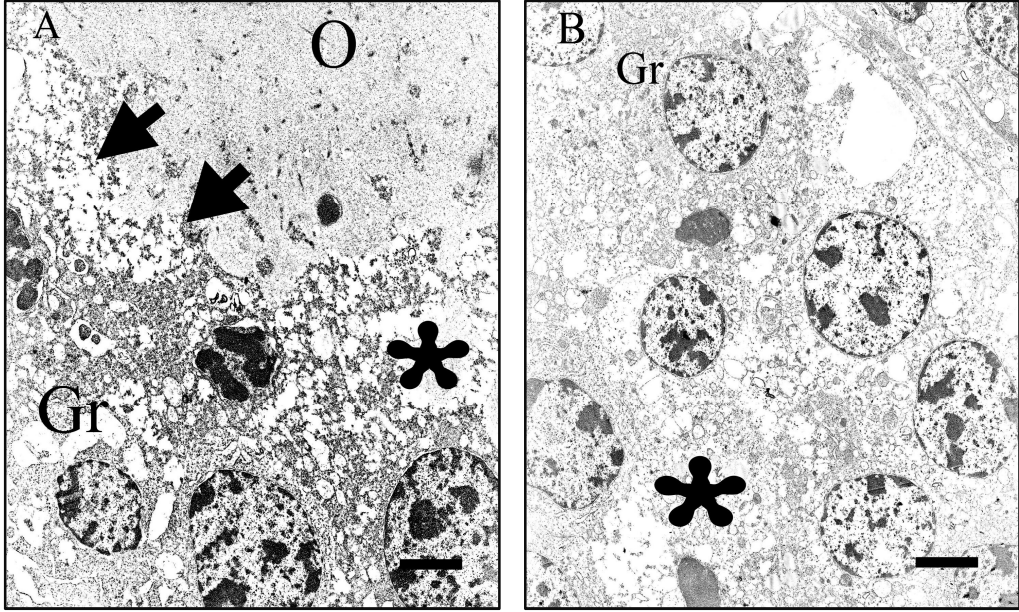
Şekil 4.24. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. E: Epitel hücresi, ok ucu: epitel hücre bağlantısı. TEM, bar A: 3,36 μm ; B: 0,72 μm



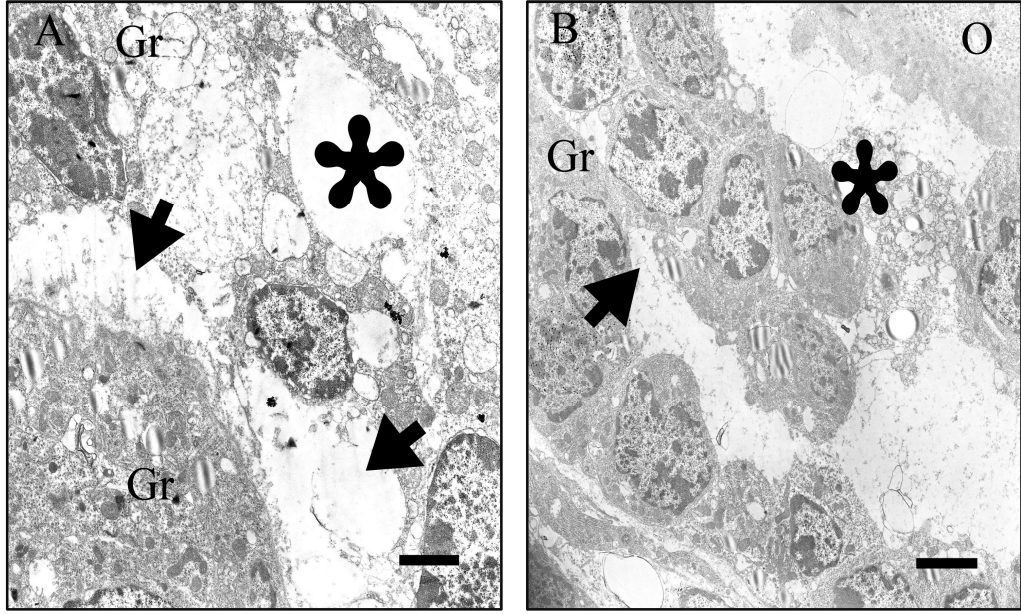
Şekil 4.25. Yavaş dondurma grubu ovaryum kesiti. Gr: granüloza hücresi, I: intertisyum. TEM, bar: 3,36 μm



Şekil 4.26. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti, Gr: granüloza hücresi, kalın oklar: hücreler arasındaki bağlantılar. TEM, bar: 6,56 µm



Şekil 4.27. Yavaş dondurma ovaryum dokusu kesiti. O: ovosit, Gr: granüloza hücresi, kalın ok: ovosit- granüloza hücre bağlantıları, yıldız: hücreler arası alanda vakuolizasyon. TEM, bar A: 3,36 µm; B: 4,34 µm



Şekil 4.28. Yavaş dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. O: ovosit, Gr: granüloza hücresi, kalın ok: granüloza hücre bağlantıları, yıldız: vakuolize alanlar. TEM, bar A: 2,60 μm ; B: 4,34 μm

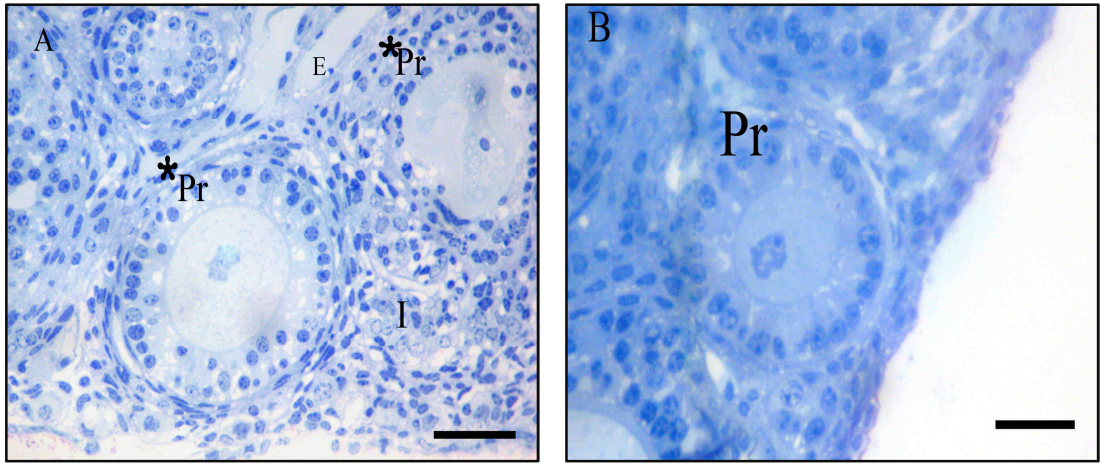
4.4.2. Hızlı Dondurma Grubu TEM Bulguları

Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu TEM incelemesinde bazı erken dönem ovosit sitoplazmalarında organel dağılımının korunduğu, ZP nin sağlam yapıda olduğu gözlemlendi (Şekil 4.34 A, B, C). Granüloza hücrelerinin ovositle arasındaki bağlantıları korumakla birlikte, hücrelerde büzüşme ve kondensasyon artışı dikkat çekiciydi (Şekil 4.31 A, B). Bazı foliküllerde ise ovositte dejenerasyon, zona kaybı, granüloza hücrelerinde ayrılma ve vakuolizasyon tipik olarak gözlemlendi (Şekil 4.33 A, B, C). Bu grubun diğer gruplardan en önemli farkı korunmuş erken dönem foliküllerin yanında dejenere foliküllerin (Şekil 4.36 A, B) fazla olması ve bu dejenerasyonun daha çok hücrelerin birbirinden ayrılması, büzülmesi, buna bağlı kondansasyonu ve sitoplazmalarında vakuolizasyonla karakterize olmasıdır (Şekil 4.35). Mitokondriyonların hem ovosit hem de granüloza hücrelerinde krista kayıpları ve kondens görünüşleri tipiktir.

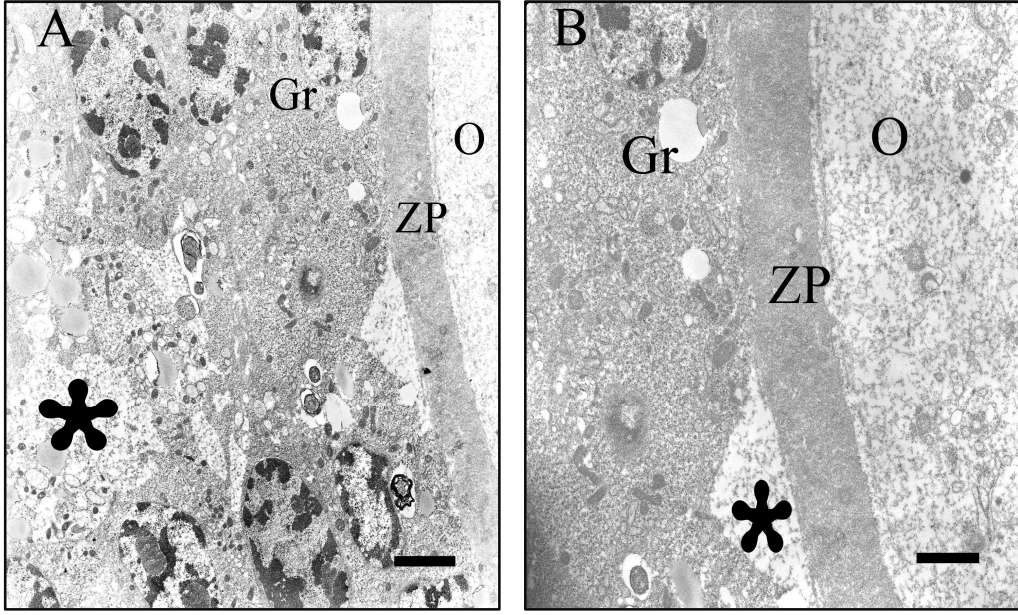
Granüloza hücreleri arasında dondurma işlemi nedeniyle ayrılmalar gözlemlendi. Hücreler arasındaki bağlantıların yer yer devamlılık göstermesiyle birlikte genel

olarak korunamadığı dikkat çekti (Şekil 4.31 A, B; Şekil 4.32). Damar endotel hücrelerinde vakuolizasyon görüldü (Şekil 4.37 A, B).

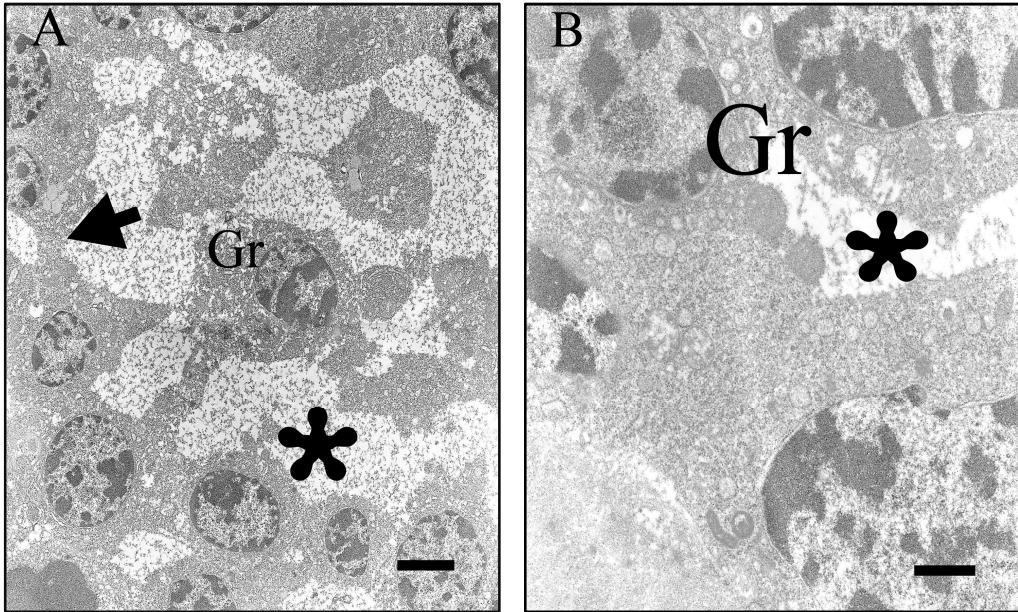
Yarı ince kesitler de granüloza hücrelerinde vakuolizasyon fark edildi (Şekil 4.29 A). Hücreler arası alanda da boşluklar fark gözlendi (Şekil 4.29 A). İntertisyum hücrelerinde de vakuolizasyon gözlendi. Buzlanma hasarından korunan ve korunmayan foliküller izlendi. Atretik foliküllerde ovosit hücre zar yapısının bozulması nedeniyle, hücrenin yuvarlak şeklini kaybettiği fark edildi (Şekil 4.29 A). Damar endotel hücrelerinde de vakuolizasyon görüldü.



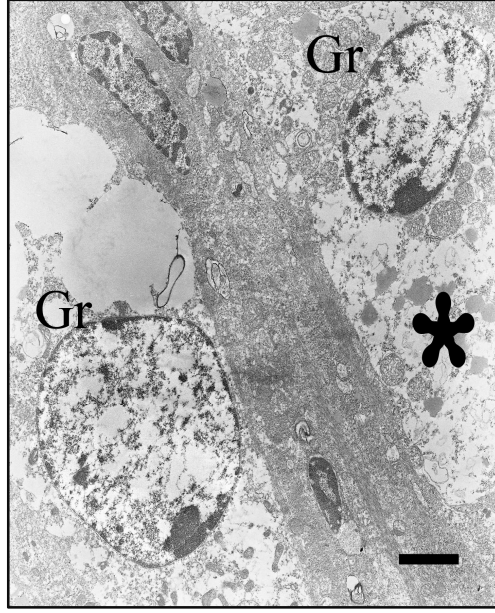
Şekil 4.29. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Pr: primer folikül, I: intertisyum, E: endotel hücresi, yıldız: atretik folikül. Toluidin mavisi-Azur II, bar A, B: 50 µm



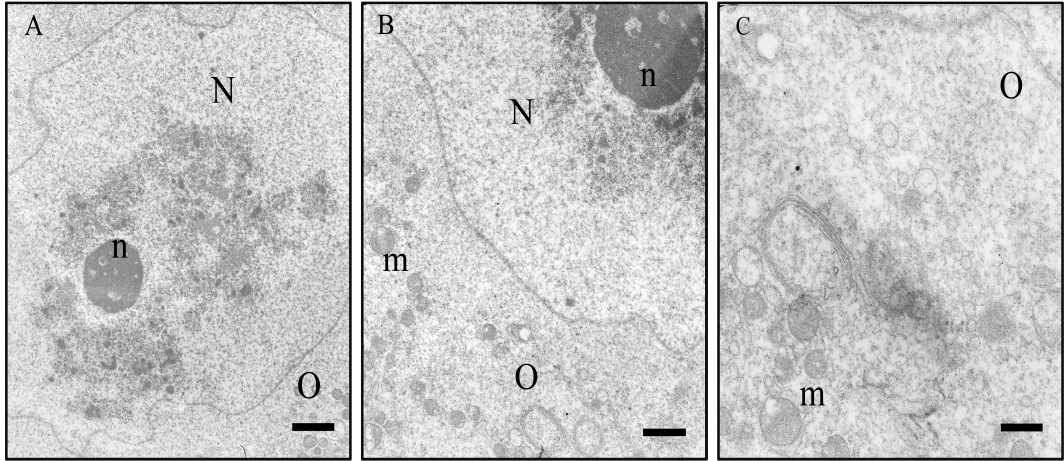
Şekil 4.30. Hızlı dondurma grubu ovaryum kesiti. O: ovosit, Gr: granüloza hücresi, ZP: zona pellusida, yıldız: hücreler arası alanda vakuolizasyon. TEM, bar A: 3,36 μm ; B: 2,01 μm



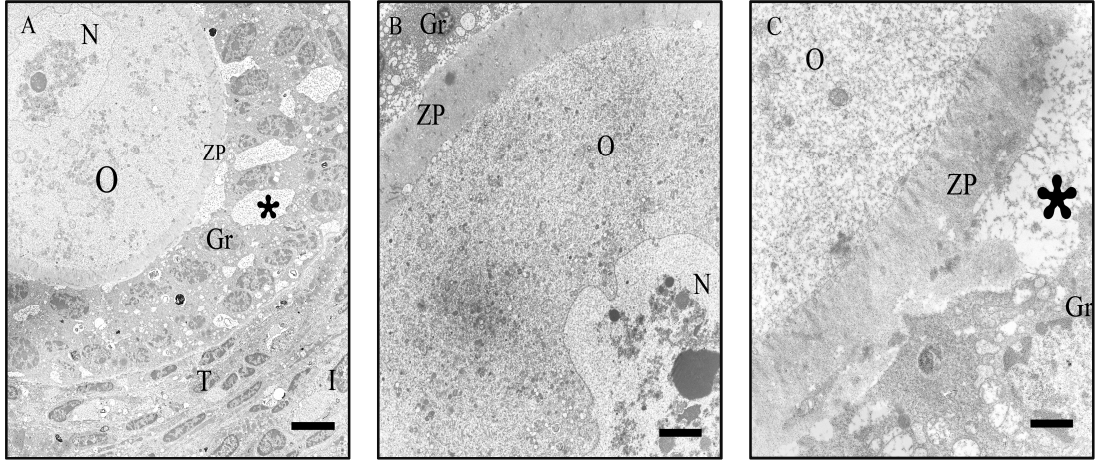
Şekil 4.31. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Gr: granüloza hücresi, kalın ok: hücre bağlantıları, yıldız: boş alanlar. TEM, bar A: 4,34 μm ; B: 1,21 μm



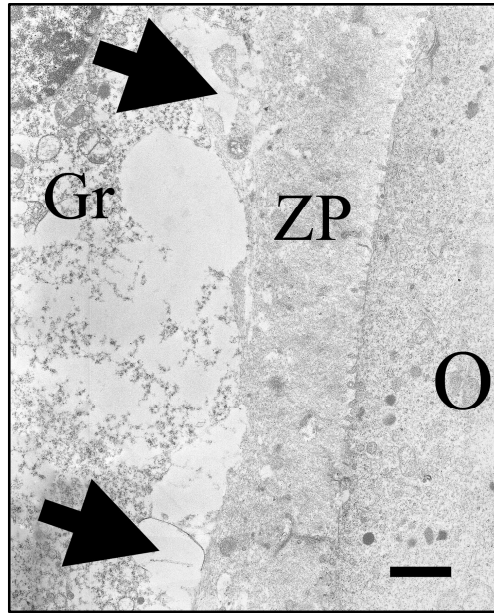
Şekil 4.32. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Gr: granüloza hücresi, yıldız: vakuolize alan. TEM, bar: 3,36 μm



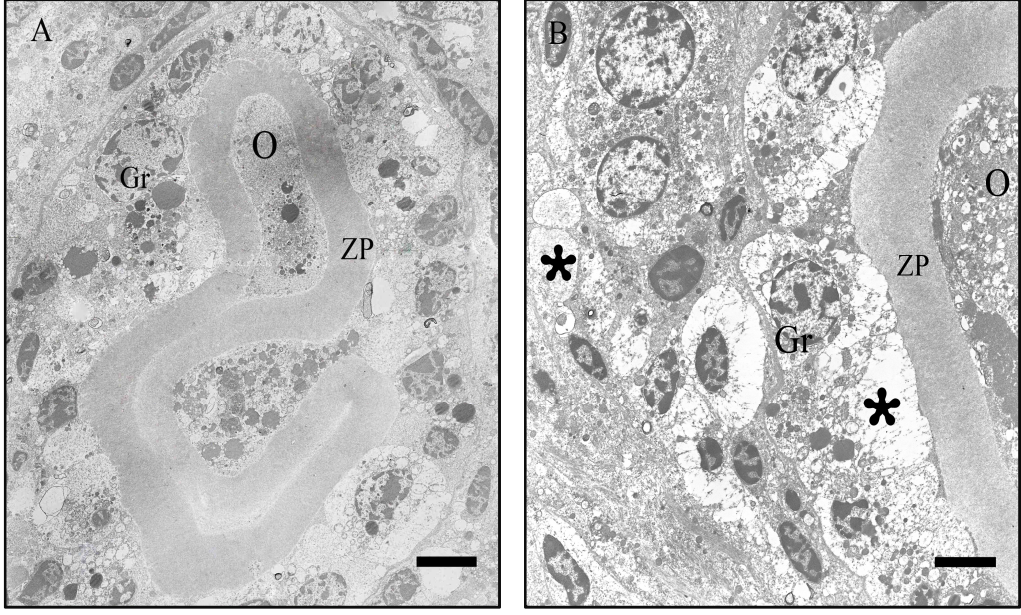
Şekil 4.33. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. O: ovosit, N: nükleus, n: nükleolus, m: mitokondriyon. TEM, bar A: 2,6 μm ; B: 1,56 μm ; C: 0,72 μm



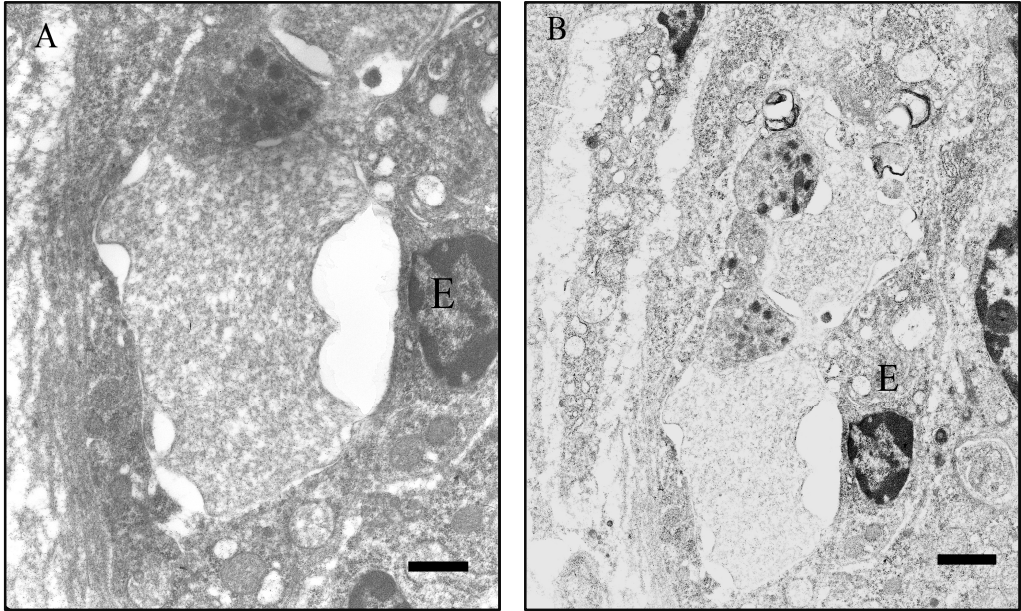
Şekil 4.34. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Primer folikül. O: ovosit, N: nükleus, n: nükleolus, Gr: granüloza hücresi, ZP: zona pellusida, yıldız: hücreler arası alanda vakuolizasyon, T: teka hücresi, I: intertisyel hücreler. TEM, bar A: 9,3 μm ; B: 5,6 μm ; C: 1,56 μm



Şekil 4.35. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. O: ovosit, ZP, Gr: granüloza hücresi, kalın ok: ovosit ve granüloza hücresi arasındaki ayrılımlar. TEM, bar: 2,01 μm



Şekil 4.36. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Atretik folikül. O: ovosit, Gr: granüloza hücresi, ZP: zona pellusida, yıldız: hücreler arası alanda vakuolizasyon. TEM, bar A: 7,2 μm ; B: 5,6 μm



Şekil 4.37. Hızlı dondurma grubu ovaryum dokusu kesiti. Damar yapısı. E: endotel hücresi. TEM, bar A: 2,01 μm ; B: 1,21 μm

5. TARTIŞMA

Ovaryum doku kriyoprezervasyonu ve transplantasyonu uygulamaları hala deneysel düzeydedir. Fazla sayıda hasta üzerinde yapılacak olan araştırmalar, transplante edilen ovaryumun fertilitésinin geri dönme süresini ve şartlarını belirleyebilir.

Araştırmalar hastaların tedaviye uygunluğu, dokuların toplanma metodu, optimal doku büyüklüğü, kriyoprotektan ve kriyoprezervasyon protokolleri, ovositlerin İVM (invitro maturasyon)'i üzerinde odaklanmaktadır.

Günümüzde ovaryum doku kriyoprezervasyonu sadece seçilmiş hastalara deneysel bir protokol olarak tavsiye edilebilir. Gelecekte kullanmak üzere ovaryum dokusunun dondurulması araştırma merkezleri için yeni bir hedef olarak görülmektedir (The practice committee of ASMR and SART. 2008).

Ovaryum farklı hücrelerden oluşan bir dokudur. Kriyoprotektanların hücrelere difüzyon hızı farklıdır ve buz kristal oluşumu her hücre ve doku tipine özeldir (Fuller ve ark., 2004). Bu nedenle, ovaryum kriyopreservasyonunun doku üzerindeki etkisi ovositler, folikül hücreleri ve stroma üzerindeki etkilerinin bileşimidir. Bildiğimiz gibi, ovaryum folikülleri stroma hücreleri, kan damarları, sinirler, ekstraselüler matriksten oluşan stroma dokusu içine gömülü halde bulunurlar. Folikül gelişimi karmaşık bir süreçtir. Stroma hücreleri granüloza hücrelerinin çoğalması ve farklanmasında rol oynayan folikül bazal laminasının dışındaki teka interna ve teka eksternaya dönüşürler. Ekstraselüler matriks, ekstraselüler sinyal moleküllerinin dağılımını ve hücre proliferasyon, adezyon ve hareketini etkileyen hücre yüzeyindeki olayları düzenler. Bu nedenle organ içerisindeki primordiyal foliküller, kültüre edilenlerden daha iyi gelişirler (Hovatta ve ark., 1999) (Liu ve ark 2000). Organ kültürlerindeki dondurulmuş ve taze primordiyal ve primer foliküllerine ekstraselüler matriks eklemek gelişimlerini iyileştirir (Hovatta ve ark., 1997). Bu bulgular, folikül gelişiminde ovaryum stroma

hücrelerinin ve ekstraselüler matriksin destekleyici bir rol oynadığını gösterir. Ovaryum doku kriyopreservasyonunda, stromal hücreler dondurma hasarına primordiyal folikülden daha hassastır (Kim ve ark., 2004).

Hızlı ve yavaş dondurma yöntemi olarak iki teknikle uygulanan ovaryum dokusu dondurulması konusunda literatürdeki çalışmalara bakacak olursak;

Huang ve ark.,nın 26 hastadan aldıkları ovaryum doku parçalarını hızlı dondurma (vitrikasyon) ve yavaş dondurma tekniklerini (slow freezing-Planer cihazı ile) kullanarak karşılaştırdıkları çalışmalarında; ışık mikroskopisinde sağlam folikülleri, yuvarlak ovosit etrafında normal dağılım ve büyüklükte yuvarlak granüloza hücreleriyle çevrili olarak tanımlamışlardır. Foliküllerin çevresinde sağlam teka hücrelerini de göstermişlerdir. Atretik folikülleri ise; ovosit sitoplazmasının daha eozinofilik bir hal alması, kromatin birikim ve yoğunlaşması, nükleer membranın dalgalanması bulgularından tanıyabileceğimizi belirtmişlerdir. Histopatolojik olarak incelediklerinde ve istatistiksel olarak değerlendirdiklerinde iki grup arasında anlamlı bir fark bulamamışlardır. Biz de çalışmamızda ışık mikroskopisinde ovaryum dokusunu değerlendirirken sağlam ve atretik folikülleri tanımlayarak saydık ve istatistiksel olarak değerlendirdik. Sağlam ve atretik foliküllerin tümünü her grupta Ki-kare testiyle karşılaştırdığımızda foliküllerin kontrol grubuna göre diğer iki grupta daha az korunduğunu ortaya koyduk. Primordiyal foliküllerde kontrol ve yavaş dondurma grubu arasında bir fark olmadığı saptandı. Sonuçta yavaş dondurma metodunun histopatolojik, istatistiksel ve ince yapı düzeyinde dokuyu daha iyi koruduğu sonucuna ulaştık.

Huang ve ark.'nın çalışmasında primordiyal foliküllerin diğer foliküllere göre daha iyi korunduğu gösterilmiştir. Bu folikülde ovosit çapı küçük olması nedeniyle sitoplazma içeriği az olduğu için kriyoprezervasyon sırasında daha az hasar görür. Biz de çalışmamızda Huang'ın bulgularını destekler şekilde her üç grupta da en çok primordiyal foliküllerin içlerindeki ovosit, çevrelerindeki folikül hücreleri ve bu hücrelerin birbirleriyle olan bağlantıları açısından iyi korunduğunu gördük.

Wang ve ark. hem hızlı dondurma metodunu, yavaş dondurma metodu ile karşılaştırmışlar hem de akupunktur iğnesi ile yapılan yeni bir hızlı dondurma tekniği

denemişlerdir. Primer ve sekonder foliküllerin morfolojik olarak yüzdelerini karşılaştırdıklarında primer ve sekonder foliküllerin akupunktur iğnesi ile yapılan hızlı dondurmada diğerlerine göre daha sağlam olarak gözlendiğini bulmuşlardır. Primordiyal foliküllerde morfolojik farklılık göze çarpmamıştır. Yavaş dondurma ve klasik vitrifikasyon arasında bir fark bulamamışlardır.

Hızlı ve yavaş dondurma tekniğinin karşılaştırılması çalışmalarında, dokunun dondurulup çözüldükten sonra transplante edilip tekrar değerlendirilmesi araştırmalarda oldukça sık rastlanan bir yöntemdir. Aerts ve ark'nın bu yöntemle planladıkları bir araştırmada iki yöntemi uygulamışlar ve calcein-AM/ethidium homodimer-I ile folikül canlılığını göstermişlerdir. Transplantasyon öncesi yaptıkları bu değerlendirmede yöntemler arasında belirgin bir fark ortaya çıkmamıştır. Transplantasyondan sonra ışık mikroskopisinde folikülleri değerlendirdiklerinde primordiyal ve primer folikülde bir farklılık gözlenmezken sekonder folikülde yavaş dondurma anlamlı bir fark ortaya koymuştur. Çalışmamızda transplatasyon uygulanmadan da sekonder foliküllerin yavaş soğutmada daha iyi korunduğu dikkat çekmiştir.

Rahimi ve ark. iki tekniği karşılaştırırken apopitozisi gösteren caspase-3 immünohistokimya boyama yöntemini kullanmışlardır. Apopitotoik hücreler, hızlı dondurma tekniğinde daha fazla oranda bulunmuşlardır. Biz de araştırmamızda caspase-3'ü immünfloresan yöntemle gösterdik ancak istatistiksel bir değerlendirme ortaya koyamadık. Çalışmamızı desteklemesi için bu yöntemi uygulayabileceğimizi düşündük ancak ovaryum dokusunda normalde de atretik foliküller ve apopitotik hücrelerin yoğunluğu nedeniyle kıyaslamayı somut olarak gösteremedik. Kullandığımız immünofloresan boyama yöntemi nedeniyle sağlıklı bir sayım yapamadık. Çalışmanın bu bölümü ileriki zamanlarda peroksidaz metodu ve seri kesitler kullanılarak devam ettirilecektir.

Araştırmamızda sağlam folikülleri istatistiksel olarak değerlendirmenin yanında elektron mikroskopisinde ince yapı düzeyinde ovaryum dokusunda yer alan hücre ve yapıları inceledik. Combani ve ark. ovosit hücre çekirdeği ve organelleri, granüloza hücrelerinin birbirleriyle ve ovositle olan bağlantıları, teka hücreleri, damar endotel hücrelerini inceleyen çalışmaları derlemişlerdir. Yeterli düzeyde

ovaryum dokusu incelemesi olmadığı için bu çalışma önemlidir. Çözme işleminin hücre şişmesine, doku ödeme ve damar hasarına neden olduğu belirtilmiştir. Ovositte ve granüloza hücrelerinde vakuolizasyon artışı, endoplazma retikulumu ve mitokondrion hasarını gösterebilir. Dokuda uygun olmayan dehidrtasyon sonucu buz krsitallerinin oluşturduğu yapılar olabilir. Ovosit ve granüloza hücre çekirdeğinde piknozda artış görülebilir. Plazma, çekirdek ve organel membranlarında, buz kristali oluşumu, osmotik stres ve düşük sıcaklık nedeniyle hasar görülebilir. Mitokondrion membranında, krista ve matrikste hasar ve şişme foliküler hasarın ilk belirtileridir. Yüksek kriyoprotektana maruziyet sonucu granüloza hücrelerinde boş sitoplazma alanları, hücre içeriğinin kaybına rastlanabilir. Hücreler arası bağlantılarda bozukluklar hem granüloza hücreleri arasında hem de ovosit- granüloza hücreleri arasında gözlenebilir. Foliküler hücrelerde düzensizlik, bağlantı kaybı, hücreler arası alanda vakuolize alanlar gözlenir. Foliküler hücre dejenerasyonu ve hücreler arası bağlarda kayıp bu hücrelerde apopitozisi indükler. Damar yapılarında nükleer, sitoplazmik membranda çöküntüler, şişmiş sitoplazma, hücre bağlantılarının devamlılığını kaybetmesi kriyoprezervasyonda gözlenebilen hasarlardır. Reversible olabilirler. Çalışmamızda her üç grupta da normal yapıda hücreleri izledik. Bu foliküllerde ovosit çekirdeğinde kromatinde normal dağılım, sitoplazmasında organel membranlarının korunduğunu, Zona Pellusida yapısının bozulmadığını, sağlam folikül hücreleri ve teka hücrelerini izledik. Deney gruplarında atretik foliküllerde artış, Combani'nin belirttiği üzere ince yapı hasarları belirgindi. Ovosit sitoplazmasında hasarlı organeller; özellikle buz kristali oluşumu, osmotik stres ve düşük sıcaklık hasarına bağlı mitokondiyonda şişme veya kondansasyon belirgin olarak gözlemlendi. Zona yapısının bozulduğu ve kondanse olduğu dikkati çekti. Granüloza hücrelerinin ovositle ve birbirleriyle bağlantılarının koptuğunu, hücre içerisinde vakuolizasyon, hücreler arası alanda vakuolize alanlar gözlendi. Yavaş dondurma grubunda damar yapılarında endotel hücreleri arasındaki bağlantıların korunduğu alanlar izlenirken hızlı dondurmada bütünlüğün bozulduğu, endotel hücrelerinde vakuolizasyonun artışı tespit edildi.

Keras ve ark. 2009 yılında insan ovaryum dokusunda yavaş dondurma ve hızlı dondurma tekniklerini karşılaştırmış; yavaş dondurma grubunda PrOH (propanodiol) ve EG (etilen glikol) kriyoprotektanlarını, hızlı dondurma grubunda

ise kriyoprotektan içerisinde farklı sürelerde bekleterek doku üzerine etkisini göstermişlerdir. Buna ilaveten dokuları çözdükten sonra kültüre ederek, folikül gelişimlerini izlemişlerdir. Işık mikroskopisinde bizim de çalışmamızda yaptığımız gibi sağlam ve atretik folikülleri saymışlardır. Stromada hasarsız ve piknotik çekirdeği olan hasarlı hücreleri sayarak istatistiksel olarak değerlendirmişlerdir. TEM de ovosit, granüloza hücreleri, intertisyel hücreleri incelemişlerdir. Sonuçta vitrifikasyon grubunda sağlam folikül oranlarını diğer gruplara göre yüksek bulmuşlardır. Elektron mikroskopisinde interstisyel hücrelerin korunduğunu göstermişlerdir. Biz ise çalışmamızda TEM bulgularımızda stromal hücrelerde harabiyet ve vakuolizasyon gösterdik. Vitrifikasyon grubumuz anlamlı olarak yavaş dondurma grubundan daha dejenere bulundu. Bunda vitrifikasyonda kullandıkları iki tip kriyoprotektanın, doku korunumu üzerinde yararlı bir sonuç ortaya çıkarmış olabileceği düşünüldü. Biz de çalışmamızın devamında bu değişkenlerin etkilerini göstermeyi hedefliyoruz.

Vitrifikasyonun daha iyi sonuçlar verdiğini gösteren Keras ve ark. nın aksine aynı yıl Isachenko ve ark. yaptıkları bir araştırmada yavaş dondurmanın, hızlı dondurmaya göre dokuyu daha iyi koruduğunu; morfolojik, endokrinolojik ve moleküler biyolojik değerlendirmelerle göstermişlerdir (*Isachenko ve ark., 2009*). Onların bu çalışması bizim bulgularımızı daha çok desteklemektedir. Biz de bu çalışmanın devamında dondurulup çözülen ovaryum dokusunu kültüre ederek, dondurma sonrası folikül canlılığını değerlendirmeyi ve dokunun endokrinolojik olarak dondurma sonrası fonksiyonunu devam ettirdiğini ise biyokimyasal parametrelerle ortaya koymayı planlıyoruz.

Ovaryum doku kriyoprezervasyonu, özellikle kanser hastalarında ovosit ve embriyon kriyoprezervasyonu ile karşılaştırıldığında birçok avantaja sahiptir (Nawroth ve ark., 2005). İlk olarak, ovaryumdaki tüm foliküllerin %70-90 ını oluşturan primordiyal foliküller dondurma ve çözme hasarına karşı daha dayanıklıdır. Küçük olması, düşük metabolik aktivite, zona pellusida ve periferik kortikal granüllerin yokluğu gibi karakteristik özellikler primordiyal foliküllerdeki bu toleransın nedenleridir. İkinci olarak, ovaryum dokusu menstrüel siklus ve kanser terapisinin gecikmesinden bağımsız olarak herhangi bir zamanda alınabilir. Son

olarak, ovaryum dokusunun dondurulması ile ovaryumun endokrin fonksiyonu korunabilir. Bu durum, ovosit ve embriyon dondurulması ile sağlanamaz. Ayrıca bu yöntem prepubertal kızlar için de uygundur (Huang ve ark., 2008).

6. SONUÇLAR

Ovaryum korunmasının ince yapı düzeyinde incelendiği çalışmamızda kontrol grubuyla deney gruplarının karşılaştırılmasında kontrole kıyasla diğer gruplardaki ince yapının bozulduğu görülmüştür. Soğuk, kullanılan kriyoprotektanların ozmolaritesi ve bunun gibi stresin dokudaki bütünlüğü bozduğu ve organellerde özellikle mitokondriyonda değişikliğe neden olduğu aşıkardır. Diğer büyük reaksiyon; hücreler arası bağlantıların kopması ve hücrelerin dejenerasyona gidişidir ancak bütün bu reaktif hasara rağmen korunmuş bağlantılar ve organel yapısının varlığı yavaş dondurmada daha fazla olmak üzere bu hasarın geri dönüşümlü olabileceğini düşündürmektedir. İstatistiksel olarak da desteklediğimizde özellikle yavaş dondurmada primordiyal ve primer foliküllerin daha iyi korunduğu gösterilmiştir. Bunun yanında hızlı dondurmada da bu folikül grubu daha az sayıda da olsa başarıyla korunmaktadır. Bu folikül grubunun özellikle incelenmesi klinikte transplante edilen ovaryumdan elde edilecek ovositlerin kaynağının özellikle bu foliküller olmasıdır. Hızlı dondurma, daha ucuz ve kolay yöntemi ile bu folikül grubunun korunmasında avantaj sağlayabilir ancak yavaş dondurmanın dokuyu daha iyi koruduğu gerçeği göz ardı edilmemelidir.

ÖZET

Ovaryum Dokusunun, Vitrifikasyon ve Yavaş Soğutma Teknikleriyle Korunurluğunun Histopatolojik Yönden Karşılaştırılması

Kadın hastalarda erken ovaryum yetmezliği ve infertilite kanser tedavisi yada başka nedenlerle ortaya çıkabilir. Bu hastalarda fertilitiyi korumak için ovosit, embriyo ve ovaryum dokusu saklanması yöntemleri kullanılabilir. Ovaryum doku kriyoprezervasyonu, tedavisini geciktiremeyecek hastalar, prepubertal kız çocukları ve partneri olmayan kadınlarda uygulanabilir tek yöntemdir ve iki teknikle uygulanmaktadır; yavaş dondurma (slow freezing) ve hızlı dondurma (vitrifikasyon). Günümüzde, bu teknikler yeterli veri olmaması nedeniyle standart bir tedavi seçeneği olarak hastalara sunulmamaktadır.

Bu çalışmada, fare ovaryum dokuları yavaş dondurma ve hızlı dondurma teknikleriyle kriyoprezerve edilerek saklandı. Çözülen dokulardaki hasarın ışık, konfokal ve elektron mikroskopunda incelenerek kontrol grubuyla karşılaştırılması ve histolojik yöntemlerle değerlendirilmesi amaçlandı.

Üç grupta foliküller ışık mikroskopunda sayılarak istatistiksel olarak birbirleriyle karşılaştırıldığında; primordiyal ve primer foliküllerin yavaş dondurmada hızlı dondurmaya göre daha çok korunduğunu ortaya koyduk. Konfokal mikroskopta TUNEL boyama ile dokularda apoptozisin varlığı gösterildi. Elektron mikroskopisinde dokularda normal foliküllerde sağlam ovosit çekirdeği, mitokondriyon başta olmak üzere membranlı organellerin zarlarında korunma, granüloza hücresinin bağlantılarında süreklilik, düzenli ZP gözlemlendi. Atretik foliküllerde ise ovosit sitoplazmasında şişmiş mitokondriyonlar, ZP'de kondansasyon, granüloza hücre bağlantılarında kopukluklar, granüloza hücre sitoplazmasında boş alanlar, hücreler arası alanda boş alanlar gözlemlendi.

Sonuç olarak, yavaş dondurma tekniğinde hızlı dondurmaya göre doku korunumunun daha fazla olduğu tespit edildi.

Anahtar sözcükler: Kriyoprezervasyon, ovaryum, yavaş dondurma, hızlı dondurma, ince yapı.

SUMMARY

Compare preservation of vitrified and slow freezed ovarium tissue

Cancer therapy and the other reasons can often induce premature ovarian failure and infertility. Oocyte, embryo and ovarian tissue freezing are developed options for fertility preservation. Ovarian tissue cryopreservation is essential in patients whose care can't be delayed, in prepubertal girls, women without a partner and have been applied in two techniques. There are two main ways of cryopreserving biologic tissue: either classic "slow" freezing or vitrification by rapid cooling. Cause of insufficient researches, this way can not offer patient. Currently, these techniques haven't been offered to patients since there hasn't been enough data.

In this study, mouse ovarium tissues have been preserved by vitrification and slow freezing. We examine tissue with light microscopy, electron microscopy and confocal microscopy to compare them with the control group and we aimed to evaluate them with histologic methods.

We analyzed sections in light microscopy and counted the number of the follicles. Primordial and primary follicles have been preserved better in slow freezing technique than in vitrification. Apoptosis is indicated in confocal microscopy with TUNEL method. Under the electron microscope, undamaged oocyte nucleus and organelles, stable junctions of granulosa cells, regular Zona pellusida have been observed in normal follicles. Swelled mitochondria in oocyte cytoplasm, condensation in ZP, breakage in junction of granulosa cell, space in cytoplasm of granulosa cell, vacuolization in extracellular space have been observed in atretic follicles.

In conclusion, We found that slow freezing is more favorable than vitrification for ovarian tissue freezing.

Key words: Cryopreservation, ovary, vitrification, slow freezing, ultrastructure.

KAYNAKLAR

- Aerts J., Clerq J., Andries S., Leory J., Aelst S., Bols P. (2008). Follicle survival and growth to antral stages in short-term murine ovarian cortical transplants after Cryologic solid surface vitrification or slow-rate freezing. *Cryobiology* 57:163-169.
- Almodin C.G., Minguetti-Camara V.C., Meister H., Ferreira J.O., Franco R.L., Cavalcante A.A. (2004). Recovery of fertility after grafting of cryopreserved germinative tissue in female rabbits following radiotherapy. *Hum Reprod* 19:1287-93.
- Blatt J. (1999). Pregnancy outcome in long-term survivors of childhood cancer. *Med Pediatr Oncol* 33:29-33.
- Carlson MB. (2009). *Human Embryology and Developmental Biology*. 4th edition Mosby Elsevier. pp: 403-437.
- Combani A., Martinez B., Dolmans M., Amorim C.A., Nottola S., Donnez J., Langendonck A.V. (2008). Preservation of fertility in young cancer patient: contribution of transmission electron microscopy. *Biomedicine online* 17(1):136-150.
- Demeestere I., Simon P., Buxant F., Robin V., Fernandez S.A., Center J. (2006). Ovarian function and spontaneous pregnancy after combined heterotopic and orthotopic cryopreserved ovarian tissue transplantation in a patient previously treated with bone marrow transplantation: Case report. *Hum Reprod* 21:2010-4.
- Donnez J., Dolmans M.M., Demylle D., Jadoul P., Pirard C., Squifflet J. (2004). Live birth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet* 364:1405-10.
- Fuller B., Paynter S. (2004). Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. *Reprod Biomed Online* 9:680-691

- Gosden R.G., Baird D.T., Wade J.C., Webb R. (1994). Restoration of fertility to oophorectomised sheep by ovarian autographs stored at -196°C . *Hum Reprod* 9:597-603.
- Hovatta O., Silye R., Krausz T., Abir R., Mangara R., Trew G. (1996). Cryopreservation of human ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol-sucrose as cryoprotectants. *Hum Reprod* 11:1268-72.
- Hovatta O., Silye R., Krausz T., Winston R.M. (1997). Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum Reprod* 12:1032-6.
- Hovatta O., Wright C., Krausz T., Hardy K., Winston R.M. (1999). Human primordial, primary and secondary ovarian ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Hum Reprod* 14:2519-2524.
- Hovatto O. (2003). Cryobiology of ovarian and testicular tissue. *Clin Obstet Gynecol* 17:331-42.
- Huang J.Y., Tulandi T., Holzer, Lau N.M., MacDonald S., Tan S.L. (2008). Cryopreservation of ovarian tissue and in vitro matured oocytes in a female with mosaic Turner sendrom: Case report. *Hum Reprod* 23:336-9.
- Huang L., Mo Y., Wang W., Li Y., Zhang Q., Yang D. (2008). Cryopreservation of human ovarian tissue by solid-surface vitrification. *J. Reprod Biol.* 139:193-198.
- Isachenko V, Lapidus I, Isachenko E, Krivokharchenko A, Woriedh M, Bader M, Weiss M. J. (2009) Human ovarian tissue vitrifikation versus conventional freezing: morphological, and molecular biological evaluation. *Reproduction and Fertility.* 138: 319-327.
- Junqueira LC., Carneiro J. (2009). (ed. Aytakin Y., Solakoğlu) *Temel histoloji text and atlas*. Nobel tip kitap evleri. s: 449-469.
- Keros V., Xella S, Hultenby K, Pettersson K, Sheikhi M, Volpe A, Hreinsson J, Hovatta O.(2009) Vitrification versus controlled-rate freezing in cryopreservation of human ovarian tissue. 24: 1670- 1683.

- Kierszenbaum A.L. (2006). (ed. Demir R.), *Histoloji ve Hücre Biyolojisi*. Palme yayıncılık, s:565-584.
- Kim S.S., Battaglia D.E., Soules M.R. (2001). The future of human ovarian cryopreservation and transplantation: Fertility and beyond. *Fertil Steril* 75: 1049-56.
- Kim S.S., Yang H.W., Kang H.G., Lee H.C., Ko D.S., Gosden R.G. (2004) Quantitative assesment of ischemic tissue damage in ovarian cortical tissue with or without antioxidant (ascorbic acid) treatment. *Fertil Steril* 82:679-685.
- Kim S.S. (2006). Fertility Preservation in female cancer patient: Current developments and future directions. *Fertil Steril* 85:1-11.
- Krajian A.A., Gradwohl R.B.H. (1952). Tecnic for small pieces of tissue, skin etc., using Bouin's solution as fixative, in histopatological tecnic second ed. *Louis the CV Mosby company* 101-102.
- Leide A., Narod S.A. (2002). Hereditary breast and ovarian cancer in Asia: Genetic epidemiology of BRCA1 and BRCA2. *Hum Mutat* 20:413-24.
- Liu J., Van Der Elst J., Van Den Broecke R., Dumortier F., Dhont M. (2000). Maturation of mouse primordial follicles by combination of grafting and in vitro culture. *Biol Reprod* 62:1218-1223
- Meirow D., Nugent D. (2001). The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum Reprod Update*;7:535-43.
- Meirow D., Levron J., Eldar-Geva T., Hardan I., Fridman E., Zalel Y. (2005). Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy. *N Engl J Med* 353:318-21.
- Moore L.K, Persaud T.V.N. (ed. Dalçık H., Yıldırım M). *Klinik Yönleriyle İnsan Embriyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri.
- Newton H., Aubard Y., Rutherford A., Sharma V., Gosden R. (1997). Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Hum Reprod* 12:1032-6.

- Okday K., Karilkaya G. (2000). Ovarian function after transplantation of frozen banked autologous ovarian tissue. *N Eng J Med*;342:1919.
- Okday K., Economos K., Kan M., Rucinski J., Veeck L., Rosenwaks Z. (2001). Endocrine function and oocyte retrieval after autologous transplantation of ovarian cortical strips to the fore arm. *JAMA* 286:1490-3.
- Okday K., Buyuk E., Veeck L., Zaninovic N., Xu K., Takeuchi T. (2004). Embryo development after heterotropic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *Lancet*;363:837-40.
- Okday K., Sönmezer M. (2004). Ovarian tissue banking for cancer patients: Fertility preservation, not just ovarian cryopreservation. *Hum Reprod* 19:477-80.
- Parrot D.M. (1960). The fertility of mice with orthotopic ovarian grafts derived from frozen tissue. *J. Reprod Fertil* 1:230-41.
- Partridge AH., Gelber S., Peppercorn J., Sampson E., Knudsen K., Laufer M. (2004). Web-based survey of fertility issues in young women with breast cancer. *J. Clin Oncol* 22:4174-83.
- Perrotin F., Marret H., Bouquin R., Fischer-Perrotin N., Lansac J., Body G. (2001). Incidence, diagnosis and prognosis of ovarian metastasis in breast carcinoma. *Gynecol Obstet Fertil* 29:308-15.
- Poirot C., Vacher-Levanu M., Helardot P., Guibert J., Brugieres L., Jouannet P. (2002). Human ovarian tissue cryopreservation: Indications and feasibility. *Hum. Reprod* 17:1447-52.
- Prasath E.B. (2008). Ovarian tissue cryopreservation: an update. *J. Hum. Reprod* 2: 50-55.
- Prasath E.B., Cherly L.J., Loh S.F., Tay E.H. (2008). Embros obtained from in vitro matured oocytes retrieved from cancerous ovary after oophorectomy. Abstract. *Controversies In Obstetrics, Gynecology and Infertility*, Paris.
- Rahimi G., Isachenko V., Todorov P., Tawadros S., Mallmann P., Nawaroth F., Isachenko E. (2009). Apoptosis in human ovarian tissue after conventional freezing or vitrification and xenotranplantation. *Cryo Letter* 30(4):300-9.

- Revel A., Safron A., Benschushan A., Shushan A., Laufer N., Simon A. (2004). In vitro maturation and fertilization oocytes from an intact ovary of surgically treated patient with endometrial carcinoma: A case report. *Hum Reprod*; 19: 1608-11.
- Ross M.H, Pawlina W. (2006). *Histology A Text And Atlas with Corralated Cell and Molecular Biology*. 5Th edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp: 772- 834.
- Sandler T.W. (2005). *Langman Medikal Embriyoloji*. 9. Baskı, Palme yayıncılık.s: 313-355.
- Silber S.J., Lenahan K.M., Levine D.J., Pineda J.A., Kim S.G., Friez M.J. (2005). Ovarian transplantation between monozygotic twins discordant for premature ovarian failure. *N Engl J Med* 353:58-63.
- Silber S.J., Gosden R.G. (2007). Ovarian transplantation in a series of monozygotic twins discordant for ovarian failure. *N Engl J Med* 356:1382-4.
- The practice committee of ASMR and SART. (2008). Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril* 90:241-6.
- Tulanti T., Al-Took S. (1998). Laparoscopic ovarian suspension before irradiation. *Fertil Steril* 70:381-3.
- Wang X., Chen H., Yin H., Kim S.S., Tan S.L., Gosden R.G. (2002). Fertility after intact ovary transplantation. *Nature* 415:385.

EKLER


Ek-1: Etik Kurul Onayı

ANKARA ÜNİVERSİTESİ HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU KARAR ÖRNEĞİ

TOPLANTI TARİHİ :11/02/2009
TOPLANTI NO :2009-36
DOSYA NO :2009-122
KARAR NO :2009-36-166

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof.Dr.Esra Atabenli Erdemli'nin araştırma yürütücüsü olduğu ve Yrd.Doç.Dr.Sibel Kılıçoğlu'nun, Uzm.Dr.Sinan Özkavukçu'nun ve Dr.Ferda Topal'ın ortak çalışmaları olan "Ovaryum dokusunun, vitrifikasyon ve yavaş soğutma teknikleriyle (kriyoprezervasyon) korunulurluğunun histopatolojik yönden karşılaştırılması" başlıklı çalışmaları Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunda incelenmiş, yapılan inceleme sonucunda çalışma Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine göre uygun bulunarak onaylanmasına, katılan üyelerin oy birliği ile karar verilmiştir.

ASLININ AYNIDIR
11/02/2009


Prof.Dr.Hakan YARDIMCI
Ankara Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel
Etik Kurulu Başkanı