

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİDE BAĞLI OVARYAN
TOKSİSİTEDE YAĞ DOKUDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİN PTEN/AKT/FOXO3A YOLAĞINA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZEN ÖNAL

DANIŞMAN

PROF. DR. GÜLÇİN METE

DENİZLİ-2018

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİDE BAĞLI OVARYAN
TOKSİSİTEDE YAĞ DOKUDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİN PTEN/AKT/FOXO3A YOLAĞINA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZEN ÖNAL

DANIŞMAN

PROF. DR. GÜLÇİN METE

DENİZLİ-2018

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
HİSTOLOJİ VE EMBRİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİDE BAĞLI OVARYAN
TOKSİSİTEDE YAĞ DOKUDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL
KÖK HÜCRELERİN PTEN/AKT/FOXO3A YOLAĞINA ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ

DR. ÖZEN ÖNAL

DANIŞMAN

PROF. DR. GÜLÇİN METE

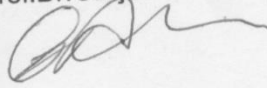
Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi'nin 31.03.2017 tarih ve
293201719 nolu kararı ile desteklenmiştir.

DENİZLİ-2018

Prof. Dr. Gülçin METE danışmanlığında Dr. Özen ÖNAL tarafından yapılan "Sıçanlarda siklofosfamide bağlı ovaryan toksisitede yağ dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin Pten/Akt/Foxo3a yolağına etkisi" başlıklı tez çalışması 14/03/2018 tarihinde yapılan tez savunma sınavı sonrası yapılan değerlendirme sonucu jürimiz tarafından Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

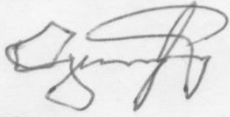
BAŞKAN

Prof.Dr.Gülçin METE



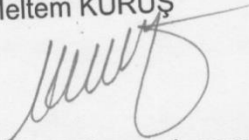
ÜYE

Prof.Dr.Emin Oğuzhan OĞUZ



ÜYE

Prof.Dr.Meltem KURUŞ

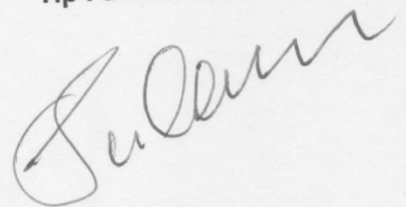


Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylım.

14/03/2018

Prof. Dr. Semin Melahat FENKİ
Dekan V.
Pamukkale Üniversitesi

Tıp Fakültesi Dekanı



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca ve tezimin her aşamasında yardımlarını benden esirgemeyen tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakóltesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilimdalı Başkanı Prof.Dr.Gölçin METE hocama sonsuz saygı ve teŐekkürlerimi sunarım.

Eđitimime olan katkılarından dolayı Prof.Dr. E. Oğuzhan OĞUZ hocama ve tezimin başvuru ve deney aŐamalarında bana yardımcı olan Dr.Öğr.Ü.Nazlı ÇİL, ArŐ.Gör.Semih TAN ve Dr.Öğr.Ü.Onur TOKGÜN'e, ayrıca bölümümüzde çalıŐan emeği geçen tüm arkadaşlarıma ve destekleriyle her zaman yanımda olan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	IV
TABLolar DİZİNİ	IX
ŞEKİLLER DİZİNİ	X
ÖZET	XII
İNGİLİZCE ÖZET	XIV
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	4
Ovaryumların Yapısı.....	4
Ovaryumların Gelişimi.....	4
Ovaryum Fonksiyonu.....	5
Ovulasyon.....	7
Korpus Luteum.....	8
Menstrual Döngü.....	8
Over Reservi.....	9
Kemoterapi ve Radyoterapinin Gonadal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi.....	10
Prematür Ovaryan Yetmezlik.....	11
Fertilite Koruyucu Yöntemler.....	12
Kök Hücre Tedavisi.....	13
Kök Hücreler.....	13
Kök Hücrelerin Genel Özellikleri.....	14
Kök Hücrelerin Karakterizasyonu ve Farklılaşması.....	16

Kök Hücre Çeşitleri-Kaynakları.....	16
Kök Hücrelerin Kullanım Alanları.....	17
PTEN/AKT/FOXO3a Sinyal Yolağı.....	18
GEREÇ VE YÖNTEM	20
Sıçanlarda Siklofosfamidle Deneysel Ovarian Toksisitenin Oluşturulması.....	20
Siklofosfamid+Yağ Dokudan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücre Verilen Grup.....	20
Mezenkimal Kök Hücre Eldesi.....	20
Farklılaşma Deneyleri.....	24
Mezenkimal Kök Hücrelerin Sıçan Ovaryumlarına Enjeksiyonu.....	27
Deneyin Sonlandırılması.....	27
Doku Takip Yöntemi.....	28
Hematoksilen-Eozin Boyama Protokolü.....	28
İmmunohistokimyasal Boyama Protokolü.....	29
Western Blot Yöntemi.....	30
Folikül Sayımı Yöntemi.....	31
Verilerin Değerlendirilmesi.....	31
BULGULAR	32
Hematoksilen-Eozin Boyama Sonuçları.....	32
Folikül Sayımı.....	33
İmmunohistokimyasal Bulgular.....	34
Western Blot Bulguları.....	41
TARTIŞMA	42
Kök Hücreler ve POY.....	49

MikroRNA'lar ve POY.....	50
POY ve İn Vitro Aktivasyon (IVA) Yöntemi.....	52
SONUÇ.....	54
KAYNAKLAR.....	55

SİMGE VE KISALTMALAR

Gram:gr

Kontrol:K

Mililitre:ml

Siklofosfamid:Ctx

Mezenkimal Kök Hücre:KH

Prematür Ovaryan Yetmezlik:POY

Adipoz Dokudan Elde edilen Mesenkimal Kök Hücre:ADMKH

TABLULAR DİZİNİ

Tablo no	Sayfa no
Tablo 1: Western Blot Analizi.....	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
Şekil 1: Menstruel Döngü Boyunca Meydana Gelen Değişiklikler.....	9
Şekil 2: Yaşla Azalan Over Rezervi.....	10
Şekil 3: Siklofosfamid, Ovaryum Folikülleri ve PTEN/AKT/FOXO3a Yolağı.....	19
Şekil 4: Mezenkimal Kök Hücrelerimizin 1.,2.,3. ve İlerleyen Günlerdeki Görüntüleri.....	21
Şekil 5: Mezenkimal Kök Hücrelerin Flow Sitometri Sonuçları.....	23
Şekil 6: Mezenkimal Kök Hücrelerin Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Farklanması.....	24
Şekil 7: Mezenkimal Kök Hücrelerin Ovaryum Enjeksiyonu.....	27
Şekil 8: Kontrol grubu ovarium dokusu, Hematoksilen Eozin boyama.....	32
Şekil 9: CTX uygulanan grupta ovarium dokusu, Hematoksilen Eozin boyama.....	32
Şekil 10: CTX+ Mezenkimal Kök Hücre uygulanan grupta ovarium dokusu Hematoksilen Eozin boyama.....	33
Şekil 11: Folikül Sayımı Sonuçları.....	34
Şekil 12: Ovaryum Dokusunda PTEN Ekspresyonu.....	35
Şekil 13: Ovaryum Dokusunda pPTEN Ekspresyonu.....	36
Şekil 14: Ovaryum Dokusunda FOXO3a Ekspresyonu.....	37
Şekil 15: Ovaryum Dokusunda pFOXO3a Ekspresyonu.....	38
Şekil 16: Ovaryum Dokusunda AKT Ekspresyonu.....	39
Şekil 17: Ovaryum Dokusunda pAKT Ekspresyonu.....	40

Şekil 18:Sisplatin ve Melatoninin Oositte PTEN/AKT/FOXO3a sinyal yolağı

üzerine etkisi.....44

ÖZET

SIÇANLARDA SİKLOFOSFAMİDE BAĞLI OVARYAN TOKSİSİTEDE YAĞ DOKUDAN ELDE EDİLEN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN PTEN/AKT/FOXO3A YOLAĞINA ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

Dr.Özen ÖNAL

GİRİŞ:Günümüzde birçok kanserin tedavisinde kemoterapi ve radyoterapinin yaygın olarak kullanılmaya başlanması ile kanser hastalarının 5 yıllık yaşam süresi artmıştır. Ancak uygulanan bu tedavilerin toksik etkileri yüzünden hastalar tedavi sonrasında bazı tıbbi sorunlar ile karşı karşıya kalmakta ve yaşam kaliteleri düşmektedir. Önemli bir konu da bu tedavilerin uygulandığı genç hastalarda üremeyi korumaya yönelik işlemlerdir. Alkilleyici grubu kemoterapotiklerden olan Siklofosfamid pekçok kanserin tedavisinde yaygın olarak kullanılmakta ve genital organlar üzerine olan toksik etkileri yüzünden infertiliteye neden olmaktadır. Siklofosfamid (CTX) kullanımı ile ovaryum rezervini temsil eden primordiyal foliküllerin kitlesel kaybı olur ve böylece prematür ovaryan yetmezlik gelişir. Daha önce yapılan çalışmalarda PTEN/AKT/FOXO3a yolağının primordiyal foliküllerin gelişimi ve hayatta kalımı ile ilişkili olduğu belirtilmiştir. Ayrıca Siklofosfamidin bu sinyal yolağı üzerinden primordiyal foliküllerin aktiflenmesine yol açarak ovaryum rezervinin yok olmasına neden olduğu bilinmektedir. Biz bu çalışmada siklofosfamidin ovaryuma olan toksik etkisine karşı mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici etkisini ve PTEN/AKT/FOXO3a yolağı üzerine olan rolünü araştırmayı amaçladık.

GEREÇ-YÖNTEM:Bu çalışmada, toplam 18 adet, 8 haftalık, 150±15 gram ağırlığında Wistar Albino cinsi dişi sıçan üzerinde çalışıldı. Sıçanlar rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı. Grup1: Siklofosfamid grubu (CTX,n=6), Grup 2: Siklofosfamid+Mezenkimal Kök Hücre grubu (CTX+KH, n=6) Grup 3: Kontrol grubu (K, n=6) olarak 3 grup oluşturuldu. Grup 1 ve Grup 2' ye ilk gün 50 mg/kg siklofosfamid intraperitoneal verildi ve aynı gruplara takip eden 13 gün boyunca günlük 8mg/kg siklofosfamid enjekte edildi. Daha sonra sadece Grup 2'ye siklofosfamid enjeksiyonunun son gününden 2 gün sonra yağ dokudan elde ettiğimiz

mezenkimal kök hücreleri (Herbir overe 50.000 mezenkimal kök hücreyi 0.05ml FBS içerisinde) cerrahi yöntemle direk sıçanların her iki ovaryumuna enjekte edildi.

Kök hücre enjeksiyonundan 8 hafta sonra tüm sıçanların ovaryumlarını çıkarılarak rutin ışık mikroskop takibi yapıldı. Parafin bloklardan 3 µm luk kesitler alınarak Hematoksilen&Eozin ile boyandı. PTEN, pPTEN, AKT, pAKT, FOXO3a ve pFOXO3a ekspresyonları İmmunohistokimyasal ve Western blot yöntemiyle incelendi.

BULGULAR: Siklofosfamidin ovaryum dokusunu hasara uğrattığı ve normal yapılı follikül sayısının azalttığı gözlemlenmiştir. CTX+ Kök hücre verilen grupta Siklofosfamidin neden olduğu hasarın engellediğini izlendi. Aynı zamanda CTX+kök hücre grubunda pAKT ve pFOXO3a ekspresyonlarının kuvvetli pozitif olduğunu belirlendi. Follikül sayımı sonucunda primordial folliküller en az grup 1 (CTX) ve grup2' de (CTX+KH grubu) ($p=0,936$) bulunurken sekonder ve tersiyer folliküller grup 1' e (CTX grubu) karşın grup 2' de (CTX+KH grubu) oldukça fazla sayıda olduğu belirlendi ($p=0,007$, $p=0,002$).

TARTIŞMA ve SONUÇ: Siklofosfomid PTEN/AKT/FOXO3a yolağına etki etmemekte ancak ovaryumda ciddi hasara neden olmaktadır. Kök hücre uygulaması ise bu hasarı azaltmakta aynı zamanda pAKT ve pFOXO3a ekspresyonunu aktifleyerek primordial follikülün primere farklanmasına neden olmaktadır. Kök hücre uygulaması primordial follikül havuzu negatif etkilemekle birlikte ovulasyona giden sağlıklı antral follikül sayısını arttırmaktadır.

Anahtar kelimeler: Siklofosfamid, Prematür Ovaryan Yetmezlik, PTEN/AKT/FOXO3a, Mezenkimal Kök Hücreler

ABSTRACT

THE EFFECT OF ADIPOSE TISSUE DERIVED MESENCHYMAL STEM CELLS ON PTEN/AKT/FOXO3A SIGNALING PATHWAY CYCLOPHOSPHAMIDE INDUCED OVARIAN TOXICIDES IN RATS.

Dr.Özen ÖNAL

INTRODUCTION: Today, the widespread use of chemotherapy and radiotherapy in the treatment of many cancers has increased the life span of cancer patients for 5 years but due to the toxic effects of these treatments, the patients are faced with some medical problems and their quality of life decreases. An important issue is the protection of young patients's fertility in the treatment of these diseases. Cyclophosphamide, an alkylating group of chemotherapeutics, is widely used in the treatment of many cancers and causes infertility due to toxic effects on the genital organs. The use of cyclophosphamide results in the massive loss of primordial follicles that represent the ovarian reserve, therefore ovarian toxicity and premature ovarian failure develop. Previous studies have suggested that the PTEN / Akt/ Foxo3a pathway is associated with the development and survival of primordial follicles. It is also known that cyclophosphamide leads to the activation of primordial follicles via this signal pathway, thus destroying the ovarium reserve. In this study, we aimed to investigate the restorative effect of mesenchymal stem cells against the toxic effect of cyclophosphamide on the ovary and its effect on the PTEN / AKT / FOXO3a pathway.

MATERIAL-METHOD: In the study, a total of 18, 8 weekly, Wistar Albino female rats weighing 150 ± 15 grams were studied. Rats were randomly selected and divided into 3 groups. These groups were formed: Group 1: Cyclophosphamide group (6 rats), Group 2: Cyclophosphamide + Mesenchymal stem cell, Group 3: Control group (6 rats). Group 1 and Group 2 were injected intraperitoneally with 50 mg / kg Cyclophosphamide on the first day and 8 mg / kg Cyclophosphamide was injected daily for the following 13 days in the same groups. 15 days after the first day of cyclophosphamide injection, we injected adipose tissue derived mesenchymal stem cells (50,000 mesenchymal stem cells in 0.05ml FBS per ovary) in Group 3 directly

into both ovaries of the rats directly by surgical procedure. After 8 weeks from the injection, we removed the ovaries of the rats and sacrificed all the rats. Histologic sections of the ovaries were Hematoxylin&Eosin stained. In addition, PTEN, pPTEN, AKT, PAKT, FOXO3a and pFOXO3a antibodies were studied by immunohistochemistry and western blot methods.

RESULTS: Cyclophosphamide was cause deterioration of integrity destroys the ovarian tissue and reduces the number of normal follicles. We observed that damage caused by cyclophosphamide was inhibited the in the CTX + stem cell given group. We also found that the expressions of pAKT and pFOXO3a in the CTX + stem cell group were strongly positive. The mean primordial follicle count was lowest in Group 1 (ctx group) and group 2 (ctx+ mesenchymal stem cell) and the mean primordial follicle counts were higher in Groups 3 (control group) than in Group 1, 2. But secondary and tersiyer follicle higher in group 2 and 3 than group1 (p=0,007, p=0,002 sırasıyla)

DISCUSSION and CONCLUSION: CTX did not effect on PTEN / AKT / FOXO3a pathway but causes degeneration in the ovarium. In the case of stem cell application, reducing this damage also activates the expression of pAKT and pFOXA3a leading to primordial follicle differentiation in primaries. Stem cell application is to increase the number of antral follicles in the health to the ovulation while affecting the primordial follicle pool negatively.

Key Words: Cyclophosphamide, Premature Ovarian Insufficiency, PTEN / AKT / FOXO3a, Stem Cells

GİRİŞ

Günümüzde kanserler kalp damar hastalıklarından sonra en sık ölüm sebebidir (1). Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu kanser biyolojisi ve genetiğinin daha iyi anlaşılmasıyla ve çok ajanlı sitotoksik kemoterapi ve radyoterapi formlarının tedaviye girmesiyle birçok kanser tedavi edilebilir hale gelmiş ve 5 yıllık sağkalım oranları tüm kanser türlerinde artmıştır (2,3). Bunun sonucunda hayatta kalan kanser hastalarının yaşam kalitesi ile ilgili konular önem kazanmıştır. Bunlardan bir tanesi de üremeyi koruyucu işlemlerdir (2,4).

Ne yazık ki her yıl üreme çağında binlerce kadın kanser tedavisi için sitotoksik kemoterapi ve radyoterapi formlarına maruz kalmaktadır. Bu tedavilerin en önemli yan etkilerinden biri de ovaryum dokusu üzerine olan gonadotoksik etkileriyle prematür (erken) ovaryan yetmezlik (POY) geliştirmeleridir (2-5). Ovaryumlar sitotoksik ajanlara (özellikle de alkilleyici tipte olanlara) oldukça duyarlıdır ve bu ilaçların kullanımı ile gonadal toksisite oluşması muhtemeldir (2,6-12).

Kemoterapi ilaçları, etki mekanizmaları ve kaynakları göz önünde tutularak 6 gruba ayrılırlar. Bunlardan Alkilleyici grup ilaçlar modern kanser kemoterapisi alanında ilk olmanın yanı sıra en sık kullanılan kemoterapotiklerin başında gelmektedirler. Bu gruptaki ilaçlar DNA' da alkillenme yaparak hücrelerde replikasyon ve transkripsiyonu bozar (13).

Siklofosfamid (CTX), Alkilleyici grup ilaçların Azotlu hardallar (biskloretilaminler) alt grubunun üyesidir (13). Siklofosfamid, 50 yılı aşkın süredir kullanılmakta ve hala birçok kanserin tedavisinde primer ilaçlardan olmayı sürdürmektedir (14,15). Hem hematolojik hem de solid tümörlerin tedavisinde başarılı bulunmuştur. Hodgkin Dışı Lenfomalar, Akut ve Kronik Lenfositik Lösemi, Küçük Hücreli Akciğer Kanseri, Hodgkin hastalığı, pediatrik solid tümörler, meme, over, testis, endometriyum, serviks, baş-boyun kanserleri, yumuşak doku sarkomları, multipl myeloma ve koriokarsinoma tedavisinde kullanılmaktadır (13,16). Siklofosfamid ayrıca güçlü immünsüpresif ve immünmodülatör (17-19) etkinliği nedeniyle Romatoid Artrit, Behçet hastalığı, Nefrotik sendrom ve bazı otoimmün hastalıkların tedavisinde de kullanılır (13).

Kemoterapiye maruz kalan premenopozal kadınlar için çözülemeyen önemli bir sorun, yenilenemeyen ovaryum primordial folliküllerinin kaybedilmesine bağlı gelişen infertilitedir (20). Kanser hastası kadınlarda kemoterapi ve radyoterapi ovaryumda

over rezervini temsil eden primordial folliküllerin erken ve kitlesel kaybına yol açarak amenore ve Prematür Ovaryan Yetmezlik (POY) oluşmasına yol açmaktadır (8-12,21). POY fertilitenin azalmasına ve 40 yaşın altındaki kadınlarda hipergonadotropik hipogonadizm ve amenoreye neden olmaktadır. CTX ile indüklenen POY klinik olarak geri döndürümsüz niteliktedir. CTX ile tedavinin sonunda genç kadınlarda amenore insidansı % 84'tür ve sonunda hastaların yarısında POY gelişir (22). Ovaryum primordiyal foliküllerin çoğunluğu, dişi üreme ömrü boyunca gametlerin düzenli olarak üretimini sağlamak için durgun durumda korunmalıdır. Bununla birlikte, primordial foliküllerin uzun süre sessiz (uykuda) kalmasını sağlayan moleküler mekanizma tam olarak anlaşılamamıştır. Belli patolojik koşullar altında, primordiyal foliküllerin tüm havuzu aynı anda olgunlaşır ve primordial foliküllerin hızla kaybedilmesine ve prematür over yetmezliğine (POY) neden olur. Primordiyal foliküllerin uykuda kalmasının ve aktivasyonunun altında yatan moleküler mekanizmalar son yıllarda açıklığa kavuşmaya başlamıştır (23,24). Önceki bazı çalışmalar, kemoterapinin sessiz primordial foliküllerin apoptozunu tetiklediğini ve POY'e ve infertiliteye neden olduğunu bildirmektedirler (25,26). Ancak, Kalich-Philosoph ve ark. kemoterapötik ajan siklofosamidin primordiyal foliküllerin apoptozunu indüklediğini bildirmiştir. Bunun yerine, siklofosamid tedavisi, aktif olarak büyüyen foliküllerin apoptozunu indükler ve primordiyal foliküllerden primer foliküllere geçişi tetikler, bu da primordiyal folikül havuzunun yok olmasına neden olur (24,27). Ayrıca kemoterapi ilaçları dinamik olarak bölünen hücreleri hedeflemektedir, bu da kemoterapinin uykuda olan foliküllere karşı daha az toksik olacağını düşündürmektedir (24).

Over rezervinin en önemli göstergesi primordiyal foliküllerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda PTEN/AKT/FOXO3a sinyal yolağının primordiyal folikül kaybının önlenmesi ve over rezervinin korunması ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. PI3K arttığında veya PTEN baskılandığında yolak AKT/FOXO3a yönüne doğru ilerler. FOXO3a'nın hücre çekirdeğinden stoplazmaya geçmesi primordiyal folikül aktivasyonunu başlatır (24,28,29). Siklofosamidin de PTEN/AKT/FOXO3a sinyal yolağının indüklenmesine neden olarak aşırı miktarda primordiyal folikülün aktiflenmesine yol açtığı belirtilmiştir. Aktiflenen primordiyal foliküller primer foliküllere sonra da sekonder ve tersiyer foliküllere dönüşürler. Böylece siklofosamid ovaryum rezervinin yok olmasına neden olur (27).

Günümüzde kök hücre tedavileri rejeneratif tıpta oldukça önemli bir yer teşkil etmektedir. Yakın gelecekte pek çok hastalığın tedavisinde farmakolojik ajanların ve cerrahi yöntemlerin yerini alacağı düşünülmektedir. Şuan da bile bazı hastalıkların tedavisinde primer olarak kök hücre tedavisi uygulanmaktadır. Bu yüzden bu alanda yapılan çalışmalar oldukça fazladır. Daha önceki çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin ovaryum dokusunu restorasyonuna ve fonksiyonuna olumlu etki edebileceği bildirilmiştir (22,30-34).

Biz bu çalışmada yağ dokudan elde ettiğimiz mezenkimal kök hücrelerin siklofosfamidin neden olduğu ovaryum dejenerasyonuna etkisini ve PTEN/AKT/FOXO3a sinyal yolağı üzerine olan rolünü araştırdık.

GENEL BİLGİLER

Ovaryumların Yapısı

Ovaryumlar, boyu yaklaşık 3 cm, eni 1,5 cm ve kalınlığı 1 cm olan badem biçiminde yapılardır. Yüzeyleri tek katlı yassı ya da kübik epitel ile kaplıdır; bu epitel 'germinal epitel' olarak adlandırılır. Germinal epitelin altında, ovaryumun beyazımsı rengini veren tunika albuginea olarak adlandırılan sıkı bir bağ dokusu katmanı bulunur. Tunika albugineanın altında oositleri içeren ovaryum foliküllerinin bol miktarda bulunduğu dış kısım (kortikal bölge) yer alır. Foliküller, kortikal bölgenin bağ dokusu (stroma) içinde gömülüdür. Bu stroma tipik iç biçiminde fibroblastlar içerir, ve bu fibroblastlar, hormonal uyarılara diğer organların fibroblastlarından farklı yanıt verir. Ovaryumun en iç kısmı gevşek bağ dokusu içinde zengin yatağı içeren medüller bölgedir. Korteks ile medulla bölgeleri arasında kesin bir sınır yoktur (35).

Ovaryumların Gelişimi

Embriyonik yaşamın yaklaşık birinci ayında, primordiyal germ hücrelerinden oluşan küçük bir hücre topluluğu vitellus kesesinden gonad taslağına göç eder. Gonadlarda bu hücreler bölünerek oogonyumlara dönüşür. Bölünmeler o kadar yoğundur ki, uterus içi yaşamın ikinci ayında yaklaşık 600 bin, beşinci ayda 7 milyonun üzerinde oogonyum vardır. Üçüncü aydan başlayarak oogonyumlar birinci mayoz bölünmenin profaz evresine girmeye başlar, ancak bölünme diploten evresinde durarak mayoz bölünmenin diğer evrelerine ilerlemez. Bu hücreler primer (birinci) oositlerdir (Yun. oon, yumurta + kytos, hücre) ve folikül hücreleri olarak adlandırılan yassı hücrelerle çevrilidir. Gebeliğin yedinci ayına ulaşıldığında, oogonyumların çoğu primer oositlere dönüşmüştür. Ancak, primer oositlerin çoğu, atrezi olarak adlandırılan bir bozunma ile (dejeneratif süreçle) yok olur. Sonuç olarak, puberte (ergenlik) dolaylarında overler yaklaşık 300 bin oosit içerir. Atrezi, kadının üreme çağı boyunca sürer ve 40-45 yaşlarında yaklaşık 8 bin oosit kalır. Her aybaşı döngüsünde (ortalama süre 28 gün) genellikle tek bir oosit serbest bırakıldığından ve kadının doğurganlık çağı yaklaşık 30-40 yıl sürdüğünden, yalnızca 450 kadar oosit salınmış olur. Diğer tüm oositler atrezi yoluyla ortadan kaldırılır (35).

Ovaryum Fonksiyonu

Ovaryumun iki ana fonksiyonu gametlerin ve steroid hormonların üretimidir.

Ovaryumların bibiri ile ilişkili iki ana fonksiyonu bulunmaktadır: gametogenez (gametlerin üretilmesi) ve steroidogenez (steroidlerin üretilmesi). Dişilerde gametlerin üretilmesi oogenez olarak adlandırılmaktadır. Gelişmekte olan gametlere oosit, matür (olgun) gametlere ise ovum denmektedir.

Steroid hormonların iki ana grubu olan östrojenler ve progesteronlar ovaryumlar tarafından salgılanmaktadır.

- Östrojenler, iç ve dış genital organların büyümesini ve olgunlaşmasını destekler ve pubertede dişi cinsiyet karakteristiklerinin gelişiminden sorumludurlar. Östrojen aynı zamanda duktal ve stromal büyümeyi ve adipoz doku birikimini stimüle edip meme gelişimini destekler.
- Progesteron, iç genital organları, özellikle de uterusu, endometriyumda salgılama değişiklikleriyle gebelik için hazırlar. Progesteron aynı zamanda lobüler proliferasyonu destekleyerek meme bezlerini laktasyon için hazırlar.

Her iki hormon da fertilize (dölleniş) ovumun implantasyonu için uterusu hazırlayarak menstrual siklusta önemli rol oynamaktadır. İmplantasyon gerçekleşmezse uterusun endometriyumu dejenere olur ve menstruasyon gerçekleşir.

Ovaryum Folikülleri

Gelişim evresine göre histolojik olarak 3 temel tip ovaryum folikülü tanımlanabilir:

1.Primordiyal foliküller

2.Büyümekte olan foliküller, primer ve sekonder(ya da antral) folikül olarak alt gruplara ayrılmaktadır.

3.Olgun folikül ya da Graaf folikülleri

Primordiyal folikül, folikül gelişiminin en erken evresidir. Primordiyal foliküller ilk olarak fetal gelişimin üçüncü ayında ortaya çıkarlar. Primordiyal foliküllerin erken gelişimi gonadotropin stimülasyonundan bağımsızdır. Oositi tek bir tabaka halinde

yassı folikül hücreleri çevreler ve folikül hücrelerinin dış yüzeyi bazal lamina ile sınırlanmıştır.

Primer folikül, büyümekte olan folikülün gelişiminde ilk evredir. Bir primordiyal folikül, büyümekte olan foliküle dönüşürken ilk olarak oosit büyür ve oositi çevreleyen yassı folikül hücreleri proliferasyon olarak kübik şekil alırlar. Folikül hücrelerinin kübik hal aldığı bu evrede, foliküle primer folikül adı verilir. Oosit büyüdükçe özel proteinler salgılanır ve bu proteinler bir araya gelerek zona pellusidayı oluşturur. Zona pellusida oosit ile folikül hücreleri arasında ortaya çıkar (36).

Folikül hücreleri, primer folikülün granüloza tabakasını oluşturmak için tabakalanmaya uğrarlar. Oositi çevreleyen tek tabakalı folikül hücreleri hızlı bir mitotik proliferasyon ile membrana granüloza (stratum granulozum) denenen ve oositi çevreleyen çok katlı bir epiteli oluştururlar. Folikül hücreleri artık granüloza hücreleri olarak adlandırılırlar. Bazal lamina, prizmatik hale gelen folikül hücrelerinin en dış tabakası ile bağ dokusu yapısındaki stroma arasında yer alır.

Bağ dokusu hücreleri primer folikülün teka tabakasını oluşturur. Granüloza hücreleri proliferasyona uğrayınca folikülün hemen çevresindeki stromal hücreler, bazal laminanın hemen dışında teka folikülü adı verilen bağ dokusu hücreleri kılıfını oluştururlar. Teka folikülü iki tabakaya ayrılır. İçte bazal laminanın üstündeki Luteinizan Hormon (LH) üreten hücrelerden zengin kısmına teka interna, dıştaki düz kas hücreleri ve kollajen liflerinden zengin kısmına ise teka eksterna denir (36).

Primer foliküller büyüdükçe ovaryum korteksinde derine doğru hareket ederler. Bu foliküllerin içerisinde hücreler foliküler sıvıyı (likör folikülü) salgıladığı için granüloza tabakaları arasında küçük boşluklar oluşur. Bu sıvı birikir, boşluklar büyür ve aşama aşama birleşir ve granüloza hücreleri sekonder veya antral folikül adını alır. Antrumun içerisinde granuloza hücreleri tarafından salgılanan glikozaminoglikanlar, steroid-bağlayıcı proteinler de dahil olmak üzere birkaç protein ve yüksek konsantrasyonda steroidler (progesteron, androjenler ve östrojenler) bulunur (35).

Antrum gelişirken oositin çevresinde granüloza hücreleri antruma çıkıntı yapan kümülüs ooforus adında küçük bir çıkıntı oluşturur. Hemen zona pellusidayı çevreleyen granüloza hücreleri korona radyatayı oluşturur ve ovulasyonda ovaryumu terk eden oosite eşlik ederler. Her menstrüel dönem sırasında, genellikle bir folikül diğerlerinden fazla büyür ve baskın hale gelir. Diğer foliküller ise dejenere olurlar. Baskın olan folikül foliküler büyümenin en son aşamasına ulaşabilir ve

ovulasyonu gerçekleştirebilir. Olgun folikül ya da graaf folikül olarak adlandırılan bu ovulasyondan önce folikül son derece büyüktür (yaklaşık 2.5 cm çapında), ovaryum yüzeyinden dışarı doğru şişkinlik yapar ve ultrasonografik inceleme ile saptanabilir (35).

Ovulasyon

Ovulasyon hormon aracılı bir işlemdir ve oositin serbestleşmesi ile sonuçlanır. Ovulasyon, oositin Graaf folikülünden atıldığı süreçtir. Herhangi bir menstrual siklusta ovulasyona uğrayacak olan folikül, siklusun ilk birkaç gününde birkaç primer oositten oluşan bir grup içinden seçilir. Ovulasyon sırasında oosit, germinal epitel de dahil olmak üzere tüm foliküler duvarı geçer.

Menstruel siklusun ortasında (28 günlük periyodun 14. gününde) oositin atılmasından, hormonal ve enzimatik değişiklikler sorumludur. Bu faktörler:

- Foliküler sıvının hacminin ve basıncının artması
- Folikül duvarının aktive plazminojen tarafından enzimatik proteolizisi
- Oosit-kumulus kompleksi ile stratum granulosum arasında hormonal yönlendirmeye glikozaminoglikanların biriktirilmesi
- Teka eksterna tabakasındaki düz kas liflerinin prostaglandinler tarafından tetiklenerek kasılması

Ovulasyondan hemen önce folikül çıkıntısının üzerindeki ovaryan yüzeyin küçük bir alanında kan akımı durur. Germinal epitelin foliküler stigma olarak bilinen bu bölümü yükselir sonrada rüptüre olur (yırtılır). Korona radiata ve kumulus ooforus hücreleri tarafından çevrelenmiş olan oosit, rüptüre olan folikülden atılır. Ovulasyon sırasında tuba uterinanın fimbriyaları ovaryumun yüzeyine iyice yaklaşır ve oositi içeren kumulus kütlesi fimbriyalar tarafından tuba uterinanın içine doğru nazikçe süpürülür. Kumulus kütlesi fimbriyaya sıkıca tutunur ve tuba uterinayı döşeyen silyumlu hücreler tarafından aktif bir şekilde taşınır. Böylece kumulus kütlesinin peritoneal boşluğa geçişi engellenir (36).

Korpus Luteum (Sarı Cisim)

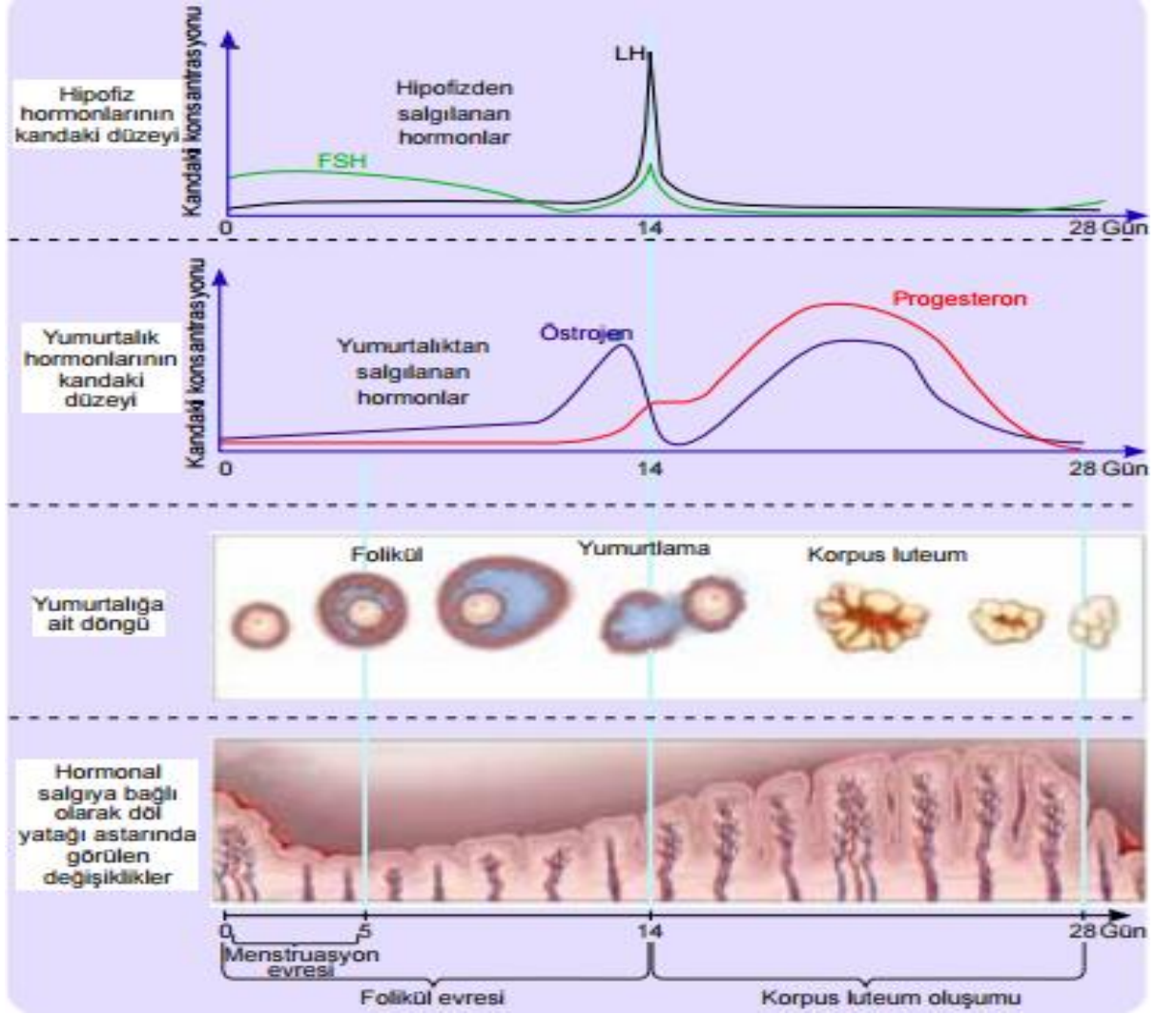
Ovulasyondan sonra, folikülün granüloza ve teka interna hücreleri, korpus luteum olarak adlandırılan geçici bir iç salgı bezi oluşturmak üzere yeniden düzenlenir. Korpus luteum ovaryumun korteks bölgesine yerleşir. Folikül sıvısının boşalmasıyla folikül duvarı kıvrımlı bir hal alır. Folikül boşluğuna bir miktar kanama olur, bu kan burada pıhtılaşır ve daha sonra yerini bağ dokusu alır. Bu bağ dokusu ile birlikte giderek ortadan kaldırılan kan pıhtısı artıkları korpus luteumun en iç kısmını oluşturur.

Granüloza ve teka internanın hücreleri hipofiz bezinden salgılanan LH'nin etkisi altında yeniden organize olurlar ve isimleri granüloza lutein hücresi ve teka lutein hücresi olarak değişir. Granüloza lutein hücreleri aşırı derecede hipertrofiye giderek artan korpus luteum boyutunun büyük miktarını oluşturur.

Korpus Luteumun kısa dönem kaderi döllenmenin olup olmamasına bağlıdır. Ovulasyona bağlı LH artışı korpus luteumun 10-12 gün kadar progesteron salgılamasını sağlar. Daha ileri LH uyarısı olmadığında ve gebeliğin yokluğunda korpus luteumun tüm ana hücre tipleri steroid üretimini durdurur ve dokunun gerilemesiyle apoptoza gider. Progesteron salgılanmasının azalmasının sonucu uterus mukozasının bir bölümünün dökülmesi menstrüasyondur. Aktif korpus luteum tarafından üretilen östrojen hipofizden FSH salgılanmasını baskılar. Ama korpus luteum bozulduktan sonra kandaki steroid konsantrasyonu azalır ve bir başka grup folikülün büyümesini uyararak ve bir sonraki menstrual döngüyü başlatmak üzere FSH salgılanması yeniden artar. Yalnız bir menstrual döngü boyunca varlığını sürdüren korpus luteum, menstrüasyon korpus luteumu adını alır. Bunun gerilemesinden arta kalanlar makrofajlar tarafından fagosite edilir, sonra ortama fibroblastlar gelir ve korpus albicans (beyaz cisim) adı verilen sıkı bağ dokusundan bir skar dokusu oluştururlar (35).

Menstrual Döngü

Ovaryum folikülleri ve korpus luteumun döngüsel gelişimi hipofiz gonadotropinleri FSH ve LH tarafından kontrol edilir. Bunlar esas ovaryum hormonları olan östrojen ve progesteronun seviyelerinde değişikliğe neden olur.



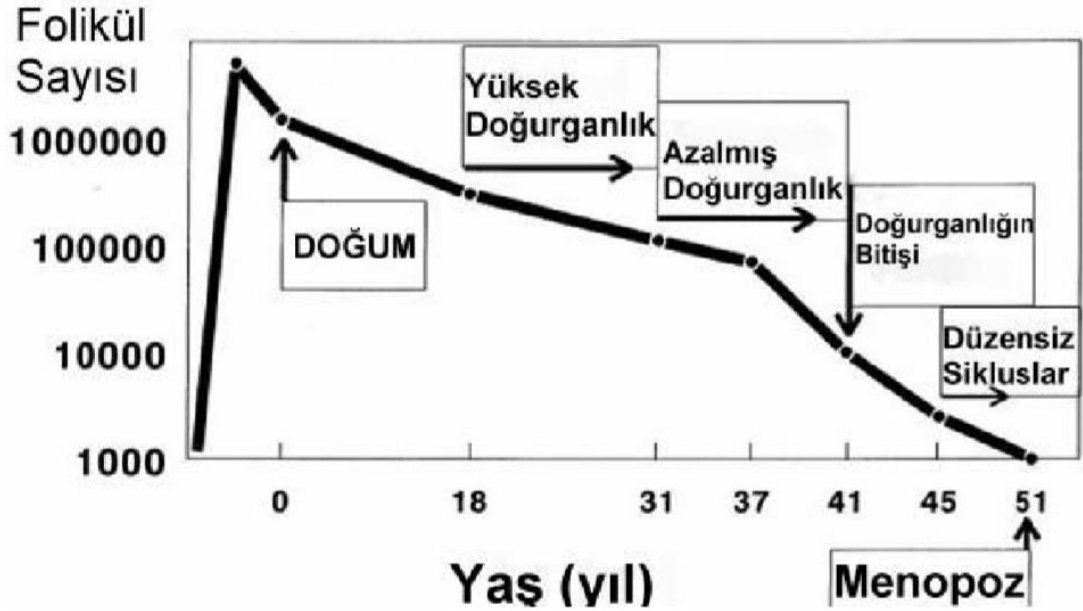
Şekil 1: Mensteruel Siklus Boyunca Meydana Gelen Değişiklikler (37)

Over Rezervi

Overlerin primer fonksiyonu fertilizasyon (döllenme) yeteneğine sahip, matür (olgun) oosit üretmektir. Doğumda overlerde, folikülogenezi gerçekleştirmeye dönük sınırlı sayıda oosit mevcuttur. Bu oositler primordiyal foliküllerin içerisinde bulunurlar. Primordiyal foliküller 'over rezervi'ni temsil ederler (38). Primordiyal foliküller normalde dormant (inaktif,uykuda) haldedirler. Ergenlik dönemiyle birlikte her menstruel siklusta az sayıda primoriyal folikül aktiflenerek sırayla primer, sekonder ve son olarak tersiyer foliküle dönüşür. Her menstruel siklusta 1 tane olgun oosit etrafındaki granüloza hücreleriyle tersiyer (olgun) folikülden dışarı atılır. Over rezervi yaşla birlikte doğal olarak azalır. Ayrıca bazı çevresel faktörler ve hastalıklar over rezervinin azalmasına neden olur:

- Geçirilmiş over cerrahisi, frozen pelvis
- Tek over
- Sigara kullanımı
- Aile öyküsü
- Otoimmün hastalıklar
- Kemoterapi, radyoterapi
- Diyabet
- Hipertansiyon
- Sistemik hastalıklar

Kadının yaşının artması ile fertilité azalmakta; özellikle 35 yaşından itibaren oosit sayı ve kalitesinde progresif bir azalma olduğu bilinmektedir (39).



Şekil 2: Yaşla azalan primordiyal folikül sayısı (39)

Kemoterapi ve Radyoterapinin Gonadal Fonksiyonlar Üzerine Etkisi

Kanser tedavilerindeki cerrahi, tıbbi ve teknolojik gelişmeler artan sağkalım oranları ile birlikte, yaşam, kalitesinde iyileşmeye de yol açmakta ve fertilitenin (üreme fonksiyonlarının) devamlılığının sağlanması giderek daha büyük önem kazanmaktadır. A.B.D.'de 2001 yılında 625.000 kadına farklı ilerlemiş kanser tanısı konmuştur ve bu kadınların ortalama %8'i 40 yaşın altındadır ve her yıl 4000 kız

çocuğu potansiyel olarak infertiliteye neden olabilen kemoterapi ve radyoterapiye maruz kalmaktadır.

Onkologların tedaviye başlayacakları hastalarında yumurtalık kapasitesini ve gelecekteki fertilitelerinin korunmasını dikkate almaları gerekmektedir. Tüp bebek uzmanı, jinekolojik onkolog ve medikal onkologların hastaları birlikte değerlendirmeleri, verilecek kemoterapi ve radyoterapi dozları tartışılmaları ve bu dozların oluşturacağı olası yumurtalık hasarı riskleri yönünden, üremeyi koruyucu yöntemlerin hastaya anlatılması günümüzde kabul edilen uygun yaklaşım şeklidir.

Günümüzde kanser tedavisi; konservatif cerrahi, radyoterapi, kemoterapi ve allogenic kemik iliği transplantasyonundan (KİT) oluşmaktadır. Bu güncel tedavi yöntemleri ile bazı kanserlerde kür oranları %90'ı geçmiştir, ancak agresif radyoterapi, kemoterapi tedavi protokolleri sonrası kadın fertilitelerini korumak için etkili klinik yöntemler oldukça azdır. Radyasyon veya kemoterapi tedavileri sonrası amenore (adetten kesilme) ve infertilite problemleri sıklıkla karşılaşılan sorunlardır. Özellikle alkilleyici ajanlar (Siklofosamid vb.) ve iyonizan radyasyon kullanımı prematür over yetmezliğine yol açabilmektedir (40).

Premature Ovaryan Yetmezlik (POY)

POY, ovaryan disfonksiyon, foliküler kayıp ve intermittant (aralıklı) over fonksiyonu ile karakterize bir sendromdur (41,42). POY'de 40 yaşından önce en az 4-6 ay süreyle adetlerin kesilmesi ve bir ay aralarla ölçülen FSH değerlerinin 40 IU/L'nin üzerinde olması tanı kriteri olarak kabul edilmiştir. (43,44).

Etiyoloji tam olarak aydınlatılamamakla beraber, genetik, immünolojik ve çevresel faktörlerin (kemoterapi, radyoterapi) rol oynayabileceği düşünülmektedir (45). 40 yaş altındaki kadınların %1'ni, 30 yaş altındakilerin %0.1'ni, 20 yaş altındakilerin ise %0.01'ni etkilediği tahmin edilmektedir (46). Bazı genlerdeki (ATM, AIR, FSH reseptör, inhibin α geni ve FMR1 premutasyonu) mutasyonların da POY ile ilişkili olduğu bulunmuştur (47). Ayrıca, X kromozom anomalileri de POY'e neden olmaktadır (48). X kromozomuna bağlı anomalilerden en sık neden olanlar ise Turner sendromu ve ilişkili defektler, Triple X sendromu, Fragile X sendromu (FMR1 premutasyonu), DIAPH2 disrupsiyonu (translokasyonu), BMP15 varyantları, PGRMC1 varyantıdır. Özellikle X kromozomunun uzun kolunda, iki kritik bölgenin Xq13-21 (48) ve Xq26-27 (49) POY ile ilişkili olduğu saptanmıştır (45).

Son yıllarda kanser hastalıklarının tedavilerinde elde edilen önemli başarılar sonucunda, kür oranlarının artması ve bunun sonucu olarak kemoterapi ve radyoterapi almış kadın sayısındaki artış ile POY yaygınlığının hızlı bir şekilde yükseleceği tahmin edilmektedir (50-54).

POY mutlak bir erken menopoz durumu değildir. Menopozun aksine POY'da ovaryum fonksiyonları her zaman kalıcı olarak bitmemektedir (50). POY başlangıcından 16 yıl sonrasına kadar ovaryan aktivitenin yeniden başlayabildiği belirtilmiştir (55). Ancak tüm bunlara rağmen POY fertilitiyi önemli oranda olumsuz etkilemektedir (38).

POY, ayrıca östrojen seviyesinin azalmasına bağlı olarak psikolojik rahatsızlık, infertilite (kısırlık), osteoporoz, otoimmün bozukluklar, iskemik kalp hastalığı ve artmış mortalite (ölüm) riski dahil olmak üzere ciddi sağlık sonuçları taşır (56).

Kemoterapiye bağlı gelişen POY' da fertilitenin sağlanmasında çeşitli tedaviler denenmektedir. Bu hastalar için kök hücre tedavileri de yeni bir umut kaynağı olarak düşünülmektedir.

Fertilite Koruyucu Yöntemler

Kanser saptanan kadınlarda fertilitiyi korumada günümüzde uygulanan ve gelecekte uygulanabilecek stratejiler şunlardır:

- 1.GnRH analogları gibi ilaçlarla hormonal korunma
- 2.Radyoterapi öncesi yumurtalıkların ışınlanma alanı dışına yerleştirilmesi (Ovaryan transpozisyon operasyonları)
- 3.Embriyo dondurulması
- 4.Yumurtaların daha sonra kullanılmak üzere dondurularak saklanması
- 5.Dondurulmuş bir kısım yumurtalık dokusunun veya tüm yumurtalığın gelecekte transplantasyon için saklanması
- 6.Dondurulmuş yumurtalık dokusunun veya tek tek yumurtaların in vitro büyüme (Vücut dışında olgunlaştırma) için saklanması
- 7.Antiapoptotik (Hücre ölümünü engelleyen) sfingozin-1-fosfat gibi ajanlarla farmakolojik korunma

8.Rahimi olmayan veya işlev görmeyen hastalarda rahim transplantasyonu

9.Kök hücre tedavisi

Denenmekte olan bu yöntemlerin avantaj ve dezavantajları tartışma kısmında bahsedilecektir. Bu kısımda ise sadece kök hücrelerden bahsedilecektir.

Kök Hücre Tedavisi

Üreme tıbbında kök hücre tedavileri 3 alanda yoğunlaşmıştır;

- Fertilitenin korunması (doku tamiri, restorasyonu)
- Kök hücrelerden fonksiyonel gamet hücresi üretimi
- Fertilitenin korunması amacıyla doku ve organ üretimi

Biz bu çalışmada kök hücrelerin restoratif etkisini inceledik.

Kök Hücreler

Kök hücre, mitoz bölünmeyle özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilen ve daha fazla kök hücre üretmek için kendini yenileme yeteneğine sahip olan, bütün çok hücreli canlıların doku ve organlarını oluşturan öncül hücre türleridir. Bir başka şekilde ifade edecek olursak bu hücreler özelleşmemiş ya da farklılaşarak özel işlevler kazanmamış ana hücrelerdir (57).

Temel kök hücre özellikleri nelerdir?

- 1.Kök hücreler uzun süre boyunca bölünme ve kendilerini yenileyebilme özelliğine sahiptir. (self-renewal)
- 2.Kök hücreler özelleşmiş hücrelere dönüşebilirler. (Farklılaşma)
- 3.Klon oluşturabilme (cloning)

Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

Kök hücreler 3 temel özelliğe sahiptir:

- 1.Farklanma (plastite)
- 2.Kendini yenileme(self-renewal), Bölünme Biçimleri ve Kök Hücre Nişi
- 3.Köklülük (Stemness) (58)

1.Farklanma (Plastite):

Farklılaşma (özelleşme) işlevsel olarak olgun bir hücre olma yolunda geçirilen bir dizi biyokimyasal ve fenotipik olaylar bütünüdür (59). Bu olay sitokinlerin, büyüme ve farklanma faktörlerinin, hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücreler arası iletişimin kombine etkisiyle oluşan karmaşık olaylar dizisidir (60). Hücre farklılaşmasını tetikleyen hücre içi ve hücre dışı sinyaller yeni yeni ortaya çıkmaya başlamıştır. İç sinyaller hücredeki genler aracılığıyla kontrol edilir. Dış sinyaller ise diğer hücrelerden salınan kimyasal maddeler , komşu hücrelerle fiziksel temas ve mikro çevredeki bazı moleküllerdir. Yapılan çalışmalarda hematopoetik kök hücrelerde, mezenkimal kök hücrelerde ve nöral kök hücrelerinde plastite özelliği gösterilmiştir. Sinir hücresine dönüşen kan hücreleri, insülin üreten karaciğer hücreleri ve kalp hücrelerine dönüşebilen hematopoetik kök hücreleri plastiteye örnek olarak verilebilir (58).

2.Kendini Yenileme (Self Renewal):

Kendini yenileyebilme özelliği hemen tüm kök hücrelerin temel özelliklerinden biridir. Bu özellik sayesinde kök hücre havuzu sürekliliğini koruyarak bu havuzu tükenmekten korur. Teorik olarak ölümsüz, sınırsız, sürekli çoğalma özelliğindedir (61).

Kök hücreler organizmanın yaşamı boyunca kendi kopyasını alacak şekilde çoğalırlar. Gerekliğinde organ ve dokuya özgü öncü hücrelere dönüşebilirler. Embriyonik gelişim sürecinde, yetişkin insan hücrelerinin ve dokularının uzun süreli korunması ve onarımında, kök hücreler ile farklılanmakta olan hücreler arasındaki denge çok önemlidir (62)

Kök hücreleri öncü hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri, bölünmeler sırasında kök hücreler bir yandan öncü hücreye dönüşecek hücreyi üretirken diğer bir yandan da kendini yedeklemesidir. Bu olay asimetric hücre bölünmesi sonucu oluşur ve kök hücre havuzunun yaşam boyu sabit kalmasını sağlar. Asimetric hücre bölünmesinde hücre içi ve hücre dışı etkenlerin birlikte çok sıkı kontrol edilmesi gerekir. Hücre içindeki asimetri, bazı organellerin, protein gruplarının ve RNA' nın yavru hücrelerden sadece birine aktarılmasıyla başarılır. Bölünme sonunda orjinal DNA, yavru hücrelerden birine giderken kararlanma geçirir ve öncü hücreye dönüşecek olan diğer hücrede yeni DNA sentezi meydana gelir. Bu mekanizmalar sayesinde kök hücreler mutasyonlardan korunmakta ve hep aynı genoma sahip hücreler bozunmadan kalabilmektedir. Sonuç olarak kök hücrelerde gen ifadesi ve işlevleri korunmaktadır (62).

Kök hücrelerin hücre dışı asimetrisi, hücrenin dışındaki mikro çevre (niş) tarafından oluşturulur. Nişi oluşturan hücre dışı matris bileşenleri, komşu hücreler ve salgı proteinleri, kök hücre sayısını ve hücrenin bulunduğu durumu kontrol altında tutar. Sonuç olarak hücre içi ve hücre dışı sinyaller hücrenin kendini yenilemesinde önemli etkenlerdendir. Her ne kadar kök hücre havuzunu sabit tutabilmek için asimetric hücre bölünmesi gerekse de, yeni hücre gereksinimini karşılayabilmek için simetric hücre bölünmesi de gerçekleşmelidir (62).

3.Köklülük (Stemness)

Kök hücreleri diğer hücrelerden ayıran hücresel ve moleküler özelliklerdir. Bunlar özgün gen ifadeleri ve transkripsiyon sonrası bir dizi değişimler olup kök hücreler farklılaşmaksızın özgün yapılarını ve işlevlerini korurlar. Kök hücre belirteçlerini kullanarak kök hücre tipini belirlemek günümüzde en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir. Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları üzerinde veya hücre-hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan bu belirteçlerden birçoğu 'CD' (Farklanma Kümeleri: Cluster of Differentiation) olarak bir başlık altında toplanmış olup, hücre türüne göre çok özgün veya çok yaygın olarak bulunurlar. Embriyonik kök hücreler için yaygın kullanılan belirteçler: SSA1, SSA4, TRA-1-60, Sox2, Oct4; hematopoetik kök hücreler için en yaygın kabul edilen belirteçler CD33, CD34, CD45; mezenkimal kök hücreleri ayırt etmek için CD29, CD54, CD90, CD106 kullanılır (62).

Kök Hücrelerin Karakterizasyonu ve Farklılaşması

1.Kök Hücrelerin Karekterizasyonu:

Kök hücre karekterizasyon çalışmaları çok yönlü birçok analizin bir araya getirilmesi ile tamamlanmaktadır. Hücre özelliklerini belirleyebilmek için temel olarak dört yöntem sıklıkla kullanılmaktadır: belli belirteçleri taşıyan hücrelerin akım sitometre ile sayılması, hücrede ifade edilen proteinlerin immün boyama ile belirlenmesi, gen ekspresyon analizleri ve farklılaşma deneyleri.

Mezenkimal kök hücreler birçok dokudan izole edilebildiklerinden dolayı kaynak sıkıntısı bulunmamaktadır. Ancak izole edildikleri doku içerisinde kazandıkları özellikleri izolasyon sonrasına taşıyabildiklerinden dolayı çeşitlilik göstermektedirler. Bir hücreyi mezenkimal kök hücre olarak tanımlayabilmemiz için birçok yüzey belirtecini ifade etmeleri ve hematopoetik kök hücrelerden farklı belirteçleri taşımaları gerekmektedir. Bunun dışında hücrelerin osteosit, adiposit ve kondrosit hücre hatlarına farklılaşabildiklerinin gösterilmesi gerekmektedir. MKH'lerine özgün bir belirteç daha tanımlanmadığından birçok belirtecin bir arada değerlendirilmesi gerekmektedir.

Niş olarak adlandırılan ve kök hücrelerin içinde bulunduğu mikro-çevre çoğalmayı destekleyen ve farklılaşmayı engelleyen özellikleri taşıyan düzenleyici (regülatör) bir ortamdır. Bu ortamın özelliklerinin değişmesi ile kök hücrelerde farklılaşma süreci uyarılabilir. Bu uyarı in vitro hücre kültürü ortamına kimyasal karışımların eklenmesi ile olabileceği gibi biyoreaktördeki sürtünme kuvveti ya da basınç da uyarı için yeterli olabilir (61).

KÖK HÜCRE ÇEŞİTLERİ-KAYNAKLARI

Kök hücreler iki kaynaktan elde edilir. Embriyonik gelişim sürecinin erken döneminde blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücrelerdir. (Embriyonik olmayan kök hücreler: dokuya özgü kök hücreler: doğum sonrası dönemdeki kök hücreler) (58)

Erişkin kök hücreler:

a.Mezenkimal kök hücreler

b.Hematopoetik kök hücreler

c.Organlardaki kök hücreler

Mezenkimal Kök Hücreler

Organların bağ dokularında bulunan erişkin kök hücrelerdir. Stromal hücreler de denir. Göç edebilme kapasiteleri oldukça gelişmiştir. Bu sayede hasarlı bölgeye giderek hasarlı dokunun tamirini yaparlar. Tümör oluşturma riski çok nadirdir. Yüksek çoğalma kapasitesine sahip hücrelerdir. Plastik flasklara yapışma özelliği gösterirler. Yüzeylerinde bulunan bazı proteinler ve bulunmayan bir takım proteinlerle ayırt edilirler: CD29(+), CD90(+), CD54(+), CD106(+), CD34(-), CD45(-), CD11b(-) veya CD14(-), CD19(-) veya CD79a(-), HLA-DR1(-) (62).

Kemik iliğinden, yağ dokusundan, amniyotik sıvıdan, göbek kordonundan, diş pulpasından ve plesentadan elde edilebilirler. Kolay elde edilebilmeleri ve birçok dokuya dönüşebilmeleri kullanımları açısından büyük avantaj sağlar.

KÖK HÜCRELERİN KULLANIM ALANLARI

Günümüzde hastalıkların tanı ve teşhisindeki gelişmeler baş döndürücü bir hızla devam etmektedir. Modern tıp' taki bu gelişmelere rağmen bu son yöntemlerin kesin tedavisinde etkin olamadığı bazı hastalık grupları vardır; Tip 1 Diyabet, Multiple skleroz (MS) ve Romatoid artrit gibi giderek artan sıklıkla görülen tüm otoimmün hastalıklar, halen kesin nedeni bilinmeyen ölümcül bir hastalık olan Amyotrofik lateral skleroz (ALS), çeşitli nedenlere bağlı olarak ortaya çıkan kesin tedavisi için canlı vericiden nakil gerektiren kalp-karaciğer ve böbrek gibi organların yetmezlikleri, genetik tabanlı olmayan sağırılık-körlük gibi hastalıklar, çeşitli seviyelerdeki omurilik hasarı sonucu ortaya çıkan felçler, denge bozuklukları ile karakterize serobrospinal ataksiler, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, müsküler distrofi gibi nöro-musküler dejeneratif hastalıklar, diyabete bağlı olarak veya başka nedenlerle (sigara gibi) periferik damarlarda ortaya çıkan olumsuzluklardan kaynaklanan ve amputasyona kadar giden ayaklarda iyileşmeyen yaralarla karakterize ülserler, tedavisi güç olan yanıklar, iyileşmeyen kırıklar, kırıkardak dejenerasyonları, osteoartritler, beldeki omurlar arasındaki diskin dejenerasyonuna

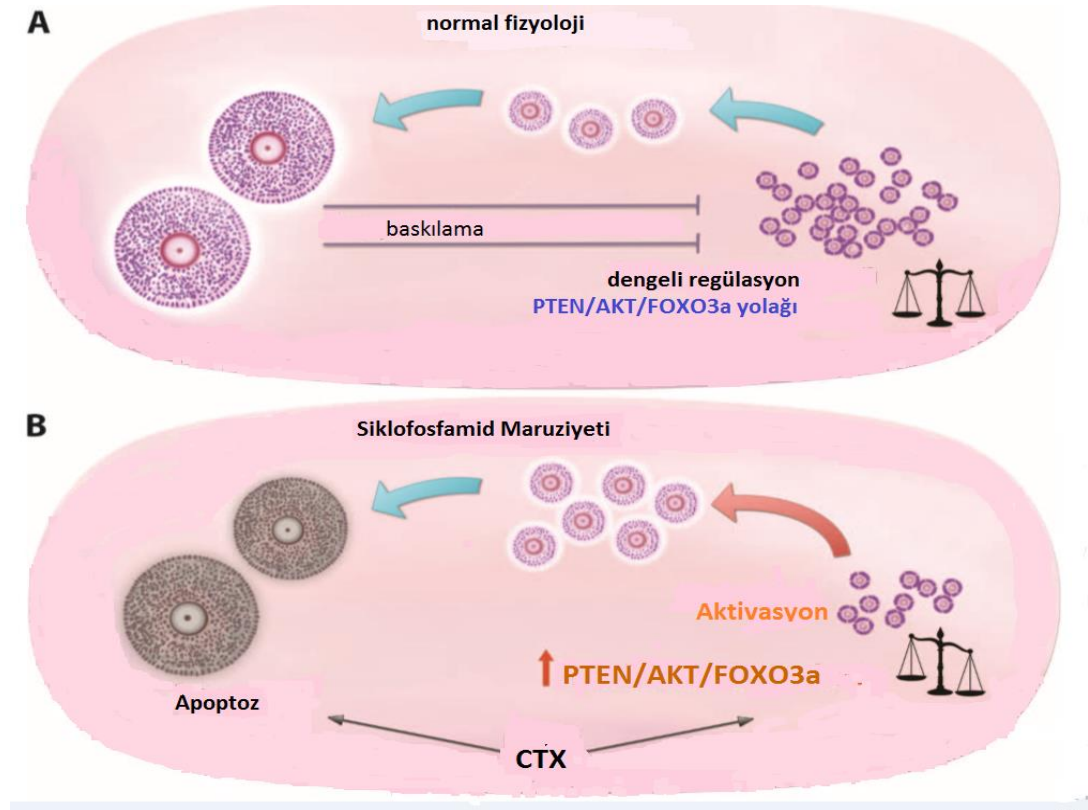
bağlı ve tedavisi mümkün olmayan bel ağrıları, üreme hücresi (erkek ve dişi) üretilmemesi sonucu ortaya çıkan kısırlık, empotans (cinsel yetersizlik ve idrar kaçıırma (idrar inkontinansı) gibi.

Bu sağlık sorunlarına sahip bireylerin yüz binlerle ifade edilen büyük bir kısmı kısıtlı kaliteyle yaşamlarına devam edebilirken büyük çoğunluğu, özellikle kesin tedavi için organ nakli gerektiren hastalıklarda (organ yetmezlikleri gibi) yaşamlarını yitirmektedir (yalnızca ABD' de yılda 700.000 insan kalp hastalıkları nedeniyle yaşamını yitirmektedir). İşte, bu tür ve benzeri hastalıkların kesin tedavisini sağlamak amacıyla araştırmacılar hasar gören hücre, doku veya organların biyolojik işlevlerini yerine koymak (rejeneratif tıp) ya da tamir etmek (reparatif tıp) ile mümkün olabileceği düşünülmektedir. Nitekim, yakın zamanda ABD' de embriyonik kök hücre çalışmalarının önünü açan önemli kararlara imza atıldı. Bunun yanında, ülkemizde de Sağlık Bakanlığı, Graft Versus Host Hastalığı (GVHD), Chron hastalığı, ALS, Siroz başta olmak üzere bazı hastalıkların tedavisinde kök hücre uygulamasının önünü açan kararlar almıştır (58).

PTEN/AKT/FOXO3a Sinyal Yolağı

Ovaryumlarda aynı anda değişik evrelerde foliküller (primordiyal, primer, sekonder, tersiyer) bulunur. Ancak ovaryumdaki primordiyal foliküller embriyonik dönemde oluşurlar ve pubertenin başlangıcına kadar dormant (uykuda,inaktif) kalırlar, primer foliküle doğru ilerlemezler (63). Dormant primordiyal foliküller doğumdan menapoza kadar ovaryumdaki folikül rezervini temsil eder. Foliküler gelişim sırasında primordiyal foliküllerin sadece çok küçük bir kısmı aktiflenir ve primer foliküle dönüşür. Primordiyal foliküllerin korunması kadındaki reproduktif (üretken) dönemin uzunluğunu belirler (64). Oositle ilgili çalışmalarda primordial foliküllerin aktivasyonunda *phosphatase and tension homolog (PTEN)* gibi bazı moleküllerin önemli rolü olduğu belirtilmiştir (65). PTEN fostinilinositol 3-kinaz(PI3K)/Akt yolağında negatif düzenleyicidir ve 1997 yılından beri tümör baskılayıcı gen olarak bilinir (66,67). PI3K sinyal yolağının dengesi primordiyal folikül havuzunun korunması, büyümesi ve hayatta kalımı için çok önemlidir (24). PI3K enzimleri hücre çoğalması, hücre ölümü, hücre hareketi ve hücre invazyonu gibi süreçlerde rol alan hücresel sinyal iletim yolağının elemanlarıdır. PI3K, inositol fosfolipidlerinin inositol halkası üzerindeki 3'OH grubunu fosforile eden, fosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate (PIP3) üreten bir lipid kinazdır. Artan PIP3, fosfoinositid-bağımlı protein kinaz 1 (PDK1) ve AKT gibi çeşitli pleckstrin homoloji domain proteinlerinin

aktiflenmesini sağlar (68). Önemli bir sinyal yolağı molekülü olan V-akt mürin timoma viral onkojen homologu 1 (AKT), PDK1 ile fosforile edilir, ve sırasıyla transkripsiyon faktörü olan FOXO'lar (Forkhead box proteinler), glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3) ve tuberoz skleroz 2 fosforillenir (65,68). PTEN, PI3K sinyal yolağını PIP3'ü PIP2'ye dönüştürerek doğrudan inhibe eder (69). PI3K sinyal yolağının baskılanması veya aktiflenmesi Prematur Ovaryan Yetmezlik ve infertilitede primordiyal foliküllerin kaderinde kritik rol oynar (70). PI3K/AKT sinyal yolağının aktivasyonu aşırı primordiyal folikül aktivasyonuna neden olarak over rezervinin azalmasına neden olur (71). Yapılan çalışmalarda kadın hastalarda siklofosfamid tedavisinin PI3K/PTEN/AKT yolağının dengesini bozarak premature ovaryan yetmezliğe ve infertiliteye neden olduğunu bildirilmiştir (24,27). Biz ise bu çalışmada sıçanlarasiklofosfamid uygulamasının ardından sıçan yağ dokusundan elde ettiğimiz mezenkimal kök hücreleri enjekte edip ovaryum ve PTEN/AKT/FOXO3a sinyal yolağı üzerine olan etkisini araştırdık.



Şekil 3: Siklofosfamid, Ovaryum Folikülleri ve PTEN/AKT/FOXO3a Yolağı

GEREÇ ve YÖNTEM:

Çalışma için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan 08.11.2016 tarihinde PAUHADYEK-2016/21 numarasıyla onay alındı. Çalışmamız için gerekli hayvanlar Pamukkale Üniversitesi Deneysel Cerrahi Uygulama Merkezinden temin edildi. Çalışmamızda Wistar-Albino cinsi, sağlıklı 18 adet sıçan kullanıldı. Ortalama ağırlıkları 150-160 gr ağırlığındaki 8 haftalık sıçanlar rastgele seçilerek 3 gruba ayrıldı. 1. grup kontrol (K grubu; n=6), 2. grup Siklofosfamid verilen grup (CTX grubu; n=6), 3. grup Siklofosfamid ve Mezenkimal Kök Hücre verilen grup (CTX+KH grubu; n=6) ve olmak üzere 3 eşit gruba ayrıldı.

Sıçanlarda Siklofosfamidle Deneysel Ovaryan Toksisitenin Oluşturulması

Sıçanlarda deneysel ovaryan toksisite oluşturmak için Siklofosfamid (CTX) kullanıldı. Litaratürde deneysel ovaryan toksisite oluşturmak için sıklıkla kullanılan yöntem; CTX'in ilk gün 50 mg/kg, takip eden 13 gün boyunca ise günlük 8 mg/kg intraperitonel enjeksiyonudur. Bu amaçla CTX ve CTX+KH grubundaki her bir sıçan için verilmesi gerekli olan doz miktarı hesaplandı. Daha sonra CTX (ENDOXAN 1g Baxter) çıkarıldı ve gerekli olan miktarlar hassas tartıda ölçüldükten sonra 14 gün için 14 ayrı tüp içerisine konuldu. CTX her 1ml de 20mg olacak şekilde distile su içinde eritildi. (erimiş vaziyette 1-2 saat bozulmadan kalabildiğinden her enjeksiyon öncesi uygulanacak doz kadar eritildi.) Litaratüre uygun şekilde 14 gün boyunca CTX enjeksiyonu yapıldı (30).

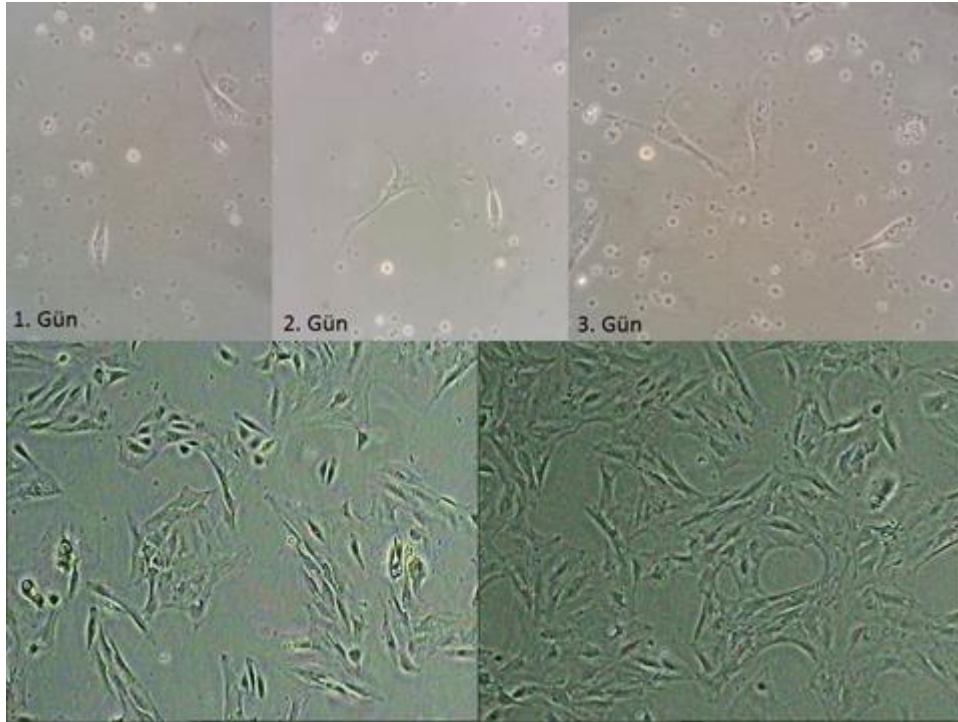
Siklofosfamid + Yağ Dokudan Elde Edilen Kök Hücre verilen grup (CTX+KH Grubu)

Bu gruptaki sıçanlara da ilk gün 50 mg/kg CTX, takip eden 13 gün boyunca günlük 8 mg/kg CTX intraperitonel yoldan enjekte edildi. Ardından herbir sıçana; yağ dokusundan elde ettiğimiz 50000 mezenkimal kök hücre 0.05 ml Fetal Bovine Serum (FBS) içerisinde direkt ovaryum içine enjekte edildi.

Mezenkimal Kök Hücre Eldesi

Bu çalışmada sıçan adipoz doku materyalinden enzimatik yöntemle mezenkimal kök hücre elde ettik. Laparotomi insizyonu ile retroperitoneal bölgede 1 sıçanın perineal ve inguinal yağ dokusu alındı. Alınan yağ dokusu izole edildikten sonra 1x Fosfat tamponlu salin (PBS 1x) içerisinde yıkandı. İlk önce falcon tüp içerisine Dulbecco'a

Modified Eagle' Medium (DMEM), Penisilin-Sterptomisin, Fetal Bovine Serum (FBS) konulup, adipoz doku steril koşullarda bu t¼p içerisinde konularak labatuara getirildi. Adipoz doku steril ince doku makası ile tam besiyeri içeren petri kabında ayrılabilen en k¼¼k parçalara ayrıldı. 15 ml' lik falkon t¼plere konulan adipoz doku ¼zerine % 0,1 lik konsantrasyonda hazırlanan kollejenaz enzimi konulup çalkalamalı su banyosunda 37 °C de 30-45 dakika ink¼basyona bırakıldı. Daha sonra istediğimiz h¼creleri doku parçalarından ayırmak için 100 µm lik s¼zgeten geçirildi. Elde edilen karışım 1600 rpm de 5 dakika santrif¼j edildi. Santrif¼j sonrası s¼pernatant atılıp kalan pellet 3 kez besiyeriyle yıkanıp santrif¼j edildikten sonra son s¼pernatant atıldıktan sonra kalan pelletin ¼st¼ne 1ml L-DMEM eklendi. İlk ekim için T₂₅-filtreli k¼lt¼r flaskına 5 ml tam besiyeri (L-DMEM, %10 FBS, 50U/ml penisilin, 50 µg/ml streptomisin, 2mM L-glutamin ve 0.1 mM non esansiyel amimoasit içerir) konuldu. ¼zerine 250 µl h¼cre s¼spansiyonundan koyarak ink¼basyona bırakıldı. Ekim yapıldıktan sonraki 3. g¼n h¼crelerin adipoz dokudan migrasyonları ve çoğalmaları takip edildi.

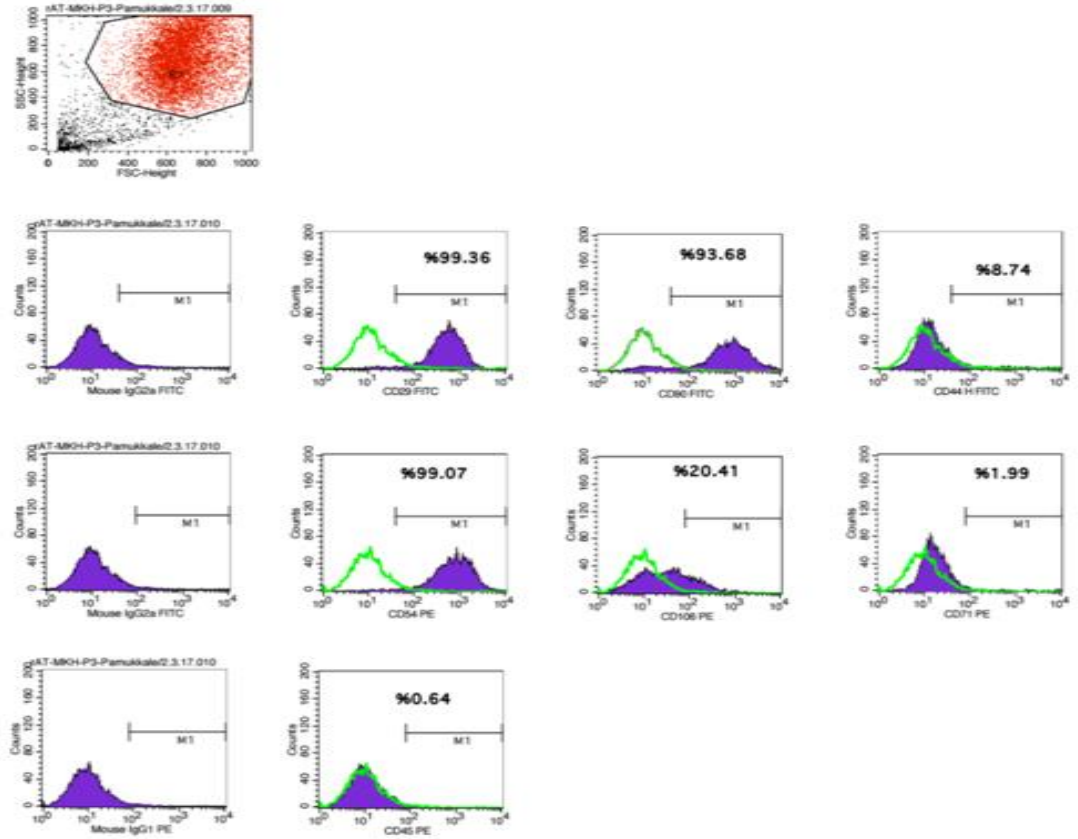


şekil 4: Mezenkimal K¼k H¼crelerimiz 1.,2.,3. ve ilerleyen g¼nlerdeki G¼r¼nt¼leri

Hücreler konfluent (%70-80) hale geldikten sonra tripsinize edildi (0.25% trypsin içeren 1 Mm EDTA) ve platelerin tabanına yapışmış olan hücreler kaldırıldı. Pasaj 3' te MKH'lerin karakterizasyonu için;

a).Mezenkimal kök hücre karakterizasyonu için Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma ve Uygulama Merkezinden hizmet alımı yapıldı. Gerekli bütçe Dr.Öğr.Ü. Nazlı ÇİL' in Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenen 2016BSP001 numaralı 'Deneysel olarak Asherman Sendromu Oluşturulan Sıçanlarda Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Tedavisi' başlıklı projeden karşılandı. Elde edilen Mezenkimal Kök Hücreler iki projede de kullanıldı.

Akım sitometri analizi mezenkimal kök hücre yüzey belirteci olarak CD29, CD90, CD45, CD54, CD71, CD106 yönlerinden yapıldı. Buradan alınan sonuçlara göre CD29, CD90, CD54 yüzey belirteçlerinin yüksek titrede olması ve CD45, CD71 yüzey belirteçlerinin çok düşük bulunması bize mezenkimal kök hücre elde ettiğimizi gösterdi. Bu deney sonucunda ikinci bir mezenkimal kök hücre ispatı için farklılaşma deneylerine geçildi.



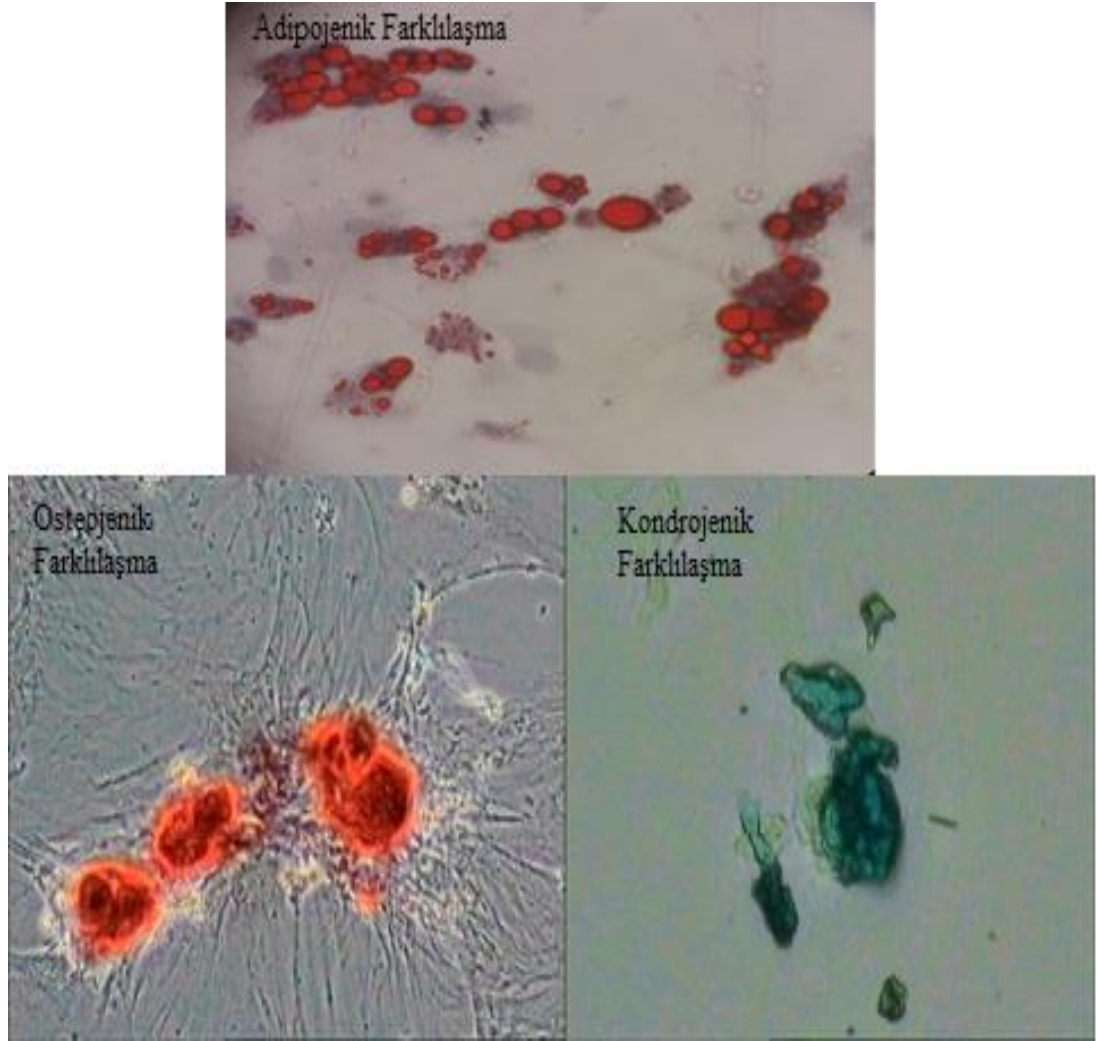
Şekil 5: Mezenkimal Kök Hücrelerimizin Flow Sitometri Sonuçları, CD29, CD90, CD54 sırası ile %99.36, %93.68, %99.07 pozitif, CD45 ve CD71 ise %0.64 ve %1.99 pozitif.

b) Kullanıma hazır ticari kitler ile adipojenik ,osteojenik ve kondrojenik değişim potansiyelleri analiz edildi:

-Adipojenik değişim histolojik olarak Oil Red O boyama,

-Osteojenik değişim histolojik olarak Alizarin Red S boyama,

-Kondrojenik değişim histolojik olarak Alcian Mavisi boyamayla gösterildi.



Şekil 6: Mezenkimal Kök Hücrelerimizizin Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik Dokuya Farklılaşması

FARKLILAŞMA DENEYLERİ

1.Adipojenik Farklılaşma

50 ml Adipojenik Differansiyon Medyumu için;

*45 ml Bazal Medium

*5 ml Adiposit Supplement

*25 µl Penisilin-Streptomisin kullanıldı.

Her kullanımdan önce +4°C' den çıkarıp 37°C'de su banyosunda ısıtıp kullanıldı.

**3. pasajdaki hücreleri kaldırıp hücre sayımı yaptıktan sonra 1×10^4 hücre/cm² olacak şekilde hücre kültür kabına adipojenik farklılanma için koyuldu. Hücreler 37°C' de %5 CO₂ de inkibatör içinde 15 gün kültüre edildi. Her 3 günde bir hazırlanan adipojenik mediumla hücrelere besiyeri değişikliği yapıldı. 15. günün sonunda Adipojenik farklılaşmayı göstermek için Oil-Red boyası yapıldı.

Oil-Red Boyama

300 mg Oil-Red tozuna 100 ml %99' luk izopropranol eklendi. Daha sonra çeker ocakta 3 birim Oil-Red+2 birim distile su olacak şekilde sulandırıldı.

Fiksasyon:

İnkibatördeki hücreleri çıkarıp mediumlarını uzaklaştırdıktan sonra %10' luk formaldehitte 1 saat bekletilerek fiksasyon tamamlandı.

Boyama:

1. Formalin'i uzaklaştırıldı.
2. %60 izopropranol herbir kuyucuğa eklendi.
3. 5dk bekledikten sonra izopropranol uzaklaştırıldı.
4. Oil-Red solüsyonundan her kuyucuğa eklendi.
5. Oil-Red tamamen uzaklaşınca kadar distile su ile yıkandı.
6. Her kuyucuğa Hemotoksilen-Eozin eklenip 1dk bekletildikten sonra distile su ile yıkama yapıldı.
7. Faz kontrast mikroskopta hücreler incelendi. Oilred le boyanan yağ hücrelerinin gösterilmesi sonucu Adipojenik Farklılaşma kanıtlanmış oldu.

2.Kondrojenik Farklılaşma

50 ml KondrojenikDifferansiyonMediumu için:

45ml Stem-Pro Bazal Medium

5 ml Stem-Pro ChondrogenesisSupplement

25 µl Penislin-Sterptomisin

Her kullanımdan önce +4°C' den çıkarıp 37°C'de su banyosunda ısıtıp kullanıldı.

**3. pasajdaki hücreleri kaldırıp hücre sayımı yaptıktan sonra hazırlanan 1 ml hücre süspansiyonundan 1.6×10^7 canlı hücre/ml olacak şekilde hücre solüsyonu 5 tane 5 µl'lik drop 12'lik well-plate'lerin ortasına konuldu. 2 saat 37°C'de bekletildi. Daha sonra üzerine hazırlanan kondrojenik differansiyon mediumundan eklenip inkübatöre konuldu. Besiyeri 2-3 günde bir (haftada 2 defa) değişim yapıldı.

14. günün sonunda mediumu uzaklaştırılan hücrelerin üzerine %4 lük formaldehit eklenip 30 dk bekletildi.

Alcian Blue Boyama

Hazırlık:

%1 Alcian Blue solüsyonunu 0.1 N HCl içinde çözüldü.

Fiksasyonu tamamlanan hücrelerden formaldehit uzaklaştırıldı. Daha sonra %1'lik alcianblue boyasında 30 dk. bekletildi. Alcian blue uzaklaştırılıp 0.1N HCl ile yıkanan hücreler Faz kontrast mikroskopta incelendi. Alcian blue ile boyanan kondrojenik hücrelerinin gösterilmesi sonucu Kondrojenik Faklılaşma kanıtlanmış oldu.

3. Osteogenik Farklılaşma

50 ml Osteosit Differansiyon Mediumu için:

45 ml Stempro Osteosit/Kondrosit Differentiation Bazal Medium

5 ml Stempro Osteogenesis Supplement

25 µl Penisilin/Streptomisin

Her kullanımdan önce +4°C' den çıkarıp 37°C'de su banyosunda ısıtıp kullanıldı.

**3. pasajdaki hücreleri kaldırıp hücre sayımı yaptıktan sonra hazırlanan 1 ml hücre süspansiyonunda 3.5×10^6 canlı hücre vardı. Kültür kabına önce besiyeri koyup sonra üzerine hücre süspansiyonundan 20 µl eklenerek inkübatöre bırakıldı. Besiyeri 2-3 günde bir (haftada 2 defa) değiştirildi. 21. günün sonunda mediumu uzaklaştırılan hücrelerin üzerine %4 lük formaldehit eklenip 30 dk bekletildi.

Alizerin Red S Boyama

Fiksasyondan sonra Alizerin Red S solüsyonu ile 2-3 dk boyanarak mikroskopta incelendi. Alizerin Red S ile boyanan osteojenik hücrelerinin gösterilmesi sonucu Osteojenik farklılaşma kanıtlanmış oldu.

Kök hücre karakterizasyon deneyleri tamamlanıp olumlu sonuçlar alınca bütün çoğaltılan kök hücreler 2., 3., ve 4. pasajda donduruldu ve deney aşamasına geçildi.

Mezenkimal Kök Hücrelerin Sıçan Ovaryumlarına Enjeksiyonu

Elde edilen MKH' lerin tekrarlayan pasajlar yapılarak çoğalmaları sağlandı. Tüm bu aşamalar invert mikroskop (CKX41,Olympus,Japan) kullanılarak gözlemlendi. 3. pasajdaki hücreler nexcelom marka hücre sayım cihazında tripan blue ile boyandıktan sonra sayıldı. Mezenkimal kök hücreler toplamda sadece grup 3 teki (CTX+KH grubu, n=6) sıçanların ovaryumuna uygulandı. Herbir sıçanın iki ovaryumuna da 0.05 ml FBS (Fetal Bovine Serum) içerisinde 50000 kök hücre enjekte edildi. Bu işlem genel anestezi altında sıçanların ovaryumları ekstorize edilerek yapıldı.



Şekil 7: Mezenkimal Kök Hücrelerin Ovaryum İçine Enjeksiyonu

Deneyin Sonlandırılması

Kök hücre enjeksiyonundan 8 hafta sonra tüm sıçanların her iki ovaryumları da disseke edildi ve sonra tüm sıçanlar sakrifiye edildi. Herbir sıçandan alınan ovaryumlardan biri Hematoksilen&Eozinve immunohistokimya için formaldehite alındı, diğer ovaryumlar ise Western-Blot yöntemi için RIPA solüsyonu içerisinde alındı.

Doku Takip Yöntemi

1. Alınan dokular 10 gün formaldehitte bekletildi.
2. Akarsuda 30 dakika yıkandı.
3. %50 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
4. %70 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
5. %80 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
6. %90 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
7. %100 Etil Alkol'de 1 saat bekletildi.
8. Ksilen I de 1 saat bekletildi.
9. Ksilen II de 1 saat bekletildi.
10. Parafin I de 1 saat bekletildi.
11. Parafin II de 1 saat bekletildi.
12. Dokulara parafine gömme ve etiketleme işlemi yapıldı.

Hematoksiklen-Eozin Boyama Protokolü:

Dokular etüvde 60 dakika boyunca deparafinizasyona uğratılır. Etüvden alınan dokular sırasıyla şu aşamalardan geçirilir:

- | | |
|-------------------------------------|-----------------|
| 1. Xylen (şeffaflaştırma amacı ile) | 30 dakika |
| 2. Xylen (şeffaflaştırma amacı ile) | 30 dakika |
| 3. %100 Etil alkol | 10 dakika |
| 4. %96 Etil alkol | 10 dakika |
| 5. %80 Etil alkol | 10 dakika |
| 6. %70 Etil alkol | 10 dakika |
| 7. Distile su | Batırıp çıkarma |
| 8. Hematoksilen | 3 dakika |

9.Akarsu	Yıkanma
10.Asit -Alkol	Batırıp çıkarma
11.Amonyak	1-2 saniye
12.Akarsu	Yıkanma
13.Eozin	10 saniye
14.%70 Etil alkol	10 dakika
15.%80 Etil alkol	10 dakika
16.%96 Etil alkol	10 dakika
17.%100 Etil alkol	10 dakika
18.Xylen	10 dakika

19.Kapatma; Xylen den alınan lamalar üzerine entellan damlatılır. Hava kabarcığı bırakılmayacak şekilde lamellerle kapatılarak ışık mikroskopunda incelenmeye hazır hale getirilir.

İmmünohistokimya protokolü:

1. Deparafinizasyon (1 gece etüv)
2. 3x10dk ksilol
3. Kurutma
4. Rehidrasyon %96, 90, 80 alkol 3'er dk
5. Distile su ile yıkama
6. Sitrat buffer ile antijen retrieval (mikrodalga içerisinde kaynamaya başladıktan sonra 20 dk. bekletildi.)
7. PBS ile yıka 3x5dk
8. H₂O₂ 10dk (200cc distile suya 25cc H₂O₂)
9. Pappen ile çizme
10. UV blok damlatılıp 8 dk bekletildi
11. Primer antikor 1 gece buzdolabı veya oda ısısında 1-4 saat
12. PBS 3x5dk
13. Sekonder antikor 10dk
14. PBS 3x5dk

15. Streptavidinperoksidaz 10dk
16. PBS 3x5dk
17. DAB damlat (renk alıncaya kadar) (Hazırlanışı: 2ml distile suya (toplam hacime göre) 3 şişeden (mavi kapaklı hariç) 2 damla olacak şekilde koyulur ve vortekslenir.)
18. Distile su 3x5dk
19. Hematoksilen batır çıkart
20. Musluk suyunda yıkama (durulanıncaya kadar)
21. Dehidre et %80, 90, 96 alkol
22. Kurutma
23. Ksilol 3dk
24. Kapatma

Western Blot Protokolü

Tüm gruptaki sıçanlardan aldığımız ovaryumların, PTEN, pPTEN, Akt, pAkt, Foxo3a, pFoxo3a genlerinin protein ürünleri miktarlarında ki değişimler Western Blot yöntemiyle belirlendi. Ovaryumlar, RIPA (0.15 molar NaCl, % 10 SDS, 0,05 molar tris-HCl pH: 7,65, % 1 NP-40 ve % 0,5 deoxycholate) tamponu içerisinde toplanıp homojenizatör ile homojenize edildi, ardından 12000 x g'de, 4 oC'de 3 dakika santrifüj edilerek istenmeyen hücre artıklarının ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Toplanan protein örneklerinin konsantrasyonu Bradford yöntemi ile tayin edildi. Daha sonra, mikrolitrede 50 mikrogram protein olacak şekilde örneklerden alındı. Bunların üzerlerine 1:1 oranında olacak şekilde protein yükleme boyası (100 mM Tris-HCL (pH 6.8), %12 betamerkaptoetanol, 2% SDS, 1% Bromofenol blue, 20% gliserol) ve protein örnekleri eklenerek, örnekler 3.5 dakika 100°C'de kaynatıldı. Kaynatma işleminin hemen ardından 10 mikrolitrelik otomatik pipet kullanılarak, ependorf tüp içindeki örnekler % 2-4 gradientli veya %10'luk SDS jelle (PIERCE) yüklendi ve yürüme tamponu (Tris baz 0.1 M, Hepes 0,1 M, SDS 3 mM) ile 80 voltta 45 dakika elektroforeze tabi tutuldu. Elektroforez işleminin ardından proteinler transfer tamponu (20% metanol, 50 mM Tris, 40 mM glisin) içinde 4 °C'de 75 mAmp akım şiddetinde bir gece boyunca immünobolin membran (Thermo) üzerine transfer edildi. Bu işlemden sonra membran, %5'lik kuru süt tozu içeren TBST (34 mM NaCl, 25 mM Tris-HCl pH:7,6 %1 Tween 20) çözeltisi içinde oda sıcaklığında 2 saat bloklandı. Ardından aynı membran %5 kuru süt içinde sırayla anti-PTEN, anti-pPTEN, anti-Akt, anti-pAkt, anti-Foxo3a ve anti-pFoxo3a primer antikolarla oda

sıcaklığında 1 saat işaretlendi. Sekonder antikör ile 1 saat muamele edildikten sonra kemolüminesan aracılığıyla görüntü alındı.

Folikül Sayımı Yöntemi

Doku takibi yapıp ovaryum dokuları parafin bloklara gömüldükten sonra mikrotom cihazıyla 3 mikronluk kesitler alındı. Bütün sıçanların ovaryumlarından 1., 5. ve 10. kesitler lamlara alınıp taşıma sepetine yerleştirildi. Hematoksilen-Eosin boyama yapıldıktan sonra primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer foliküllerin sayımı yapıldı. Her bir sıçan ovaryumundan alınan 1., 5., ve 10. kesitlerde bulunan sonuçlar toplandı. (Folikül değerlendirme kriterleri bulgular kısmında açıklanmıştır.)

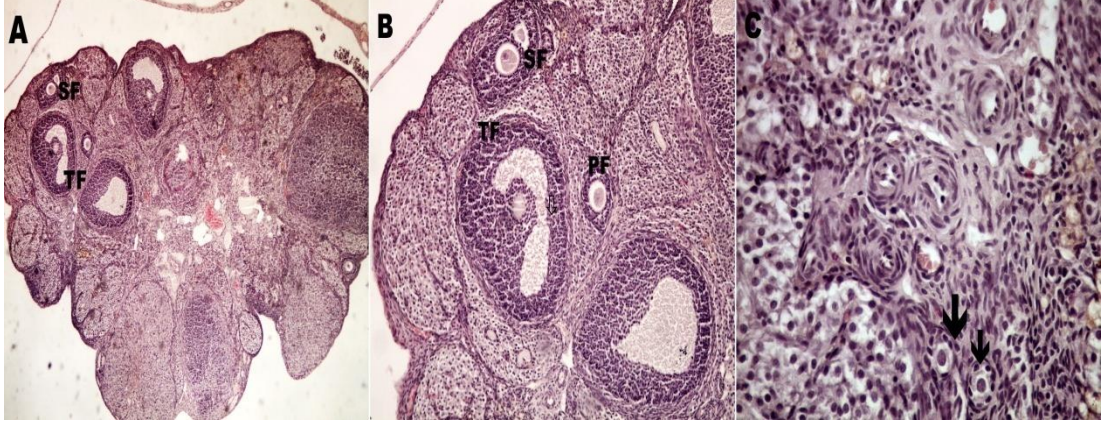
Verilerin Değerlendirilmesi

Tüm deneklerin ovaryum kesitlerinde primordiyal, primer, sekonder ve tersiyer follikül sayımı yapıldı. Gruplar arasındaki farklılık Kruskal Wallis, iki grup arasındaki farklılık Mann-Whitney U ile analiz edilmiştir. İstatiksel analizlerde SPSS 21 paket programı kullanılmıştır. $P < 0,05$ kabul edilmiştir.

BULGULAR

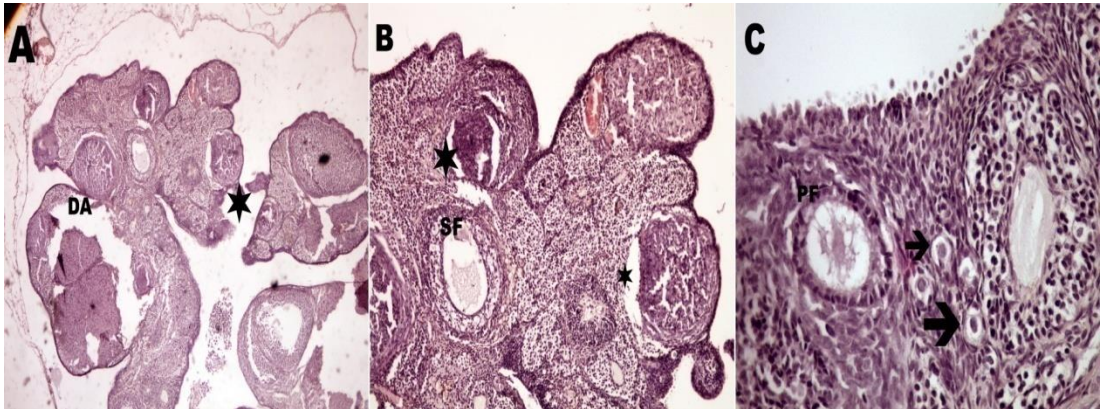
Hematoksilen-Eosin Boyanma Sonuçları

Kontrol grubunda gelişimin tüm aşamasındaki folliküller ile birlikte ovaryum normal görünümdeydi (Şekil 8).



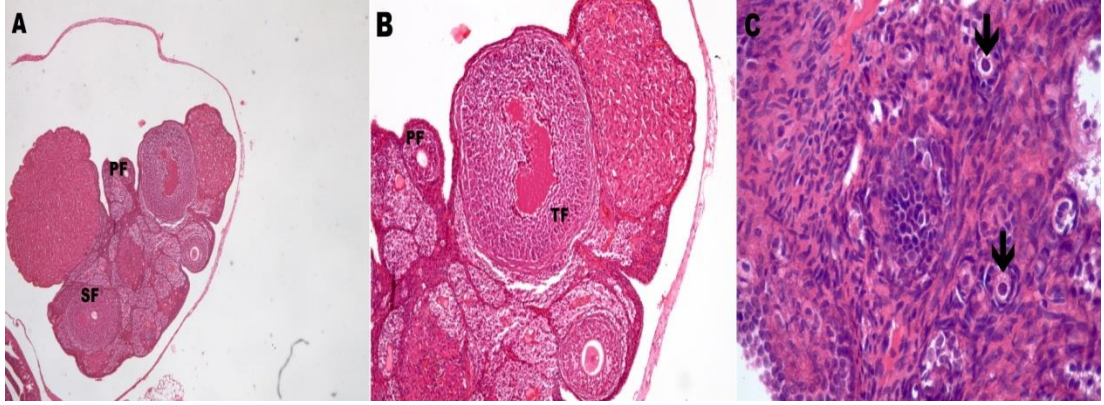
Şekil 8: Kontrol grubu ovaryum dokusu. Hematoksilen&Eozin Boyama. Ok:Primordiyal folikül PF:Primer folikül, SF:Sekonder folikül TF:Tersiyer folikül. A:X4,B:X10,C:X40

CTX uygulanan grupta ovaryumda bütünlüğün bozulduğu izlendi. Folliküllerin çoğunluğunun normal yapısını kaybettiği granulosa hücre sitoplazmasında kayıpların olduğu ve bazı granulosa hücrelerinin çekirdeklerin piknotik görüldüğü izlendi. Primordial folliküllerde normal yapının kaybolduğu ve follikül hücrelerinde hasarlanmanın olduğu belirgindi. Stromaldokuda da yer yer ayrılmaların olduğu izlendi (Şekil:9).



Şekil 9: CTX uygulanan grupta ovaryum dokusu. Hematoksilen&Eozin Boyama. Yıldız: Dejeneratif alan, PF:Primer folikül, SF:Sekonder folikül DA:Dokuda ayrılma, Ok:Primordiyal folikül. A:X4,B:X10,C:X40

CTX+ Mezenkimal Kök Hücre uygulanan grupta ovaryumda bütünlüğün korunduğu dejeneratif görünümlü folliküllerin sayısının azaldığı izlendi. Granulosa hücrelerinin normale yakın görünümde olduğu primordial folliküllerde folliküler hücrelerin normal yapısının korunduğu izlendi. Bununla birlikte stromal dokudaki ayrılmaların az da olsa devam ettiği izlendi (Şekil 10).



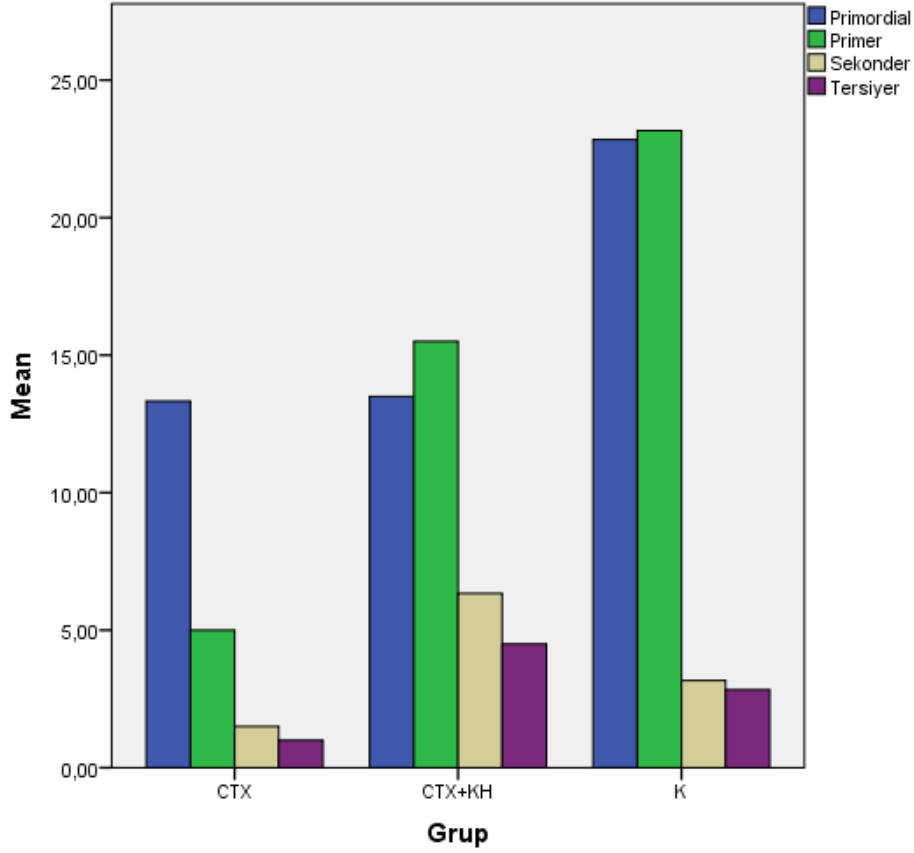
Şekil 10: CTX+Mezenkimal Kök Hücre uygulanan grupta ovaryum dokusu. Hematoksilen&Eozin Boyama. Ok:Primordiyal follikül PF:Primer follikül, SF:Sekonder follikül TF:Tersiyer follikül. A:X4, B:X10, C:X40

Folikül sayımı

Hematoksilen-eosinle boyanan kesitlerde Folliküller aşağıdaki verilen kriterlere uygun olarak belirlenmiştir. Sayılan folliküller Kruskal Wallis ve Mann Whitney Utesti ile analiz edilmiştir.

- 1) Primordialfollikül: Tek katlı yassı epitelle çevrili folliküller
- 2) Primerfollikül: Tekkatlıkübik ya da daha fazla granulosa hücre tabakası içeren folliküller
- 3) Sekonderfollikül: Granulosa hücre tabakasında boşluklar oluşan folliküller
- 4) Tersiyer follikül: Geniş antrumu olan ve kumulus ooforusu oluşan folliküllerdir.

Yapılan sayımlara göre primordial folliküller en fazla kontrol grubunda bulunmaktadır. Primordial folliküllerin sayısı istatistiksel olarak CTX grubu ile CTX-KH grubunda farklı değildi ($p=0,936$). Primer follikül sayısı CTX ile CTX+KH grubunda ($p=0,035$) ve CTX ile K grubu arasında ($p=0,010$) istatistiksel olarak anlamlı bulunurken CTX+KH ile K grupları arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p=0,170$). Sekonder follikül sayısı CTX ile CTX+KH arasında ($p=0,007$) ve CTX ile K ($p=0,006$), grupları arasında anlamlılık gösterirken CTX+KH ile K grupları arasında anlamlılık yoktu ($p=0,140$). Tersiyer follikül sayısı CTX ile CTX+KH ($p=0,002$), ve CTX ve K ($p=0,002$), grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıyken CTX+KH ile K ($p=0,1$), arasında anlamlılık yoktu.

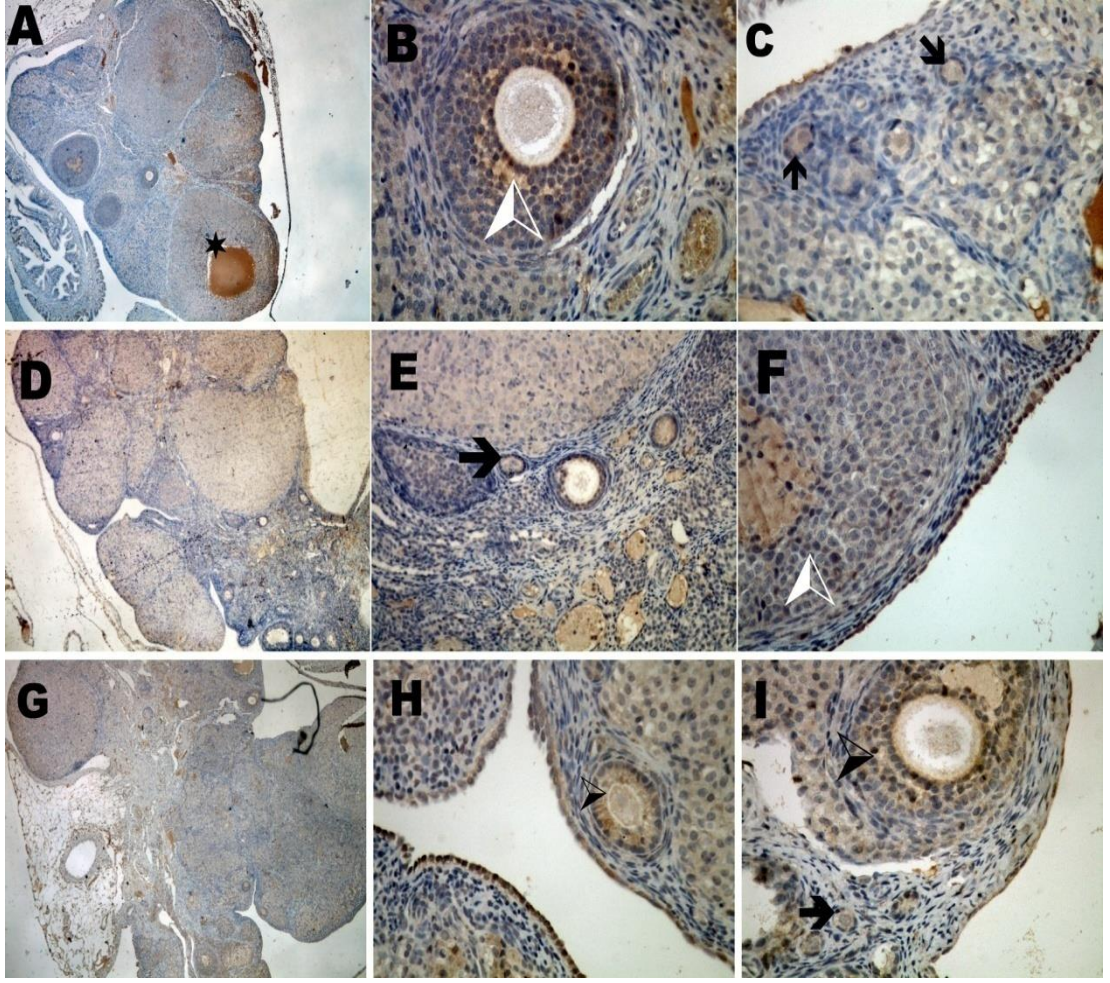


Şekil 11: Folikül Sayımı Sonuçları

İmmunohistokimyasal Bulgular

PTEN Ekspresyonu

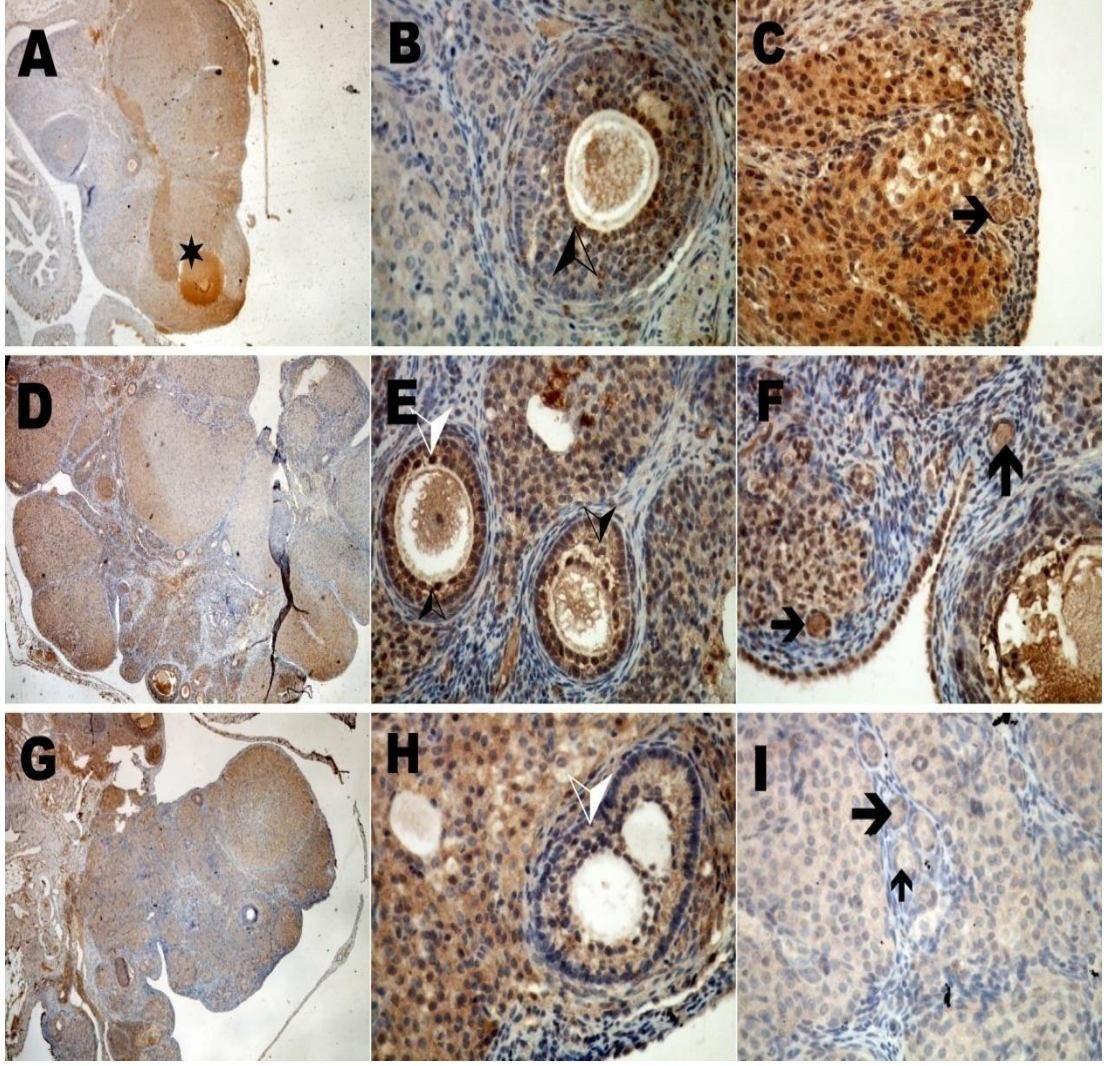
CTX grubunda PTEN primordial folliküllerde zayıf, primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde ise orta derecede boyanmıştı. Primer, sekonder ve tersiyer folliküllerin granuloza hücrelerinde boyanma orta derecede ve sitoplazmik olarak izlenirken follikül sıvısının kuvvetli boyanması dikkati çekiciydi. CTX+Kök hücre uygulanan grupta pozitif ve negatif boyanan primordial folliküllerin varlığı ilgiyi çekiciydi. Primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde oositlerin negatif olduğu granuloza hücrelerinin ise zayıf sitoplazmik boyanma gösterdiği belirlendi. Kontrol grubunda primordial folliküllerde kuvvetli boyanan oositler dikkat çekiciydi. Bu grupta primer, sekonder ve tersiyer follikül oositlerinin de yoğun boyanma gösterdiği bunun yanı sıra granuloza hücrelerinin, follikül sıvısının ve korpus luteum hücrelerinin de kuvvetli boyanma gösterdiği izlendi(Şekil 12).



Şekil 12:Ovaryum dokusunda PTEN ekspresyonu. A,B, C, Grup1; Ctx uygulanan grup. D,E,F Grup2 Ctx+kök hücre uygulanan grup, G,H,I grup3 kontrol grubu. OK; primordialfollikül, okbaşı; granuloza hücreleri, asterix; follikül sıvısı. Immunoperoksidaze-hematoksilen A,D,G:X40, C,E,H:X200, B,F,I: X40

pPTEN Ekspresyonu

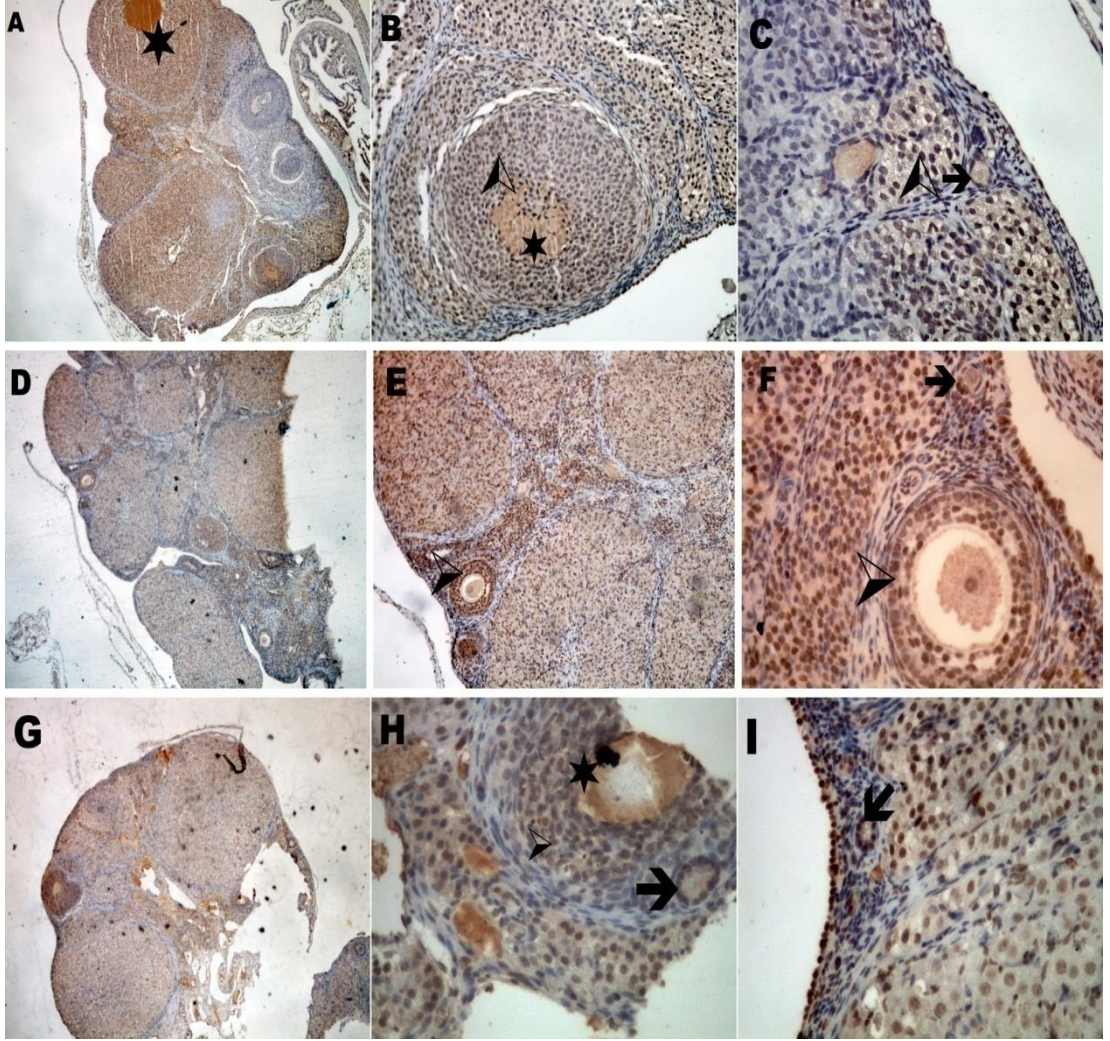
CTX, CTX+Kök hücre ve kontrol grupları arasında pPTEN reaksiyonu açısından farklılık yoktu. CTX ve CTX+kök hücre grubunda boyanmanın kontrol grubuna oranla daha kuvvetli olduğu gözlemlendi. Primordial follikül boyanması da CTX ve CTX+kök hücre grubunda kontrol primordial folliküllerine oranla daha kuvvetli idi. Korpus luteum hücreleri ve kan damarlarında pozitif reaksiyon gösterdiği izlendi (Şekil 13).



Şekil 13: Ovaryum dokusunda pPTEN ekspresyonu. A,B, C, Grup1; CTX uygulanan grup. D,E,F Grup2 CTX+kök hücre uygulanan grup, G,H,I grup3 kontrol grubu. OK; primordial follikül, okbaşı; granuloza hücreleri, asterix; follikül sıvısı. Immunoperoksidase-hematoksilen A,D,G:X40, B,E,H:X400, C,F,I: X200.

FOXA3a Ekspresyonu

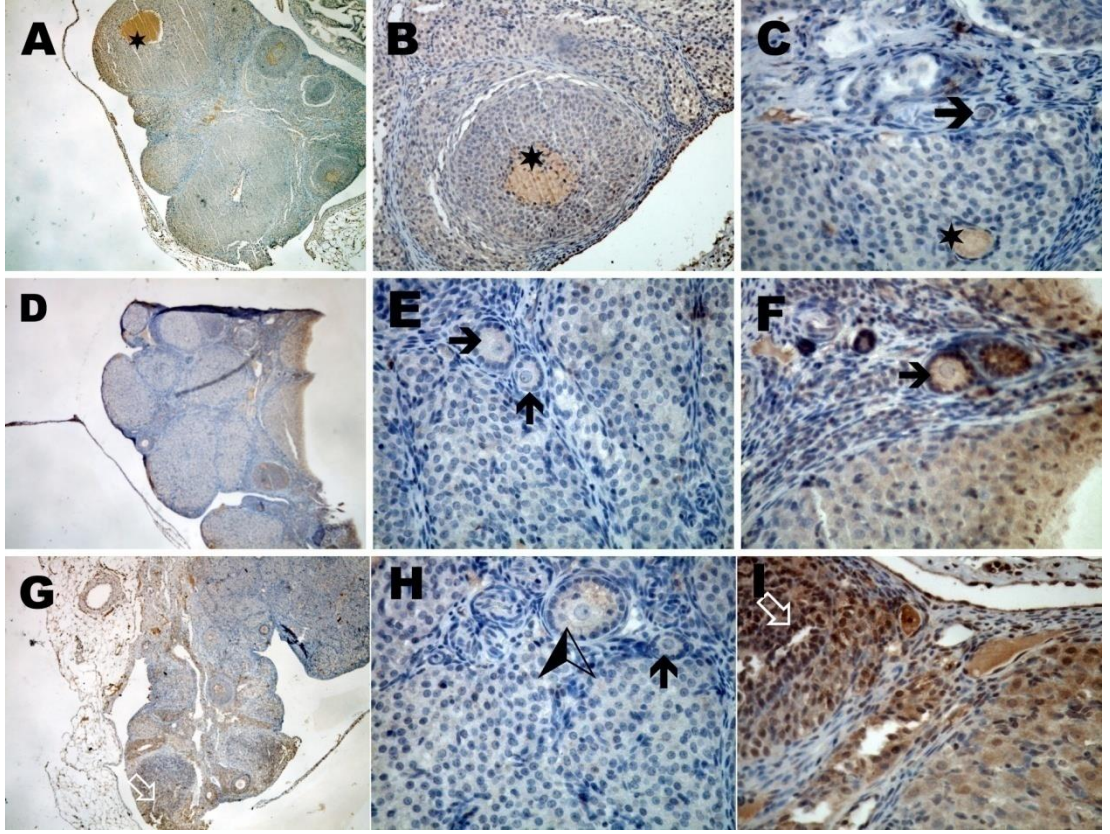
Her üç grupta da kuvvetli reaksiyon izlendi. Primordial, primer, sekonder ve tersiyer folliküllerin hepsi pozitif boyanmıştı. Boyanma CTX grubunda sitoplazmik olmasına karşın CTX + KH ve Kontrol gruplarında sitoplazmik ve nüleerdi (Şekil 14).



Şekil 14 : Ovaryum dokusunda Foxo3a ekspresyonu. A,B, C, Grup1; CTX uygulanan grup. D,E,F Grup2 CTX+kök hücre uygulanan grup, G,H,I grup3 kontrol grubu. OK; primordialfollikül, okbaşı; granuloza hücreleri, asterix; follikül sıvısı. Immunoperoksidaze-hematoksilen A,D,G:X40, B,E,H:X200, C,F,I: X400

pFOXA3aEkspresyonu

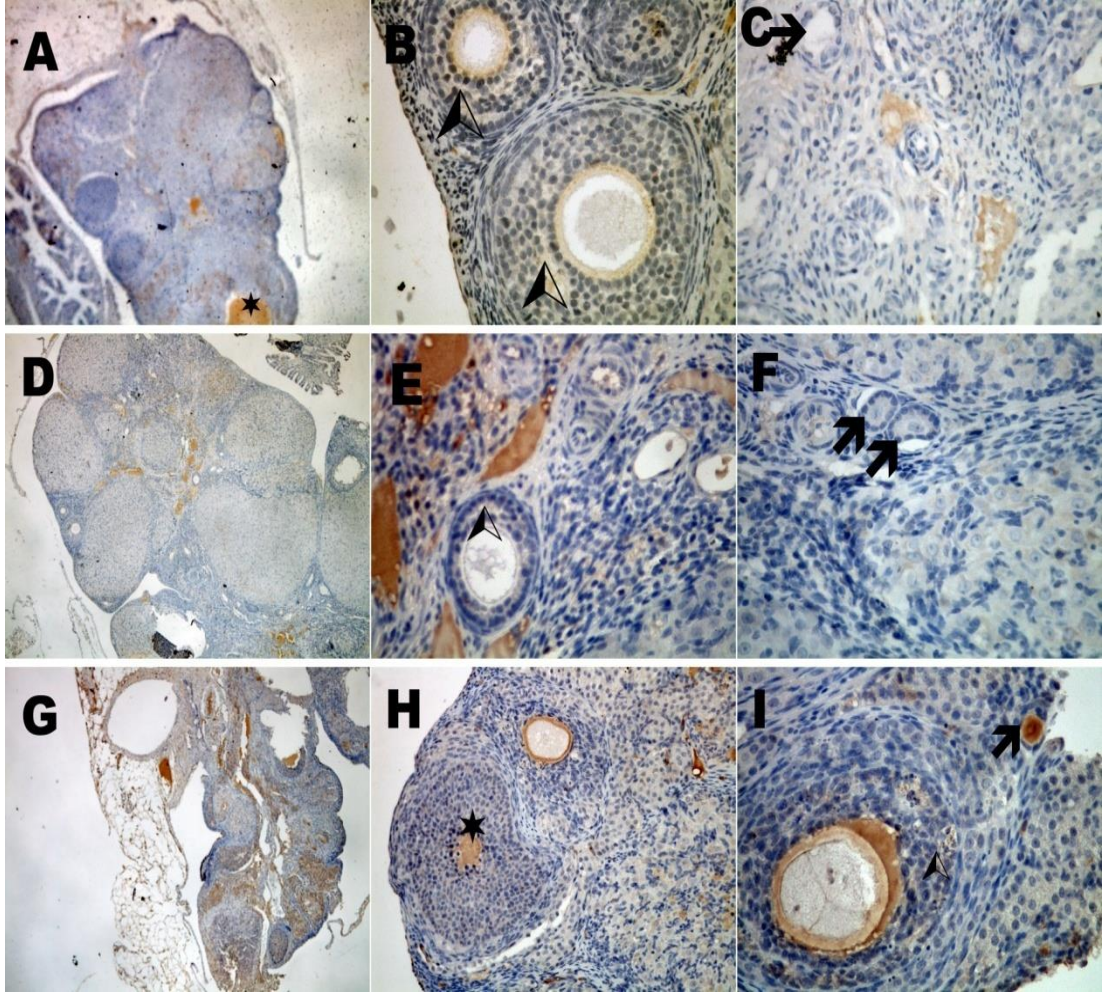
CTX ve kontrol grubunda primordialfolliküllerde zayıf boyanma izlenirken, CTX+ kök hücre uygulanan grupta kuvvetli pozitifreaksiyon ve aynı zamanda negatif reaksiyon gösteren primordialfolliküller dikkat çekiciydi. Her üç grupta da primer, sekonder ve tersiyer folliküllerde negatiften pozitive değişen reaksiyonlar gözlemlendi. CTX ve kontrol grubunda follikül sıvılarında da pozitif reaksiyon izlendi (Şekil 15).



Şekil 15: Ovaryum dokusunda pFoxa3a ekspresyonu. A,B, C, Grup 1; CTX uygulanan grup. D,E,F Grup2 CTX+kök hücre uygulanan grup, G,H,I grup3 kontrol grubu. OK; primordialfollikül, okbaşı; granuloza hücreleri, asterix; follikül sıvısı, beyaz kalın ok; ovaryumstromasında kuvvetli pozitif reaksiyon gösteren hücreler. Immunoperoksidase-hematoksilen. A,D,G:X40, B,E,H:X200, C,F,I: X400

AKT Ekspresyonu

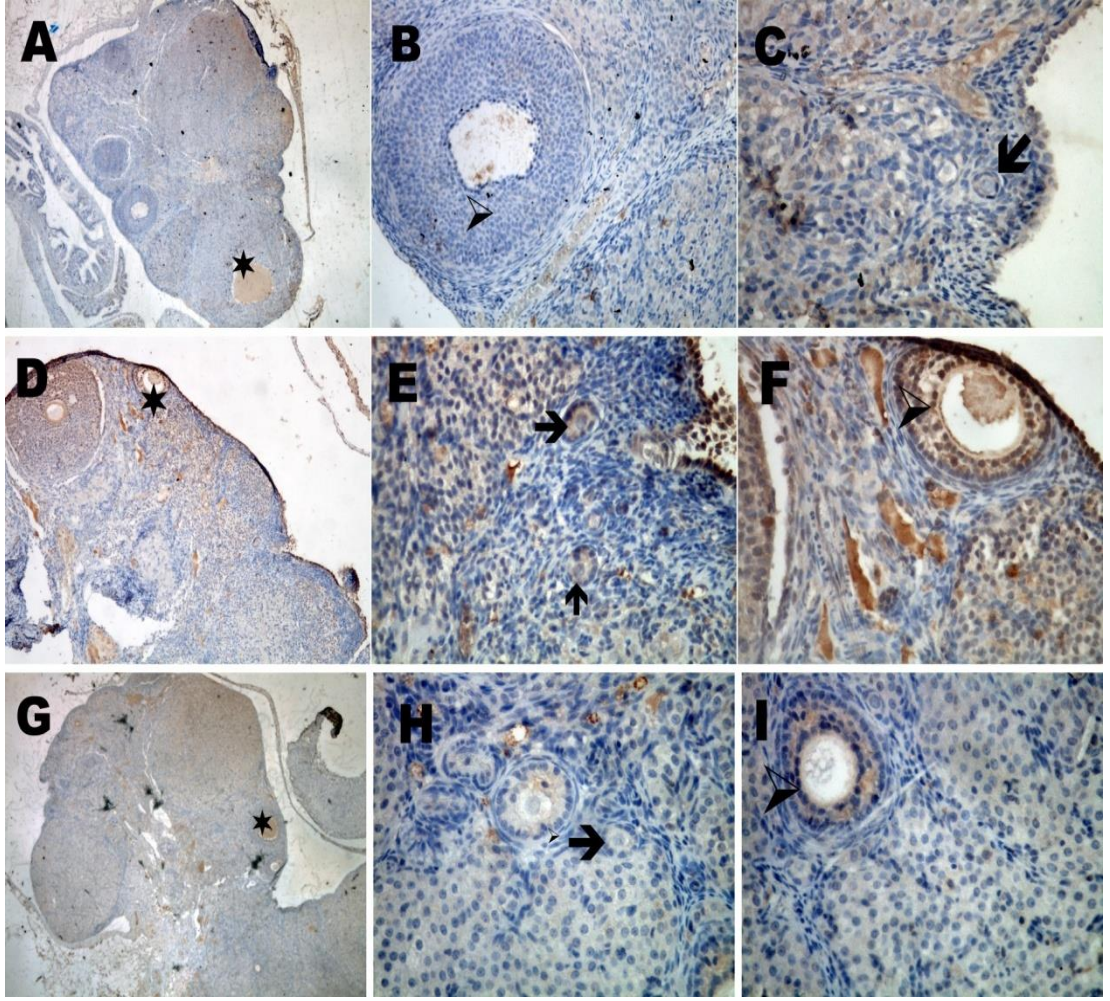
Kontrol grubunda Akt ekspresyonu primordialfolliküllerde pozitif, CTX ve CTX +kök hücre grubunda negatifti. Zona pellusida da pozitif boyanma kontrol ve CTX grubunda izlenirken CTX+ kök hücre uygulanan grupta ise negatifti. Granuloza hücreleri zayıf pozitif reaksiyon göstermişti. Stroma CTX ve CTX+ kök hücre grubunda negatif izlenirken kontrol grubu stromasının yer yer kuvvetli pozitif boyanan hücrelere rastlandı. Korpus luteum negatif kan damarları ise pozitif reaksiyon gösterdi (Şekil 16).



Şekil 16: Ovaryum dokusunda AKT ekspresyonu. A,B, C, Grup1; CTX uygulanan grup. D,E,F Grup2 CTX+kök hücre uygulanan grup, G,H,I grup3 kontrol grubu. OK; primordialfollikül, okbaşı; granuloza hücreleri, asterix; follikül sıvısı. Immunoperoksidase-hematoksilen A,D,G:X40, B,E,H:X200, C,F,I: X400

pAKT Ekspresyonu

Primordialfolliküller CTX grubunda çok zayıf pozitif, CTX+kök hücre grubunda kuvvetli pozitif, kontrol grubunda ise negatif reaksiyon göstermişti. Primer, sekonder ve tersiyer folliküller kontrol ve CTX+kök hücre grubunda kuvvetli pozitif, CTX grubunda negatifti. Reaksiyon CTX+ kök hücre grubunda nükleer ve sitoplazmik, kontrol grubundayalnızca sitoplazmikti (Şekil17).



Şekil 17:Ovaryum dokusunda pAKT ekspresyonu. A,B, C, Grup1; CTX uygulanan grup. D,E,F Grup2 CTX+kök hücre uygulanan grup, G,H,I grup3 kontrol grubu. OK; primordialfollikül, okbaşı; granuloza hücreleri, asterix; follikül sıvısı. Immunoperoksidase-hematoksilen. A,D,G:X40, B,E,H:X200, C,F,I: X400

Western Blot Bulguları

Gruplar arasında reaksiyon açısından farklılık izlenmedi.

	FOXO3a	pFOXO3a	AKT	pAKT	PTEN
ctx 1	0,02232	0,002594	0,0944	0,0000584	0,02792
ctx 2	0,026176	0,091964	0,145098	0,000214	0,032255
ctx 3	0,107242	0,003413	0,208012	0,000033	0,05963
ctx 4	0,02993	0,000215	0,179814	0,000025	0,046404
ctx 5	0,105668	0,000824	0,067701	0,000696	0,069091
ctx 6	0,045385	0,017766	0,11453	0,003249	0,073162
cttx+kh1	0,153987	0,001317	0,166113	0,001076	0,145183
cttx+kh2	0,020529	0,004246	0,142317	0,001017	0,047103
cttx+kh3	0,064945	0,000108	0,070266	0,000657	0,097183
cttx+kh4	0,119597	0,000306	0,096337	0,001778	0,09011
cttx+kh5	0,123471	0,000186	0,050888	0,001992	0,135897
cttx+kh6	0,081563	0,000099	0,009844	0,00029	0,07375
kontrol 1	0,040442	0,000516	0,148673	0,000189	0,063628
kontrol 2	0,091892	0,000827	0,18601	0,000112	0,093641
kontrol 3	0,052802	0,003056	0,1868	0,000238	0,068493
kontrol 4	0,093398	0,000096	0,169082	0,0000323	0,080193
kontrol 5	0,078392	0,007838	0,284757	0,000125	0,08459
kontrol 6	0,105903	0,001801	0,160243	0,0000278	0,08459

Tablo 1: Western Blot Analizi

TARTIŞMA

İnfertilite ve prematür over yetmezliği (POY) kemoterapinin en önemli ve yaygın yan etkilerindedir (72). Bu nedenle, POY'un önlenmesi ve over follikül havuzunun korunması, kemoterapi alan kanser hastası kadınların yaşam kalitesini iyileştirmek için artan bir ilgi kazanmıştır. Avrupa Tıbbi Onkologlar Birliği, kemoterapi ile indüklenen POY ve over disfonksiyonu riski taşıyan kadınlarda doktorlar ve kanser hastalarının fertilitate (doğurganlık) korunması için izleyecekleri yola mümkün olduğunca kısa sürede karar vermesi gerektiğini tavsiye etmektedir (73). Doğurganlığın korunması için stratejiler arasında yumurtalık dokusunun veya immatür (erken) oositin kriyoprezervasyonu yaygın olarak düşünülür. Bununla birlikte, bu yöntemler, zaman, maliyet ve gonadotoksik potansiyel gibi çeşitli faktörlerden dolayı sınırlıdır (73-75). Folikül havuzunu koruyabilen ve kemoterapi sırasında follikül kaybını önleyebilen koruyucu ajanların (24,27,76) veya restoratif (yenileyici) ve reperatif (onarıcı) etkileri olan kök hücrelerin mevcut (fertilitate) doğurganlık koruma stratejilerine göre hastalar için daha uygun olacağı için önemli avantajlar sağlabilecekleri düşünülmektedir (22, 30-34).

Kanserde kemoterapi standart tedaviler arasında yerini korumaktadır. Kemoterapi ilaçları yaş, cinsiyet ve ilaç dozuna bağlı olarak çeşitli organlara zarar verebilmektedirler (77,78). Kemoterapi ilaçları, hücrelerin yaşamsal süreçlerini engeller, böylece hücre proliferasyonunu (çoğalmasını) durdurur ve ovaryumda (yumurtalıkta) durgun folliküllerin anormal aktivasyonuna neden olur (24,27).

Kemoterapinin indüklediği POY klinik olarak kalıcıdır, tedavi sonrasında da devam etmektedir. Genç kadınlarda siklofosfamid ile tedavi sonrasında hastalar arasındaki amenore sıklığı %84'tür ve sonuçta hastaların %50'sinde POY gelişmektedir (22).

Önceki araştırmalar, kanser önleyici ilaç tedavisinin değişik oranlarda ovaryum (yumurtalık) hasarına neden olduğunu ve doğurganlığın baskılanmasına neden olduğunu bildirmiş (79,80) ve yumurtalık atrofisini iyileştirmek ve follikül rezervini korumak ve doğurganlık kaybını önlemek için çözümler sunmuştur (72,81,82).

POY, 40 yaşın altındaki kadınlarda amenore (4 aydan uzun süren), hipergonadotropik hipogonadizm (yüksek FSH, düşük östrojen) ve infertilite ile karakterize olan semptomları tanımlamak için kullanılan terimdir. Önceleri Prematür Menopoz olarak tanımlanmış olsa da bu hastaların bir kısmında tanı konulduktan yıllar sonra bile ovaryan aktivitenin aralıklı olarak devam etmesinden dolayı POF

teriminin kullanılması daha uygun görülmüştür (45,83). POY'e neden olan üç faktör bulunmaktadır; (i) primordial follikül havuzunda azalma, (ii) folliküler atrezi oranında artma (iii) folliküler işlev veya olgunlaşmanın gerçekleşmemesi. Olguların çoğunun etiyojisi bilinmemektedir. Bununla birlikte viral, otoimmün, çevresel toksinler, pelvik cerrahi, radyasyon veya kemoterapi gibi etkenler de POY'e neden olabilmektedir (45)

Follikül gelişimi çok sayıda, karmaşık aşamalardan oluşur ve bu aşamalardan herhangi birindeki bozulma üreme bozukluklarına ve infertiliteye yol açabilir. Bu nedenle, bu evreleri kontrol eden hassas mekanizmaları aydınlatmak, kadın hastalarda doğurganlığı korumak ve infertilitenin tedavisi için kritik önem taşır. Birçok çalışma, kemoterapinin dormant primordial foliküllerin apoptozunu tetikleyerek POY ve infertiliteye neden olduğunu öne sürmüştür (24). Bununla birlikte, Kalich-Philosoph ve ark., kemoterapötik ajan Siklofosfamidin primordial folliküllerin apoptozunu indüklediğini bildirmiştir (27). Bunun yerine, siklofosfamid tedavisi, aktif olarak büyüyen foliküllerin apoptozunu indükler ve primordiyal follikülleri primer foliküllere aktive eder ve primordiyal follikül havuzunun "yok olmasına (burn-out)" neden olur (24,27,84). Bu mekanizma daha muhtemeldir çünkü kemoterapi ilaçları dinamik olarak bölünen hücreleri hedeflemektedir ve bu da kemoterapinin uykudaki foliküllere karşı daha az toksik olabileceğini düşündürmektedir (24).

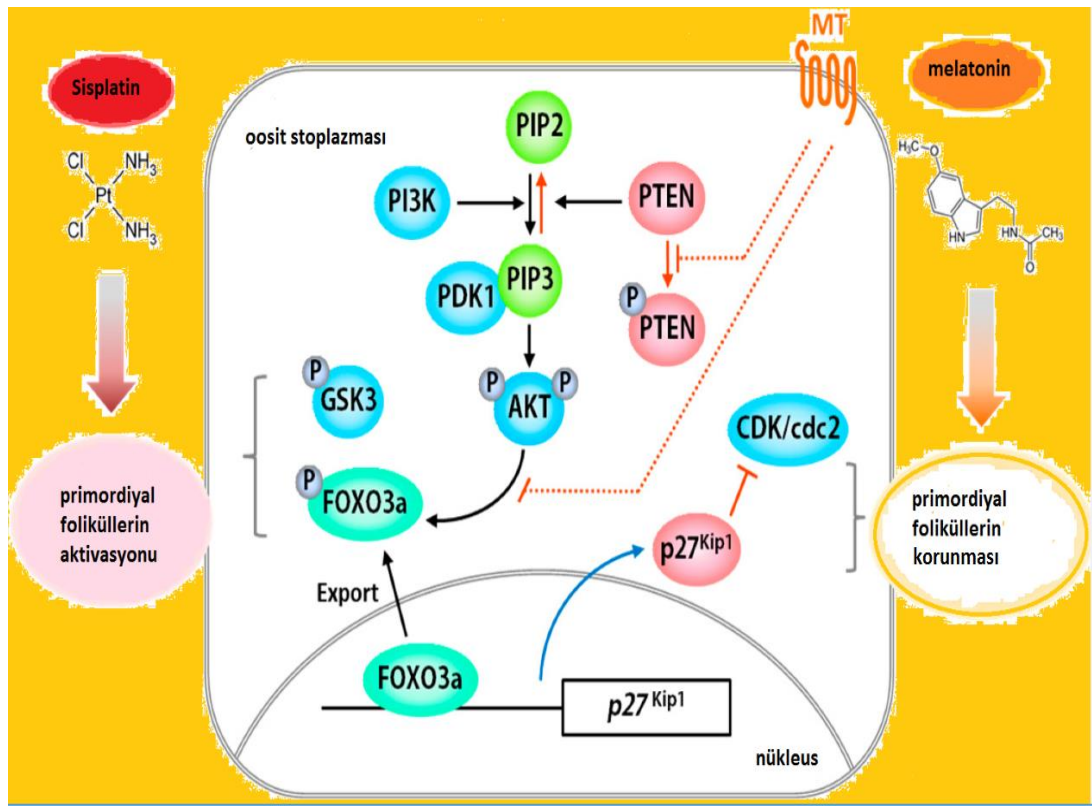
Deneysel olarak da ovaryan toksisite ve POY oluşturmak için kemoterapotikler kullanılmaktadır. Deney hayvanlarında POY modeli oluşturmak için Siklofosfamid ve Sisplatin sıklıkla kullanılırlar (30-34)

Biz de bu çalışmamızda sıçanlarda kemoterapi ilacı olarak Siklofosfamid kullandık. Siklofosfamid ile oluşturduğumuz ovaryum hasarında sıçan yağ dokusundan elde ettiğimiz mezenkimal kök hücrelerin iyileştirici etkisini ve PTEN/AKT/FOXO3a yolu üzerine olan etkisini inceledik.

PTEN / AKT / FOXO3a ise uykudaki (dormant) primordiyal foliküllerin aktivasyonunda rol aldığı bilinen önemli bir sinyal yolağıdır. PTEN, AKT/FOXO3a yolağında negatif düzenleyicidir. PTEN'in baskılanması veya PI3K artışı AKT ve FOXA3a da aktiflenmesine (fosforillenmesine) neden olur. FOXA3a'nın nükleustan stoplazmaya salınımı primordiyal folikülün aktiflenmesine neden olur (24,27,85,86).

Bizim çalışmamızda ilginç olarak PTEN her üç grup primordal follikülerinde orta derecede pozitif reaksiyon gösterdi. Bununla birlikte pPTEN ekspresyonu hem CTX hem de CTX+ kök hücre grubu primordal folliküllerinde kontrol grubundakilere oranla oldukça kuvvetli pozitifiti.

Deney hayvanlarında ve ayrıca insanlarla yapılan çalışmalarda in vitro koşullarda ovariumlarda PTEN' in baskılanması ile çok sayıda primordiyal folikülün aktiflendiği ve primer foliküllere dönüştüğü gösterilmiştir.(87-89).



Şekil 18:Sisplatin ve Melatoninin Oositte PTEN/AKT/FOXO3a sinyal yolağı üzerine etkisi(76)

Jang H ve arkadaşları; sisplatinin fare ovariumlarında PTEN/Akt/Foxo3a yolağı üzerinden indüklediği POY' e karşı melatonin ve ghrelinin koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir. Yaptıkları çalışmada farelere melatonin ve ghrelinin sisplatinin ile eş zamanlı verilmiş. Çalışmada sadece sisplatin alan farelerde PTEN, Akt ve Foxo3a moleküllerinin fosforillenip aktif hale geçtiği ve böylece inaktif durumdaki primordiyal foliküllerin primer foliküle dönüştüğü gösterilmiştir. Bu çalışmada histolojik yöntemler

ve Western blot yöntemi kullanılmıştır. Sisplatin+Melatonin alan farelerin ovaryumlarındaki primordiyal foliküllerin sayıları kontrol grubundaki farelerinkine yakın sayıda olduğu, sadece sisplatin alan grubundaki farelerin oldukça az miktarda primordiyal folikülleri kaldığı belirtilmiştir. Ayrıca TUNEL yöntemiyle sisplatin alan gruptaki fare ovaryumlarındaki primordiyal foliküllerden ziyade büyümekte olan olan antral folliküllerinin etrafındaki granüloza hücrelerinin apoptotik olduğu immunfloresan mikroskopta gösterilmiştir. Son olarak bu çalışmada melatonin ve ghrelinin birbirinin etkisini arttırdığı sisplatine karşı beraber kullanımlarının ayrı ayrı kullanımlarından daha etkili olduğu belirtilmiştir (24,76).

Kalich-Philosoph ve arkadaşlarının farelerde yapmış olduğu çalışmada, AS101' in siklofosfamidin yapmış olduğu erken primordiyal folikül aktivasyonunu engellediği böylece over rezervini koruduğu ayrıca bu sıçanların gebe kaldığının yani fertilitenin korunduğu gösterilmiştir. AS101 şuanda Faz 2 klinik çalışması aşamasındadır ve insanda kullanımının güvenli olabileceği öngörülmektedir. Ayrıca AS101' in anti-kanser etkisi olması nedeniyle; siklofosfamid ile birlikte kullanımı siklofosfamidin anti-kanser etkisini pekiştirirken, fertilitenin korunmasını da sağlayacağı düşünülmektedir (27).

Kalich-Philosoph ve arkadaşlarının çalışmasında Akt' nin fosforillenmesinin Siklofosfamid tedavisinden ilk 24 saat sonra en fazla olduğu daha sonra bunun giderek azaldığı ve 1 hafta sonrasında ise p-Akt/Akt' nin Siklofosfamid almayan gruptaki farelerin ovaryumlarındaki ile neredeyse eşitlendiği gösterilmiştir (27). Bu sonuç CTX'in PTEN/AKT/FOXA3a sinyal yolağı üzerine olan etkisinin akut bir etki olduğunu, CTX'in kesilmesinden bir süre sonra yolağın dengelendiğini, ancak aktiflenerek kayba uğrayan primordiyal foliküllerin ise geri döndüremediğini göstermektedir.

Biz çalışmamızda diğer çalışmalarda olduğu gibi CTX'in primordiyal foliküllerde PTEN/AKT/FOXA3a yolağını aktivelemesini bekledik. Ancak CTX grubu primordiyal folikülleri pAKT ve pFOXA3a için negatif ya da çok zayıf reaksiyon gösterdi. CTX'in etkisinin akut olduğu ve incelemenin uygulamadan yaklaşık 8 hafta sonra yapıldığı düşünülürse CTX'in PTEN/AKT/FOXA3a yolağındaki etkisinin kaybolmuş olabileceğini düşündük. PTEN ve pPTEN ekspresyonları gruplar arasında farklılık göstermedi. PTEN orta derecede ,pPTEN ise kuvvetli reaksiyon gösterdi. AKT en yoğun pozitif boyanmasını kontrol grubunda pAKT ise CTX+ kök hücre grubunda

gösterdi. FOXA3a reaksiyonu her üç grupta da hemen hemen aynı iken pFOXA3a ise sadece CTX+kök hücre grubunda kuvvetliydi.

Kemoterapi ve radyoterapi alacak olan kanser hastalarında fertilitiyi koruma amacıyla uygulanmakta olan yöntemler bulunmakla birlikte bu yöntemler tartışılmakta ve daha etkili yeni tedaviler araştırılmaktadır.

Kanser hastalarında kemoterapi tedavisi sırasında GnRH agonistleri ile gonadları korumak için 30 yıl önce ilk olarak test edilen yöntemdir. Ancak yakın zamanda yapılan çalışmalar GnRH agonistlerinin koruyucu olup olmadığına dair moleküler bir veri olmadığına bu konuda araştırmaya ihtiyaç olduğunu vurgulamaktadırlar (90). Yakın zamanda insan over dokusu üzerinde yapılan bir çalışmada GnRH kendi reseptörlerine bağlandığı ancak antiapoptotik mekanizmaları aktive etmediği ve over dokusunu siklofosamid ve cisplatin gibi gonadotoksik kemoterapi ajanlarına karşı korumadığı gösterilmiştir (91). Bu nedenle GnRH agonistleri kabul edilmiş bir fertilitiyi koruma metodu olarak kabul edilmemektedir.

Bir başka yöntem ise ovaryan transpozisyonudur. Pelvik bölgeye yapılacak olan radyoterapiden önce ovaryumların etkilenmesini engellemek için overlerin laparoskopi yöntemi ile ışınlama alanının dışına taşınmasına ovaryan transpozisyon denir (40). Bu yöntemin fertilitiyi koruma konusundaki başarısı %16-90 oranında değişmektedir (92). Over transpozisyonu sonrası sağlıklı gebeliklerin elde edildiği çalışma sonuçları mevcuttur. Morice ve ark. (1998)'nin çalışmasında servikal kanser nedeniyle radikal histerektomi yapılan 95 hastaya over transpozisyonu uygulanmış, hastaların %83'ünde over fonksiyonları korunmuştur 2 yıl boyunca takip edilen 37 hastanın 12'sinde 18 gebelik elde edilmiştir (93). Ancak kemoterapotikler sistemik etkili olduğundan bu yöntem ile overler yalnızca radyoterapinin zararlı etkisinden korunabilir.

Günümüzde, herhangi bir kanser tedavisi öncesinde yapılacak bir tüp bebek tedavisi ve sonrasında elde edilen embriyoların dondurularak saklanması, bu hastaların daha sonraki dönemlerde doğurganlığını sağlamada en geçerli yöntemdir. Bu yöntemle, daha sonra bu embriyoların çözümlenerek transfer edilmesi %59 gebelik, %26 canlı doğum şansı sağlayabildiği belirtilmiştir (94). Ancak bu en geçerli metodun uygulanabilmesi için hastanın üreme çağında olması, ve bir erkek partnerinin bulunması gerekmektedir. Aynı zamanda, kanser tanısı almış bir kadında kanser

tedavilerinin bir an önce başlama zorunluluğu, çoğu zaman tüp bebek uygulaması için yeterli zamanı tanımamaktadır.

Kadın fertilitasını korumada yumurtaların dondurularak saklanması diğer bir yöntemdir ve bu yöntemle elde edilen başarılı sonuçlarla giderek artmaktadır. İyi bilinen stimülasyon protokolleri nedeniyle hastalar için cazip olmakta ve sadece yumurtalar dondurulduğu için partnere ihtiyaç bulunmamaktadır.

Önceki yıllarda 'yavaş dondurma' adı verilen yöntemle dondurulan bu oositlerin çözülmesinden sonraki dölleme ve embriyo transferi ile elde edilen gebelik oranları, taze yumurtalarla yapılan tüp bebek tedavilerine oranla daha düşüktü. Ancak özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda, geliştirilen yeni dondurma tekniklerinin örneğin hızlı dondurma (vitrikasyon) tekniklerinin kullanımı ile çözme sonrası yumurta sağkalımı, dölleme ve gebelik oranlarına ilişkin daha iyi sonuçlar bildirilmiştir. Bu nedenle de yumurtaların dondurulmasına yeniden ilgi duyulmaya başlanmıştır. Yakında bu yöntemin standart pratik uygulamalar arasında yerini alması beklenmektedir (40).

Vitrikasyon tekniği ile dondurulup çözülen yumurtaların kullanımı ile dölleme oranlarının %70'lerin üzerine, gebelik oranlarının ise %40'ların üzerine çıkılabildiğini gösteren çalışmalar yapılmıştır. Dondurulmuş çözülmüş yumurtalar ile elde edilen gebelikler ve sonrası doğan çocukların takiplerinde; gebelik haftaları, ortalama doğum kiloları ve kromozom analizlerinde herhangi bir sorun saptanmamıştır Oosit stimülasyonu için yeterli zamana ihtiyaç duyulması ve cerrahi gerektirmesi ise bu yöntemin dezavantajıdır (40).

Ovaryum dokusunun dondurulması (kriyoprezervasyonu) ise diğer bir yöntemdir. En sık uygulanan yaklaşım tedaviden önce hastadan laparoskopik (karın açılmadan) yöntem ile alınan ve dondurulan yumurtalık dokusunun parçalar halinde re-implantasyonudur (tekrar vücuda yerleştirilmesi). Hastanın tedavisi bittikten ve iyileşme sağlandıktan sonra bu doku çözülerek hastaya transplante edilir. Ortotopik ovaryan doku transplantında bu doku kesitleri çözüldükten sonra bir paket şeklinde aynı veya karşı taraf yumurtalık bölgesine, yani anatomik yerine yerleştirilir, böylece doğal yolla hamilelik şansı olabilir. Ovaryum dokusunun heterotopik transplantasyonunda ise alınan doku, önkol ve karın duvarı gibi başka bölgelere yerleştirilir. Heterotopik transplantasyonun avantajı daha az invaziv cerrahidir, genel anestezi gerektirmez, iyileşme hızlıdır, ancak yumurta takibi zordur ve doğal gebelik

şansı yoktur, ayrıca heterotopik transplantasyon ile şimdiye kadar gebelik bildirilmemiştir (40).

Ovaryum dokusunun dondurularak saklanması klinik teknikler içinde özellikle ergenlik öncesi dönemde ovaryum fonksiyonlarının korunmasını sağlamada ümit verici olmuştur. İşlem için partnere ihtiyaç yoktur. Bu işlem üreme ve hormonal fonksiyonların yeniden başlamasını sağlayabilmektedir. Özellikle çocukluk çağı kanserlerinde uygun tedavi alternatifi olabilir. Ancak cerrahi işlem gerektirmesi ve başarı şansının halen düşük olması ise dezavantajlarıdır. Ayrıca 35 yaş üstü, yumurtalık rezervinin doğal olarak düşük olduğunu bildiğimiz kadınlarda yararlı olmadığı düşünülmektedir (40).

Olgunlaşmamış yumurtaların vücut dışında büyütülmesi ve olgunlaştırılmasında fertilitiyi koruma adına kullanılan yöntemlerden biridir. Anne karnında ve erişkin insan yumurtalığında bulunan yumurtaların büyük bir kısmı olgunlaşmamış durumdadır. Bundan dolayı olgunlaşmamış yumurtalar yoğun olarak bulunur. Ancak, büyümeleri ve döllenmeleri için bu şekilde elde edilmiş yumurtaların vücut dışında olgunlaştırılmaları (in vitro maturasyon (IVM)) gerekmektedir. Bu yöntemin klasik tüp bebek yöntemlerine göre avantajları düzenli adet gören kadınlarda hormonal baskılama veya hormonal enjeksiyonlar gerektirmemesi, böylece yan etki ve rahatsızlığı en aza indirmesi ve stresin azalmasıdır. Ancak bu yumurtaların vücut dışında büyütülmeleri ve olgunlaştırılmaları kolay değildir (40).

Olgunlaşmamış yumurtaların vücut dışında büyütülmeleri (IVM) sonrası ilk canlı doğum 1991 de gerçekleşmiştir (95). O tarihten günümüze kadar yaklaşık 1300'den fazla bebeğin bu yöntem sayesinde dünyaya geldiği tahmin edilmektedir (96). Takiplerde gebelik, doğum ve bebek sağlığı ile ilgili bir sorun bildirilmemiştir. Tüp bebek tedavisinde küçük yumurtaların toplanması ve in vitro yumurta matürasyonu önemli yapı taşlarından biri olmaya başlamıştır ve özellikle polikistik over hastalığı olan kadınlarda daha iyi bir seçenek olmaktadır. IVM' nin çocuk sağlığı ve gelişimi üzerine olan uzun dönemdeki muhtemel etkileri için ileri çalışmalara ihtiyaç vardır (40).

Bir diğer yöntem olan antiapoptotik (Hücre ölümünü engelleyen) sfingozin-1-fosfat (S1P) gibi ajanlarla farmakolojik koruma ise henüz deneysel aşamada olan bir yöntemdir. Yapılan bir çalışmada ovaryum dondurma işlemi sırasında S1P kullanılmasının folikül kaybını azaltacağı belirtilmiştir (97).

Kök Hücreler ve POY

Kök hücreler tahrip olan ovaryum dokusu ve foliküllerini onarmak için denenmektedir. Kök hücreler salgıladıkları sitokinlerle mikro-çevre oluşturarak parakrin etki ile doku onarımını sağlarlar. Ayrıca dokudaki diğer hücrelere dönüşebilme yetenekleri sayesinde dokunun yenilenmesine yardımcı olurlar. Deney hayvanlarında yapılan çalışmalarda değişik tekniklerle işaretlenen mezenkimal kök hücrelerin ovaryumlardaki foliküllerin teka tabakalarına kadar ulaştığı gösterilmiştir (22, 30-34).

Kök hücreler günümüzde artık birçok hastalığın tedavisinde kullanılmakla birlikte pekçok hastalık için de umut kaynağı haline gelmiş bulunmaktadır. Henüz deney aşamasında olmasına rağmen kök hücrelerin birçok hastalığın tedavisinde kullanılabileceğine dair çok sayıda çalışma vardır. Bizim çalışmamıza paralel olarak POY'de kök hücre tedavisi uygulayan çalışmalardan bazıları şunlardır:

Takareha ve arkadaşları; yağ dokudan elde edilen mezenkimal kök hücrelerin(ADMSC), kemik iliği kök hücrelerinin ve sıçan kuyruğundan elde edilen fibroblast hücrelerinin siklofosamid enjekte edilen fare ve sıçanlarda ovaryum fonksiyonu üzerine etkilerini araştırmışlar. Çalışmalarında puberte dönemindeki sıçan (7-8 haftalık) ve fareleri (5 haftalık) kullanmışlar. Bu çalışmada ADMSC'lerin ovaryumlarda anjiogenezi ve olgun folikül sayısını arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca bu CTX+ADMSC alan sıçanların çiftleşmeleri sonucu doğum sayısı ve doğan yavruların sağlık durumu açısından kontrol grubundaki sıçanlar ile arasında önemli bir fark gözlenmezken, sadece CTX alan grupta önemli oranda fertilité kaybı gözlenmiştir (30).

Sıçanlarda oluşturulan prematür ovaryan yetmezlik modelinde insan umbilikal kord mezenkimal kök hücrelerinin etkisini araştıran çalışmada; kök hücrelerin sıçanların serum FSH,E2 ve AMH seviyelerinin düzelmesini, apoptozun azalmasını sağladığı ve folikülogenezi geliştirdiği belirtilmiştir (31,32).

Zhen Wang ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise menstruasyon kanından elde edilen kök hücrelerin (MKKH) POY oluşturulan farelerde iyileştirici etkisi olduğu belirtilmiştir. Kuyruk veninden verilen kök hücrelerin ovaryuma ulaştığı, ovaryumdaki

folikül sayısını arttırdığı, fibrozisi ve granuloza hücrelerindeki apoptozu azalttığı ve sex hormonlarının da normal seviyelerine dönmesini sağladıkları gösterilmiştir. Çalışmadaki PCR sonuçları MKKH'lerin diğer sitokinlere oranla daha fazlamiktarda FGF2 sitokini salgıladığı göstermiştir bu yüzden MKKH'lerin koruyucu etkisini FGF2 salgılayarak yaptığı düşünülmüştür (33).

Yapılan bir diğer kök hücre çalışmasında, insan amniyotik membranından elde edilen mezenkimal kök hücrelerin (hAM-MSK) ve ADMSC'nin POY oluşturulmuş ratlara ayrı ayrı verilmesi sonucu, hAM-MSK'nin terapotik etkisinin ADMSC'ye göre daha fazla olduğu belirtilmiştir (34).

POY'de yapılan kök hücre çalışmalarında PTEN/AKT/FOXO3a yolağına daha önce bakılmamıştır. Bu yüzden çalışmamızın immünohistokimya ve western bulgularını bu çalışmalar ile kıyaslayamadık.

İmmünohistokimyasal sonuçlarımız mezankimal kök hücrelerin PTEN/AKT/FOXO3a yolağını aktiflediğini göstermektedir.

Hematoksilen eosinle boyanan preparatlarda yalnızca CTX uygulanan gruplarla kontrol ve CTX+kök hücre uygulanan gruplar arasında histolojik olarak oldukça farklılıklar vardı. CTX grubunda çoğunlukla ovaryumda bütünlük kaybolmuş folliküllerde bozulmalar belirgin hale gelmişti. Bu grupta antral follikül oranı oldukça azalmıştı ($p=0.002$). Kök hücre uygulanan grupta ise CTX' in oluşturduğu hasarın büyük ölçüde kaybolduğu folliküllerin normal görünümüne yakın izlendiği ve antral follikül oranının oldukça arttığı izlendi ($p=0,007$).

MikroRNA' lar ve POY

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, MikroRNA (miRNA)' ların da POY' un gelişiminde ve tedavisinde rol oynadığı belirtilmiştir.

Plazma membranı ile füzyon sonrasında endozomal membran bölümünden türetilen çapı 30 ila 120 nm arasındaki yapılara ekzozom denir. Hücreler arası iletişimde önemli bir rol oynadıklarına dair önemli ölçüde kanıtlar bulunmaktadır. Nitekim, hedef hücreleri reseptör aracılı etkileşimlerle doğrudan uyarabilirler veya içerisindeki proteinler, mRNA' lar, mikroRNAlar ve organeller gibi biyoaktif moleküller ile uyarabilirler (98). Son yıllarda yapılan çalışmalar, ekzozom aracılı RNA dağıtımının hedef hücrelerin kaderinin düzenlenmesine katkıda bulunduğunu belirtmektedir (99,100). Kök hücrelerden salınan ekzozomlar, kök hücre tedavisinde faydalı bir

etkiye sahip belirli bir hücre-hücre etkileşimi için yeni bir araç olarak bildirilmiştir (101). Buna göre, kök hücreler ile hedef hücreler arasındaki eksozom aracılı etkileşimin tanımlanması klinikte POY' u tedavi etmek için yeni stratejiler sağlayabilir (22).

MiRNA'lar, ökaryotlarda 22 nükleotidden daha kısa kodlanmayan tek sarmallı RNA'lardır. Hedef mRNA'nın 3'-çevrilmemiş bölümünün (UTR) baz dizilerine bağlanarak hedef mRNA'nın bölünmesini veya translasyonunu düzenleyebilirler. MiRNA'lar, hücre çoğalması, apoptoz, farklılaşma ve patojen enfeksiyonu gibi bir dizi fizyolojik ve patolojik süreçte düzenleyici rol oynarlar (102). Birçok çalışmada, miRNA'ların follikül gelişiminde, foliküler atrezide, hormonların modülasyonunda, hücre apoptozisi ve çoğalmasında önemli roller oynadığı gösterilmiştir (103).

MiR-21, memelilerde en erken keşfedilen miRNA'lar arasındadır. Araştırmalar, miR-21'in birçok hücredeki apoptotik regülasyonla ilişkili olduğunu göstermektedir (105-107). MiR-21, ayrıca granüloza hücrelerinin apoptozisi ve folikül gelişimi için düzenleyici niteliktedir (108). Bununla birlikte, miR-21'in kemoterapi ile indüklenen POY'de MKH'lerin tamir etkisini artırıp arttırmadığı ile ilgili birkaç rapor bulunmaktadır. miR-21 grubundaki ve miR-21-MKH grubundaki miR-21 ifadesi, diğer gruplarla karşılaştırıldığında belirgin biçimde yukarı doğru düzenlenmiştir; PTEN ve PDCD4'ün mRNA ekspresyonu ve protein ekspresyonu, Fosfamid ve MKH grubuna kıyasla önemli ölçüde azalmıştır. Ayrıca, follikül sayımlarında bir artış bulunmuştur, bu da kemoterapi ile indüklenen POF'de miR-21'in kısmi tamir etkisini göstermektedir (104).

MiR-23a ve miR-27a'nın doğrudan SMAD5' i hedeflediğini ve in vitro granüloza hücrelerinde FasL-Fas yolu yoluyla apoptosisi teşvik etme konusunda benzer işlevlere sahip olduklarını gösterilmiştir. Bu bulgular, miRNA' ların granüloza hücre apoptozundaki rollerini açıklamaya yardımcı olabilir ve gelecekteki klinik uygulamalarda oositlerin kurtarılması ve foliküler büyümenin kontrol edilmesini kolaylaştırabilirler (109).

Guan-Yu Xiao ve arkadaşları, AFSC'den türetilmiş eksozomların, iki gastrointestinal sistemdeki apoptozisi inhibe eden ve CTX sonrasında farelerde atreziden over foliküllerini önleyen iki mikroRNA (miRNA), miR-146a ve miR-10a içerdiğini ortaya koymuştur. AFSC'lerde miR-146a ve miR-10a ekspresyonunun düşürülmesinin, AFSC'den türetilen eksozomların zarar görmüş GK'ler üzerindeki

etkilerini in vitro olarak zayıflattığını buldular. Ayrıca, miR-10a'nın CTX verilen farelerde lipozomlar yoluyla doğrudan gönderilmesinin yumurtalık hücrelerinde apoptozu etkili bir şekilde bastırıldığını ve atrezide follikül kurtardığını gösterdiler. Bu bulgular, restoratif süreçte miR-10a'nın rolüne yeni ışık tutmaktadır ve POF tedavisi için hücre-dışı bir terapötik strateji vaad etmektedir (22).

Hem plazma hem de yumurtalık dokularından alınan örneklerle dayanan son çalışmalar, POF gelişiminde rol oynayan miRNA'ları tanımlamıştır. Dang ve ark. Çin'deki hastalarda yaptığı araştırmada POY'lu hastaların kontrol grubu olan sağlıklı kadınlarla karşılaştırıldıklarında daha düşük miR-22-3p plazma düzeylerine sahip olduklarını bildirmiştir. Ek olarak, azalan ovaryum rezerv ile azalmış miR-22-3p ekspresyonu arasında korelasyon bulmuşlardır (110). Önceki çalışmalarda ise, plazmada POY'lu ve sağlıklı kadınlar arasındaki farklı olarak ifade edilen miRNA'ları ve bir çok sinyal yolunu düzenleyen miRNA'ların rolünü tanımlanmıştır. MiR-23a POF hastalarının plazmasında up-regüle edilir ve miR-23a aşırı ekspresyonu XIAP (X' e bağlı apoptoz inhibitörü proteini) ve kaspaz-3 seviyelerini düşürür ve insan granülosa hücrelerinde apoptozu artırır. Bu sonuçlar, miR-23a'nın in vitro hem mRNA hem de protein seviyelerinde XIAP ekspresyonunu inhibe ederek potansiyel olarak granülosa hücre apoptozunu indüklediğini göstermektedir (111). Buna ek olarak, Kuang ve arkadaşları normal sıçanlardan alınan örneklerle karşılaştırıldığında, 4-vinilsikloheksen diepoksit (VCD) ile tetiklenen sıçan POF modellerinden yumurtalık dokusu örneklerinde toplam 63 upregulated ve 20 downregulated miRNA saptamıştır (112).

Son çalışmalar, miRNA tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP'ler) hastalık duyarlılığı ile ilişkili olduğunu göstermektedir. miRNA polimorfizm analizi ile ilgili bir çalışmada, Kore kökenli kadınlarda, miR-146aC> G, miR-196a2T> C ve miR-499A> G ve POF kombine genotipleri ile haplotipleri arasındaki ilişkiyi tanımlandı; sonuçlar, miRNA SNP'lerin neden olduğu miR-146a ve miR-196a2'nin transkripsiyonel sapmalarının potansiyel olarak POF gelişiminde rol oynadığını ortaya koymaktadır (113,114).

POY ve İn Vitro Aktivasyon (IVA) Yöntemi

IVA yöntemi üreme tıbbında oldukça yenidir. Kawamura ve ark. 100 POY hastasına uyguladıkları IVA yöntemi sonrası 2 canlı doğum ve henüz doğum yapmamış 3 hastalarının gebe olduğunu bildirmiştir. Bu yöntemde çok az primordiyal folikülü kalan (<1000) POY hastalarından laparoskopik olarak ovaryum korteksinden alınan

parçalar labaratuvar ortamında PTEN'i baskılayan veya PI3K'yı arttıran kimyasal sıvıların içerisinde 2 gün bekletildikten sonra hastalara tekrar transplante edilmiştir. Transplantasyondan 6 ay sonra klasik tüp bebek tedavisi uygulanmıştır. IVA yöntemi özellikle ovaryan rezervi çok düşük olan hastalar için düşünülmektedir.

SONUÇ

Bizim çalışmamızda literatür bulgularına paralel şekilde CTX' in PTEN yolağındaki etkisinin akut olduğunu izledik. Ancak CTX uygulandığı dönemde ovaryum dokusuna ciddi hasarlar vermekte ve bu hasarlar geri dönmemektedir.

Mezenkimal kök hücreler primordial follikülleri aktiflemektedir. Bunun yanısıra CTX'in neden olduğu hasarları tedavi etmektedir. Bu tedavi olasılıkla salgıladıkları faktörlerin parakrin etkisi ile olmaktadır. Ayrıca ovulasyona giden antral follikül sayısını da artırmaktadır. PTEN/AKT/FOXA3a yolağı primordial folliküllerde etkili olduğu için ayrıntılı immunohistokimyasal analizler bu folliküllerde yapılmıştır. Bu analizlere göre mezenkimal kök hücreler özellikle AKT'nin ve FOXA3a'nın aktiflenmesinde etkilidirler.

Mezenkimal kök hücre uygulaması her ne kadar primordial havuzu tetiklesede aktiflenen folliküllerin normal yapısını koruyarak ovulasyona ulaşmasını sağlıyor gibi görünmektedirler.

KAYNAKLAR

- 1.Türkiye İstatistik Kurumu:<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=21526>
Erişim tarihi: 26.12.2016
- 2.Bedoschi G, Oktay K. Current approach to fertility preservation by embryo cryopreservation. *Fertility and Sterility* 2013;99:1496–1502
- 3.Siegel R, Ward E, Brawley O, Jemal A. Cancer statistics: The impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths *CA Cancer J Clin.* 2011 Jul-Aug; 61(4):212-36
- 4.Donnez J, Dolmans MM. Fertility preservation in women. *Nature Reviews Endocrinology* 2013;9:735–49
- 5.Yuksel A, Bildik G, Senbabaoglu F, Akin N, Arvas M, Unal F et al. The magnitude of gonadotoxicity of chemotherapy drugs on ovarian follicles and granulosa cells varies depending upon the category of the drugs and the type of granulosa cells. *Human Reproduction* 2015;30(12):2926-35
- 6.Donnez J, Martinez-Madrid B, Jadoul P, Van Langendonck A, Demylle D, Dolmans MM. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review. *Human Reproductive Update* 2006; 12:519-35
- 7.Donnez J, Jadoul P, Squifflet J, Van Langendonck A, Donnez O, Van Eyck AS et al. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation in cancer patients. *Best Practice&Research Clinical Obstetric&Gynecology* 2010; 24:87–100
- 8.Wallace WH, Anderson RA, Irvine DS. Fertility preservation for young patients with cancer: Who is at risk and what can be offered? *Lancet Oncology* 2005; 6: 209–19
- 9.Anderson RA and Wallace HB. Antimüllerian hormone, the assessment of the ovarian reserve, and the reproductive outcome of the young patient with cancer. *Fertility and Sterility* 2013; 99:1469–75
- 10.Jadoul P, Donnez J.How does bone marrow transplantation affect ovarian function and fertility? *Current Opinion in Obstetrics Gynecology* 2012;24:164–171
- 11.Wallace WH, Thomson AB, Saran F, Kelsey TW. Predict in gage of ovarian failure after radiation to a field that includes the ovaries. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics* 2005;62:738–44
- 12.Schmidt KT. et al. Autotransplantation of cryopreserved ovarian tissue in 12 women with chemotherapy-induced premature ovarian failure: the Danish experience. *Fertility and Sterility* 2011;95:695–701
13. Kayaalp Tibbi Farmakoloji, Ankara: Hacettepe-Taş 2005, 323-25

14. Moignet A, Hasanali Z, Zambello R, Pavan L, Bateau B, Tournilhac O et al. Cyclophosphamide as a first-line therapy in LGL leukemia. *Leukemia* 2014, 28 (5): 1134–36.
15. Lawson M, Vasilaras A, De Vries A, MacTaggart P, Nicol D. Urological implications of cyclophosphamide and ifosfamide, *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology* 2008; 42 (4): 309–17
16. Schiavoni G, Sistigu A, Valentini M, Mattei F, Sestili P, Spadaro F et al. Cyclophosphamide synergizes with type I interferons through systemic dendritic cell reactivation and induction of immunogenic tumor apoptosis. *Cancer Research* 2011; 71:768-78
17. Bracci L, Moschella F, Sestili P, La Sorsa V, Valentini M, Canini I et al. Cyclophosphamide enhances the antitumor efficacy of adoptively transferred immune cells through the induction of cytokine expression, B-cell and T-cell homeostatic proliferation, and specific tumor infiltration. *Clinical Cancer Research* 2007;13:644–53
18. Matar P, Rozados VR, Gervasoni SI, Scharovsky GO. Th2/Th1 switch induced by a single low dose of cyclophosphamide in a rat metastatic lymphoma model. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 2002; 50:588–96
19. Ghiringhelli F, Larmonier N, Schmitt E, Parcellier A, Cathelin D, Garrido C et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress tumor immunity but are sensitive to cyclophosphamide which allows immunotherapy of established tumors to be curative. *European Journal of Immunology* 2004; 34:336–44
20. Druckenmiller S, Goldman KN, Labella PA, Fino ME, Bazzocchi A, Noyes N. Successful Oocyte Cryopreservation in Reproductive-Aged Cancer Survivors. *Obstetrics & Gynecology*. Mar 2016;127(3):474–80
21. Sonmezer M, Oktay K. Fertility preservation in female patients *Human Reproduction Update* 1 May 2004; Volume 10, Issue 3: 251–266

- 22.Xiao GY, Cheng CC, Chiang YS, Cheng WTK, Liu IH, Wu SC. Scientific. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. Reports 2016; 6, Article number: 23120
- 23.Adhikari D, Risal S, Liu K, Shen Y. Pharmacological Inhibition of mTORC1 Prevents Over-Activation of the Primordial Follicle Pool in Response to Elevated PI3K Signaling PLoS One. 2013; 8(1): e53810
24. Jang H, Lee OH, Lee Y, Yoon H, Chang EM, Park M et al. Melatonin prevents cisplatin-induced primordial follicle loss via suppression of PTEN/AKT/FOXO3a pathway activation in the mouse ovary. Journal of Pineal Research 2016 Apr;60(3):336-47
- 25.Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. Rev Reprod 1996; 1:162–172. 52.
- 26.Morgan S, Anderson RA, Gourley C et al. How do chemotherapeutic agents damage the ovary? Hum Reprod Update 2012; 18:525–535.
27. Kalich-Philosoph L, Roness H, Carmely A, Fishel-Bartal M, Ligumsky H, Paglin S et al. Cyclophosphamide triggers follicle activation and "burn out"; AS101 prevents follicle loss and preserves fertility. Sci Transl Med. 2013; 5(185):185ra62
- 28.Jagarlamudi K, Liu L, Adhikari D, Reddy P, Idahl A, Ottander U et al. Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. PLOS ONE 2009;4:e6186
- 29.Chang EM, Lim E, Yoon S, Jeong K, Bae S, Lee DR et al. Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/AKT/FOXO3a Pathway which Leads to Loss of Ovarian Reserve in Mice. PLOS ONE 2015; 10(12): e0144245
- 30.Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, Kuroda T, Yamadera R, Sano C et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. Laboratory Investigation 2013;93:181-193
- 31.Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. BioMed Research International 2016 Mar: 2517514
32. Elfayomy AK, Almasry SM, El-Tarhouny SA, Eldomiaty MA. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: Possible direct and indirect effects. Tissue Cell 2016 Aug;48(4):370-82
- 33.Wang Z, Wang Y, Ting Yang T, Li J and Yang X. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. Stem Cell Research & Therapy 2017; 8:11

- 34.Fouada H, Sabrya D, Elsetohy K, Fathya N. Therapeutic efficacy of amniotic membrane stem cells and adipose tissue stem cells in rats with chemically induced ovarian failure. Journal of Advanced Research Volume 7, Issue 2, March 2016, Pages 233-241
- 35.Mescher AL. Junqueira's Temel Histoloji. Solakoğlu S, Çev. Ed, 13. Baskı,İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2015:449-458.
- 36.Ross MH, Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. Baykal B, Çev. Ed, 6.Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, 2014: 830-39.
- 37.Odevi. <http://www.odevi.org/soru/menstrual-dongu-boyunca-yumurtalikta-meydana-gelen-degisiklikler> Erişim tarihi:27.02.2018
- 38.Yardımcı Üreme Teknikleri, Editör: Çelik Ö. Baskı Nobel Kitabevi 2011:159
- 39.Ünal F. Ratlarda siklofosfamide bağlı ovaryan toksisitenin azaltılmasında n-asetilsistein ile arttırılmış hücre içi glutatyon düzeyinin rolünün araştırılması (Tıpta Uzmanlık Tezi). İstanbul. İstanbul Üniversitesi. 2009
- 40.Tup bebek - genetik. <http://www.tupbebek-genetik.com/ayin-konusu/kanser-sonrasi-hastalarin-dogurganligini-nasil-koruyalim> Erişim tarihi: 4.1.2017
- 41.Nelson LM, Anasti JN, Kinzey JN et al. Development of luteinised Graffian follicles in patient with karyotypically normal spontaneous premature ovarian failure. J Clin Endocrinol Metab 1994; 79; 1470-75
- 42.Richardson SJ, Nelson J. Follicular depletion during the menopausal transition. Ann NY Acad Sci 1990;592:13-20
- 43.Coulam CB, Adamson SC, Annegers JF. Incidence of premature ovarian failure. Obstet Gynecol. 1986 Apr;67(4):604-6.
- 44.Vegetti W, Marozzi A, Manfredini E, Testa G, Alagna F, Nicolosi A et al. Premature ovarian failure. Mol Cell Endocrinol. 2000 Mar 30;161(1-2):53-7.
- 45.Kara N, Tural S, Oktena G, Kocak I, Tekcan A Prematüre ovaryen yetmezlik ve 46,X,del(X)(q21). Journal of Experimental and Clinical Medicine 2012; 29:167-168.
- 46.Goswami D, Conway GS. Premature ovarian failure Human Reproduction Update, Volume 11, Issue 4, 1 July 2005, Pages 391–410
- 47.The ESHRE Capri Workshop Group. Genetic aspects of female reproduction. Human Reproduction Update, Volume 14, Issue 4, 1 July 2008, Pages 293–307
- 48.Powell CM, Taggart RT, Drumheller TC, Wangsa D, Qian C, Nelson LM, White BJ. Molecular and cytogenetic studies of an X; autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. Am. J. Med. Genet.1994; 52, 19-26

- 49.Krauss C, Turksoy RN, Atkins L, McLaughlin C, Brown LG, Page DC. Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arm of the X chromosome. *New Engl. J. Med.* 1987; 317: 125-131
- 50.Rebar RW, Connolly HV. Clinical features of young women with hypergonadotropic amenorrhea. *Fertile Steril* 1990; 53:804-810
- 51.Jee BC, Lee JR, Youm H, Suh CS, Kim SH, Moon SY. Effect of sphingosine-1-phosphate supplementation on follicular integrity of vitrified-warmed mouse ovarian grafts. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 152 (2010), pp. 176-180
- 52.Van Asselt et al. Heritability of menopausal age in mothers and daughters. *Fertil Steril* 2004 Nov; 82(5):1348-51
- 53.Ponay N, Fenton A. Premature ovarian failure: a growing concern. *Climamatrix* 2008 Feb;11:1-3
- 54.Sklar CA, Mertens AC, Mitby P et al. Premature Menopause in survivors of childhood cancer: a report from the Childhood Cancer Survivor Study. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:890-96.
- 55.Cowahock FS, McCabe JL, Montgomery BB. Pregnancy after corticosteroid administration in premature ovarian failure (polyglandular endocrinopathy syndrome). *Am J Obstet Gynecol* 1988;158:1118-9
- 56.Jankowska K. Premature ovarian failure. *Menopause Review/Przegląd Menopauzalny* 2017 July 16(2): 51–56.
- 57.Tuch BE "Stem cells — a clinical update". *Australian Family Physician* 2006; 35 (9): 719–21
- 58.Karaöz e. Temel Kök Hücre Teknikleri ve Moleküler Biyoloji Uygulamaları Kursu. Kocaeli Üniversitesi Kök Hücre ve Gen Tedavileri Araştırma Merkezi, Kocaeli, 2010
- 59.Alp CAN; Kök hücre, biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları kitabı 2014
- 60.Kök hücre biyolojisi ve klinik uygulamalar. 1, Ankara: türkiye bilimler akademisi, 2009
- 61.Doç.Dr.yusufhan yazır 14. Kök hücre ve doku mühendisliği kursu: Temel kök hücre teknikleri ve moleküler biyoloji uygulamaları 2015
- 62.Can A. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. TÜBA: Ankara: 2009: 15-22.
- 63.McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; 21:200-14
- 64.Hansen KR, Knowlton NS, Thyer AC et al. A new model of reproductive aging; the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum Reprod* 2008;23:699-708

- 65.Reddy P, Adhikari D, Zhen W, Liang S, Hämäläinen T, Tohonen V et al. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. *Hum Mol Genet* 2009; 18: 2813–24
- 66.Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997; 275:1943–7
67. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 1997; 15:356–62
- 68.Zheng W, NAGARAJU G, Liu Z et al. Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases(PI3Ks) signaling in the mammalian ovary. *Mol Cell Endocrinol* 2012;356:24-30
69. Cantley LC, Neel BG. New insights into tumor suppression: PTEN suppresses tumor formation by restraining the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*1999; 96:4240–4245.
- 70.Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009;30:624-712
71. Jagarlamudi K, Liu L, Adhikari D et al. Oocyte-specific deletion of PTEN in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. *PLoS One* 9 July 2009
- 73.Peccatori FA, Azim HA Jr, Orecchia R, Hoekstra HJ, Pavlidis N, Kesic V et al. Cancer, pregnancy and fertility: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2013, 24, vi60–vi70.
- 74.Loren AW, Mangu PB, Beck LN, Brennan L, Magdalinski AJ, Partridge AH et al. American Society of Clinical Oncology. Fertility preservation for patients with cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline update. *J. Clin. Oncol.* 2013, 31, 2500–2510
75. Paluch-Shimon S, Pagani O, Partridge AH, Bar-Meir E, Fallowfield L, Fenlon D et al. Second international consensus guidelines for breast cancer in young women (BCY2). *Breast* 2016, 26, 87–99.
- 76.Jang H, Hong K and Choi Y. Melatonin and Fertoprotective Adjuvants: Prevention against Premature Ovarian Failure during Chemotherapy.
- 77.Mahajan N. Fertility preservation in female cancer patients: An overview. *J. Hum. Reprod. Sci.* 2015, 8, 3–13
- 78.Sklar CA, Mertens AC, Mitby P, Whitton J, Stovall M, Kasper C. et al. Premature menopause in survivors of childhood cancer: A report from the childhood cancer survivor study. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006, 98, 890–96
- 79.Bath LE, Wallace WH, Shaw MP, Fitzpatrick C, Anderson RA. Depletion of ovarian reserve in young women after treatment for cancer in childhood: Detection by anti-Mullerian hormone, inhibin B and ovarian ultrasound. *Hum. Reprod.* 2003; 18, 2368–74

80. Anderson RA, Themmen AP, Al-Qahtani A, Groome NP, Cameron DA. The effects of chemotherapy and long-term gonadotrophin suppression on the ovarian reserve in premenopausal women with breast cancer. *Hum. Reprod.* 2006, 21, 2583–92
81. Himmelstein-Braw R, Peters H, Faber M. Morphological study of the ovaries of leukaemic children. *Br. J. Cancer* 1978, 38: 82–87.
82. Meirou, D.; Nugent, D. The effects of radiotherapy and chemotherapy on female reproduction. *Hum. Reprod. Update* 2001, 7: 535–43.
83. Michel De Vos, Paul Devroey, Bart C J M Fauser. Primary ovarian insufficiency. *The Lancet* 2010 Volume 376, No. 9744: 911–921
84. Eun Mi Chang, Eunjin Lim, Sookyoung Yoon, Kyungah Jeong, Sijeong Bae, Dong Ryul Lee et al. Cisplatin Induces Overactivation of the Dormant Primordial Follicle through PTEN/ AKT/FOXO3a Pathway which Leads to Loss of ovarian Reserve in Mice *Plos One* 2015; 10(12), e0144245
85. Domenico Accili, Karen C Arden. FoxOs at the Crossroads of Cellular Metabolism, Differentiation, and Transformation. *CELL* Volume 117, Issue 4, p421–426, 14 May 2004
86. Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocr Rev* 2009; 30:624– 712
87. Marie McLaughlin, Hazel L. Kinnell, Richard A. Anderson and Evelyn E. Telfer. Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. *Mol Hum Reprod* 2014; 20(8): 736–44
88. Lia J, Kawamura K, Chenga Y, Liuc S, Kleina C, Liuc S, Duanc EK and AaronJ.W.Hsueha. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *PNAS* 2010 June, 107 (22) :10280-84
89. Adhikari D, Gorre N, Risal S, Zhao Z, Zhang H, Shen Y et al. The Safe Use of a PTEN Inhibitor for the Activation of Dormant Mouse Primordial Follicles and Generation of Fertilizable Eggs. *PLOS ONE* June 27, 2012
90. Turner NH, Partridge A, Sanna G, Di Leo A and Biganzoli L. Utility of gonadotropin-releasing hormone agonists for fertility preservation in young breast cancer patients: the benefit remains uncertain. *Ann Oncol* 2013;24: 2224-2235
91. Bildik G, Akin N, Senbabaoglu F, Sahin GN, Karahuseyinoglu S, Ince U et al. GnRH agonist leuprolide acetate does not confer any protection against ovarian damage induced by chemotherapy and radiation in vitro. *Hum Reprod.* 2015;30(12):2912-25

92. Oktay K, Oktem O. Fertility preservation medicine: a new field in the care of young cancer survivors. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53(2):267-73
93. Morice P, Juncker L, Rey A, El-Hassan J, Haie-Meder C, Castaigne D. Ovarian trans-position for patients with cervical carcinoma treated by radiosurgical combination. *Fertil Steril* 2000;74(4):743-8. 43
94. Kenny A Rodriguez-Wallberg Kutluk Oktay. Fertility preservation during cancer treatment: clinical guidelines, *Cancer Management and Research* 2014; 6: 105–117
95. Cha KY, Koo JJ, Ko JJ, et al. Pregnancy after in vitro fertilization of human follicular oocytes collected from nonstimulated cycles, their culture in vitro and their transfer in a donor oocyte program. *Fertil Steril*. 1991;55(1):109
96. Suikkari AM. In-vitro maturation: its role in fertility treatment. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2008; 20(3): 242-48
97. Tsai YC, Tzeng CR, Wang CW, Hsu MI, Tan SJ and Chen CH. Antiapoptotic Agent Sphingosine-1-Phosphate Protects Vitrified Murine Ovarian Grafts. *Reprod Sci*. 2014 Feb; 21(2): 236–43
98. Camussi, G., Deregibus, M. C., Bruno, S., Cantaluppi, V. & Biancone, L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int*. 2010; 78, 838–848
99. Valadi, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol*. 2007; 9, 654–672
100. Deregibus, M. C. et al. Endothelial progenitor cell-derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood* 2007; 110, 2440–48
101. Bruno, S. et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2009; 20, 1053–67
102. Ying Li, Ying Fang, Ying Liu and Xiaokui Yang. MicroRNAs in ovarian function and disorders. *Journal of Ovarian Research* 2015;8:51
103. Jiawei Zhou, Bin Lei, Huanan Li, Lihua Zhu, Lei Wang, Hu Tao, Shuqi Mei and Fenge Li. MicroRNA-144 is regulated by CP2 and decreases COX-2 expression and PGE2 production in mouse ovarian granulosa cells. *Cell Death&Disease* 2017 Feb; 8(2)
104. Xiafei Fu, Yuanli He, Xuefeng Wang, Dongxian Peng, Xiaoying Chen, Xinran Li and Qing Wang. Overexpression of miR-21 in stem cells improves ovarian structure and function in rats with chemotherapy-induced ovarian damage by targeting PDCD4 and PTEN to inhibit granulosa cell apoptosis. *Stem Cell Research&Therapy* 2017;8:17

105. Chan JK, Blansit K, Kiet T, Sherman A, Wong G, Earle C, et al. The inhibition of miR-21 promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2014;132:739–44
106. Shang C, Guo Y, Hong Y, et al. MiR-21 up-regulation mediates glioblastoma cancer stem cells apoptosis and proliferation by targeting FASLG. *Mol Biol Rep.* 2015;42:721–7. 11
107. Pennelli G, Galuppini F, Barollo S, Cavedon E, Bertazza L, Fassan M, et al. The PDCD4/miR-21 pathway in medullary thyroid carcinoma. *Hum Pathol.* 2015; 46:50–7
108. Carletti MZ, Fiedler SD, Christenson LK. MicroRNA 21 blocks apoptosis in mouse periovulatory granulosa cells. *Biol Reprod.* 2010;83:286–95
109. Nie M, Song Yu, Sha Peng, Ying Fang, Hongmei Wang and Xiaokui Yang. miR-23a and miR-27a Promote Human Granulosa Cell Apoptosis by Targeting SMAD51 Mingyue. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* (2015) 93(4):98, 1–10
110. Dang Y, Zhao S, Qin Y, Han T, Li W, Chen ZJ. MicroRNA-22-3p is downregulated in the plasma of Han Chinese patients with premature ovarian failure. *Fertil Steril.* 2015;103(3):802–7
111. Yang X, Zhou Y, Peng S, Wu L, Lin HY, Wang S, et al. Differentially expressed plasma microRNAs in premature ovarian failure patients and the potential regulatory function of mir-23a in granulosa cell apoptosis. *Reproduction* 2012;144:235–44
112. Kuang H, Han D, Xie J, Yan Y, Li J, Ge P. Profiling of differentially expressed microRNAs in premature ovarian failure in an animal model. *Gynecol Endocrinol.* 2014;30:57–61
113. Rah H, Jeon YJ, Shim SH, Cha SH, Choi DH, Kwon H, et al. Association of miR-146aC>G, miR-196a2T>C, and miR-499A>G polymorphisms with risk of premature ovarian failure in Korean women. *Reprod Sci.* 2013;20:60–8
114. Ying Li, Ying Fang, Ying Liu and Xiaokui Yang. MicroRNAs in ovarian function and disorders. *Journal of Ovarian Research* 2015; 8:51