



OVARYUM DOKUSUNDA KÖK HÜCRE VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Duygu GÖK

**Mayıs 2011
DENİZLİ**

**OVARYUM DOKUSUNDA KÖK HÜCRE VARLIĞININ
ARAŞTIRILMASI**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı**

Duygu GÖK

Danışman: Prof. Dr. Gülçin ABBAN

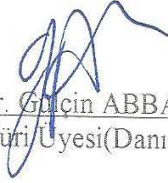
**Mayıs, 2011
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

Duygu GÖK tarafından, Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE yönetiminde hazırlanan “Ovaryum Dokusunda Kök Hücre Varlığının Araştırılması” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Recep KUTLUBAY
Jüri Başkanı



Prof. Dr. Gülçin ABBAN METE
Jüri Üyesi (Danışman)



Doç. Dr. Güven ERBİL
Jüri Üyesi



Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 2016/11 tarih ve 11/9-6 sayılı kararıyla onaylanmıştır.



Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince her konuda yanımda olan, manevi yönden desteğini hissettiren; tezimin planlanmasında, içeriğinin düzenlenmesinde, tez sonuçlarının yorumlanmasında, tez çalışması için ortamın sağlanmasında ve tezin her aşamasında özverilerini, bilgilerini ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Gülçin ABBAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

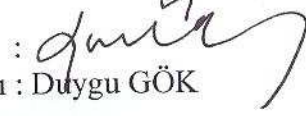
Deneylelimin yürütülmesi esnasında, tüm laboratuvar imkânlarından faydalanmamı sağlayan ve laboratuvar çalışmalarında önerileri ile bana yol gösterici olan Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Recep KUTLUBAY'a, Sayın Doç. Dr. N. Lale ŞATIROĞLU TUFAN'a, Sayın Doç. Dr. A. Çevik TUFAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Erdoğan KOCAMAZ'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. E. Oğuzhan OĞUZ'a, deneysel çalışmalar sırasında paylaştığı bilgileri ve manevi desteği ile yanımda olan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Dr. Yavuz DODURGA'ya, tezimin histolojik preparasyon aşamalarında tecrübelerinden yararlandığım Teknisyen Sayın Erdinç KARATAŞ'a ve Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda çalışan ve tezimin yapılmasında emeği geçen herkese teşekkür ederim.

Varlıkları ile kendimi şanslı ve güvende hissetmemi sağlayan, her türlü konuda yanımda olarak beni cesaretlendiren, hayatımdaki en önemli insanlar babam Mustafa GÖK, annem Fatma GÖK ve kardeşim Zeynep GÖK'e; ayrıca hayatıma renk katan ve beni mutlu kılan tüm arkadaşlarıma çok teşekkür ederim.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza

Öğrenci Adı Soyadı : Duygu GÖK



ÖZET

OVARYUM DOKUSUNDA KÖK HÜCRE VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Gök, Duygu

Yüksek Lisans Tezi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Gülçin ABBAN

Mayıs 2011, 70 sayfa

Bu tezde kök hücre belirteçlerinden Nanog, Oct 3/4, c-Kit ve SSEA-1 ifadesinin yenidoğan, pubertal, ergin ve yaşlı ovaryum dokusundaki varlığı, yerleşimi ve dağılımı incelendi.

Çalışmada yenidoğan (n=6), pubertal dönem (n=6), ergin dönem (n=6) ve yaşlı dönem (n=6) Balb/c tipi dişi fare kullanıldı. Nanog, Oct 3/4, c-Kit ve SSEA-1 kök hücre belirteçleri immunohistokimyasal ve reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyon yöntemleriyle incelendi ve resimlendi.

Yenidoğan, pubertal ve ergin dönem ovaryumunda Nanog, Oct 3/4, c-Kit ve SSEA-1 oositlerde pozitif. Bununla birlikte ergin ovaryum dokularında reaksiyon daha kuvvetli idi. Ayrıca ergin ovaryumunda sekonder ve tersiyer folikül granuloza hücreleri Nanog, Oct 3/4, c-Kit ve SSEA-1 için pozitif. Yaşlı gruplarda oositler ve granuloza hücreleri tüm belirteçler için negatif. Yenidoğan gruplarında ovaryum yüzey epiteli Nanog ve Oct 3/4 için pozitifken SSEA-1 ve c-Kit için negatif. Pubertal dönemde ovaryum yüzey epiteli dört belirteç içinde negatif. Ergin dönem ovaryum yüzey epiteli ise yalnızca SSEA-1 için negatif diğer belirteçler için pozitif. Yaşlı gruplarda ise ovaryum yüzey epiteli tüm belirteçler için pozitif ve negatif gösteren hücrelerden oluştu.

Ovaryum kanseri yüksek mortalite oranına sahip olup değişik faktörlere bağlıdır. En son yapılan çalışmalar da embriyonik kök hücrelerinin kanser kök hücrelerine dönüşerek hastalığa neden olduğu hipotezi yaygın olarak kabul edilmektedir.

Polikistik Over Sendromu (PCOS) nedeni bilinmeyen endokrin bir hastalıktır. Bu hastalıkta foliküller gelişmemekte ovulasyon olmamaktadır. Hastalarda primordial ve primer foliküller olmasına karşın sekonder ve tersiyer foliküller yoktur. PCOS'ta ortaya atılan olası neden anormal oosit üretimidir. Anormal oosit üretiminin ovaryan embriyonik kök hücreleriyle ilgili olabileceği bildirilmektedir.

Ovaryum dokusunda pluripotent ve embriyonik kök hücre belirteçlerini ifade eden hücrelerin işlevinin araştırılması preovaryan yetmezlik, polikistik over sendromu ve kanser gibi üreme sistemi hastalıklarının nedenlerinin anlaşılmasında ve tedavisinde oldukça önemli bir yere sahip olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Ovaryum, Kök hücreler

ABSTRACT

ANALYSIS OF STEM CELL PRESENCE IN OVARIAN TISSUE

Gök, Duygu

M.Sc. Thesis in Histology and Embriyology Department

Supervisor: Prof. Dr. Gülçin ABBAN

May 2011, 70 pages

In our study, we investigated the expression patterns of embryonic stem cell markers including Nanog, Oct 3/4, c-kit and SSEA-1 from the newborn to aging period in ovary tissue.

Immunohistochemistry and Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction were used to examine the expression of Nanog, Oct 3/4, c-Kit and SSEA-1 in newborn period (n=6), pubertal period (n=6), adult period (n=6) and aging period (n=6) in ovary tissues.

All markers were poorly positive in newborn oocytes, and negative in granulosa cells. Oocytes in newborn, pubertal and adult period were positive for nanog, Oct 3/4, c-Kit and SSEA-1. However, the expression of these markers in adult period was increased. In addition positive reaction for Nanog, Oct 3/4, c-Kit and SSEA-1 was seen in granulosa cells in seconder and tertiary follicles in adult ovary. Ovarian surface epithelium was negative for these markers in pubertal ovary. However in adult ovarian surface epithelium was negative for SSEA-1. In aging ovary, while oocytes and granulosa cells were negative ovarian surface epithelium was positive.

Ovary cancer has high mortality rate and also depends on various factors. The most recent studies suggested that embryonic stem cells cause disease by returning to cancer stem cell.

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is an endocrine disorder and has an unknown cause. Follicles do not develop in these patients and there is no ovulation. Although there are primordial and primer follicles, there are no seconder and primer follicles in this group of patients. It is believed that the reason for polycystic ovary syndrome is abnormal oocyte production. The number of oocytes is very low in preovarian failure and patients have early menopause. These results directed investigators to work on ovarian stem cell.

It is suggested that investigations on ovary stem cells and its function and effects on fertility will be helpful to understand mechanisms and to improve treatments for polycystic ovary syndrome, preovarian failure and disease such as cancer.

Key Words: Ovary, Stem cells

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
Özet	i
Abstract	ii
İçindekiler	iii
Şekiller Dizini	v
Tablolar Dizini	vi
Simge ve Kısaltmalar Dizini	vii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI	3
2.1. Gametogenez.....	3
2.1.1. Primordial Germ Hücreleri.....	3
2.2. Genital Sistemin Gelişimi.....	3
2.2.1. Gonadların Gelişimi.....	4
2.2.2. Farklanmamış Gonadlar.....	4
2.2.3. Cinsiyetin Belirlenmesi.....	4
2.2.4. Ovaryumların Gelişmesi.....	5
2.3. Ovaryumlar.....	6
2.3.1. Oogenesis.....	7
2.3.1.1. Doğum Öncesi Olgunlaşma (prenatal).....	7
2.3.1.2. Doğum Sonrası Olgunlaşma (postnatal).....	8
2.3.2. Kadın Üreme Siklusu (Genital Siklus).....	8
2.3.3. Ovaryum Siklusu.....	9
2.3.4. Foliküllerin Gelişmesi.....	10
2.3.5. Ovulasyon.....	12
2.3.6. Korpus Luteumun Gelişmesi.....	13
2.4. Kök Hücreler.....	14
2.4.1. Kök Hücrelerin Tanımı ve Kök Hücre Tipleri.....	14
2.4.2. Kök Hücre Araştırmalarının Tarihçesi.....	18
2.4.3. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri.....	21
2.4.3.1. Farklanma (Plastisite).....	21
2.4.3.2. Kendini Yenileme, Bölünme Biçimleri ve Kök Hücre Nişi.....	23
2.4.3.3. Köklülük (Stemness).....	26
2.5. Kök Hücre Kaynakları.....	27
2.5.1. Embriyonik Kök Hücreler.....	27
2.5.2. Embriyonik Kök Hücreleri Diğer Hücrelerden Ayıran Morfolojik, Genetik ve İmmünolojik Özellikleri.....	29
2.5.3. Embriyonik Kök Hücre Belirleyicileri.....	30
2.6. Hipotez ve Çalışmanın Amacı.....	33
3. MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları.....	34
3.2. Deneysel Uygulama.....	34

3.3. Reaktif Hazırlanması.....	35
3.4. Uygulanan Teknikler.....	35
3.4.1. Doku Takip Yöntemi	35
3.4.2. İmmünohistokimyasal Boyama.....	35
3.4.3. Taze Dokudan RNA İzolasyonu	37
3.4.4. Revers Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi	38
4. BULGULAR	40
4.1. RT-PCR Bulguları.....	40
4.2. Ovaryum Dokusunda Nanog İfadesi.....	41
4.3. Ovaryum Dokusunda SSEA-1 İfadesi	43
4.4. Ovaryum Dokusunda Oct 3/4 İfadesi.....	45
4.5. Ovaryum dokusunda c-Kit İfadesi.....	47
5. TARTIŞMA	53
6. SONUÇLAR	58
7. KAYNAKLAR	59
8. ÖZGEÇMİŞ.....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ**Sayfa**

Şekil 1. Üç farklı kök hücre nişi görülmektedir.....	25
Şekil 2. İnsan embriyonik kök hücrelerinde yapılan DNA mikrodizin analizlerine göre 918 gen bölgesinin işlevlerine göre dağılımları (%).....	26
Şekil 3. Fare ovaryum dokusunda RT-PCR gen ekspresyon profilleri.....	40

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1. Kökenlerine, farklanma etkinliklerine veya farklanma yönlerine göre kök hücre türleri	17
Tablo 2. Kök hücrelerin farklanma yetkinliği (plastisite)	22
Tablo 3. Blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücrelerinin yaygın kullanılan belirteçleri.....	27
Tablo 4. Embriyonik germ tabakalarından farklılaşarak oluşan dokular	28
Tablo 5. İnsan embriyonik kök hücrelerinin köklülük markerlarının karakterizasyonu	32
Tablo 6. Gen ekspresyonlarının analizinde kullanılan RT-PCR primerleri	39
Tablo 7. Nanog Ekspresyonu Dağılımı ve Yerleşimi.....	49
Tablo 8. Ovaryum Yüzey Epiteli ve Stromal Hücrelerde Nanog Ekspresyonu	49
Tablo 9. SSEA-1 Ekspresyonu Dağılımı ve Yerleşimi	50
Tablo 10. Ovaryum Yüzey Epiteli ve Stromal Hücrelerde SSEA-1 Ekspresyonu.....	50
Tablo 11. Oct 3/4 Ekspresyonu Dağılımı ve Yerleşimi	51
Tablo 12. Ovaryum Yüzey Epiteli ve Stromal Hücrelerde Oct 3/4 Ekspresyonu.....	51
Tablo 13. c-kit Ekspresyonu Dağılımı ve Yerleşimi.....	52
Tablo 14. Ovaryum Yüzey Epiteli ve Stromal Hücrelerde c-kit Ekspresyonu	52

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ALS	Amyotrophik Lateral Skleroz
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DP	Dermal Papilla
EKH	Embriyonik Kök Hücre
FSH	Folikül Stimüle Eden Hormon
FSHR	Folikül Stimüle Eden Hormon Reseptörü
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin Hormonu
HSCs	Hematopoetik Kök Hücre Nişi
IL-6	Interlökin-6
ISC	İnce Barsaktaki Kök Hücreler
IVF	İn Vitro Fertilizasyon
iEKH	İnsan Embriyonik Kök Hücre
LH	Luteinizan Hormonu
MS	Multiple Skleroz
SNO	N-cadherin-pozitif Osteoblastik Hücreler
SSEA	Stage Spesifik Embriyonik Antijen
OMI	Oosit Olgunlaşmasını Baskılayıcı Faktör
PCOS	Polikistik Over Sendromu
PGC	Primordial Germ Hücreleri
RNA	Ribonükleik Asit
TDF	Testis Belirleyici Faktör
ZP1, ZP2 ve ZP3	Zona Pellusida Glikoproteinleri

1. GİRİŞ

Tarih boyunca insanoğlunun en büyük hedeflerinden biri hastalıklara çare bulmak ve insan ömrünü uzatmak olmuştur. MÖ. 1534 yılına ait olduğu düşünülen bir papirüste çeşitli bitkilerden elde edilen iksirlerin ilaç olarak kullanıldığına dair bilgiler bulunmaktadır. Eski Mısır anıt ve hiyerografilerinde ise insanların hastalıklı organlarının değiştirilmesini gösteren şekiller vardır. MÖ. 1700'lü yıllarda Babil'lilerin bıçak kullanarak ameliyat yaptıklarına dair bilgiler bulunmaktadır. Organ nakillerinin o zamanlar gerçekte yapılıp yapılmadığı bilinmese de, insanoğlunun hastalıkları yenme ve yaşlanmanın önüne geçme çabaları ilk zamanlardan günümüze dek sürmüştür (Şenel 2002).

İnsan genom projesi ile birlikte yaşamın sırlarının gizli olduğu genlerin şifresi, bugün için % 99.99 oranında çözülmüştür. Günümüzde insan genomu, yani kalıtım şifresi hakkında bilgilerimiz arttıkça, genetik alanında önemli gelişmeler olmaktadır. Bu gelişmeler daha çok, kök hücre tedavisi, gen tedavisi, preimplantasyon genetiği, insan genom projesi, biyoteknoloji ve klonlama konularında yoğunlaşmaktadır.

Günümüze kadar, genetik şifredeki bozukluklara bağlı hastalıkların tedavisinde çeşitli ilaçlar kullanılmasına rağmen, bozuk şifre yapısı değiştirilmediği için, bu hastalıklara kalıcı çözüm bulunamamıştır. Dolayısı ile günümüzde bozuk genin tamiri veya normal genle değiştirilme çabalarına başlanmıştır. Ayrıca son yıllarda genetik şifrenin aydınlatılması ve hücre davranışlarının daha iyi anlaşılması ile insanın kök hücreleri kullanılarak beyin, deri, kemik, kalp kası gibi çeşitli dokular üretilmeye başlanmıştır (Aydın 2003).

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

Son 20 yıl içerisinde kök hücrelerin biyolojik, moleküler, biyokimyasal ve immünolojik özelliklerindeki hızlı gelişmeler, aynı zamanda translasyonel araştırmalara da yansımıştır. 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 baēlı olarak ortaya çıkan kesin tedavisi için canlı bir vericiden nakil gerektiren kalp-karaciēer ve böbrek gibi organların yetmezlikleri, genetik tabanı olmayan saēırlık-körlük gibi hastalıklar, çeşitli seviyelerdeki omirilik hasarı sonucu ortaya çıkan felçler, denge bozuklukları ile karakterize serebrospinal ataksiler, Alzheimer ve Parkinson gibi nörodejeneratif hastalıklar, musküler distrofi gibi nöromusküler dejeneratif hastalıklar, diyabete baēlı 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, kırıktağ dejenerasyonları, osteoartritler, beldeki omurlar arasındaki diskin rejenerasyonuna baēlı ve tedavisi mümkün olmayan bel aērıları, üreme hücresi (erkek ve diēi) üretilmemesi sonucu ortaya çıkan kısırlık, çağımız erkeēinde sık rastlanan empotans (cinsel yetersizlik) ve kadınlarda çok sık rastlanan idrar kaēırma (idrar inkontinansı) gibi bu tür ve benzeri hastalıkların kesin tedavisini saēlamak amacıyla araştırmacılar, hasar gören hücre-doku veya organların biyolojik işlevlerini yerine koymak (rejeneratif tıp) ya da tamir etmek (reparatif tıp) ile mümkün olabileceēini düşünmektedirler.

Kök hücre araştırmaları konusunda bugüne kadar ulaşılan nokta gelecek için büyük umut vadetmektedir. Organ veya doku transplantasyonunun tek tedavi seçeneēi olduēu hastalıklarda uygun verici teminindeki zorluk tedavi şansını engelleyen en önemli etmendir. Kök hücre araştırmaları istenildiēi doērultuda gelişirse hasta kişilere nakil uygulamasında yeni bir hücre kaynaēı oluşturabilecektir (Kansu 2005). Kök hücre üzerine süren araştırmalar, insan hastalıklarının birçoēunun tedavisinde yeni ufuklar açılacaēına olan büyük inancı sürdürmektedir.

2. KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. GAMETOGENEZ: Germ Hücrelerinin Erkek ve Dişi Gametlere Dönüşmesi

2.1.1. Primordial Germ Hücreleri

Gametler (sperm ve oosit); gelişimin ikinci haftasında epiblastın içinde oluşan ve daha sonra da yolk kesesine göç eden primordial germ hücrelerinden (PGC) köken alırlar. Primordial germ hücreleri dördüncü haftadan itibaren, bu sefer yolk kesesinden, gelişmekte olan gonadlara doğru yer değiştirmeye başlar ve hedeflerine beşinci haftada ulaşırlar. Göç sırasında başlayan mitotik bölünmelerle sayıca kalabalıklaşan hücreler bu durumu gonada ulaştıktan sonra da devam ettirirler. Fertilizasyona hazırlık amacıyla germ hücreleri gametogenez sürecine girerler (Sadler 2005).

Gametogenezis, özelleşmiş üreme hücreleri olan gametlerin oluşum ve gelişme sürecidir. Bu olgunlaşma sürecine erkekte spermatogenesis, kadında ise oogenezis denir. Sperm ve ovum vücut hücrelerinin yarısı kadar (haploid sayıda) kromozom taşırlar. Gametogenezis sırasında özel bir hücre bölünmesi olan mayoz bölünme ile kromozom sayısı yarıya düşer, bunun yanı sıra hücrenin şekli de değişir. Sentromerin (kromozomun sıkışmış bölgesi) bulunması yapının kromozom olduğunu gösterir. Kromozomlar, DNA replikasyonundan önce hücre döngüsünün S fazında tek kromatidli kromozom halindeyken DNA replikasyonundan sonra çift kromatidli kromozom haline gelirler. Kadın ve erkekte gametlerin oluşum şekli farklı olmasına rağmen mayoz bölünme de olayların oluşum sırası aynıdır.

2.2. GENİTAL SİSTEMİN GELİŞİMİ

Embriyonun kromozomal ve genetik cinsiyeti, sekonder oositi dölleyen sperm türüne bağlı olarak fertilizasyonda belirlenir. Gonadların erkek ve dişiliğe farklılaşmaları, yani gonadal cinsiyet 7. haftada olur ve XX, XY cins kromozom kompleksine bağlıdır. Bu nedenle başlangıç dönemi, genital gelişimin farklılaşmamış evresi olarak tanımlanır (Şeftalioğlu 2003).

2.2.1. Gonadların Gelişimi

Gonadlar (testisler ve overler) üç kaynaktan köken alırlar;

- Posterior karın duvarını döşeyen sölom epiteli (mezodermal epitel)
- Sölom epiteli altındaki mezenşim
- Primordial germ hücreleri (ilkel cinsiyet hücreleri)

Gonad gelişmesi, ilk kez gelişmenin 5. haftasında, mezonefrozun medialinde, sağ ve solda, sölom epitelinin çoğalması ve altındaki mezenşimin yoğunlaşmasıyla oluşan, uzunluğuna iki adet gonadal ya da genital kabartı'yla (genital ridge) dikkati çeker. Gelişmenin 4. haftasında büyük yuvarlak ilkel cinsiyet hücreleri, allantois kesesine yakın vitellüs kesesi (yolk kesesi) endoderm hücreleri arasında görülmeye başlarlar. Embriyonun kıvrılması sırasında, vitellüs kesesinin dorsal kısmı embriyon içine alınır. Bu katılma olaylanırken ilkel cins hücreleri, son bağırsağın dorsal mezenteri yoluyla 6. haftada ameboid hareketlerle gonad kabartılarına göç ederler (Şeftalioğlu 2003).

2.2.2. Farklanmamış Gonadlar

İlkel cins hücrelerinin göçlerinden az önce ya da göçleri sırasında gonad kabartısının sölom epiteli tekrar çoğalır ve altındaki mezenşime yayılarak düzensiz primitif seks kordonlarını oluştururlar. Hem erkek hem dişi embriyonlarda bu kordonlar, yüzey epiteli ile devam ederler. 7. haftadan önce, her iki cinsin gonadları birbirine benzer ve farklanmamış gonad'lar olarak adlandırılırlar (Şeftalioğlu 2003). Farklanmamış gonad dışta yer alan bir korteks ve içte yer alan bir medulla'dan oluşmaktadır. Eğer embriyo XX seks kromozom kompleksine sahip ise, farklanmamış gonad'ın korteksi overe differensiye olur, medullası geriler. Embriyo XY seks kromozom kompleksini içermekteyse, medulla testise farklanır, korteks bir takım kalıntıları dışında gerileyerek dejenere olur (Moore 2002).

2.2.3. Cinsiyetin Belirlenmesi

Kromozomal ve genetik cinsiyet fertilizasyon ile sağlanır, X kromozomuna sahip ovum'un X veya Y kromozomu taşıyan bir sperm ile döllenmesine bağlıdır.

Gelişmekte olan gonadlar XX ve XY kromozom kompleksine sahip olurlar. Erkek fenotipinin gelişimi için bir Y kromozomu gereklidir, fakat bu kromozomun yalnızca kısa kolu seks tayini için son derece kritiktir. Testis belirleyici faktör (TDF) için gerekli olan SRY geninin, Y kromozomunun cinsiyet belirleyici bölgesinde yerleştiği saptanmıştır (Berta vd. 1990, DiGeorge 1992). Dişi fenotipinin gelişmesi için iki X kromozomuna gerek vardır. X kromozomunda yer alan bir seri genin ve bölgenin, seksin belirlenmesinde özel rolleri bulunmaktadır.

Y kromozomu, farklanmamış gonadın medullası üzerinde testis belirleyici etkiye sahiptir. Y kromozomu tarafından düzenlenen, testis belirleyici faktör (TDF) testiküler farklılaşmayı sağlamaktadır. Bu faktörün etkisi altında, primer seks kordonları seminifer tübüllere farklılaşırlar. Y kromozomunun yokluğu over gelişimiyle sonuçlanırken seks kromozom kompleksinin tipi, fertilizasyonla sağlanır, bu da farklanmamış gonadın hangi yönde gelişeceğini belirlemektedir (Mittwoch 1992).

Mevcut gonadın tipi, daha sonra dış genitallerde ve genital duktuslarda oluşan seksüel farklılaşmayı belirlemektedir. Fötal testisler tarafından üretilen testosteron erkekliği belirlemektedir. Dişide primer seksüel farklılaşma hormonlara bağlı değildir; overlerin yokluğunda bile, dişiliğin oluşması hormonal bir etkinin söz konusu olmadığını göstermektedir (Carr vd. 1970).

2.2.4. Ovaryumların Gelişmesi

Dişi embriyolarında gonadal gelişim daha yavaş olaylanır. X kromozomları ovaryum gelişmesi için genler taşıırken, ovarian organogenez'de otozomal bir genin de rol oynadığı ortaya çıkmıştır (DiGeorge 1992, Quingley vd. 1994). Ovaryumlar 10. haftaya kadar histolojik olarak ayırt edilemezler. Primitif seks kordonları dişi embriyonlarda, erkek embriyonlarındaki kadar belirgin değildirler ancak gonadın medullasına kadar uzanırlar ve rudimenter bir yapı olan rete ovarii'yi oluştururlar. Normalde rete ovarii ve primitif cinsiyet kordonları dejenere olurlar ve daha sonra kaybolurlar.

Erken fötal dönemde kortikal kordonlar denilen ikinci cinsiyet kordonları, gelişmekte olan gonadın yüzey sölom epitelinin başlangıçta altındaki mezenşime doğru gelişmeye başlarlar. Sölom epitelinin çoğalmasıyla kortikal kordonlar kalınlaşırken, ilkel cinsiyet hücreleri kordonlar içine karışırlar. Yaklaşık 16. haftada

bu kordonlar, primordial folikül denilen ayrı hücre gruplarına bölünürler. Her bir grup, ortada, ilkel cinsiyet hücrelerinden köken almış oogonium ve onun çevresinde kortikal kordon sölom epiteli kaynaklı tek sıra follikül hücrelerinden meydana gelir. Fötal dönemde, milyonlarca oogonium aktif mitozla oluşurken doğum öncesinde oogoniumların bir kısmı dejenere olur, bir kısmı da büyüyerek primer oosit'leri yaparlar.

Gelişmekte olan bir ovaryumun histolojik tanısı, 10.-11. haftalarda kalın tunica albugineanın olmaması ve mayoz evresine girmekte olan cinsiyet hücrelerinin varlığıyla konur (Persaud 1992).

Postnatal (doğum sonrası) dönemde oogonium meydana gelmez. Her ne kadar doğumdan önce pek çoğu dejenere olsa da, doğumdan sonra iki milyon civarında primer oosit kalmaktadır. Doğumdan sonra overin yüzey epiteli düzleşir ve tek tabakalı hale geçen hücreler, over hilumunda, periton mezoteli ile devamlılık kazanırlar. Overin yüzey epiteli eskiden 'germinal epitel' olarak isimlendirilmiştir ki bu ad yanlıştır, çünkü şimdi germ hücrelerinin, primordial germ hücrelerinden köken aldıkları kesin olarak bilinmektedir. Ovaryum follikülleri oluşurken yüzey epiteliyle olan bağlantılarını kaybederler. Tunica albuginea denilen ince fibröz bir kapsül, yüzey epiteliyle ovaryum korteksi arasında gelişir. Mezonefroz gerilerken, ovaryum ondan ayrılır ve mezovaryum denilen kendi mezenteriyile vücut duvarına asılır (Şeftalioğlu 2003).

2.3. Ovaryumlar

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

Histolojik kesitlerde, ovaryumlar, içte medulla, dışta korteksten oluşur. Medulla, zengin kan ve lenf damarları ve sinirleri içeren gevşek bağ dokusu yapısındadır. Korteks, periferde medullayı sarar ve hücrelerden zengin sıkı bağ dokusuna gömülü ovaryum folliküllerini içerir. Medulla ile korteks arasında belirgin bir sınır yoktur.

Hilusta korteks sona erer ve mesovaryum medulla ile devam eder. Korteks stroması, iğ biçimli fibroblast benzeri hücreleri ve retiküler lif ağını içerir. Medulla stroması ise fibroblastlardan, elastik liflerden ve düz kas hücrelerinden oluşmuştur. Ovaryum stromasına dağılmış interstisyel hücreler bulunur. Atretik foliküllerin fazla olduğu dönemde bu hücrelerin sayısı fazlalaşırken, menstruasyonun başladığı puberte de sayıları azalmaktadır. Erginde bu hücreler, ovaryum stromasına az sayıda dağılmışlardır. Ovaryum hilusunda ve mesovaryuma yakın yörede büyük epiteloid hücre grupları (hilus hücreleri veya sempatikotropik hilus bezi olarak adlandırılırlar) gözlenir, bunlar kan damarları ve miyelinsiz sinir telleri ile sıkı ilişkiindedirler. Bu hücreler, leyding hücrelerine daha çok benzerler. Bünyelerinde kolesterol esterlerini, lipokrom pigmentlerini ve reinke kristallerine benzeyen kristalleri içerirler. Aktif olarak iç salgı bezinin tüm histokimyasal ve sitolojik özelliklerine sahip olan bu hücreler, gebelik ve menopoza dönemlerinde fazla sayıdadırlar.

Ovaryumlar, dıştan tek katlı kübik ya da yassı epitel ile örtülüdür. Bu epitele germinal epitel denir. Epitel altında ovaryum korteksi yoğunlaşarak sıkı bağ dokusu yapısında tunika albuginea'yı oluşturur (Şeftalioğlu 2003).

2.3.1. Oogenezis

Oogonia denilen primitif germ hücrelerinin olgun oositlere dönüşmesiyle gerçekleşen olaylar dizisine oogenezis denir. Hücrelerdeki bu olgunlaşma süreci doğumdan önce başlar, cinsel olgunluğa (puberte: ergenlik) erişildiğinde tamamlanır (Moore 2002). Oogenezisi doğum öncesi ve doğum sonrası olgunlaşma olarak ikiye ayırmak mümkündür.

2.3.1.1. Doğum Öncesi Olgunlaşma (Prenatal Maturasyon)

Erken fetal yaşamda primitif cins hücreleri, genetik olarak dişi gonadlara gelince oogoniumlara farklılaşırlar. Bir dizi mitoz bölünme geçirerek çoğalırlar, üçüncü ayın sonunda tek katlı epitel ile sarılırlar. Oogoniumların büyük bir kısmı mitozla bölünürken bir kısmı da büyüyerek primer oositleri oluştururlar. Primer oositlerin hemen DNA'ları replike olur ve birinci mayoz bölünmenin profaz safhasına girerler. Sonraki aylarda, oogoniumlar mitoz bölünmeyle sayıca artmaya devam ederler ve gelişmenin beşinci ayında, ovaryumda gelişen dişi germ hücrelerinin (gamet) sayısı

7.000.000'dur. Bu dönemde hem primer oositlerde hem de oogoniumlarda atrezi (gerileme) gözlenir. Sekizinci ayda oogoniumların hemen hepsi dejenere olur, sağlam kalan primer oositlerin tümü birinci mayoz bölünmeye girerler ve tek katlı epitel ile sarılarak primordial folikülleri meydana getirirler.

2.3.1.2. Doğum Sonrası Olgunlaşma (Postnatal Maturasyon)

Doğuma yakın tüm primer oositler, birinci mayoz bölünmenin profaz safhasını bitirirler, metafaz'a gireceklerine dikoten (istirihat) safhasına geçerler. Primer oositler, bu safhada uzun süre kalırlar. Birinci mayoz bölünmeyi pubertede ovulasyondan az önce bitirirler. Primordial foliküllerdeki folikül hücreleri, oosit olgunlaşmasını baskılayıcı (OMI) bir madde salgılayarak primer oositlerin birinci mayoz bölünmeyi puberteden önce bitirmesini engeller. Primer oositlerdeki bu birinci mayoz bölünme gecikmesi 40 ya da daha ileri yaşlara kadar sürebilir. Böyle durumlarda, mayoz bölünme hatalarına, yani anne yaşı ile artan kromozom çiftlerinin ayrılmamasına rastlanır.

Doğumda, primer oositlerin tüm sayısı 700.000-2.000.000 arasındadır. Doğumdan sonra artık primer oosit meydana gelmez. Çocukluk döneminde, oositlerin çoğu atretik olur. Puberteye gelindiğinde bir genç kızın ovaryumunda toplam 40.000 adet (primordial folikül içinde olmak üzere) primer oosit bulunur (Şeftalioğlu 1991).

2.3.2. Kadın Üreme Siklusunu (Genital Siklus)

Puberteden başlayarak, üreme yaşamı boyunca kadınlar devamlı olarak aylık üreme sikluslarına girer. Bu siklus; hipotalamus, hipofiz bezi, ovaryumlar, uterus, uterin tüpler, vajina ve meme bezlerini içerir. Bu aylık sikluslar üreme sistemini gebeliğe hazırlar. Pubertenin başlaması ile hipotalamustaki nörosekretuar hücreler, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) sentezler ve bu hormonu hipofiz bezinin ön lobuna hipofizyel portal sistem yardımıyla iletir. GnRH, hipofizde üretilen ve ovaryumlar üzerinde etkili iki hormonun salınmasını uyarır.

- Folikül stimüle eden hormon (FSH): ovaryum folikülünün gelişimini ve folikül hücrelerinden östrojen salınımını uyarır.

- Luteinizan hormon (LH): ovulasyonu (sekonder oositin atılması) tetikler, folikül hücreleri ve korpus luteumu uyarak progesteron üretimine neden olur.

Kısacası bu gonadotropinler, her 28 günde bir tekrarlanan foliküllerin gelişip olgunlaşması, ovulasyon ve korpus luteum oluşmasını içine alan ovaryum siklusunu ve ovaryum siklusu ile eş zamanda gerçekleşen uterus, uterus tüpleri, vajina ve meme bezlerinde bir dizi değişikliklere neden olan menstruasyon ya da endometriyum siklusu'nu hazırlarlar.

2.3.3. Ovaryum Siklusu

Ovaryal siklus üç evreden oluşur; foliküler evre, ovulatuvar evre ve luteal evre. Her siklusta, FSH etkisi ile 5-15 adet primordial folikül gelişip büyür. Ancak bunlardan bir tanesi, özellikle LH etkisiyle olgun folikül olur, bu olgun folikül ovaryum yüzeyi ile birlikte yırtılır ve içindeki oosit dışarı atılır.

Geriye kalan 4-14 adet antral folikül farklı gelişme safhalarında yavaş yavaş gerilerler, dejenere olurlar ve hiçbir zaman olgunlaşmazlar. Bu dejenere foliküllere atretik folikül denir. Böylece, kadının puberteden başlayıp, menopoza kadar olan cinsel hayatı boyunca ancak 400 adet olgun folikül yırtılır ve oosit atılır (ovulasyon). Genç bir kadının ovaryumlarında 400.000 adet primordial ve primer folikül bulunmaktadır (Şeftalioğlu 1991). Hangi primer folikül grubunun büyüme fazına gireceği, 5-15 adet büyük antral-veziküler folikülden hangisinin dominant olacağı ve ovulasyona gideceğini belirleyen faktörler kesin olarak bilinmemektedir. Son verilere göre, folikülleri düzenleyen protein diye adlandırılan bir protein, siklusun başında folikül grubu içinden birinin baskın gelmesine ve diğerlerinin gerilemesini sağlamakla görevli olduğu ileri sürülmektedir. Bu proteinin, baskın folikül tarafından salgılandığına ve gonadotropik stimülasyonuna karşı, diğerlerinin yanıtını baskıladığına inanılmaktadır. Folikül düzenleyen protein, baskın folikülü içeren ovaryumun venöz kanında belirlenmiş olmasına karşın, diğer ovaryumdan çıkan venöz kanda saptanmamıştır (Fawcett 1994).

2.3.4. Foliküllerin Gelişmesi

Folikül gelişimi, foliküler evrede primordiyal foliküllerin farklanması ile başlar. Farklanma gerçekleşmeden önce, primordiyal foliküllerdeki primer oositler 30 µm büyüklükte dirler. Bir ya da birden fazla çekirdekçik içeren veziküller çekirdekleri merkezden uzakta yer alır. Sitoplazmaların da iyi gelişmiş bir golgi kompleksi, fazla sayıda mitokondriler ve küçük veziküller bulunmaktadır. Primordiyal folikül, en çok bulunan ve en küçük (25 µm çapında) olan, ince bir bazal lamina üzerine oturmuş tek katlı yassı foliküler ya da granuloza hücreleri tarafından çevrilmiş foliküldür. Bu foliküller ovaryumda hemen tunika albuginea altında yerleşirler (Şeftalioğlu 1991). Primordiyal foliküller fetal ovaryumda geliştikten sonra bir dinlenme evresine girer ve bu evrede bekler. Bekleme evresinden çıkan foliküllere primer foliküller denir ve bunlar iki tiptir (Abraham L. 2006). Primer oositler büyürken çevrelerindeki tek katlı folikül epiteli mitoz ile çoğalarak tek katlı kübik, tek katlı prizmatik ya da çok katlı folikül epitelinin, granuloza hücrelerini oluşturmaya başlarlar (Şeftalioğlu 1991).

- a) Tek tabakalı primer foliküller: Bunların etrafında tek sıralı kübik foliküler hücreler bulunur.
- b) Çok tabakalı primer foliküller: Çok katlı ve çoğalan kübik hücrelerle çevrilidir. Foliküler hücreler, kendilerini ovaryumun stromasından ayıran bir bazal lamina tarafından desteklenirler.

Primer folikül evresinde, primer oosit organellerden ve lipit damlalarından zenginleşerek zona pellusida denilen glikoprotein (ZP1, ZP2, ZP3) bir kılıf sentezlemeye başlar. Zona pellusida, foliküler hücreleri oositten ayırır. Foliküler hücrelerin ince sitoplazmik uzantıları zona pellusidayı deler ve oositin mikrovilluslarıyla temas eder, bu temas noktalarında oluklu bağlantı adını verdiğimiz geçiş noktaları bulunur.

Sonraki evre, sürekli bölünen folikül hücreleri ve kalınlaşan zona pellusida ile karakterize sekonder foliküldür. Folikülü çevreleyen stromal hücreler sıklaşarak, teka (kılıf) denilen hücresel bir kapsül oluşturacak şekilde düzenlenirler. Teka daha sonra iki tabakaya farklı olarak kan damarları ve hücrelerden zengin teka internayı (iç

kılıf), sıkı bağ dokusu yapısında teka eksternayı (dış kılıf) oluşturur (Abraham L. 2006).

Teka interna hücreleri, önceleri fibroblast benzeri hücrelerdir. Daha sonraki gelişim basamaklarında hormon stimülasyonu ile hormon depolarlar ve steroid hormon salgılayan endokrin hücrelerinin ince yapısal özelliklerini kazanırlar (Şeftalioğlu 2003). Bir androjen prekürsoru olan androstenediyonu salgırlar. Androstenediyon, testosteron üretimi için folikül hücrelerine taşınır daha sonra testosteron, aromataz tarafından östradiyole çevrilir. Foliküler hücreler, östrojenlerin doğrudan üretimi için gerekli olan enzimlere sahip değildir. Bu nedenle, foliküler hücreler folikülogenez sırasında steroid prekürsorlerini üretemezler (Abraham L. 2006).

Teka eksterna hücreleri ise hormon stimülasyonu ile değişmezler ve fibroblasta benzer özelliklerini korurlar. (Şeftalioğlu 2003).

Primer folikülün bir yarısındaki granuloza hücreleri daha hızlı bir çoğalma göstererek, primer folikülün oval bir şekil almasına ve oositin eksentrik bir duruş göstermesine neden olur. Primer folikül 0.2 mm büyüklüğe ulaştığında granuloza hücre tabakasında düzensiz, içi sıvı dolu küçük boşluklar (Call-Exner cisimleri) meydana gelir (Kuehnel 2002). Hyaluronik asitten zengin olan bu sıvıya, folikül sıvısı denir. Bu sıvının miktarı, folikülün büyüyerek küçük boşlukların birleşip büyük ve at nalı şeklini almasıyla artar. At nalı biçimindeki bu boşluğa antrum ya da folikül boşluğu denir. Antrumun oluşmasıyla gelişen bu folikül sekonder, antral ya da veziküler folikül adını alır. Bu dönemde primer oosit, son büyüklüğü olan 125-150 µm'ye ulaşır, bundan sonra artık oosit büyüyemez. Ancak folikülün kendisi 10 ya da daha fazla mm'ye ulaşınca kadar büyümeye devam eder.

Sekonder folikül büyürken antrum genişler, granuloza hücre tabakasının sırasında farklılıklar oluşur. Primer oositin bağlantı noktasında kalın, diğer yerlerde ince ve eşit bir sıralanma düzeni meydana gelir. Primer oosit, onu saran ışınal düzenlenmiş granuloza hücreleriyle birlikte antruma doğru bir tümsek oluştururlar. Bu tümseğe kumulus ooforus (yumurta tümseği) denir.

Sekonder foliküller, genital siklusun 14. gününde maksimum büyüklüklerine ulaşırken, içlerinde artan folikül sıvısı nedeniyle büyük bir basınç gösterip ovaryum yüzeyinde bir kabarıntı oluştururlar. Bu foliküllere olgun, graaf folikülü ya da preovulatuvar folikül denir. Ovulasyondan hemen önce, primer oosit folikül içinde eksentrik bir konum alır. Zona pellusidaya sıkıca yapışmış ve korona radiyata

denilen tek sıralı foliküler hücrelerle çevrilidir. Olgun folikül aşağıdaki özelliklerle karakterizedir:

- 1) En büyük foliküldür (15-20 mm çapında),
- 2) Foliküler sıvı içeren büyük bir antruma sahiptir,
- 3) Korona radyatayı yapan tek sıralı foliküler hücrelerin çevrelediği zona pellusida bulunur,
- 4) Oosit ve ona bağlı olan korona radyata, kumulus ooforistan ayrılır; oosit-zona pellusida-korona radyata kompleksi folikül sıvısı içinde serbest olarak yüzer,
- 5) Ovulasyondan birkaç saat önce I. mayoz tamamlanır. Bunun sonucunda, sekonder oosit ve birinci kutup cismi oluşur. Birinci kutup cismi, perivitellin aralık denilen ve zona pellusida ile oosit arasındaki aralığa atılır,
- 6) Foliküler hücreler, sahip oldukları FSH reseptörlerinin yanı sıra, LH reseptörleri de kazanırlar. Bu olay korpus luteumun gelişmesi için kritiktir.

2.3.5. Ovulasyon

Puberte ile birlikte düzenli olarak gerçekleşen genital siklusun ortalarında (14. gün), FSH ve LH'nin etkisi altında, olgun folikül içerisindeki oosit ovaryumdan atılmaktadır (Hardy vd. 2000). Bu aşamada olgun foliküllerden birinin folikül sıvısı ani bir şekilde artarak folikül duvarının bir yerinde, ovaryumun yüzeyine doğru bir çıkıntı oluşturur. Kısa sürede bu çıkıntının üzerinde, oval ve damarsız bir nokta olan stigma belirir. Stigma, LH'nin yükselmesiyle balon şeklinde şişer ve yırtılır.

Gonadotropin (LH/FSH) artışı, preovulatuvar foliküllerin ovulasyonunu uyaran fizyolojik bir tetikleyicidir (Espey vd. 2000). Ovulasyon genellikle LH artışından 12-24 saat sonra olur (Moore 2002). LH yükselmesi en yüksek düzeye vardığında, primer oosit birinci mayoz bölünmesini ya ovulasyondan az önce ya da ovulasyon sırasında bitirir. Eşit büyüklükte olmayan, her biri 23 çift kromozom taşıyan ve 2n DNA miktarına sahip iki cins hücresi meydana gelir. Birinci hücre oldukça büyük, sitoplazmadan zengin sekonder oosit'tir. Sekonder oosit, hemen ikinci mayoz bölünmeye girer ancak bölünmesini sperm tarafından döllenirken bitirir. İkinci hücre çok küçük, sitoplazmadan yoksun, herhangi bir işlevi olmayan birinci polar cisimdir.

Sekonder oosit oluştuktan kısa süre sonra hücre zarı ile zona pellusida arasında yer alır.

Stigma, LH'nin yükselişiyyle beraber balon şeklinde şişer ve yırtılır. Sekonder oosit, bir miktar granuloza hücreleri ve folikül sıvısıyla birlikte yırtılan bölgeden periton boşluğuna atılırken, uterus tüplerinin fimbriya yapıları tarafından tüpler içine alınır. Olgun bir graaf folikülünün yırtılması ile içerdiği sekonder oositin uterus tüplerine alınması olayına ovulasyon denir. Oositin atılması folikül içi basıncın artması ve olasılıkla teka eksternadaki düz kasların prostaglandin uyarımına bağlı olarak kasılmasının bir sonucudur (Moore 2002). Folikül duvarının enzimlerle sindirimi ovulasyona neden olan ana mekanizmalardan birisi olarak görülmektedir (Oehninger vd. 1993).

Ovulasyon, puberteden menapoza kadar olan dönemde, 28 günde bir tekrar eden periyodik bir olaydır ve iki menstruasyon arasındaki 28 günlük zamanın yaklaşık ortalarına rastlamaktadır. Genellikle her siklusta, bir ovulasyonla bir adet sekonder oosit atılır. Ancak, aynı zamanda birkaç ovulasyon da gerçekleşebilir. Bu da ikizlik ya da çoklu gebeliğe neden olur. Genellikle iki ovaryum da dönüşümlü olarak ovulasyon gösterir (Şeftalioğlu 1991).

2.3.6. Korpus Luteumun Gelişmesi

Ovulasyondan kısa süre sonra ovaryum folikülünün ve teka folikülünün duvarları büzüşür ve katlanır. LH etkisiyle korpus luteum (sarı cisim) olarak bilinen glandüler (progesteron ve az miktarda östrojen salgılar) bir yapıya dönüşür. Bu hormonlardan özellikle progesteron, endometriyal bezlerin salgı yapmasına ve blastosistin implantasyonu için endometriyumun hazırlanmasına neden olur.

Eğer oosit fertilize olursa; korpus luteum genişleyerek 'gebelik korpus luteumu'nu oluşturur ve hormon üretimini artırır. Gebelik olursa, koryonun sinsityotrofoblastları tarafından salgılanan insan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) korpus luteumun bozulmasını engeller. Sinsityotrofoblast LH bakımından zengindir. Gebelik korpus luteumu hamileliğin ilk 20 haftası boyunca işlevsel olarak aktiftir. Daha sonra plasenta gebeliğin devamı için gerekli olan östrojen ve progesteronu salgılar.

Eğer oosit fertilize olmazsa; ovulasyondan 10-12 gün sonra korpus luteumda gerileme ve dejenerasyon gözlenir. Bu haldeki korpus luteuma 'menstruasyon korpus

luteumu' denir. Korpus luteum, bunu takiben ovaryum üzerinde 'korpus albicans veya atretik korpus luteum' adı verilen beyaz skar dokusuna dönüşür (Moore 2002).

2.4. Kök Hücreler

2.4.1. Kök Hücrenin Tanımı ve Kök Hücre Tipleri

Organizmayı oluşturan hücreler çoğalma, bölünme ve büyüme özellikleri bakımından birbirlerinden bazı farklılıklar göstermektedirler. İleri farklılaşma gösteren eritrositlerin ve sinir hücrelerinin bölünmedikleri kabul edilir ve bu hücreler post mitotik hücreler olarak tanımlanır. Bazı hücreler ise uzun süre sessiz kalırlar fakat uygun sinyallerle bölünmek üzere tetiklenebilirler (Kierszenbaum 2006).

Canlı vücudunda, uzun süre bölünebilen, kendini yenileyen ve aynı zamanda vücudun ihtiyacına göre farklı hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip olan, bu özelliklerini ise kendilerine özgü sinyaller vasıtasıyla gerçekleştiren hücreler 'kök hücreler' olarak bilinmektedir (Odorico vd. 2001). Farklılaşmamış kök hücrelerin, diğer hücrelerden farklı olarak başlangıçtaki hücrenin karakteristik özelliklerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (self-renewal); tek bir hücreden birden fazla hücre serisine farklılaşabilme yeteneği (multi-lineage differentiation) ve bir dokunun işlevsel olarak yeniden yapılandırılması özellikleri vardır (Weissman 2000).

Kök hücreler, genlerin kontrolü altında aldıkları sinyallere göre birçok dokuya kaynaklık edebilmelerine rağmen, özelleşmiş bir hücrenin işlevini yerine getiremezler. Laboratuvar ortamında bu hücreler uzun zaman dilimlerinde çoğaltılabilirler. Okarma ve arkadaşları tarafından, kök hücre serilerinin 300-400 döngü boyunca çoğalabildikleri gösterilmiştir (Okarma vd. 1999). Bu sınırsız bölünme yetenekleri telomeraz enzim aktivitesi sonucunda oluşmaktadır. Bu enzim, doğrusal kromozomların ucunda bulunan, tekrarlanan 'TTAGGG' DNA dizileridir ve telomerlerin ksalmasını önlemektedir. Telomerler ne kadar uzun olursa, hücrelerin bölünme kapasitesi de o kadar fazla olur. Bir hücrede telomeraz ne kadar aktifse telomer uzunluğu da o kadar korunabiliyor demektir. Kök hücrelerde de çok aktif telomeraz enzim aktivitesi ve buna bağlı uzun telomer zinciri vardır. Bu nedenle, kök hücreler çok uzun sınırsız bölünme yetenekleri ile kendilerini kopyalarlar. İnsan germ, tümör (Aragona vd. 2000), embriyonik (Hoffman vd. 2005)

ve erişkin kök hücre (Tam vd. 2007) serilerinde yüksek telomeraz enzim aktivitesi bulunmuştur.

Ondokuzuncu yüzyıldan bu yana gelişim gösteren klonlama teknolojisindeki ilerlemeler devam ederken kök hücreler hakkındaki çalışmalar da aynı şekilde gelişim göstermiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda, bir dokudan elde edilen kök hücrelerin, uygun ortam şartlarında, uygun uyarılarla farklı doku hücrelerine dönüşebilme yetenekleri gösterilmiştir. Bu kavram plastisite (transdiferansiyasyon) olarak tanımlanmıştır (Vescovi vd. 2002).

Kök hücreler, totipotent, pluripotent ve multipotent olmak üzere 3 grup altında tanımlanmaktadır (Weissman 2002). Sperm ve ovumun fertilizasyon sonucu birleşmesi ile oluşan zigot, vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonik hücredir. Bu hücreye her şeyi yapabilen anlamında 'totipotent hücre' denir.

Bu terim, erken embriyonik dönemdeki embriyonun, 5. gününe kadar olan tüm blastomerleri için geçerlidir. Totipotent embriyonik kök hücreler tam ve işlev gören bir canlıyı oluşturabilecek tüm hücre tiplerine farklılaşabildikleri gibi plasenta ve amniyon kesesi gibi embriyon dışı dokulara da farklılaşma yeteneğine sahiptirler (Tablo-1). Totipotent hücreler gelişimin ileri evrelerinde pluripotent hücrelere dönüşebilmektedirler (Chapman vd. 1999).

Pluripotent kök hücreler, fertilizasyondan sonra, pre-implantasyonun 5. gününde oluşan blastosist aşamasındaki embriyoda bulunan hücrelerdir (Tablo-1). Blastosist; embriyon dışı tabakaları oluşturacak trofoblastik hücreler, blastosöl ve iç hücre kitlesi olmak üzere 3 yapıdan oluşmuştur. Embriyonik kök hücrelere kaynaklık eden iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler 'pluripotent kök hücreler' olup gerekli ortam sağlandığında yaklaşık 200 hücre türüne dönüşebilecek potansiyele sahiptirler ancak bu kök hücreler, sadece embriyoya ait bütün hücre ve dokuları oluşturacak olan ana iskeleti meydana getirdiklerinden ve embriyon dışı tabakalara farklılaşamadıklarından dolayı işlev gören bir organizmayı oluşturamazlar (Thomson 1998).

Bunun dışında; gastrula aşamasındaki embriyoda bulunan her üç embriyonik germ yaprağına (ektoderm, mezoderm ve endoderm) farklılaşma yetisine sahip epiblastlar ile her bir germ yaprağını oluşturan ve her biri farklı somatik hücrelere farklılaşabilen ektoderm, mezoderm ve endoderm hücreleri de 'pluripotent

embriyonik kök hücreler' olarak isimlendirilirler (Tablo-1). Gelişmekte olan bir organizmada embriyonik kök hücrelerden söz etmek mümkün değildir.

'Multipotent kök hücreler', embriyonik gelişimin ileri evresine (fötal, prenatal, posnatal, infertil ve çocukluk dönemleri) ait hücreler olup, özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilirler (ör. hematopoetik kök hücre) ve yetişkin (dokuya özgü) kök hücrelere dönüşebilirler. Multipotent hücreler doğumla birlikte kordon kanında ve erişkin vücudunda özellikle kemik iliği ve yağ dokusunda bulunurlar.

Başta kemik iliği olmak üzere vücudumuzun çeşitli organlarında ve bu organların belirli doku bölgelerinde lokalize olan gerektiğinde kendini çoğaltıp, farkanabilen, kararlı haldeki kök hücrelere 'Yetişkin Kök Hücreler' denir (Tablo-1). Yetişkin kök hücreler, doku ya da organa özel doku bütünlülüğünün devamını sağlayan kök hücrelerdir (Can 2009). Multipotent bir kök hücre olan yetişkin kök hücreleri, EKH'ler ve embriyonik germ hücreleriyle karşılaştırıldığında daha düşük pluripotensiye yani daha az sayıda hücre türüne farkanma kapasitesine sahiptirler (Chapman vd. 1999). Bu özelliklerinden dolayı prokürsör (öncü veya progenitör) hücre olarak isimlendirilebilirler. Yetişkin kök hücreler retina, akciğer, kalp kası, iskelet kası, bağırsaklar, böbrek, dalak, kemik iliği, kan ve deri gibi dokuların oluşumuna katkıda bulunabilmektedirler (Grove vd. 2004). Ayrıca sahip oldukları asimetric hücre bölünme potansiyeliyle hemen hemen sınırsız bir şekilde kendilerini yenileme kabiliyetine de sahiptirler (Schwab vd. 2005).

Yetişkin kök hücrelerinden bulunduğu dokuya göre birden fazla türde hücreye farklılaşabilen hücrelere 'Multipotent Yetişkin Kök Hücreler', tek bir dokuda yerleşik sadece bir hücre tipine farklılaşabilen hücrelere 'Unipotent Yetişkin Kök Hücreler' denir. Örnek olarak kas dokusundaki uydu hücreleri verilebilir (Tablo-1).

Tablo-1. Kökenlerine, farklılaşma etkinliklerine veya farklılaşma yönlerine göre kök hücre türleri.

İsim	Hücre tipi (yerleşim)	Farklanma etkinliği	Farklanma yönü
EKH*	Morula aşmasındaki hücreler	Totipotent	Embriyon ve embriyon dışı tabakalar
EKH	Blastokist aşmasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyon gövdesi (tüm somatik ve germ hücreleri)
EKH	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Ektoderm, mezoderm ve endoderm hücreleri
EKH	Ektoderm, mezoderm, endoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
YKH**	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Hücresinin bulunduğu dokuya göre bir veya daha fazla türde hücre (ör: Hematopoetik kök hücre)
YKH	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi (ör: Kas dokusundaki uydu hücreler)

EKH*: Embriyon kök hücreler; YKH** : Yetişkin kök hücreleri; Bu tablo Can A (2008)' den alınmıştır.

Yetişkin kök hücreler üzerindeki en kapsamlı çalışmalar immün sistem ve kan yapımını sağlayan 'hematopoetik kök hücreler' üzerinde gerçekleştirilmiştir (Masson vd. 2004). Hematopoetik progenitör hücre kaynağı olarak kemik iliği, periferal kan ve göbek kordonu kullanılmaktadır (Cuneo vd. 2004). Kemik iliği, hematopoetik ve mezenşimal kök hücrelerine diferensiyel olma potansiyeline sahip olan stromal hücrelerin yapımını da üstlenmektedir (Masson vd. 2004). Mezenşimal kök hücreler veya kemik iliği stromal hücreleri olarak bilinen fibroblast koloni formları ilk olarak 1974 yılında tanımlanmışlardır. Bunu takiben 1999 yılında bu hücreler, çoğalma faktörleri kullanılarak in vitro kültürlerde saflaştırıp üretilerek osteoblast, kondrosit ve adipositler elde edilmiştir (Vats vd. 2005). Yapılan çalışmalarda mezenşimal kök hücrelerin kemik, kas ve diğer dokuların onarımı için mutlaka gerekli olduğu tespit edilmiştir (Chapman vd. 1999).

İnsanda gelişimin ikinci haftasının başında epiblast tabakasından köken alan ve ilk kez dördüncü haftanın başında vitellus kesesi duvarında gözlenen kök hücelere ise 'Primordiyal Germ Hücreleri' denir. Bu hücreler kadında ovositlerin öncüsü olan ovogonyumları; erkekte spermatozoonların öncüsü olan spermatogonyumları oluştururlar (Can 2009). 'Embriyonik Germ Hücreleri' ise primordiyal germ hücrelerinden köken alan pluripotent kök hücrelerdir. 5-9 haftalık fetusun gonadal kıvrım ve mezenter bölgesindeki primordiyal germ hücrelerinin kültürü ile elde edilirler. İlk olarak farede gözlenen bu hücreler insanlarda da gösterilmiştir. Germ hücrelerinin diabet, ürolojik ve nörolojik sorunlarda tıbbi tedavide kullanılması için çalışmalar yapılmaktadır (Kerr vd. 2006).

Spontan olarak sonlanmış ya da ebeveynlerin izniyle yasal ve sistemli olarak sonlandırılmış gebeliklerdeki fetüslerden elde edilebilen, çoğalma ve farklılaşma yeteneklerine sahip, sınırlı sayıdaki hücelere 'Fetüs Kök Hücreleri' denir. Bu gruptaki kök hücelere örnek olarak; amniyon sıvısındaki kök hücreler, plasenta kaynaklı kök hücreler ve göbek kordonu stroması kaynaklı kök hücreler verilebilir (Can 2009).

Son yıllarda kök hücre araştırmalarında çığır niteliğinde olabilecek bir gelişme yaşanmıştır. 2006 yılında Takahashi ve Yamanaka adlı araştırmacılar tarafından embriyonik kök hücelere benzeyen pluripotent kök hücre özelliği kazandırılmış 'Yeniden Programlanmış Somatik Hücre' anlamına gelen uyarılmış pluripotent kök hücreleri keşfedilmiştir. Yeniden programlanma, belirli genlerin ifadesinden sorumlu transkripsiyon faktörlerinin somatik hücreye aktarılması prensibine dayanmaktadır (Jaenisch 2009).

2.4.2. Kök Hücre Araştırmalarının Tarihçesi

Transplantasyon düşüncesi tarih boyunca mitolojide yer alan ve her biri xenotransplantasyon örneği olan sfenkslerin, deniz kızlarının ve kantaronların örneğinde hayata geçmiştir. Mitolojide ateşi tanrılardan çalarak insanlığa hediye etmesi üzerine Zeus tarafından cezalandırılan Prometheus'un hikayesi de buna bir örnektir. Zeus tarafından Olimpos dağında bir kayaya bağlanarak karaciğerinin her gün bir kartal tarafından yenmesi şeklinde bir cezaya çarptırılan Prometheus'un karaciğeri, her gün kendisini yenilemektedir. Bu, karaciğer hücresinin rejenerasyon yeteneği ve dolayısı ile kök hücre kavramını ortaya koyan ilk hikâyedir.

Bugünün kök hücre tedavisi üzerine dünyada belki de ilk çalışmaları yapan, insan ömrünü uzatmanın yolunun, doğum sonrası atılan plasentalarda, kordon hücrelerinde olduğunu söyleyen araştırmacı Prof. Dr. Süreyya Tahsin Aygün'dür. 1950-1960'lı yıllarda kendisi hayvanlarda fetal greftler ve kordon kanı greftleri ile çeşitli hastalıkların tedavisinde araştırmalar yapmış ve bu araştırmalarını almanca tıp dergilerinde yayınlamıştır (Şahin 2005, Saydam 2005, Omay 2005).

- 1878 yılında ilk kez, memeli yumurtalarını vücut dışında fertilize etme girişimleri başlatıldı (Trounson vd. 2000).
- 1959'da in vitro fertilizasyonla ABD'de ilk hayvan (tavşan) eldesi başarılı (Trounson vd. 2000).
- 1960'da farelerde teratokarsinomların embriyonik germ hücrelerinden kaynaklandığı gösterildi (Friedrich vd. 1983, Kleinsmith vd. 1964).
- 1968'de Edwards ve Bavister in vitro olarak ilk kez insan yumurtasını fertilize ettiler (Trounson vd. 2000).
- 1970'li yıllarda kültürde kök hücreler embriyonik gelişmeyi göstermek için çoğaltıldı.
- 1975'de erken memeli gelişiminin incelenmesinde teratoma ve teratokarsinomlar model sistem olarak kullanılmaya başlanmıştır (Martin vd. 1975).
- 1978'de ilk in vitro fertilizasyon bebeği, Louise Brown İngiltere'de doğdu (Trounson vd. 2000).
- 1981'de, implantasyonun son evresindeki fare embriyolarının pluripotent hücreler içerdiği tespit edilmiş ancak bu hücrelerin in vitro ortamda kültüre etme girişimleri başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Embriyo gelişimi için, hücre hatlarının kullanılması çalışmalarındaki in vitro sistemler, in vivo koşullarda oluşturulan teratokarsinomlardan sağlanabilmektedir. Bu teratokarsinom hücre hatlarının pluripotent embriyonik kök hücrelerle (EKH) pek çok morfolojik, biyokimyasal ve immünolojik özellikleri paylaştığı fakat kültüre edilme girişimlerinde transformasyona ve karyotipik değişikliklere uğradığının belirlendiği bildirilmektedir (Downing vd. 2004).
- 1981'de, teratokarsinom hücre hatları konusunda edinilen deneyimler neticesinde, implantasyonun son evresindeki embriyonların ektopik bölgelere

transferinin pluripotent kök hücreleri içeren teratomlara neden olduğu ortaya konulmuştur (Downing vd. 2004).

- 1981'de Evans, Kaufman ve Martin laboratuvarında ilk kez fare embriyonik kök hücrelerini blastosistlerin 'iç hücre grubu'ndan elde ettiler ve kültürde çoğaltmayı başardılar (Martin 1981, Evans vd. 1981)
- 1989'da Pera ve arkadaşları, her 3 germ tabakasından insan embriyonal karsinom hücre dizilerini elde ettiler (Pera vd. 1989).
- 1994'de in vitro fertilizasyon için gönüllülerce verilen örneklerden insan blastosistleri elde edildi ve kültürde 2 pasaj sağlandı (Bongsa vd. 1994).
- 1995-96'da hayvanlarda ilk kez in vitro embriyonal kök hücre sağlandı (Thomson vd. 1996, Trounson vd. 2000).
- 1998'de Wisconsin-Madison Üniversitesinden James Thomson ve arkadaşları, infertilite tedavisi gören çiftlerden normal insan blastosistlerinin iç hücre grubundan insan embriyonik kök hücrelerini ilk kez elde ettiler ve kültürde çoğaltmayı başardılar (Thomson vd. 1998). Aynı zamanda, Johns Hopkins Üniversitesinden John Gearhart, fetal gonadal dokulardaki izole bir grup hücreden insan embriyonik germ hücrelerini elde etti ve bu hücreleri 'primordial germ hücreleri' olarak adlandırdı. Bu hücreler yumurta ve spermi oluşturmak üzere görevliydi.
- 2000'de insan embriyonik kök hücrelerinin pluripotent olduğu anlaşıldı. Sonraki yıllarda daha farklı yöntemlerle insan embriyosundan pluripotent kök hücre elde edilmesi başarıldı. Artık bu hücrelerin gerçekten de kalp, pankreas ve sinir sistemi gibi doku ve organların yerini alabileceği kanıtlanmıştır. Transplantasyon amaçlı pankreatik ada hücreleri, dopamin salgılayan nöronlar, kalp kası hücreleri gibi insan dokuları yapmaya yönelik yöntemler geliştirilmektedir.
- 2001'de insan EKH dizilerinin genetiği değiştirildi (Eiges vd. 2001)
- 2006'da bir grup Japon araştırmacı tarafından, yeniden programlanmış anlamına gelen, uyarılmış pluripotent kök hücreleri üretildi (Takahashi vd. 2007).

2.4.3. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

2.4.3.1. Farklanma (Plastisite)

Farklanma; sitokinlerin, büyüme ve farklanma faktörlerinin, hücre dışı matriks proteinlerinin ve hücrelerarası iletişimlerin birlikte etki etmesiyle meydana gelen, çok hücreli organizmaları oluşturan hücrelerin olgunlaşma ve uzmanlaşma sürecinde geçirdikleri değişiklikleri ifade etmek için kullanılan bir terimdir. Farklanma aşamasına giren bir hücre, bir yandan bölünmeyi durdururken diğer yandan çevresinden gelen sinyallere yanıt vermeye hazırlanır. Bunu da enzim bağımlı yüzey ve hücre içi reseptörler ile aktivasyon yollarını aktive ederek yapar (Can 2009).

Bir hücrenin ileri farklanması, o hücrenin çoğalma sürecinin bittiği noktadan başlar. Hücre, öncelikle yeterli sayıya ulaşarak çoğalmayla ilgili hücre yüzeyi ve hücre içi yollarını kapatır sonra hücrenin farklanmayla ilgili mekanizmaları devreye girer. Bu, hücre bölünme döngüsünden kalıcı veya geçici olarak çıkılması yani G_0 fazına giriş demektir. Eğer farklanmayı uyaran ve sürdüren etkenler ortadan kalkarsa, hücreler tekrar hücre bölünme döngüsüne (G_1 fazına) girer (Can 2009).

Laboratuvar ortamında kök hücrelerin istenilen hücre türüne farklanması (yönlendirilmiş farklanma) belli kimyasal ve fiziksel koşulların yerine getirilip, doğrudan hücrenin genetik programının değiştirilmesiyle başarılır. Örneğin; yetişkin bir kök hücrenin yağ hücresine farklanması için kültür ortamına belli dozlarda çeşitli kimyasallar (deksametazon, indometazin, izobutil metilksantin) ile insülin gibi doğal hormonlar ilave edilir. Oluşturulan bu kültürde; yağ hücresine özgü proteinlerin sentezi, yağ hücresi fenotipinin kazanılması, nötral yağların ve trigliseridlerin depolandığı büyük yağ damlacıklarının ortaya çıkması beklenir. Kullanılan bu maddelerin, *in vivo* ortamda kök hücrelerin yağ hücresine dönüşümünü uyarıp uyarmadığı bilinmemektedir ancak *in vitro* ortamda birkaç haftada bu yolla elde edilen yağ hücreleri *in vivo* karşılıklarıyla kıyaslanabilecek düzeydedir (Can 2009).

Embriyon kök hücrelerinde farklanmanın kontrol edilmesi diğer kök hücre türlerine göre oldukça zordur. Bunun için *in vitro* ortamlarda çoğaltılan embriyonik kök hücrelerin kendiliğinden farklanmasını engelleyen, IL-6 ailesi üyesi lösemi engelleyici faktör (LIF) kullanılır (Can 2009).

Farklanmakta olan bir hücredeki protein sentezi ile ilgili işlevlerin tümünde ileri derecede bir artış görülür. Bu artış, hücreye hem yapısal hem de işlevsel anlamda özgünlük kazandırır. Bunun en tipik örneğini, embriyonik kök hücrelerle yetişkin öncü hücrelerin kıyaslanması oluşturur. Embriyonik kök hücreler, her üç germ tabakasına (ektoderm, mezoderm ve endoderm) ait proteinleri sentezleme potansiyeline sahipken, öncü kök hücreler bu üç tabakadan sadece birisine ait proteinleri sentezleyebilirler. Bu da farklanma yolunda sona yaklaşıldığının bir kanıtıdır (Can 2009).

Kök hücrelerini diğer hücrelerden ayıran en önemli özellik, farklanma kapasitelerinin yüksek olmasıdır. Bu özellikleri sayesinde organizmanın hücresel yapım ve onarım olaylarında eksilen hücreleri yenilemek üzere geniş bir olanak sunarlar. Tablo 2, kök hücrelerin farklanma potansiyellerini örnekleriyle özetlemektedir. Kök hücre çalışmalarının ilerlemesiyle araştırmacılar, ara farklanma (transdiferansiyasyon) terimini bir yönde farklanmış hücrenin bir başka hücreye doğru farklanması olarak tanımlamışlardır (Can 2009).

Tablo-2. Kök hücrelerin farklanma yetkinliği (plastisite). Amerika Birleşik Devletleri'ndeki Ulusal Sağlık Enstitüsü, totipotent kavramını “sınırsız kapasite”, pluripotent kavramını da “birçok dokuya köken verebilme” olarak tanımlamıştır (2000)

Kısaltılmış biçimi	Anlamı	Örnek
Toti	Bütün	Embriyon
Multi	Birçok	Hematopoetik
Pluri	Çok	Hematopoetik
Oligo	Az	GİS kök hücreleri
Quadri	Dört	GİS kök hücreleri
Tri	Üç	Bronş epiteli
Bi	İki	Safra kanalı
Uni	Bir/tek	Prostat

Bu tablo Can (2009)'dan alınmıştır.

2.4.3.2. Kendini Yenileme, Bölünme Biçimleri ve Kök Hücre Nişi

Kök hücrelerin kendini yenileme özelliği, hücrenin kendi kopyasını alacak şekilde çoğalması ve gerektiğinde organ ya da dokuya özgü öncü hücrelere farklılaşabilmesidir. Embriyonun gelişim sürecinde, kök hücreler ile farklılanmakta olan hücreler arasındaki denge oldukça önemlidir çünkü bu denge yetişkin insan hücrelerinin ve dokularının uzun süreli korunması ve onarımında etkindir (Can 2009).

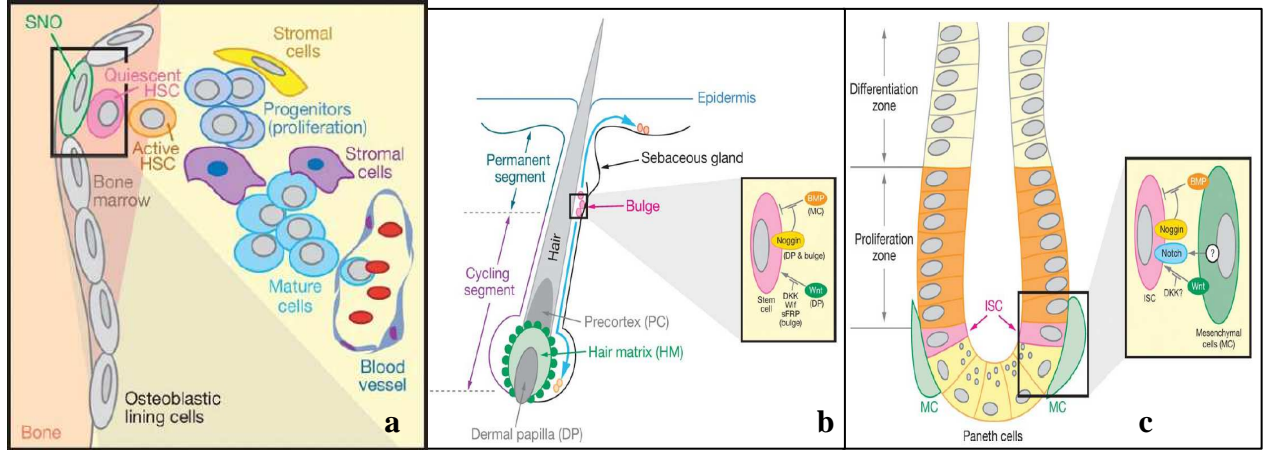
Kök hücreleri öncü hücrelerden ayıran en önemli özelliklerden biri de asimmetrik hücre bölünmesi (invariant veya değişmez) dir. Kök hücreler bölünmeler esnasında bir yandan progenitör (öncü) hücreye dönüşecek hücreyi üretirken bir yandan da kendi yedeğini oluşturur. Bu bölünme tipi, kök hücre havuzunun yaşam boyu sabit kalmasını sağlarken hem hücre içi hem de hücre dışı etkenlerin birlikte çok sıkı kontrol edilmesini gerektirir. Hücre içindeki asimmetrik bölünme sayesinde bazı organellerin, protein gruplarının ve RNA'nın yavru hücrelerden sadece birisine aktarılması sağlanır. Yapılan bazı deneylerde DNA'nın da asimmetrik olarak dağıldığı gösterilmiştir. Asimmetrik bölünme sırasında orijinal DNA, yavru hücrelerden kök hücre özelliğini koruyacak olan hücreye giderken kararlanma geçirir ve progenitör hücreye dönüşecek olan diğer hücre de yeni DNA sentezi meydana gelir. Bu sistem sayesinde, kök hücrelerdeki sabit genom (immortal DNA) korunurken yeni sentezlenen DNA da, mutasyon gibi zararlı etkilerden korunmuş olacaktır. DNA'nın bozulmadan kalması demek o kök hücredeki gen ifadesinin ve işlevinin korunması demektir.

Kök hücrelerin hücre dışı asimmetrisini, hücrenin dışındaki mikroçevre (hücre dışı matriks bileşenleri, bazal membran, miyofibroblast destek hücreleri, komşu hücreler ve salgı proteinleri) oluşturur. Bu mikroçevre 'niş' olarak adlandırılır. Örneğin; *Drosophila* ovaryumunda, kök hücrelerinin bölünme eksenini niş tarafından belirlenir ve mitoz mekiği nişe dik açıyla konumlanır. Böylece nişe yakın olan hücre kök hücre özelliğini korurken diğer hücre nişten uzaklaştığı için kök hücre özelliğini kaybeder ve farklılanma gösterir. Bu durum bölünme ekseninin niş tarafından kontrol edildiğini gösterir (Can 2009).

Asimmetrik hücre bölünmesi her ne kadar kök hücre havuzunu sabit tutabilmek için gerçekleşse de, embriyonun gelişim sürecinde ve doku onarımında gerekli olan yeni hücre ihtiyacı simetrik hücre bölünmesi (düzenleyici) ile sağlanır. Örneğin; akut

harabiyet durumlarında bu bölünme ile kök hücreler progenitör hücelere dönüşerek kısa zamanda doku yenilenmesi sağlanır. Ancak kök hücre havuzu küçülmüş olur, bu durumda kök hücreler simetrik olarak bölünmeye başlarlar ve kök hücre havuzunu genişletirler (Can 2009).

Kök hücrelerin niş ortamından uzaklaşmaları, bu hücrelerin kendini yenileme özelliklerinin ortadan kaybolmasına neden olur. Kök hücre nişine örnek olarak kemik iliği kök hücre nişi verilebilir. Bu niş, hematopoetik kök hücreleri, kemik matriksi sentezleyen osteoblastları, endotel hücrelerini, büyüme faktörlerini, kollajen ve çok sayıda hücrelerarası matriks bileşenini içerir. Şekil 1’de ‘kök hücre nişi’ kavramına örnek olarak kemik iliği hematopoetik kök hücre nişi, derideki epitelial kök hücre nişi ve ince barsaktaki intestinal kök hücre nişi şematize edilerek anlatılmıştır. Kök hücre nişinde mikroçevrenin fiziksel belirleyici olarak rol alması kök hücrelerin hem pozitif hem de negatif yönde etkilenmelerine neden olur. Gelişme, yaşlanma, yaralanma ve hastalık durumlarında niş bölgesinde yer alan hücre içi ve hücre dışı yapıların değişime uğraması, kök hücreleri olumlu veya olumsuz yönde etkileyebilir. Kök hücrelerin kendini yenileme mekanizmasının hassas bir denge içinde ayarlanması, dokuda yenilenmesi gereken hücrelerin ortaya çıkışını, farklanmakta olan yeni hücrelerin oluşmasını ve kök hücre havuzunun sabit tutulmasını gerektirir (Can 2008).

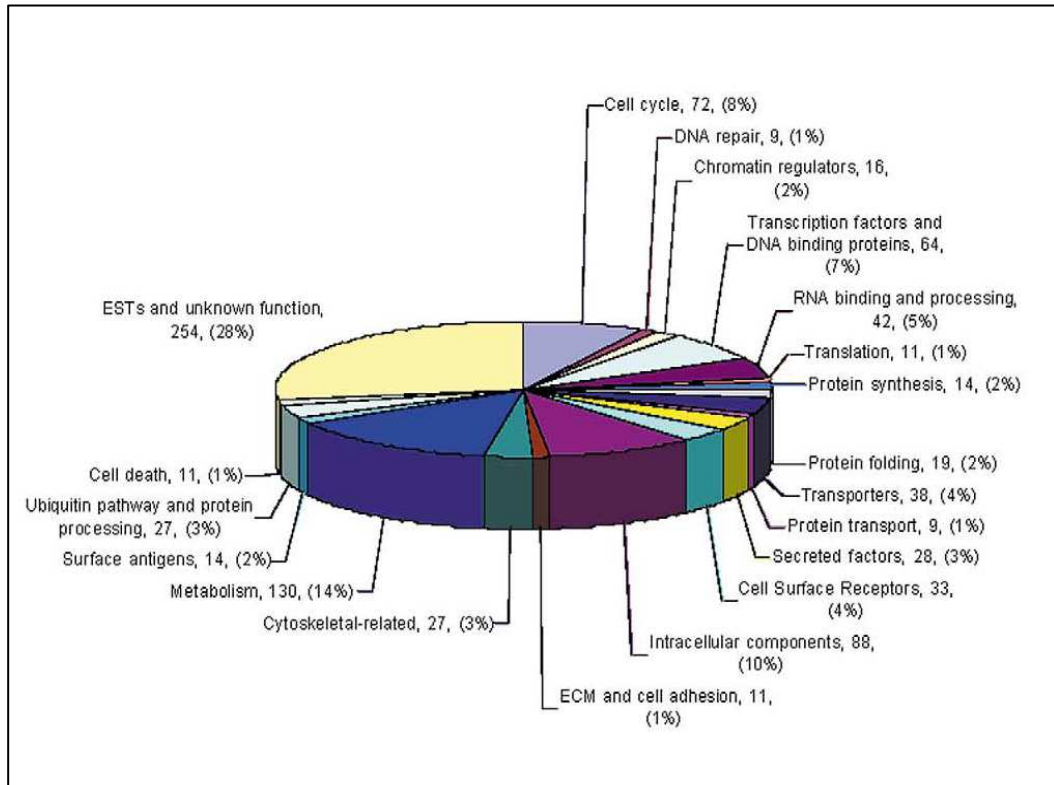


Şekil 1. Üç farklı kök hücre nişi görülmektedir: (a) Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücre nişi (HSCs) görülmektedir. HSCs nişi, öncelikle trabeküler kemiğin yüzeyinde yerleşim gösterir. Bu bölgede yer alan iğ şekilli N-cadherin-pozitif osteoblastik hücreler (SNO) ile sessiz olarak adlandırılan HSC'ler, hematopoetik kök hücre nişinin anahtar komponentleridir. N-cadherin ve β -catenin kök hücreler ile niş hücreleri arasındaki bölgede yapışma molekülleri olarak rol oynarlar. Nişte yer alan farklı tip ve şekildeki stromal hücreler kök hücre aktivasyonunu, proliferasyonunu ve diferansiyasyonu farklı mikroçevresel sinyaller salgılayarak düzenlerler. Olgunlaşmış kan hücreleri ise kan damarlarının içerisine sızıp, göç ederek yeni kan hücrelerine farklılaşabilirler (Li 2005, Xie 2005). **(b)** Derideki epidermal kök hücreler, yağ bezinin altında saç folikülünün tümsek bölgesinde yerleşmişlerdir. Epitelial kök hücreler multipotenttirler ve kardeş hücrelere farklılaşırlar. Bu hücrelerden yukarı epidermise göç edenler, herhangi bir yara tamirinde epidermal hücreleri üretmek için epidermal progenitör (öncü) hücreler olarak görev yaparken, aşağı dermal papillaya (DP) göç edenler saç-matriks progenitörlerine dönüşerek saçın yenilenmesini sağlarlar. **(c)** İnce barsaktaki kök hücreler (ISC), kriptlerin tabanında paneth hücrelerinin üzerinde yerleşiktirler. Barsaktaki yenilenme, barsak kök hücreleriyle sağlanır ve dört farklı tipte epitelial soy oluşturulur: emici enterositler, musin salgılayan goblet hücreleri, paneth hücreleri ve enteroendokrin hücreler (Winton 2000). Epitelial hücrelere komşu mezenşimal hücreler (MC), postnatal barsak yenilenmesi boyunca epitelial hücre proliferasyonunda, diferansiyasyonda ve apoptoziste direkt olarak rol alırlar (He vd. 2004).

2.4.3.3. Köklülük (Stemness)

Kök hücrelerini diğer hücrelerden ayırt eden, hücreSEL ve moleküler düzeydeki özelliklerine ‘köklülük’ denir. Bu özellikleri, özgün gen ifadeleri veya translasyon sonrası bir dizi değişimler olup (Şekil 2’de özetlenmiştir) bunlar sayesinde kök hücreler farklanmadan özgün yapılarını ve işlevlerini korumaktadırlar. Kök hücrelerin hangi tipte olduğunu belirlemek için günümüzde artık kök hücrelere özgü olduğu bilinen bir takım belirteçler kullanılır. Hücrelerin yüzeyinde yer alan bu belirteçler, sinyal yolları üzerinde ve hücre-hücre yapışma molekülleri olarak görev yaparlar ve kısaca “CD” (Farklanma kümeleri=Clusters of Differentiation) başlığı altında toplanırlar. Örneğin, hematopoetik kök hücreler için CD33 ve CD45 belirteçleri kabul görürken, mezenşimal kök hücreler için CD29, CD79, CD105 gibi belirteçler kullanılmaktadır.

(ayrıntılı liste <http://www.sciencegateway.org/resources/prow/> adlı internet sitesinden edinilebilir). Embriyonik kök hücreler için en yaygın kullanılan belirteçler Tablo 3’te kısaca listelenmiştir.



Şekil 2. İnsan embriyonik kök hücrelerinde yapılan DNA mikrodizin analizlerine göre 918 gen bölgesinin işlevlerine göre dağılımı (%). Sato ve ark. (2003)’den alınmıştır.

Tablo-3. Blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücrelerinin yaygın kullanılan belirteçleri

Pozitif Belirteçler	Negatif Belirteçler
Alkalen Fosfataz	Trofoektoderm Belirteci: BEX
SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, CD9, E-cadherin	Nöroektoderm Belirteci: Sox-1
TERT (telomeraz revers transkriptaz)	Endoderm Belirteçleri: GATA genleri, HNF3 β , PDX-1
Stabil Karyotip, Oluklu bağlantılar (gap junctions)	Mezoderm Belirteçleri: Brachury, MSX-1

Bu tablo Can (2009) dan alınmıştır.

2.5. Kök Hücre Kaynakları

Kök hücreler esas olarak iki farklı kaynaktan elde edilirler. Embriyonik gelişim sürecinin erken dönemlerinde blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilen embriyonik kök hücreler ve embriyonik olmayan kaynaklardan elde edilen kök hücreler (dokuya özgün=erişkin kök hücreler, fetüs kök hücreleri, göbek kordonu ve plasenta kök hücreleri, kadavradan elde edilen kök hücreler).

2.5.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücreler; daha uterus duvarına implante olmamış erken dönemdeki (insanda 5-6 günlük implantasyon öncesi blastosist dönemi) blastosistin iç hücre kitlesinden oluşan, in vitro olarak sonsuz şekilde üreme potansiyeline sahip, normal ve dengeli bir karyotipte olan pluripotent hücrelerdir. İnsan embriyonik kök hücreleri yaygın olarak, in vitro fertilizasyon kliniklerinde, in vitro şartlarda döllenmiş yumurtalardan elde edilen ihtiyaç fazlası olarak ayrılmış ve verici onayı ile araştırma yapmak üzere bağışlanmış bulunan embriyolardan temin edilmektedir. Bu hücreler, in vivo ve in vitro ortamlarda üç germ tabakasından köken alan farklı hücre tiplerine farklılaşabilmektedirler (Shufaro vd. 2004). Tablo 4’de embriyonik germ tabakalarından farklılaşarak oluşan dokular gösterilmiştir.

Tablo-4. Embriyonik germ tabakalarından farklılaşarak oluşan dokular.

<i>Embriyonik Germ tabakası</i>	<i>Farklılaşmış doku</i>
Endoderm	Timus Tiroid, paratiroidler Larinx, trakea, akciğer Mesane, vagina, uretra Gastrointestinal (Gİ) organlar (karaciğer, pankreas) Gİ traktusun iç yüzü Solunum yolu iç yüzü
Mezoderm	Kemik iliği (kan) Sürrenal korteks Lenfatik doku İskelet, döz ve kalb kası Konnektif dokular (kemik ve kıkırdada dahil) Urogenital sistem Kalb ve kan damarları (vasküler sistem)
Ektoderm	deri Nöral doku (nöroektoderm) Sürrenal medullası Hipofiz Baş ve yüzün konnektif dokusu Gözler, kulaklar

Bu tablo Sargın (2010)'dan alınmıştır.

Uygun kültür ortamı sağlandığı takdirde bu hücreler farklılaşmadan çoğaldıkları gibi, ortamın değiştirilmesi ile de bu hücrelerin farklılaşması sağlanabilir. Embriyonun ilk hücrel farklılaşması, morulayı oluşturan hücrelerin blastosist hücrelerine farklılaşmasıdır. Morulanın dış tarafında bulunan hücreler, sıvı transportunu sağlayan ve blastosolün oluşmasında rol oynayan trofoblast epitel hücrelerine farklılanırlarken içte bulunan morula hücreleri blastosistin iç hücre kitlesini oluştururlar. İç hücre kitlesini oluşturan hücreler pluripotent kök hücreler olup, embriyoyu oluşturacak olan tüm dokuların esas kaynağıdır (Gardner vd. 1997).

Fare embriyosunda yarıklanma dönemi ile birlikte başlayan farklılaşma süreci iç hücre kitlesi ve trofoblast hücrelerinin oluşması ile devam eder. Yaklaşık 32-hücreli olduğunda ise (embriyonik gün olarak 3.5 güne uyar) iç hücre kitlesinin farklılaşması başlar. Bu dönemde DNA metilasyonunun gerçekleşmesiyle, somatik hücre farklılaşması ve gastrulasyon süreci devam eder. Yaklaşık 4 günlük fare

embriyosunda blastosöl tarafında bulunan iç hücre kitlesi hücreleri primitif endoderme (PrEN), iç kısımda bulunan 20 kadar nonpolarize pluripotent hücre ise primitif ektoderme farklıdır. Hücrelerin proliferasyonu 6 günlük embriyoda başlar. 5.5 güne kadar epiblast hücreleri totipotent olarak kalırlar ve iç hücre kitlesi hücreleri gibi alkalen fosfataz, E-kadherin, SSEA-1 ve Oct 3/4 pozitifdir (Gardner vd. 1997).

Bu dönemdeki embriyoda, trofoblast hücrelerinden ziyade iç hücre kitlesini oluşturan hücrelerde birçok faktör salgılanır. Örneğin; embriyonik gelişimin erken dönemlerinde organizasyondan sorumlu integrin beta-1, epiblast hücrelerini apoptozisten koruyan taube nuss (tbn) veya Smad 2 gibi erken farklılanmayı önleyici faktörler salgılanır (Sue O'Shea 2004).

2.5.2. Embriyonik Kök Hücreleri Diğer Hücrelerden Ayıran Morfolojik, Genetik ve İmmünolojik Özellikleri

1. Embriyonik kök hücrelerin, diğer vücut hücrelerine kıyasla son derece yüksek bir çekirdek/sitoplazma hacim oranı mevcuttur ve her hücrede belirgin pronükleus yapısı içerirler. Bu hücreler, destek hücreleri üzerindeki kültürleri sırasında üç boyutlu koloni oluştururlar (Zaehres vd. 2005).
2. EKH'ler, preimplantasyon evrensindeki embriyodan elde edilirler.
3. EKH'ler, farklılaşmadan sürekli bölünebilme başka bir ifadeyle "kendini yenileme" özelliğine sahiptir. Bu durum, kök hücrenin kendisini tanımlayan genlerin aktif olarak kopyalanabildiği aşamayı işaret eder. Erişkin kök hücrelerden farklı olarak embriyonel kök hücreler çok daha hızlı çoğalma gücündedir (Elçin 2005).
4. EKH'in telomerleri oldukça uzundur. Yani yüksek seviyelerde telomeraz ekspresyonuna sahiptirler, bundan dolayı çok uzun süre çoğalabilmektedirler. Laboratuvar ortamında bu hücreler iki yıldan uzun süre yaşatılabilmektedir (Attar 2003).
5. Kültürde çoğaltılan EKH'ler, bağışıklığı baskılanmış farelere nakledildiklerinde, her üç eşey tabakasını içeren bir tümör dokusu olan teratomları oluşturabilmektedirler. Bu özellik, EKH'lerin pluripotensi özelliğini ifade etmektedir (Elçin 2005).
6. Günümüzde kök hücrelerin farklılaşmasının kontrolü üzerinde durulmaktadır. Bu amaçla kültür ortamına çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler ve kimyasallar eklenmiş, farklı destek hücreleri kullanılmış ve gen aktarımı ile

farklılaşmanın gerçekleşmesi yönünde çalışmalar yapılmıştır. Üretilen kök hücrelerin dondurulması, çözülmesi ve tekrar kültürünün yapılması, sonrasında bozulmadan kalması önem taşımaktadır (Attar 2003).

7. Özel markerleri yüksek düzeylerde eksprese ettikleri gösterilmiştir, bunlar gelişim evresine özgü hücre yüzey antijenleri (SSEA-3, SSEA-4), proteoglikanlar (TRA-1-60, TRA-1-81), çoklu farklılaşmayı (pluripotens) belirleyen transkripsiyon faktörleri ile ilişkilendirilmiş fare embriyonik kök hücrelerinde bulunan transkripsiyon faktörleri (Oct-4, Sox-2, Tert, Utf1, Rex-1 vb.), alkalin fosfataz reaksiyonunun varlığı, yüksek telomeraz aktivitesi ve normal karyotip yapısının korunmuş olması embriyonik kök hücre soylarında aranan özelliklerdir (Zaehres vd. 2005, Trounson 2006).

2.5.3. Embriyonik Kök Hücre Belirleyicileri

Embriyonik kök hücreler, hücre yüzey belirteçleri olarak Oct-4, SSEA-1, TRA-1-60, TRA-1-81 eksprese ederler (Ayrıntılı bilgi Tablo-5'den edinilebilir). İnsan embriyonik kök hücreleri, fare embriyonik fibroblast hücreleri ve 'Leukemia Inhibitory Factor'-LIF varlığında bu özelliklerini korumaktadırlar. EKH'lerin farklılaşmadan kendini yenileyebilmesi için birçok faktörün dengede olması gerekmektedir. EKH farklılaşmasının yönlendirilmesi amacıyla, kültür ortamına çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler eklenerek, farklı destek hücreleri kullanarak gen aktarımı ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır (Trounson 2006, Yao vd. 2006). Büyüme faktörlerinin etkisi bu hücreler üzerinde denenmiş, büyüme faktörleriyle indüksiyon yapıldığında üç embriyonik germ tabakasından köken alan 11 farklı doku elde edilmiş ve 24 tür hücrede özgün belirteçlerin varlığı izlenmiştir. Büyüme faktörleri, etkilerine göre mezodermal hücrelere farklılaşmayı indükte eden faktörler (aktivin-A, TGF β -1), ektodermal ve mezodermal indüksiyon yapan faktörler (retinoik asit, EGF, BMP-4, bFGF) ve tüm germ tabakalarına (NGF, HGF) indüksiyon sağlayan faktörler olmak üzere üç gruba ayrılmıştır (Schuldiner vd. 2009).

Embriyonik kök hücrelerin fonksiyonel veya fenotipik özelliklerine bakıldığında insanda ve farede yüksek alkalin fosfataz aktivitesi, yüksek telomeraz aktivitesi ve yüksek nükleer-sitoplazmik oran görülmektedir (Wobus 2001). Alkalin fosfataz aktivitesi insanda TRA-2-49 ve TRA-2-54 antikolarıyla saptanırken, kemirgenlerde

enzime bağılı reaksiyonla görüntülenmektedir (Draper vd. 2003). Yüksek telomeraz aktivitesi hücre dizilerinin immortalitesiyle ilişkilidir. Pluripotent hücrelerin her zaman yüksek telomeraz aktivitesi gösterdiği de bilinmektedir (Thomson vd. 1998, Donovan vd. 2001, Wobus 2001). Sox-2, Oct-4 ve Nanog pluripotent kök hücre fenotipinin devamlılığının sağlanmasında önemli transkripsiyon faktörleridir (Rodda vd. 2005). EKH'lerin tedavide kullanımında en önemli faktör, farklılaşmanın istenilen yönde kontrol edilmesidir ancak etik sorunlar nedeniyle EKH kullanımı yasaklanmıştır.

Stage Spesifik Embriyonik Antijen (SSEA)'in; SSEA-1, SSEA-3 ve SSEA-4 formlarının insan ve farede embriyonik kök hücrelerde farklı gelişimsel dönemlerde ve farklı paternlerde ekspresyonu gösterilmiştir (Verfaillie vd. 2002). Pluripotent insan embriyonik kök hücrelerinde Oct-4 ekspresyonuna ek olarak SSEA-4, TRA-1-60, GCTM-2, TRA-1-81 ve SSEA-3 ekspresyonu bilinmektedir (Thomson vd. 1998, Reubinoff vd. 2000, Donovan vd. 2001). Fare embriyonik kök hücrelerinin tanımlanmasında kullanılan SSEA-1, insan embriyonik kök hücrelerinde ekspresyon göstermemektedir (Thomson vd. 1998, Reubinoff vd. 2000, Kaufman vd. 2001). Bundan başka CD90, CD133 ve CD117 (c-kit) ekspresyonu da insan embriyonik kök hücrelerinde tanımlanmıştır (Verfaillie vd. 2002). Oct-4'ün fare embriyonik kök hücrelerinde sınırlı ekspresyon paterni göstermesi ve fonksiyonel önemi, bu molekülü pluripotent hücreler için güçlü bir işaretleyici yapmaktadır (Niwa vd. 2000, Xu vd. 2001).

Tablo-5. İnsan Embriyonik Kök Hücrelerinin Köklülük Markerlarının Karakterizasyonu

	Parametreler	Tanım ve İşlevleri
Gen Ekspresyonu; RT-PCR seviyesinde	Oct-4 (Oct 3/4)	Sadece pluripotent hücrelerde eksprese edilen POU domainine sahip transkripsiyon faktörüdür. Embriyonik hücrelerin farklılaşmasını inhibe eder.
	Nanog	Bir homeodomain proteindir. İnsan embriyonik kök hücrelerinin pluripotensisi için gereklidir.
	Rex-1	Asidik çinko-parmak transkripsiyon faktörüdür. İnsan embriyonik kök hücrelerindeki Oct-4'ün özel düzenleyicisidir.
	Sox-2	Transkripsiyon faktörüdür. İnsan embriyonik kök hücrelerinin yenilenmesinde hem de farklılaşmanın inhibisyonunda görev alır.
	GCTM-2	İnsan embriyonik kök hücrelerinin yüzeyindeki epitoptur.
	FGF-4	Fibroblast büyüme faktörü-4 embriyonik iç hücre kitlesinde eksprese edilir. Oct-4'ün transkripsiyonel düzenleyicisi ve Sox-2 için hedef genidir.
	c-kit (CD117)	Reseptör bir tirozin kinazdır. Aralarında hematopoezin, melanogenez ve fertilitenin de olduğu gelişimsel süreç için gereklidir.
Gen Ekspresyonu; İmmünohistokimya tekniği ile	SSEA-3, SSEA-4	Stage spesifik embriyonik antijen; bir glikolipit proteindir. İnsan embriyonik kök hücrelerinde eksprese edilir. İnsan embriyonik kök hücresi farklılaşmaya başladığı dönemde ifadesi görülür.
	TRA-1-60, TRA-1-81	Embriyonik kanser hücreleri, embriyonik germ hücreleri ve insan embriyonik kök hücrelerinin yüzeyinde eksprese edilen yüksek moleküler ağırlıklı glikoprotein antijenleridir.
Protein Fonksiyonu	Alkalen Fosfataz	Farklılaşmamış insan embriyonik kök hücrelerinde yüksek seviyelerdedir.
	Telomeraz	İnsan embriyonik kök hücrelerinin sınırsız bir şekilde kendini yenileyebilme kapasitesinden sorumlu olduğu düşünülmektedir ve telomeraz etkinliği yüksek seviyelerdedir.

Bu tablo Yael vd. (2007)'den alınmıştır.

Hipotez ve Çalışmanın Amacı

1921 yılından 2000'li yıllara kadar erkeklerde sperm üretiminin hayat boyu devam ettiğine, kadınlarda ise oosit üretiminin doğumdan önce bittiğine inanılıyordu. Hübner ve arkadaşlarının (2003), ilk olarak embriyonik kök hücreleri kullanarak in vitro ortamda oosit elde etmesiyle bu inanış değişmeye başladı. Devam eden çalışmalarda in vitro olarak elde edilen oositler kullanılarak ilk preimplantasyon öncesi embriyo elde edilmiştir. Johnson ve arkadaşları (2004), postnatal oogenezin olduğunu kanıtlamak için kemik iliğinden ve (2005) periferik kandan elde ettikleri kök hücreleri busulfanla oositleri tamamen yok olmuş ovaryumlara transplante etmiş ve ovaryumlarda oogenezin tekrar başladığını göstermişlerdir. Daha sonraki yıllarda deri epitelinden ve pankreas adacık hücrelerinden elde edilen kök hücrelerden de oosit üretilmiştir. İn vitro olarak elde edilen bu oositlerin tamamının kaynağı, ovaryum dışı dokulardan elde edilen kök hücrelerdir.

Polikistik over sendromu (PCOS) nedeni bilinmeyen endokrin bir hastalıktır. Bu hastalarda foliküller gelişmemekte, ovulasyon olmamaktadır. Bu hastalarda primordial ve primer foliküller olmasına karşın sekonder ve tersiyer foliküller yoktur. PCOS'ta ortaya atılan olası neden anormal oosit üretimidir. Anormal oosit üretiminin ovaryan embriyonik kök hücreleriyle ilgili olabileceği bildirilmektedir. Preovarian yetmezlikte de oosit sayısının oldukça az olması ve hastaların erken yaşta menopoza girmeleri bu konuda çalışan araştırmacıları ovaryum kök hücrelerine yönlendirmiştir. Ovaryan kök hücrelerinin araştırılması, ovaryum işlevinin ve fertilitenin daha iyi anlaşılmasına ve büyük oranda PCOS, preovarian yetmezlik ve kanser gibi hastalıkların nedenlerinin ve gelecekteki yeni tedavi yaklaşımlarının oluşmasına büyük katkı sağlayacaktır.

2008 yılında ise oosit epitelinde embriyonik kök hücre belirteçlerini eksprese eden hücrelerin varlığının bulunması çalışmaların yoğunluğunu ovaryum epiteline yönlendirmiştir. Ovaryum epitel hücreleri arasındaki bu hücrelerin işlevinin araştırılması, üreme sistemi hastalıklarının nedenlerinin özellikle de ovaryum kanserlerinin patofizyolojisinin anlaşılmasında ve tedavisinde oldukça önemli bir yere sahip olacaktır. Ovaryum kanseri yüksek mortalite oranına sahip olup değişik faktörlere bağlıdır. En son yapılan çalışmalarda embriyonik kök hücrelerinin kanser kök hücrelerine dönüşerek hastalığa neden olduğu hipotezi yaygın olarak kabul edilmektedir.

Bu tez de pluripotent ve embriyonik kök hücre belirteçlerinden Nanog, Oct 3/4, c-Kit ve SSEA-1 ifadelerinin yenidoğan, pubertal, ergin ve yaşlı ovaryum dokusundaki varlığı, yerleşimi ve dağılımı immunohistokimyasal olarak ve reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu tekniği kullanılarak incelenmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Hayvanlar ve Bakım Şartları

Çalışmamızda, Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanlar Araştırma Birimi'nden alınan 24 adet dişi Balb/c türü fareler kullanılmıştır. Tüm denekler için önerilen optimum çevresel koşullar aynı merkez tarafından sağlanmış ve fareler, ışıklandırması (12 saat aydınlık/karanlık siklusunda, 07:00-19:00 saatleri arası aydınlık), havalandırılması (%60-70 nem) ve oda ısısı (20-24 °C) kontrol edilen bir odaya çiftleştirilmeleri için yerleştirilmiştir. Denekler, günlük içme suyu ve %21 ham protein içeren pelet yemlerle (purina) beslenmiştir.

3.2. Deneysel Uygulama

Bu çalışmada; yenidoğan, pubertal, ergin ve yaşlı fareler kullanıldı. Fareler 4 gruba ayrıldı; birinci grup yenidoğan (doğum sonrası 2 günlük) deneklerden, ikinci grup puberte dönemindeki deneklerden (38 günlük yaklaşık 6 haftalık), üçüncü grup fertil hale gelmiş ergin deneklerden (12 haftalık), dördüncü grup ise yaşlı deneklerden (18 aylık) oluştu.

Doğumlarından itibaren 2 günlük (Yenidoğan dönem), 6 haftalık (Pubertal dönem), 12 haftalık (Ergin-fertil dönem) ve 18 aylık yaşlı (olasılıkla menopoza girmiş) hayvanlardan, anestezi altında ovaryum doku örnekleri alındı. Alınan ovaryumlar tespit için, %10'luk formaldehit solüsyonunda bekletildi. Dokular bir gece tespit edildikten sonra rutin ışık mikroskopi takibine alındılar. Hazırlanan parafin bloklardan, Leica RM-2125 rotary mikrotom kullanılarak 5 µ kalınlığında kesitler alındı. Kesitlere, Nanog, Oct 3/4, c-Kit ve SSEA-1 ifadelerini belirlemek amacıyla immunohistokimyasal boyama işlemi yapıldı. Kesitler daha sonra, Olympus BX51 marka ışık mikroskobu ve Olympus DP72 dijital kamera ile

resimlendi. Reverse transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu için taze ovaryum dokuları kullanıldı.

3.3. Reaktif Hazırlanması

Fiksatif Solüsyonu Hazırlama: % 37'lik formaldehitden 10 ml, distile sudan 90 ml alınarak % 10'luk fiksatif solüsyonu hazırlanmıştır.

3.4. Uygulanan Teknikler

3.4.1. Doku Takip Yöntemi:

- a. Alınan dokular formaldehitde 1 gece bekletildi.
- b. Akarsuda 30 dakika yıkandı.
- c. %70'lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- d. %80'lik etil alkolde 1 saat bekletildi.
- e. %90'lık etil alkolde 1 saat bekletildi.
- f. %100'lık etil alkolde 1 saat bekletildi.
- g. Ksilende 1 saat bekletildi.
- h. Ksilende 1 saat bekletildi.
- i. Parafinde 1 saat bekletildi.
- j. Parafinde 1 saat bekletildi.
- k. Dokulara parafinle gömme ve etiketlenme işlemi yapıldı.

3.4.2. İmmunohistokimyasal boyama

Doku takip yöntemi tamamlanan ovaryum bloklarından, mikrotom cihazıyla 5 μ 'luk kesitler alınıp, kesitler benmariye bırakıldı. Ardından uygulanan protokol sırası aşağıdaki gibidir: (Reaktifler için İnvitrogen Histostain-Plus kit kullanılmıştır.)

- a. Kesitler, benmariden lamlara alınıp lam taşıma sepetine yerleştirildi.

- b.** Lam taşıma sepeti etüvde 60 °C’de 1 saat bekletildi.
- c.** Ksilende, deparafinizasyon işlemi için 1 saat bekletildi.
- d.** Kesitler sırasıyla %100, %96, %70, %50’lik etil alkol serilerinde 2’şer dakika bekletildi.
- e.** Alkolden çıkan preparatlar akarsuda yıkanarak 10 dakika PBS’de bırakıldı. Bu aşamada kesitler PAP pen kullanılarak işaretlendi.
- f.** Dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesi, % 30’luk H₂O₂:Metanol (1:9) karışımı ile 30 dakikalık uygulamayla ortadan kaldırıldı.
- g.** PBS ile yıkanan kesitler, üzerlerine ilave edilen serum bloklama solüsyonu ile 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. (Invitrogen, Camarillo, CA 93012, A.B.D.)
- h.** Kesitler üzerine uygun primer antikorlar ilave edilerek 1 gece over night yapıldı. Bu çalışmada kullanılan primer antikorlar ve kullanıldıkları dilüsyonlar şu şekildedir: Oct 3/4 (1:50-1:500), SSEA-1 (1:50-1:500), Nanog (1:100-1:500), c-kit (1:50-1:500). Bütün primer antikorlar PBS ile dilüe edilmiştir.
- i.** Kesitler, PBS ile yıkandıktan sonra primer antikorlarla reaksiyon veren, biotinlenmiş afiniteye sahip sekonder antikorlarla 20 dakika muamele edilmiştir.
- j.** Tekrar PBS ile yıkanması yapılan kesitlere, biotinlenmiş-sekonder antikorlara kolayca bağlanabilen horseradish peroksidaz konjugatı streptavidin (HRP-SA) 10 dakika kadar muamele edilmiştir.
- k.** Kesitler son kez PBS ile yıkandıktan sonra kromojen boyası DAB ile 3-10 dakika kadar muamele edilmiştir.
- l.** Antijenin lokalizasyonunun daha iyi gözlenmesi için kesitlere hematoksilen (Merk Harris’ hematoksilen) ile zıt boyama yapılmıştır.

m. Kesitler akarsu da yıkanmış ve sırasıyla %50, %70, %96, %100'lük etil alkol serilerinde 2'ser dakika bekletilmiştir.

n. Dokuların üzeri entellan ile kapatılmıştır.

Boyanmanın değerlendirilmesinde aşağıdaki skala kullanıldı.

(+++): kuvvetli boyanma, (++): orta derecede boyanma, (+): zayıf boyanma, (/+/-): çok zayıf boyanma, (-): boyanma yok, (/): o yapıya rastlanmamıştır.

3.4.3. Taze Dokudan RNA İzolasyonu

Taze dondurulmuş dokulardan RNA İzolasyonu Trizol (Sigma) kullanılarak, üretici firmanın önerdiği protokol çerçevesinde yapılmıştır. Protokol aşamaları kısaca özetlenmiştir. İlgili örnek dokuların her biri, 500 µl Trizol (Sigma) içinde bir bistüri yardımı ile küçük küçük parçalara ayrılarak parçalanmış ve 5 dk oda ısısında (25 °C) bekletilmiştir. Sonrasında 1,5 ml tüplere alınan örneklere 100 µl kloroform eklenip 15 sn vorteks yardımı ile karıştırılıp 15 dk oda ısısında (25 °C) bekletilip +4 °C 15.000 rpm'de (12.000 g) 15' santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında tüplerde 3 ayrı fazın oluşumu gözlemlenmiş ve en üstteki fazda bulunan total RNA bir mikropipet yardımı ile ayrı bir tüp içerisine alınmıştır. Bunu takiben her bir tüpe 250 µl 2-propanol eklenerek -20 °C'de gece boyu (12-18 saat) bekletilmiştir. Ertesi gün, örnekler -20 °C'den çıkarılarak +4 °C 15.000 rpm'de 15' santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonrasında RNA, tüpün dibinde beyaz bir pellet oluşturmuş ve RNA'nın üzerindeki sıvı pipetle çekilip atıldıktan sonra RNA pelleti 500 µl % 70'lik soğuk etanolle yıkanıp, tekrar +4 °C 15.000 rpm'de 10' santrifüj edilmiştir. RNA pelletinin üzerindeki süpernatant kısmı mikropipet yardımı ile uzaklaştırılmış ve tüplerin ağzı açık bir şekilde (kalan etanolün uzaklaşması için) 5-15 dk beklenmiştir. Son aşamada pelletin üzerine 25 µl soğuk RNaz'dan arındırılmış su (RNaz free water) ilave edilmiş ve örnekler RNA kalitesi ve miktarları belirlendikten sonra hemen kullanılmış veya daha sonra kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır.

3.4.4. Reverse Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) Analizi

RNA izolasyonu yapılan örneklere ait total RNA nitelik ve nicelik konsantrasyonu ‘Nanodrop D1000’ spektrofotometre cihazı ile ölçülmüştür. Ayrıca elde edilen RNA’nın kalitesi agaroz jel elektroforezi ve etidyum bromür boyaması ile test edilmiştir. Her bir reverse transkripsiyon reaksiyonu için 1 mikrogram RNA örneği kullanılmıştır. Oct 3/4 (521 bç), Nanog (431 bç), c-kit (401 bç) ve GAPDH (98 bç) amplikonları OneStep RT-PCR kit (Cat# 210212, Qiagen) kullanılarak, tek aşamalı semikantitatif RT-PCR reaksiyonu ile çoğaltılıp, EtBr ile boyanmış % 2’lik agaroz ile hazırlanmış jelde görüntülenmiştir. OneStep RT-PCR kit için kullanılan protokol kısaca şu şekilde özetlenebilir:

A. PCR toplam 50 µl’lik hacimde gerçekleştirilmiştir:

- 1- 10 µl 5x Qiagen OneStep RT-PCR tampon çözeltisi (12.5 mM MgCl₂ içermektedir),
- 2- 2 µl dNTP karışımı, her dNTP’den 10 mM içermektedir
- 3- 10 µl 5x Q-solüsyonu,
- 4- 3 µl., Primer analiz edilecek gen için spesifik olarak dizayn edilmiş 10 µM konsantrasyondaki ileri ve geri primerlerin her birisinden (Bu çalışmada kullanılan primerler Tablo-6’da özetlenmiştir. Primerlerin sentezi İontek AŞ tarafından gerçekleştirilmiştir.)
- 5- 2 µl Qiagen OneStep RT-PCR enzim karışımı,
- 6- 21 µl RNase-free distile H₂O, toplam 50 µl volüm içerisinde, buz üzerinde örnek RNA ile karıştırılmıştır.

B. Elde edilen karışım ile aşağıda basamakları sıralanan RT-PCR reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

- 1- 50 C°, 30 dakika, 1 döngü (reverse transkripsiyon),
- 2- 95 C°, 15 dakika, 1 döngü (PCR aktivasyon basamağı),
- 3- 94 C°, 1 dakika (denatürasyon). 54 C° (Oct 3/4, GAPDH ve Nanog için) ve 58 C°’de (c-kit için), 1 dakika (primerlerin örnek cDNA’ya tutulumu). 72 C°, 1 dakika (sentez ve uzama); bu üç basamak sırası ile 33 döngüde tekrarlanmıştır.
- 4- 72 C°, 10 dakika, 1 döngü (son sentez ve uzama),

5- Reaksiyonlar +4 C° de sonlandırılmışlardır ve -20 C° de saklanmışlardır.

C. PCR ürünleri etidyum bromür ile hazırlanmış % 2'lik agaroz jele yüklenerek elektroforez ile gözlemlenmiştir.

D. Elde edilen gen spesifik ampikonlar GelQuant Ver.2.7 (DNR Bio-Imaging Systems, Jerusalem, Israel) bilgisayar programı kullanılarak dansitometrik olarak analiz edilmiştir.

Tablo-6. Gen ekspresyonlarının analizinde kullanılan RT-PCR Primerleri

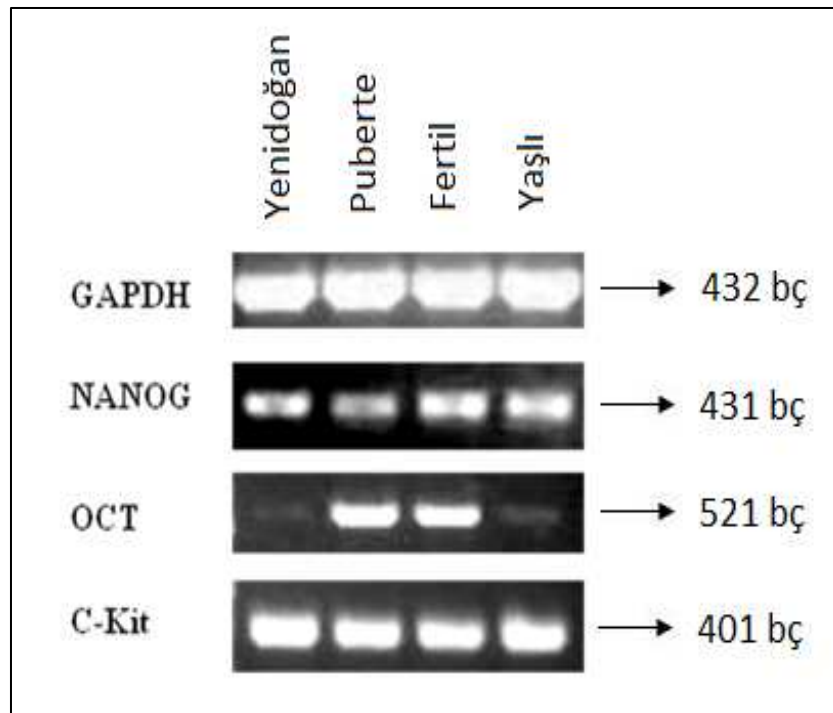
Gen	Primer Dizisi Sense(F)/Antisense(R)	Ürün (bp)	Annualing Temperature (C°)	Referans
Fare				
<u>Embriyon kök hücrelerine özgü genler</u>				
Oct 3/4	F: GAGCACGAGTGGAAAGCAAC R: CGCCGGTTACAGAACCATAC	521	62	Mansergh et al., 2009
Nanog	F:TTACAAGGGTCTGCTACTGAGATG R: GCAATGGATGCTGGGATACT	431	62	Mansergh et al., 2009
c-Kit	F:CTGGTGGTTCAGAGTTCATAGAC R:TCAACGACCTTCCCGAAGGCACA	401	58	Jin Lim et al., 2010
<u>Ev sahibi gen</u>				
GAPDH	F: ACCACAGTCCATGCCATCAC R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	432	62	Mansergh et al., 2009
F = İleri primer; R = Geri primer.				

4. BULGULAR

4.1. RT-PCR Bulguları

Nanog, Oct 3/4, c-kit mRNA'larının fare ovaryum dokusunda ekspresyon profilleri RT-PCR ile incelenmiştir. Semikantitatif RT-PCR reaksiyonunda, Gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) gen ifadesi “kontrol gen ifadesi (housekeeping gene expression)” olarak kullanılmıştır.

Ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde nanog geninin RNA ekspresyon düzeyleri yenidoğan (3 günlük) ile 38 günlük puberte döneminde benzerdir. Ancak bu genin, 2 aylık fertil ile 1 yaşını doldurmuş yaşlı dokusundaki ekspresyon düzeyinin, yenidoğan ve 38 günlük puberte dönemindeki dokulara göre arttığı gözlemlenmiştir. Bu bulguya göre, fare ovaryum dokusundaki nanog ekspresyonunun gelişimsel süreçte giderek artış gösterdiği düşünülmektedir. Oct 3/4 RNA ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde, yenidoğan ile yaşlı dokusunda Oct 3/4 geni ekspresyonunun diğer puberte ve fertil dönemdeki dokulardan çok daha az düzeyde olduğu gözlemlenmiştir. c-kit RNA ekspresyon sonuçları değerlendirildiğinde, gruplar arasında benzer ekspresyon olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulguya göre c-kit geninin ekspresyonunun yenidoğandan yaşlı döneme kadarki gelişimsel süreçte korunduğu düşünülmektedir.



Şekil 3. Fare ovaryum dokusunda RT-PCR gen ekspresyon profilleri

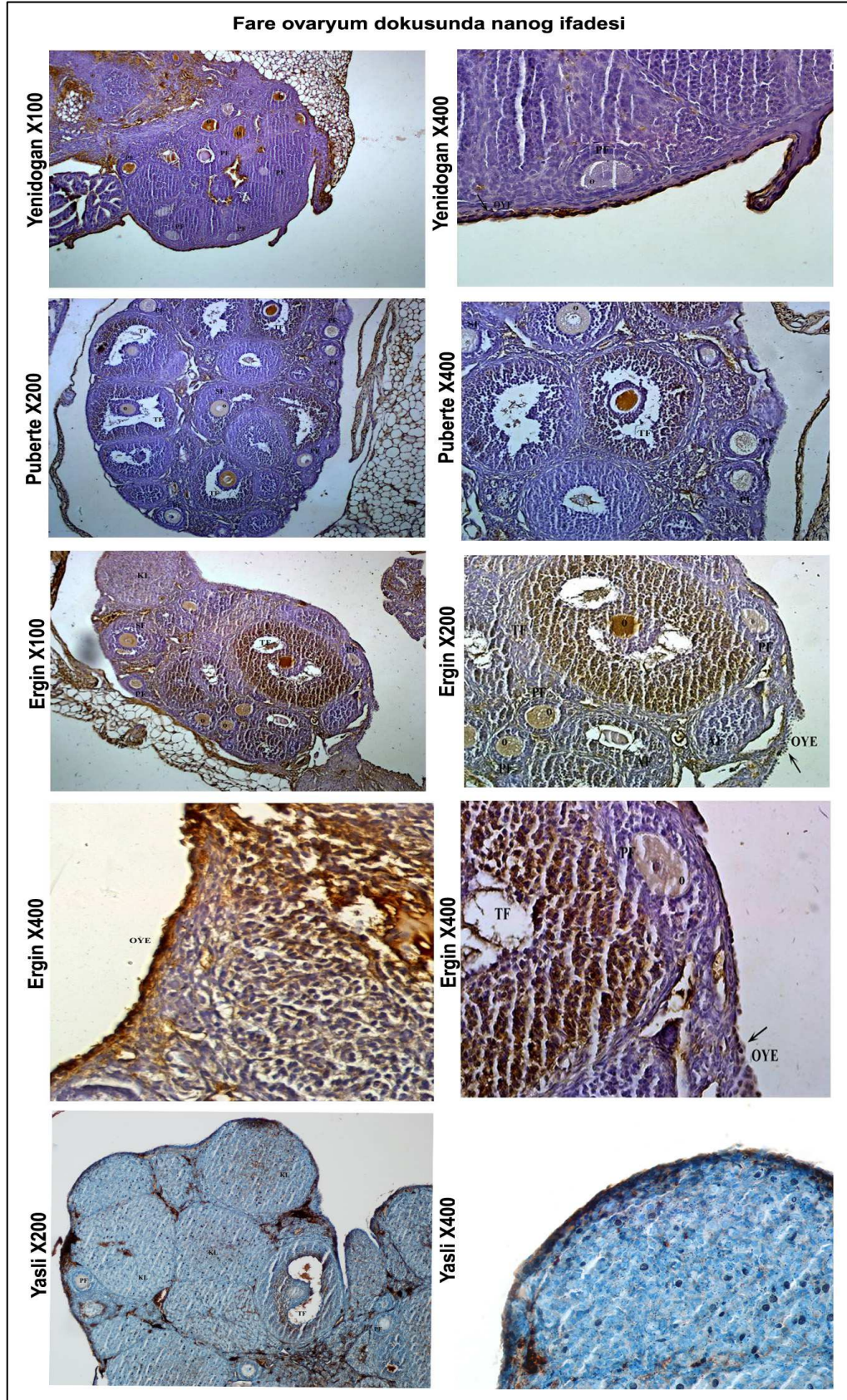
4.2. Ovaryum Dokusunda Nanog İfadesi

Yenidoğan (2. gün) ovaryum yüzey epitelinde nanog ifadesi kuvvetli olarak izlendi. Foliküllerde epitel hücreleri negatif olarak izlenirken oositlerin bazılarında negatif bazılarında ise kuvvetli pozitif reaksiyon olması dikkat çekiciydi. Ovaryum stromasında ise kan damarları kuvvetli reaksiyon gösterirken stromal hücrelerde reaksiyon zayıf pozitif (Resim 1)

38 günlük puberte dönemi ovaryum dokusunda ise yenidoğan grubundan farklı olarak ovaryum yüzey epiteli negatif ifade gösterdi. Primer ve sekonder foliküllerin folikül granüloza hücrelerinde boyanma izlenmezken tersiyer foliküllerin granüloza hücrelerinde yer yer pozitif yer yer negatif boyanma vardır. Primer ve sekonder foliküllerdeki oositler zayıf pozitif, tersiyer foliküldeki oosit kuvvetli pozitif. Ovaryum stroması yenidoğan grubundan farklı olarak yoğun pozitif (Resim 1).

12 haftalık ergin (fertil) farelerin ovaryum yüzey epitelindeki ifade yenidoğan grubunda olduğu gibi kuvvetli pozitif. Primordial foliküllerde negatif reaksiyon gözlenirken primer foliküllerde yer yer negatif yer yer pozitif reaksiyon vardır. Sekonder ve tersiyer foliküllerde folikül epitel hücre ifadesi puberte dönemine göre artış göstermiştir. Aynı şekilde sekonder ve tersiyer foliküllerin oositlerinde de artış izlenmektedir. Primordial foliküllerin oositlerinde ifade gözlenmemesine rağmen primer foliküllerin oositlerinde zayıf pozitif ifade vardır. Korpus luteum hücre çekirdekleri negatif ifade gösterirken hücre sitoplazmalarında pozitif reaksiyon görülmektedir (Resim 1).

18 aylık yaşlı farelerin ovaryum yüzey epitelinde pozitif ve negatif reaksiyon gösteren hücreler vardı. Bu grupta folikül sayısı göreceli olarak azalmış korpus luteum sayısı ise artmış olarak izlendi. Luteal hücreler negatif reaksiyon gösterirken stromal hücrelerde ve atretik foliküllerde gözlenen reaksiyondaki artış ilgi çekiciydi (Resim 1). (Nanog belirtecinin sonuçları tablo 7 ve 8'de kısaca özetlenmiştir.)



Resim 1

Nanog ifadesinin fare ovaryum dokusundaki yerleşimi ve dağılımında primer folikül; (PF), sekonder folikül; (SF), tersiyer folikül; (TF), primer oosit; (o), ovaryum yüzey epiteli; (OYE) ve korpus luteum; (KL) yapıları görülmektedir.

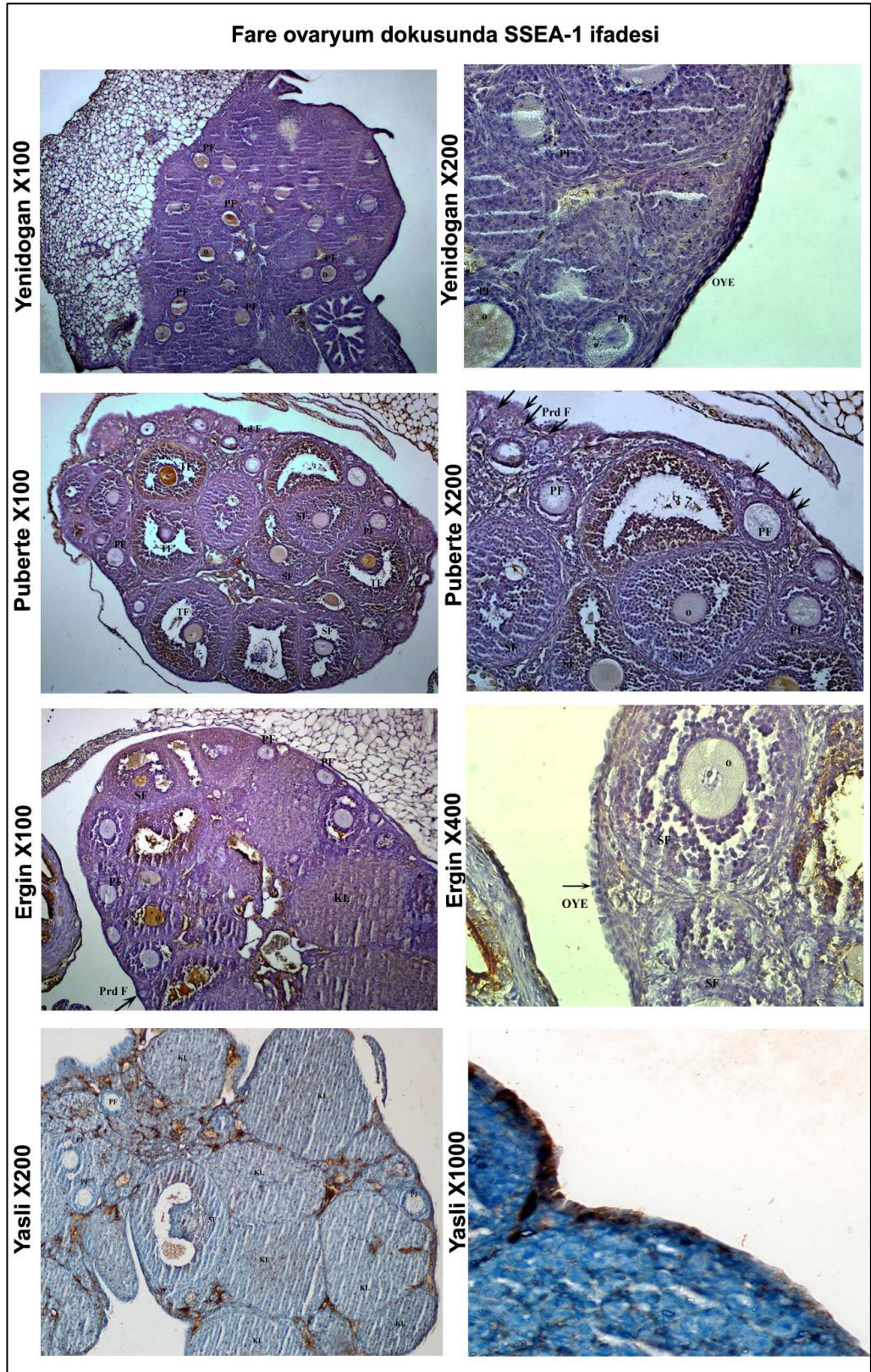
4.3. Ovaryum Dokusunda SSEA-1 İfadesi

Yenidoğan (2. gün) ovaryum dokusunda, ovaryum yüzey epitel folikül epitel hücreleri negatifti. Primer oositler de zayıf pozitiften kuvvetli pozitive değişen reaksiyon görüldü. Ovaryum stromasının da zayıf pozitif reaksiyon gösterdiği izlenmiştir (Resim 2).

38. günlük puberte dönemi ovaryum dokusunda, ovaryum yüzey epitelindeki reaksiyon negatifti. Primordial ve primer foliküllerin epitel hücrelerindeki ve oositlerindeki ifade zayıfken, sekonder ve tersiyer foliküllerin granüloza hücrelerinde negatif ve pozitif reaksiyon birlikte gözlemlendi. Oositlerde de negatiften kuvvetli pozitive değişen derecelerde reaksiyonlar izlendi. Ovaryum stromasında yer yer pozitif boyanma gözlemlendi (Resim 2).

12 haftalık ergin (fertil) farelerin ovaryum yüzey epitel negatifti ifade gösterdi. Primordial ve primer foliküllerin epitel hücrelerinde negatif ifade gözlenirken, sekonder ve tersiyer foliküllerin granüloza hücreleri genel olarak negatif olmakla birlikte çok az hücrede pozitif boyanma dikkati çekti. Diğer gruplarda olduğu gibi oositlerin bazıları negatif, bazıları pozitif reaksiyon gösterdi. Teka eksterna bu grupta da negatif olarak gözlemlendi. Korpus luteumda boyanma orta derecedeydi ve sitoplazmikti. Ovaryum stroması çok zayıf pozitifken kan damarları kuvvetli pozitif (Resim 2).

18 aylık yaşlı farelerin ovaryum dokusunda pozitif ve negatif reaksiyon gösteren yüzey epitel hücrelerine rastlandı. Bu grupta folikül sayısı göreceli olarak azalmış korpus luteum sayısı ise artmış olarak izlendi. Luteal hücreler negatifti, stromal hücreler ile atretik foliküller pozitif (Resim 2). (SSEA-1 belirtecinin sonuçları tablo 9 ve 10'da kısaca özetlenmiştir.)



Resim 2

SSEA-1 ifadesinin fare ovaryum dokusundaki yerleşimi ve dağılımında primordial folikül; (Prd F), primer folikül; (PF), sekonder folikül; (SF), tersiyer folikül; (TF), primer oosit; (o), ovaryum yüzey epiteli; (OYE) ve korpus luteum; (KL) yapıları görülmektedir.

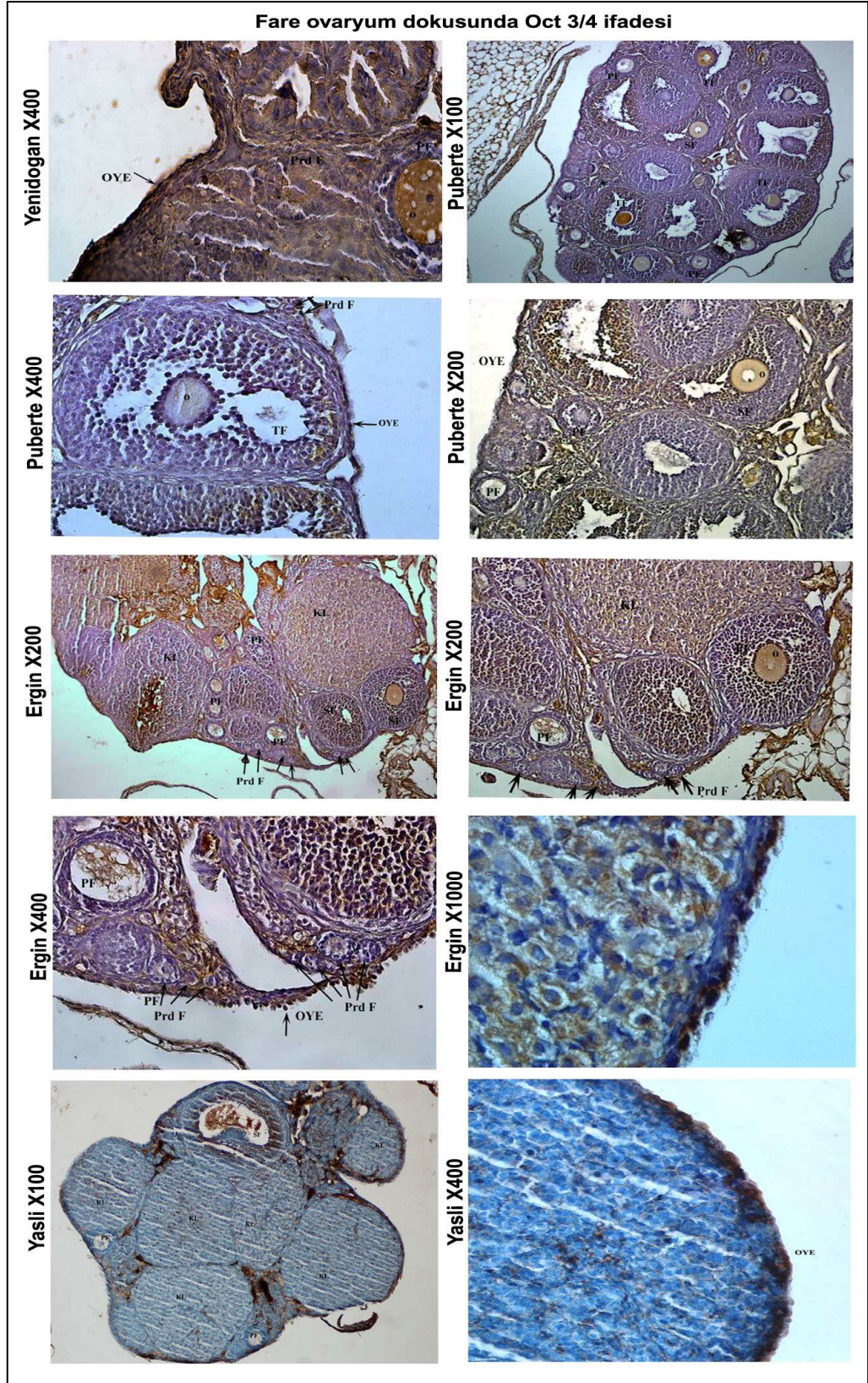
4.4. Ovaryum Dokusunda Oct 3/4 İfadesi

Yenidoğan (2. gün) ovaryum yüzey epitelinde Oct 3/4 ifadesi pozitif olarak izlendi. Primordial ve primer foliküllerin oositleri kuvvetli pozitif reaksiyon gösterdi ancak folikül epitel hücreleri negatifti (Resim 3).

38. günlük puberte dönemi ovaryum yüzey epiteli Oct 3/4 için negatifti. Primer ve sekonder foliküllerin epitel hücrelerinde negatif ifade izlenirken tersiyer foliküllerin granüloza hücrelerinde negatif ve pozitif reaksiyon gösteren hücreler iç içeydi. Primer folikülün oositinde negatif ifade gözlenirken, sekonder ve tersiyer foliküllerin oositlerinde kuvvetliden zayıf pozitif kadar değişen ifade gözlemlendi (Resim 3).

12 haftalık ergin (fertil) farelerin ovaryum yüzey epitelinde zayıf pozitif ve kuvvetli pozitif reaksiyon gösteren hücrelere rastlandı. Primordial ve gelişen foliküllerin granüloza hücrelerinde negatif ifade varken primer ve sekonder foliküllerin granüloza hücrelerinde pozitif ifade vardır. Primer oositteki boyanmanın şiddeti folikül büyüdükçe artmaktadır. Korpus luteum hücreleri de pozitif reaksiyon göstermektedir ve boyanma genel olarak sitoplazmiktir (Resim 3).

18 aylık yaşlı farelerin ovaryum yüzey epitelinde negatif ve pozitif boyanma gösteren hücreler iç içeydi. Bu grupta da diğer gruplarda olduğu gibi folikül sayısı göreceli olarak azalmış, korpus luteum sayısı artmış olarak izlendi. Luteal hücreler negatif, stromal hücreler ve atretik foliküller pozitif (Resim 3). (Oct 3/4 belirtecinin sonuçları tablo 11 ve 12'de kısaca özetlenmiştir.)



Resim 3

Oct 3/4 ifadesinin fare ovaryum dokusundaki yerleşimi ve dağılımında primordial folikül; (Prd F; oklar), primer folikül; (PF), sekonder folikül; (SF), tersiyer folikül; (TF), primer oosit; (o), ovaryum yüzey epiteli; (OYE) ve korpus luteum; (KL) yapıları görülmektedir.

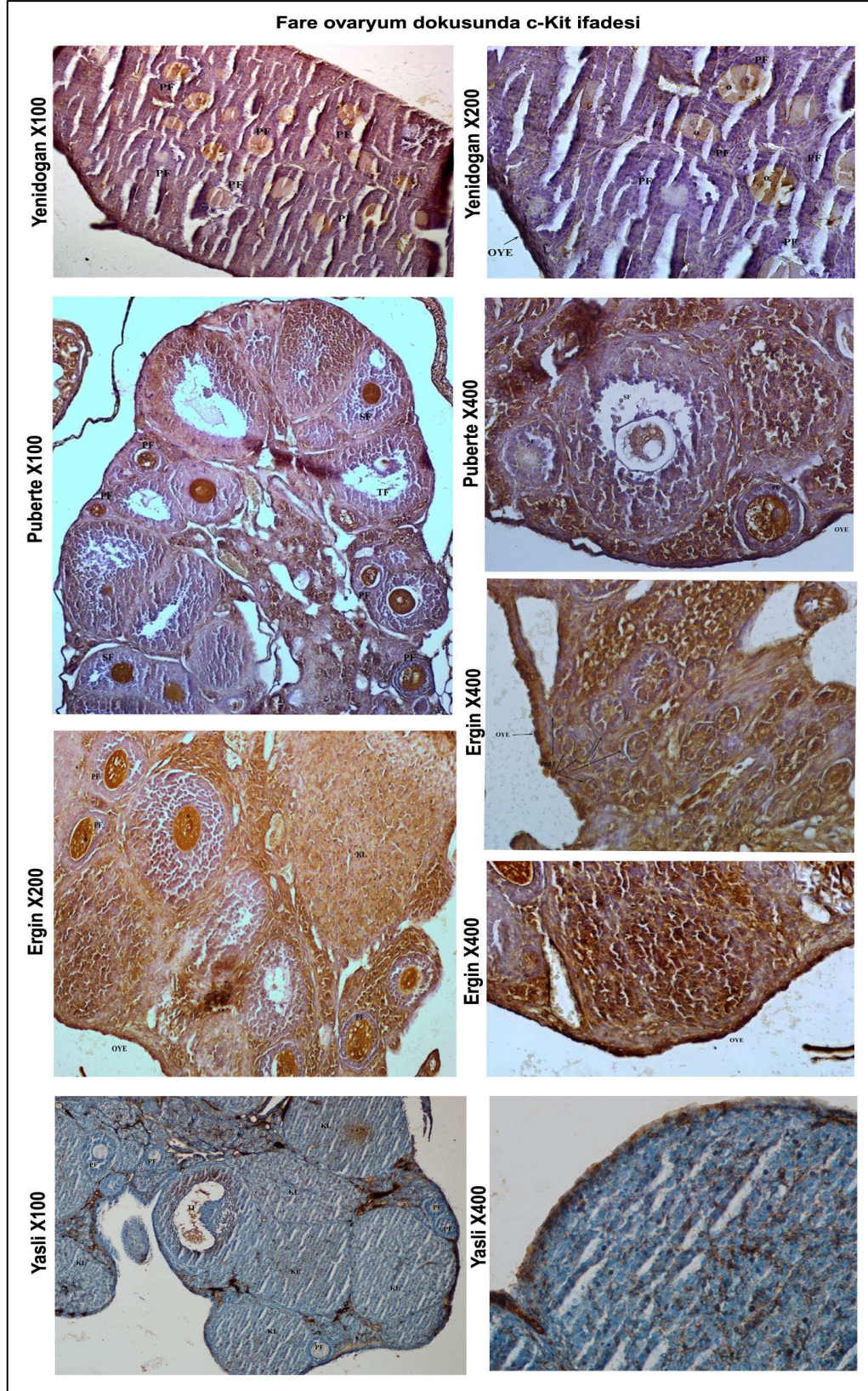
4.5. Ovaryum Dokusunda c-kit İfadesi

Yenidoğan (2. gün) ovaryum yüzey epitelinde c-kit ifadesi pozitif olarak izlendi. Folikül epitel hücreleri negatif olarak izlenirken oositlerin bazısında negatif bazısında kuvvetli pozitif ifade izlendi. Ovaryum stromasındaki ifade ise zayıf pozitif olarak gözlemlendi (Resim 4).

38. günlük puberte dönemindeki grup da ovaryum yüzey epitelinde kuvvetli pozitif boyanma gösterdi. Primordial, primer ve sekonder foliküllerin hem epitel hücrelerinde hem de oositlerinde pozitif reaksiyon görülürken, tersiyer foliküllerin lümene yakın olan granüloza hücrelerindeki boyanmanın şiddeti orta derecede pozitifken, lümeden bazale doğru inildikçe boyanmanın derecesi giderek artmış ve bu tabakalardaki hücreler kuvvetli pozitif bir reaksiyon göstermiştir. Tersiyer foliküllerdeki sekonder oositler de kuvvetli pozitif boyanmıştır. Korpus luteum hücrelerinde ve ovaryum stromasındaki reaksiyon da pozitifdir (Resim 4).

12 haftalık ergin (fertil) farelerin ovaryum yüzey epiteli bu grupta da pozitif boyanma gösterdi. Primordial foliküllerin granüloza hücreleri orta derecede pozitif ve kuvvetli pozitif boyanma gösterirken foliküllerin primer oositlerindeki reaksiyonlar negatiftir. Tek tabakalı primer foliküllerdeki granüloza hücrelerinde orta derecede pozitif boyanma varken, çok katlı tabakaya sahip primer foliküllerin granüloza hücrelerindeki boyanma kuvvetli pozitifdir. Primer foliküllerin hem zona pellusidaları hem primer oositleri hem de oosit çekirdekleri kuvvetli pozitif ifade göstermiştir. Korpus luteumun bazı hücre çekirdekleri boyanmazken bazı hücre çekirdeklerinde kuvvetli pozitif reaksiyon izlenmiştir (Resim 4).

18 aylık yaşlı grupta genel görünüm diğer gruplarla aynı idi. c-kit'in ifadesi, dağılımı ve yerleşimi de Nanog, Oct 3/4 ve SSEA-1'in sonuçlarına benzerdi. Bu grupta da stromal hücreler ile atretik foliküllerde kuvvetli boyanma, luteal hücrelerde negatif boyanma izlenmiştir (Resim 4). (c-Kit belirtecinin sonuçları tablo 13 ve 14'de kısaca özetlenmiştir.)



Resim 4

c-Kit ifadesinin fare ovaryum dokusundaki yerleşimi ve dağılımında primordial folikül; (Prd F; oklar), primer folikül; (PF), sekonder folikül; (SF), tersiyer folikül; (TF), primer oosit; (o), ovaryum yüzey epiteli; (OYE; tek ok) ve korpus luteum; (KL) yapıları görülmektedir.

Tablo-7. Nanog Ekspresyonu Dağılımı ve Yerleşimi

Nanog	Oosit				Granuloza Hücreleri				Teka Hücreleri			
	YD	PB	E	Y	YD	PB	E	Y	YD	PB	E	Y
Primordial Folikül	+	+	++	/	-	-	-	-	/	/	/	/
Primer Folikül	+/ ++	++ +	++ +	/	-	-	-	-	/	/	/	/
Sekonder Folikül	/	++ +	++ +	/	/	++ +/-	-	-	/	++	++ +	-
Tersiyer Folikül	/	++ +	++ +	/	/	++ +/-	+/-	/	/	++ +	++ +	
Korpus Luteum	/	/	++	-								

Tablo-8. Ovaryum yüzey epiteli ve stromal hücrelerde Nanog ekspresyonu

Nanog	Yenidoğan	Pubertal Dönem	Ergin Dönem	Yaşlılık
Stromal Hücreler	-	+++	++	+++
Ovaryum Yüzey Epiteli	+++	-	+++	+++/-

Tablo-9. SSEA-1 Ekspresyonu Dağılımı ve Yerleşimi

SSEA-1	Oosit				Granuloza Hücreleri				Teka Hücreleri			
	YD	PB	E	Y	YD	PB	E	Y	YD	PB	E	Y
Primordial Folikül	+	-	-	-	-	-	-	-	/	/		
Primer Folikül	- /+ +	-/+	-	-	-	-	-	-	/	-		
Sekonder Folikül	/	+/-	+/-	-	/	+/ ++	++ +/-	-	/	-		
Tersiyer Folikül	/	+/ ++ +	++ /+	-	/	++	+/-	-	/	-		
Korpus Luteum		++	++					-	/	/		

Tablo-10. Ovaryum yüzey epiteli ve stromal hücrelerde SSEA-1 ekspresyonu

SSEA-1	Yenidoğan	Pubertal Dönem	Ergin Dönem	Yaşlılık
Stromal Hücreler	-	+	-/++	+++
Ovaryum Yüzey Epiteli	-	-	-	-/+++

Tablo-11. Oct 3/4 Ekspresyonu Dağılımı ve Yerleşimi

Oct 3/4	Oosit				Granuloza Hücreleri				Teka Hücreleri			
	YD	PB	E	Y	YD	PB	E	Y	YD	PB	E	Y
Primordial Folikül	+/-	-	-/+	/		-	-	-			-	
Primer Folikül	++ /-	+/-	+	+/-		-	- /+ +	-	/	-	-	
Sekonder Folikül	/	+/-	++	/	/	+	- /+ +	+	/	-	-	
Tersiyer Folikül	/	++ /+ ++	++	/		- /+ ++	+/ ++	- /+ +	/	-	-	
Korpus Luteum	/	/		-	/			-	/	-	-	

Tablo-12. Ovaryum yüzey epiteli ve stromal hücrelerde Oct 3/4 ekspresyonu

Oct 3/4	Yenidoğan	Pubertal Dönem	Ergin Dönem	Yaşlılık
Stromal Hücreler	-	+ / ++	+	+++
Ovaryum Yüzey Epiteli	+++	-	+ / +++	- / +++

Tablo-13. c-kit Ekspresyonu Dağılımı ve Yerleşimi

c-kit	Oosit				Granuloza Hücreleri				Teka Hücreleri			
	YD	PB	E	Y	YD	PB	E	Y	YD	PB	E	Y
Primordial Folikül	+/-	+	++	+	-	-	-	/	-	/	/	/
Primer Folikül	+/ ++	++ +	++ +	-	-	-	-	-	-	/	/	/
Sekonder Folikül	/	++ +	++ +	/	/	++ +/-	-	/	/	++	++ +	-
Tersiyer Folikül	/	++ +	++ +	/	/	++ +/-	+/-	/	/	++ +	++ +	-
Korpus Luteum	/	/	++	-	-	/			/			

Tablo-14. Ovaryum yüzey epiteli ve stromal hücrelerde c-kit ekspresyonu

c-kit	Yenidoğan	Pubertal Dönem	Ergin Dönem	Yaşlılık
Stromal Hücreler	-	+++	+++	++/-
Ovaryum Yüzey Epiteli	+++	+++	+++	+++/-

5. TARTIŞMA

Ovaryum dokusunda belli sayıda oosit olduğu ve bunların sayısının arttırılmasının mümkün olmadığı üreme biyolojisinin en temel dogmasıdır. İlk olarak 1870'lerde temeli atılan bu doktrin (Waldeyer vd. 1870) 1950'lerde daha da kabul görmüştür (Zuckerman 1951).

Ancak son yıllarda doğum sonrası dönemde oogenezinin olabileceğini gösteren çalışmalar bu dogmanın kesinliğinin sorgulanmasına neden olmuştur (Johnson vd. 2004, Lee vd. 2007). Aslında doğum sonrası oogenezinin olabileceği fikri ilk olarak Allen (1923) ve Simkins (1932) tarafından ortaya atılmıştır. 2004 ve 2005 yılında Tilly ve arkadaşları kemik iliği ve periferik kan kök hücrelerini, kemoterapi ile sterilize edilmiş ovaryumlara transplante etmişler (Johnson vd. 2004, Johnson vd. 2005) ve yeniden oogenezinin olabileceğini göstererek bu fikri canlandırmışlardır.

Bu çalışmaların yanısıra kök hücrelerden germ hücresi eldesi çalışmalarında bu süre içerisinde bilim dünyasındaki yerini hızla almıştır. Bu konuda ilk olarak 2003 yılında Hübner ve arkadaşları yeşil florasan protein taşıyan transgenik fare embriyonik kök hücrelerini kullanarak in vitro olarak oosit elde etmişlerdir. 2004 yılında Geijsen ve arkadaşları embriyonik kök hücrelerden spermatogonyum elde etmişlerdir. 2006 yılında Lacham-Kaplan ve Novak embriyonik kök hücrelerden oosit elde etmişler ancak Novak, elde ettikleri oositlerin mayoz bölünme geçirmediğini ve fertilizasyon kapasitelerinin olmadığını belirtmiştir. Dyce ve arkadaşları 2006 yılında fetal domuzların deri kök hücrelerini kullanarak VASA ve DAZL ifade eden granuloza hücreleri elde etmişlerdir. Bu hücreleri 30-40 gün boyunca kültüre ettiklerinde foliküllerin geliştiğini görmüşlerdir. Ayrıca bu hücrelerin FSH reseptörüne sahip ve FSH'a duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Ghadami 2008 yılında folikül stimule edici hormon reseptörü (FSHR) olmayan farelere kemik iliği transfer ettiğinde hem follikül sayısında hem de östrojen düzeyinde artış gözlemiştir. Lue ve arkadaşları ise kemik iliği kökenli kök hücreleri fare testislerine naklettiklerinde FSHR eksprese eden sertoli hücreleri elde etmişlerdir (Lue vd. 2007). 2004 ve 2005 yıllarında Bukovsky ve arkadaşları ovaryum yüzey epitelindeki germ hücrelerinin kan akımıyla ovaryum içine geçebileceğini ve yeni oluşan foliküllerin bunlar olabileceğini söylemişlerdir.

Ancak 2006 yılında Egan yaptığı parabiyojen fare modelinde bu foliküllerin yanlış işaretlenmiş immün hücreler olduğunu savunmuştur.

Yukarıda belirtildiği gibi pek çok araştırmada somatik kök hücrelerinden ya da embriyonik kök hücrelerinden oosit elde edilmiştir. Bukovsky'nin ovaryum yüzey epitelinden germ hücrelerini elde ettiğini bildirmesi bu konuda yeni araştırma sahalarının ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Ovaryum yüzey epitelinin ovaryum fizyolojisindeki ve ovaryum kanserlerindeki rolü büyüktür. Ovaryum kanserlerinin % 85-90'nı epiteliyal kökenlidir ve öldürücü olan bu kanserler ovaryum yüzey epitelinden kaynaklanır (Jemal vd. 2002). Ovaryum yüzey epiteli çok az farklılaşan, değişime az uğrayan pek çok epitel dokudan farklı olarak hem epiteliyal hem de mezenşimal belirteçleri ifade eder (Auersperg vd. 2001). Ovaryum yüzey epiteli ovulasyonda yırtılır daha sonra da kendini yenileyebilir. Son yıllarda pek çok çalışmada olgun ovaryum yüzey epitelinde varlığı gösterilen kök hücreler tartışılmaktadır (Auersperg vd. 2001, Zhang vd. 2008). Parte ve arkadaşları, kültüre ettikleri yüzey epitel hücrelerinde kök hücre belirteçlerinden Oct 3/4'ün ve SSEA-4'ün ifade olduğunu göstermişlerdir. Virant-Klun ovaryum yüzey epitelinin embriyonik kök hücre özelliği gösterdiğini ve Sox-2, Oct4 ve Nanog ifade ettiğini ileri sürmüştür (Virant-Klun 2010, Skutella 2010). Virant-Klun ve arkadaşları doğal olarak folikül bulunmayan menapozal dönemdeki ve prematür ovaryan yetmezliği olan hastalardan ovaryum yüzey epiteli izole etmiş ve bu hücrelerden oosit elde etmişlerdir. Zhang ve arkadaşları 2008 yılında ovaryumda folikül dışındaki yapılardan da, germ belirteçlerinden Oct 3/4, MVH, SCF-R (c-kit) ve SSEA-1'i eksprese eden hücreleri tanımlamışlardır (Zhang vd. 2008).

Transkripsiyonel faktörlerden Oct 3/4 ve nanog güçlü transkripsiyonel faktörlerdendir. Pluripotent ve embriyonik kök hücrelerde bulunurlar. Bu genlerin doğum sonrasında üreme hücrelerinde ve çeşitli somatik hücrelerde bulunması bazı araştırmacılara göre yalancı gen (pseudogen) ifadesi olarak ele alınmıştır (Lengner vd. 2007, 2008). Adewumi ve arkadaşları ise bu genlerin primerlerini kullanarak yaptıkları çalışmada, primerlerin amplifiye olduğunu pseudogenlerin ise amplifiye olamayacağını göstermişlerdir. Bununla birlikte Oct 3/4 ve nanog gibi güçlü transkripsiyonel faktörlerin somatik hücrelerdeki işlevi tam olarak açıklanamamıştır.

Biz literatüre bu konu ile ilgili daha fazla katkıda bulunabilmek için öncelikle yenidoğan dönemden yaşlı dönemine kadar tüm ovaryum dokusunda nanog, Oct 3/4, c- kit ve SSEA-1'in varlığı, yerleşimi ve dağılımını incelemeyi amaçladık.

Nanog 2003 yılında keşfedilen kök hücre belirteçlerinden biridir. İmplantasyon öncesi embriyolar, embriyonik kök hücreler, embriyonik germ hücreleri ve embriyonik kanser hücreleri nanog ifade ederler. Sox2 ve Oct 3/4, nanog ifadesinin düzenlenmesinde rol oynayan transkripsiyon faktörleridir ve bu üç transkriptik faktör kök hücrelerin farklılaşmadan çoğalmasında koordineli olarak çalışırlar (Boyer vd. 2005, Yongmiao Pan vd. 2010). Mitsui vd. 2003, Wang vd. 2003, Hart vd. 2004, Hatano vd. 2005, Shinpei vd. 2005 tarafından immünohistokimyasal ve RT-PCR teknikleri kullanılarak yapılan araştırmalarda, döllenmemiş oositlerin nanog için negatif olduğu belirtilmiştir. Yine 2005 yılındaki Shinpei Yamaguchia ve arkadaşları 8 haftalık ovaryum dokusunda yaptıkları çalışmalarda tüm foliküllerde nanog ifadesini negatif bulmuşlardır.

Bu çalışmaların aksine biz yenidoğan döneminde, pubertal dönemde ve ergin dönemde oositlerde nanog ifadesini pozitif bulduk. Ayrıca puberte ve ergin ovaryum dokusundaki tersiyer folikülün granuloza hücrelerinde ve ovaryum stromal hücrelerinde nanog ifadesi pozitif. Yaşlı ovaryum dokusunda ise yalnızca stromal hücreler ve ovaryum yüzey epitelindeki bazı hücreler pozitif ifade göstermişti.

C-kit oosit-granuloza etkileşiminde rol oynayan tip III reseptör tirozin kinazdır. C-kit oositlerde ifade olmaktadır. Robinson ve arkadaşları insanlarda mitozun olaylandığı oogonyumlarda c-kit mRNA'sını ve proteinini göstermiştir (Robinson vd. 2001). Yoshida ve arkadaşları (Yoshida vd. 1997) ise primordial folikülden primer folikül geliştikten sonra c-kit ifadesinin bloke olduğunu bildirmişlerdir. Driancourt ve arkadaşları mRNA c-kit salınımının fetal dönemde 8-14 günlerde olduğunu aynı zamanda doğum sonrası dönemde oositlerde, primordial foliküllerde ve gelişen foliküllerin yüksek oranda c-kit içerdiğini bildirmişlerdir (Driancourt vd. 2000). İnsan primordial germ hücreleri 7. haftada ve 13. ile 21. haftalar arasında c-kit'i ifade ederler. Stoop ve arkadaşları intrauterin hayat boyunca c-kit ifadesinin olduğunu bildirmişlerdir (Stoop vd. 2005). Kang ve arkadaşları primordial ve primer folikül oositlerinin 2. ve 7. günlerde c-kit ifade ettiğini, granuloza hücrelerinin ise bu ifadeyi 21. günde gösterdiğini bildirmişlerdir (Jae Seong Kang vd. 2003).

Bizim sonuçlarımızda bu bulguları destekler yöndedir biz de yenidoğan döneminde primordial ve primer folikül oositlerinde c-kit ifadesini pozitif bulduk. Bununla birlikte ne yenidoğan döneminde ne pubertal dönemde ne de ergin dönemdeki deneklerde primordial ve primer foliküllerin granuloza hücrelerinde

pozitif boyanmaya rastlamadık. Pozitif reaksiyona sadece sekonder ve tersiyer foliküllerin granuloza hücrelerinde rastladık.

Oct4 (Oct 3/4, Oct3) en önemli transkripsiyon faktörü olup embriyonik kök hücrelerde, primordial germ hücrelerinde ve germ hücrelerinde bulunur. Buna ek olarak germ hücre tümörlerinde de varlığı bildirilmiştir. Oct4 embriyonik hücrelerin farklılaşmasını inhibe eder. Oct4'ün salınımının azalması ile birlikte farklılaşma başlar. Ayrıca Oct4 salınımı ile birlikte erken embriyonik dönemde Sox2, Fgf4, Rex1, hCG ve Utf1 gibi birçok genin de ekspresyonunun salınımı başlamış olur. Farklılaşmanın başlaması ile birlikte Oct4 sentezinde azalır (Hansis vd. 2000, Koestenbauer vd. 2006). Oct 3/4'ün, 17. ile 24. haftalardaki germ hücrelerinde ifade olduğu, daha sonraki dönemlerde ifadesinin azaldığı bildirilmiştir (Goto vd. 1999). Doğumdan sonra hiçbir germ hücresinde ifade olmadığı bildirilmiştir (Goto vd. 1999, Looijenga vd. 2003, Rajpert-De Meyts vd. 2004).

Bizim çalışmamızda yenidoğan ovaryumlarında oositlerde, pubertal dönem ovaryumlarındaki bazı antral foliküllerin antruma yakın granuloza hücrelerinde ve oositlerinde, ergin dönem fare ovaryumunda gelişen ve tersiyer folikül oositlerinde, granuloza hücrelerinde ve yüzey epitelinde, yaşlı ovaryumunda ise yalnızca yüzey epitelinde ve stromal hücrelerde Oct 3/4 ifadesi belirlenmiştir.

Hem fare hem de insan embriyonik kök hücrelerinde tanımlanan SSEA (Stage-Specific Embryonic Antigen) antijenin bilinen üç formu vardır; SSEA-1, SSEA-3 ve SSEA-4. SSEA-1 aynı zamanda bir karbonhidrat antijenidir ve Lex (Lewix X), CD15 veya 3-FAL olarak isimlendirilmiştir. İnsan embriyonik kök hücresi pluripotent özellik gösterdiği dönemde SSEA-3 ve SSEA-4 pozitif iken, farklılaşmaya başladığı dönemde SSEA-1 antijenini de salgılamaya başlar. SSEA-1 antijeninin varlığı trofoblast farklılaşmasının bir göstergesidir. İnsan blastokistinde SSEA-3 ve SSEA-4 pozitifdir, trofoblast hücreleri ise zayıf olarak SSEA-1 salgılanması gösterir. Pre-implantasyon dönemindeki fare embriyosu sadece SSEA-1 pozitifdir.

Fakat farklılaşma ile birlikte SSEA-1 antijen pozitifliği kaybolur. Fare iç hücre kitlesi SSEA-1 pozitif iken, fertilize olmamış oosit ve erken yarıklanma dönemindeki fare embriyosu SSEA-3 ve SSEA-4 pozitifdir. Fakat insan embriyosuna zıt olarak blastokist aşamasında SSEA-3 ve SSEA-4 negatiftir. Morula dönemindeki fare embriyosunda SSEA-1 antijeni blastomerler arasındaki hücre-hücre adezyonunda görev almaktadır. SSEA-3 ve SSEA-4 antijenlerinin rolleri ise hala tartışmalıdır (Henderson vd. 2002). SSEA-3 ve SSEA-4 antikollarının eritrositlerde pozitif olması

bu antijenlerin immun cevapta veya erken düşükte rol oynayabileceklerini düşündürmektedir (Tippett vd. 2009). Bristol ve arkadaşları ergin ovaryum dokusunda SSEA-1 ifadesini kan damarlarında, teka hücrelerinde, korpus luteumda belirtmişlerdir (Bristol-Gould vd. 2006).

Bizim çalışmamızda; yenidoğan ovaryum dokusundaki oositlerde zayıf ve orta derecede, pubertal dönem ovaryum dokusundaki değişik safhalardaki foliküllerin oositlerinde kuvvetli pozitif, negatif ve orta derecede SSEA-1 ekspresyonu izlenmiştir. Aynı boyanma özellikleri ergin dönem ovaryum dokusunda da kendini göstermiştir. Yaşlı ovaryum dokusunda ise sadece stromal hücreler pozitifdir. İlginç olarak, tüm gruplarda yüzey epiteli negatif reaksiyon göstermiştir.

6. SONUÇLAR

Oct 3/4, c-Kit, Nanog ve SSEA-1'in yenidoğan dönem, pubertal dönem ve ergin dönem folikül oositlerinde, sekonder ve tersiyer foliküllerin granuloza hücrelerinde ifade edildiğini immünohistokimyasal ve RT-PCR tekniklerini kullanarak gösterdik.

Kullandığımız dört antikorun ergin dönem ovaryum dokusunda diğer gruplara göre daha kuvvetli reaksiyon gösterdiğini belirledik. Özellikle sekonder ve tersiyer foliküllerin granuloza hücreleri ve oositleri SSEA-1 dışında kuvvetli boyanma göstermiştir. Aynı zamanda atretik foliküllerde de boyanma pozitifdir. Sekonder ve tersiyer foliküllerin granuloza hücreleri ile oositlerindeki boyanmanın yoğunluğu, bize bu moleküllerin dominant folikül seçiminde, normal folikülogenezisde etkili olabileceğini düşündürmüştür.

Ayrıca sekonder ve tersiyer foliküllerin granuloza hücrelerinde hem çekirdek boyanması hem de sitoplazmik boyanma izlenmiştir. Bu tarzda boyanma şekli farklı çalışmalarda da gözlenmiş ve bu moleküllerin çekirdek DNA'sının yanı sıra sitoplazmada mitokondrial DNA'sıyla da ilişkili olabileceği ifade edilmiştir. Özellikle Nanog, Oct 3/4 ve c-kit ifade eden granuloza hücrelerinin normal folikülogenezisde rol alabileceği gibi, onkojen kök hücrelerine dönüşme potansiyellerinin olabileceği izlenimi verdi. Bu bulgular normal ve patolojik germ hücre gelişim ile folikül gelişimindeki ileri araştırmalar için referans olabilir.

Çalışmamızda yaşlı gruplarda stromal ve yüzey epitel hücreleri dışında pozitif reaksiyon izlenmemiştir. Bu dört molekülünde yüzey epitelinde pozitif olması hem ovaryum kanserlerinin anlaşılmasında hem de doğum sonrası oogenezis çalışmalarının güçlenmesinde etkili olacaktır.

Bununla birlikte SSEA-1'in yalnızca yaşlı dönem ovaryum yüzey epitelinde pozitif olması, c-Kit'in yenidoğan ve pubertal dönemde negatif olup ergin ve yaşlılık dönemi ovaryum yüzey epitelinde pozitif olması, Oct 3/4 ve Nanog'un ise yalnızca pubertal dönemde yüzey epitelinde negatif olup diğer dönemlerde pozitif olması açıklanamamıştır.

7. KAYNAKLAR

- Abraham, L., K. (2006) *Histology and Cell Biology*, **Mosby**, s618.
- Adewumi, O., B, Aflatoonian., L. Ahrlund-Richter., M. Amit., P. W. Andrews., G. Beighton, et al. (2007) The international stem cell initiative characterization of human embryonic stem cell lines by the international stem cell initiative. **Nat. Biotechnol** 25:803–816.
- Allen, E., Doisy, E. A., (1983) An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. (By Edgar Allen and Edward A. Doisy). **JAMA., Landmark article** Sept 8, 1923., Nov 18;250(19):2681-3.
- Allen, E. (1923) Ovogenesis during sexual maturity. **Am J Anat**;439- 81.
- Aragona, M., Maisano, R., Panetta, S., Giudice, A., Morelli, M., La Torre, I., La Torre, F. (2000) Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis. **Int J Oncol.**, 17(5): 981-989.
- Attar, E. (2003) Hastalık Modeli Olarak Transjenik Fareler ve Kök Hücreler. **Tıp Fakültesi, Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı, Moleküler Tıp ABD, İstanbul.**, 167- 178.
- Auersperg, N., A. S. T., Wong., K. C., Choi., S. K., Kang., and P. C. K., Leung. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology and pathology. **Endocr Rev.**, 22:255–288.
- Berta, P., Hawkins, J. R., Sinclair A. H., Griffiths B. L., Goodfellow P. N., Fellous, M. (1990) Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. **Nature.**, 348:448-450.
- Bongsa, A., Fong, C. Y., Ng, S. C., Ratman, S. (1994) Isolation and culture of inner mass cell from human blastocysts. **Hum. Reprod.**, 9:2110-2117.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. R., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., Young, R. A. (2005) Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, 122:947–956.
- Bukovsky, A., Caudle, M. R., Svetlikova, M., Upadhyaya, N. B. (2004) Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, Apr 28;2:20

- Bukovsky, A. (2005) Can ovarian infertility be treated with bone marrow- or ovary-derived germ cells? **Reprod. Biol. Endocrinol.**, Aug 15;3:36.
- Can, A. (2008) Haematopoietic stem cell niches: Interrelations between structure and function. **Trans. Apheresis Sci.** 8; 2 1–2 8.
- Can, A. (2009) Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, **TÜBA, Ankara**, 113s.
- Can, A., Karahüseyinoğlu, S. (2009) Kök Hücre: **Biyolojik ve Klinik Yaklaşım. Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sağlıkta Birikim Dergisi**, Cilt 1, Sayı 5, 57-65s.
- Carr, D. H. (1970) Heredity and Embryo. **Science J. London.**, 6: 75.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smith, A. (2003) Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. **Cell**, 113: 643–655.
- Chapman, R., Frankel, M. S., Garfinkel, M. S. (1999) Stem cell research and applications: Monitoring the frontiers of biomedical research. **Am. Assoc. Adv. Sci. Inst. Civil. Soc.**, 34: 405–416
- Cuneo, S., Rangel, R., Ruvalcaba, L., Chanona, J., Batiza, V., Bermudez, A., Gallardo, E., Muniz, M. (2004) Stem cells from umbilical cord blood as a source for future genetic and therapeutic uses in patients from IVF donation programs. **International Congress Series**; 1271: 167–170.
- Di George, A. M. (1992) Hermaphroditism, In Behrman RE ed. Nelson Textbook of Pediatrics, 14th edition, **Philadelphia, WB Saunders**, s1465.
- Donovan, P. J., and Gearhart, J. (2001) The end of the beginning for pluripotent stem cells. **Nature.**, 414:92-7.
- Downing, G. J., and Battey, J. (2004) Technical assessment of the first 20 years of research using mouse embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, 22: 1168–1180.
- Draper, J. S., and Fox, V. (2003) Human embryonic stem cells: multilineage differentiation and mechanisms of selfrenewal. **Arch. Med. Res.**, 34:558-64.
- Driancourt, M. A., Reynaud, K., Cortvrindt, R., Smitz, J. (2000) Roles of kit and kit ligand in ovarian function. **Rev Reprod** 5:143–152
- Dyce, P. W., and Li, J. (2006) From skin cells to ovarian follicles? **Cell Cycle.**, Jul;5(13):1371-5.

- Eggan, S. M., Lewis, D. A. (2007) Immunocytochemical distribution of the cannabinoid CB1 receptor in the primate neocortex: a regional and laminar analysis. **Cereb. Cortex.**, Jan;17(1):175-91.
- Elçin, Y. M., (2009) Embriyonik Kök Hücreler: Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar, **TÜBA**, Ankara, 23-28.
- Espey, L. L., Ujioka, T., Russell, D. L. (2000) Induction of Early Growth Response Protein-1 Gene Expression in the Rat Ovary in Response to an Ovulatory Dose of Human Chorionic Gonadotrophin. **Endocrinology**, 141: 2385-91.
- Fawcett, D. W. (1994) Female reproductive system, in A Textbook of Histology, 12th edn. (eds. Bloom, W. & Fawcett, D.W.), **Chapman & Hall**, New York, London, s857–858.
- Fleming, T. P (2002) Cell-cell interactions in early mammalian development. **Oxford University Press, Second edition.**, pp:204-228.
- Friedrich, T.D., Regenass, U., Stevens, L.C. (1983) Mouse genital ridges in organ culture: the effects of temperature on maturation and experimental induction of teratocarcinogenesis. **Differentiation**. 24:60-64.
- Gardner, R. L., Brook, F. A. (1997) Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. **Int. J. Dev. Biol.** 41: 235–
- Geijsen, N., Horoschak, M., Kim, K., Gribnau, J., Eggan, K., Daley, G. Q. (2004) Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. **Nature**, Jan 8;427(6970):148-54.
- Ghadami, M., Salama, S. A., Khatoon, N., Chilvers, R., Nagamani, M., Chedrese, P. J., Al-Hendy, A. (2008) Toward gene therapy of primary ovarian failure: adenovirus expressing human FSH receptor corrects the Finnish C566T mutation. **Mol Hum Reprod.**, Jan;14(1):9-15.
- Goto, T., Adjaye, J., Rodeck, C. H. and Monk, M. (1999) Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. **Mol Hum Reprod.**, 5,851–860.
- Green, S. H., Zuckerman, S. (1951) Quantitative aspects of the growth of the human ovum and follicle. **J Anat.**, Oct;85(4):373-5.
- Grove, J. E., Bruscia, E., and Krause, D. S. (2004) Plasticity of bone marrow-derived stem cells. **Stem Cell.**, 22: 487–500.

- Hansis, C., Grifo, J. A., and Krey, L. C. (2000) Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. **Mol Hum Reprod.**, 6,999–1004.
- Hardy, K., Wright, C. S., Franks, S., Winston, R. M. L. (2000) In vitro maturation of oocytes. **Br. Med. Bull.**, 56(3):588-602.
- Hart, A. H., Hartley, L., Ibrahim, M., Robb, L., (2004) Identification, cloning and expression analysis of the pluripotency promoting Nanog genes in mouse and human. **Dev. Dyn.**, 230, 187–198.
- Hatano, S. Y., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T., Suemori, H., Nakatsuji, N., Tada, T. (2005) Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. **Mech. Dev.**, 122, 67–79.
- He, X. C., Zhang, J., Tong, W. G., Tawfik, O., Ross, J., et al. (2004) BMP signaling inhibits intestinal stem cell self-renewal through suppression of Wnt-beta-catenin signaling. **Nat. Genet.** 36:1117–21.
- Henderson, J. K., Draper, J. S., Baillie, H. S., Fishel S, Thomson, J. A., Moore, H., Andrews, P. W. (2002) Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. **Stem Cells (Dayt)** 20:329–337.
- Hoffman, L. M., Carpenter, M. K. (2005) Human embryonic stem cell stability. **Stem Cell Rev.**, 1(2): 139-144.
- Hübner, K., Fuhrmann, G., Christenson, L. K., Kehler, J., Reinbold, R., De La Fuente, R., Wood, J., Strauss, J. F. 3rd., Boiani, M., Schöler, H. R. (2003) Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. **Science.** May 23;300(5623):1251-6.
- Jae Seong, Kang., Chang Joo, Lee., Jong Min, Lee., Joong, Yeol Rha., Kang Won, Song., and Moon, Hyang. (2003) Park Follicular Expression of c-Kit/SCF and Inhibin-in Mouse Ovary During Development. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry** 51(11): 1447–1458.
- Jaenisch, R. (2009) Stem cells, pluripotency and nuclear reprogramming. **Journal of Thrombosis Haemostasis**, 7 (Suppl. 1):21-3.
- Jemal A, A Thomas, T Murray and M Thun. (2002) Cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin.**, 52:23–47.

- Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J. K., Tilly, J. L. (2004) Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature.**, Mar 11;428(6979):145-50.
- Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H. J., Adams, G. B., Niikura, Y., Tschudy, K. S., Tilly, J. C., Cortes, M. L., Forkert, R., Spitzer, T., Iacomini, J., Scadden, D. T., Tilly, J. L. (2005) Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell.**, Jul 29;122(2):303-15.
- Kansu, E., (2006) Kök Hücre Biyolojisi ve Plastisitesinde Güncel Kavramlar, Hacettepe Üniversitesi, Onkoloji Enstitüsü ve Hematopoietik Stem Hücre Transplantasyon Ünitesi, **ANKEM Derg.** Ankara, 20(Ek 2): 1-8.
- Kaufman, D. S., Hanson, E. T., Lewis, R. L., Auerbach, R., Thomson, J. A. (2001) Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 98:10, 716-10, 721.
- Kelly E. Mayo., Lonnie D. Shea., Teresa K. Woodruff. (2006) Fate of the initial follicle pool: Empirical and mathematical evidence supporting its sufficiency for adult fertility. **Developmental Biology**, 298:149–154
- Kerr, C. L., Gearhart, J. D., Elliott, A. M., Donovan, P. J. (2006) Embryonic germ cells: when germ cells become stem cells. **Semin. Reprod. Med.**, 24(5): 304-313.
- Kierszenbaum, A. L. (2006) Histoloji ve Hücre Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık, Çev. Ed: Prof. Dr. Ramazan Demir, **Mosby Inc.**, 618s.
- Kleinsmith, L. J., Pierce, Jr, G. B. (1964) Multipotentially of single embryonal carcinoma cells. **Cancer Res.**, 24:1544-1551.
- Koestenbauer, S., Zech, N. H., Juch, H., Vanderzwalmen, P., Schoonjans, L., Dohr, G. (2006) Embryonic Stem Cells: Similarities and Differences Between Human and Murine Embryonic Stem Cells. **American J. Reprod. Immun.**, 55(3):169-180.
- Kuehnel, W. (2002) Female reproductive organs, Color Atlas of Cytology, Histology and Microscopic Anatomy, 4th edition, **Thieme**, s400-434.
- L, Li., and Xie, T. (2005) Stem cell niche: Structure and Function. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 21:605–31

- Lacham-Kaplan, O., Chy, H., Trounson, A. (2006) Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. **Stem Cells**, Feb;24(2):266-73.
- Lee, H. J., Selesniemi, K., Niikura, Y., Niikura, T., Klein, R., Dombkowski, D. M. et al. (2007) Bone marrow transplantation generates immature oocytes and rescues long-term fertility in a preclinical mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. **J Clin Oncol**; 25: 3198- 204.
- Lengner, C. J., F. D. Camargo., K. Hochedlinger., G. G. Welstead., S. Zaidi., S. Gokhale., H. R. Scholer., A. Tomilin., and R. Jaenisch. (2007) Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. **Cell Stem Cell** 1:403–415.
- Lengner, C. J., G. G. Welstead., and R. Jaenisch. (2008) The pluripotency regulator Oct4. A role in somatic stem cells. **Cell Cycle** 7:725–728.
- Looijenga, L. H. J., Stoop, H., De Leeuw, P. J. C., De Gouveia Brazao, C. A., Gillis, A. J. M., Van Roozendaal, K. E. P., Van Zoelen, E. J. J., Weber, R. F. A., Wolffenbuttel K. P., Van Dekken, H. et al. (2003) POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. **Cancer Res.**, 63,2244–2250.
- Lue, Y., Erkkila, K., Liu, P. Y., Ma, K., Wang, C., Hikim, A. S., Swerdloff, R. S. (2007) Fate of bone marrow stem cells transplanted into the testis: potential implication for men with testicular failure. **Am J Pathol.**, Mar;170(3):899-908.
- Martin, G. R., Evans, M. J. (1975) Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: Formation of embryoid bodies in vitro, **PNAS USA**, 72: 1441-5.
- Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by terotocarcinoma stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 78:7634-7638.
- Masson, S., Harrison, D. J., Plevris, J. N., and Newsome, P. N. (2004) Potential of hematopoietic stem cell therapy in hepatology: A critical review. **Stem Cell.**, 22: 897–907.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M.,Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., Yamanaka, S. (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. **Cell**, 113, 631–642.

- Mittwoch, U. (1992) Sex determination and sex reversal: genotype, phenotype, dogma and semantics. **Hum Genet.**, 89: 467.
- Moore, K. L. & Persaud, T. V. N. (2002) *The Developing Human: clinically oriented embryology* 6th ed., Philadelphia, **Saunders**, 560s.
- Niwa, H., Miyazaki, J., Smith, A. G. (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. **Nat. Genet.**, 24:372-6.
- Novak, I., Lightfoot, D. A., Wang, H., Eriksson, A., Mahdy, E., Höög, C. (2006) Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. **Stem Cells**, Aug;24(8):1931-6.
- Odorico, J. S., Kaufman, D. S., and Thomson, J. A. (2001) Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. **Stem Cells**, 19: 193-204.
- Oehninger, S., Hodgen, G. D. (1993) Hypothalamic-pituitary-ovarian uterine axis, In Copeland LJ: *Textbook of Gynecology*. Philadelphia, **WB Saunders**.
- Okarma, T. B., (1999) Human primordial stem cells. **Hastings Cent. Rep.**, 29(2):30.
- Oktem, O., and Oktay, K. (2009) Current knowledge in the renewal capability of germ cells in the adult ovary. **Birth Defects Res.**, 87:90–95.
- Owen, C. M., Segars, J. H. (2009) Imprinting Disorders and Assisted Reproductive Technology. **Semin Reprod Med.**, 27(5):417-428.
- Pera, M. F., Cooper, S., Mills, J., Parrington, J. M. (1989) Isolation and characterization of a multipotent clone of human embryonal carcinoma cells. **Differentiation**, 42:10-23.
- Persaud, T. V. N. (1992) Embryology of the female genital tract and gonads, In Copeland LJ, Jarrell J, McGregor J (eds), *Textbook of Gynecology*, Philadelphia, **WB Saunders**, 481s.
- Rajpert-De Meyts, E., Hanstein, R., Jorgensen, N., Graem, N., Vogt, P. H. and Skakkebaek, N. E. (2004) Developmental expression of POU5F1 (OCT3/4) in normal and dysgenetic gonads. **Hum Reprod** 19,1338–1344
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., Bongso, A. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocyst: somatic differentiation in vitro. **Nat biotechnol.**, 18:399-404.

- Revazova, E. S., Turovets, N. A., Kochetkova, O. D., Agapova, L. S., Sebastian, J. L., Pryzhkova, M. V., Smolnikova, V. I., Kuzmichev, L. N., Janus, J. D. (2008) HLA homozygous stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts. **Cloning Stem Cells** 10(1): 11-24.
- Robinson, L. L., Gaskell, T. L., Saunders, P. T., Anderson, R. A. (2001) Germ cell specific expression of c-kit in the human fetal gonad. **Mol Hum Reprod** 7:845–852.
- Rodda, D. J., Chew, J. L., Lim, L. H., Loh, Y. H., Wang, B., Ng HH., Robson, P. (2005) Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. **J. Biol. Chem.**, 280(26): 24731-24737.
- Sadler, T. W. (2005) Langman's Medical Embryology 9th ed., **Lippincott Williams & Wilkins**, 507s.
- Sargin, D. (2003) Kök hücre ve kök hücre tedavisi. **XXX. Ulusal Hematoloji Kongresi, İstanbul**, Vol:20, no:3.
- Sato, N., Sanjuan, I. M., Heke, M., Uchida, M., Naef F., Brivanlou, A. H. (2003) Molecular signature of human embryonic stem cells and its comparison with the mouse. **Dev. Biol.** 260: 404-13.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D. A., Benvenisty, N. (2000) Effect of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 97(21): 11307-11312.
- Schwab, K. E., Chan, R. W. S., and Gargett, C. E. (2005) Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. **Fertil Steril.** 84: 1124–1130.
- Seema, Parte., Deepa, Bhartiya., Jyoti, Telang., Vinita, Daithankar., Vinita, Salvi., Kusum, Zaveri., and Indira, Hinduja. (2011) Detection, Characterization, and Spontaneous Differentiation In Vitro of Very Small Embryonic-Like Putative Stem Cells in Adult Mammalian Ovary. **Stem Cells and Development**, doi:10.1089/scd.2010.0461.
- Shinpei Yamaguchia., Hironobu Kimuraa., Masako Tadaa., Norio Nakatsuji, Takashi Tadaa (2005) Nanog expression in mouse germ cell development. **Gene Expression Patterns** 5, 639–646.
- Shufaro, Y., and Reubinoff, B. E. (2004) Therapeutic applications of embryonic stem cells. **Best Pract. Res. Clin. Obs. Gyn.**, 18: 909–927.

- Simkins, C. (1932) Development of the human ovary from birth to sexual maturity. **Am J Anat.**, 51: 465- 505.
- Stoop, H., Honecker, F., Cools, M., Krijger, R.de., Bokemeyer, C., and Looijenga, L. H. J. (2005) Differentiation and development of human female germ cells during prenatal gonadogenesis: an immunohistochemical study. **Human Reproduction** Vol.20, No.6 pp. 1466–1476.
- Strulovici, Y., Leopold, P. L., O'Connor, T. P., Pergolizzi, R. G., and Crystal, R. G. (2007) Human Embryonic Stem Cells and Gene Therapy. **The American Society of Gene Therapy**, vol. 15 no. 5, 850–86
- Sue O'Shea², K. (2004) Self-renewal vs. Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, **Biol. Reprod.**, 71:1755–1765.
- Şahin, F., Saydam, G., Omay, S. B., (2005) Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte Kök Hücre Tedavisi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, **Hematoloji AnaBilim Dalı, İzmir.**
- Şeftalioğlu, A. (1991) Genel İnsan Embriyolojisi, **Ankara**, 159s.
- Şeftalioğlu, A. (2003) Genel ve Özel İnsan Embriyolojisi, 4. Baskı, **Alp Ofset Matbaacılık Ankara**, 653s.
- Şenel, F. (2002, Şubat) Kök Hücreler. **Bilim ve Teknik Dergisi (Yeni Ufuklara)**. 1-15.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, 131:1-12.
- Tam, W. L., Ang, Y. S., Lim, B. (2007) The molecular basis of ageing in stem cells. **Mech. Ageing Dev.**, 128(1): 137-148.
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., During, M., Harris, C. P., Hearn, J. P. (1996) Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. **Biol. Reprod.**, 55:254-259.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., and Jones, J. M. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, Nov 6; 282 (5391):1145-1147.

- Trounson, A. O., Gardner, D. K., Baker, G., Barnes, F.L., Bongso, A., Bourne, H., Calderon, I., Cohen, J., Dawson, K. Et al: (2000) Handbook of in vitro fertilization, Boca Raton, London, New York, Washington, D.C., **CRC Press**.
- Trounson, A. (2006) The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. **Endocrine Reviews**, 27(2): 208-219.
- Tilly, J. L., Rueda, B. R., (2008) Minireview: stem cell contribution to ovarian development, function, and disease. **Endocrinology**, Sep;149(9):4307-11.
- Tippett, P., Andrews, P. W., Knowles, B. B., Solter, D., Goodfellow, P. N. (2009) Red cell antigens P (globoside) and Luke: identification by monoclonal antibodies defining the murine stagespecific embryonic antigens -3 and -4 (SSEA-3 and SSEA-4). **Vox Sang** 1986; 51:53–56.
- Vats, A., Bielby, R. C., Tolley, N. S., Nerem, R., and Polak, J. M. (2005) **Stem cells. Lancet**, 366: 592–602.
- Verfaillie, C. M., Pera, M. F., Lansdorp, P. M. (2002) Stem cells: hype and reality. **Hematology**, 1:369-91.
- Vescovi, A., Gritti, A., Cossu, G., Galli, R. (2002) Neural stem cells: plasticity and their transdifferentiation potential. **Cells Tissues Organs**, 171(1): 64-76.
- Virant-Klun, I., Zech, N., Rozman, P., Vogler, A., Cvjeticanin, B., Klemenc, P., Malicev, E., Meden-Vrtovec, H. (2008) Putative stem cells with an embryonic character isolated from the ovarian surface epithelium of women with no naturally present follicles and oocytes. **Differentiation**, Oct;76(8):843-56.
- Virant-Klun, I., and T., Skutella., (2010) Stem cells in aged mammalian ovaries. **Aging** 2:3–6.
- Wang, S. H., Tsai, M. S., Chiang, M. F., Li, H. (2003) A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells. **Gene Expr. Patterns** 3, 99–103.
- Weissman, I. L. (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic barriers and opportunities. **Science**, 287: 1442-1446.
- Weissman, I. L. (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. **Cell**, 100: 157-168.

- Winton, D. (2000) Stem cells in the epithelium of the small intestine and colon. In *Stem Cell Biology*, (ed. D. R. Marshak, R. L. Gardner, D. Gottlieb.) NY: **Cold Spring Harbor Lab. Press**, pp. 515–36.
- Wobus, A. M. (2001) Potential of embryonic stem cells. **Mol. Aspects Med.**, 22:149-64.
- Wolpert, L. (1991) *The Triumph of the Embryo*. Oxford, **Oxford University Press.**, pp.211.
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J. (2001) Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. **Nat. Biotechnol.**, 19:971-4.
- Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A., Ding, S. (2006) Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, 103(18) : 6907-6912.
- Yongmiao, Pan., Jie, Jiao., Caiyun, Zhou., Qi, Cheng., Yuting, Hu., Huaizeng, Chen. (2010) Nanog Is Highly Expressed in Ovarian Serous Cystadenocarcinoma and Correlated with Clinical Stage and Pathological Grade. **Pathobiology**, 77:283–288.
- Yoshida, H., Takakura, N., Kataoka, H., Kunisada, T., Okamura, H., Nishikawa, S. I. (1997) Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. **Dev Biol** 184:122–137.
- Young, R. H. (2005) A brief history of the pathology of the gonads. **Mod Pathol.**, Feb;18 Suppl 2:S3-S17.
- Zaehres, H., Lensch, M. W., Daheron, L., Stewart, S. A., Itskovitz-Eldor, J., and Daley, G. Q. (2005) High efficiency RNA interference in human embryonic stem cells. **Stem Cells** 23, 299–305.
- Zhang, D., Fouad, H., Zoma, W. D., Salama, S. A., Wentz, M. J., Al-Hendy, A. (2008) Expression of stem and germ cell markers within nonfollicle structures in adult mouse ovary. **Reprod. Sci.**, Feb;15(2):139-46.
- Zuckerman, S. (1951) The number of oocytes in the mature ovary. **Recent Prog Horm Res.**, 1951; 6: 63- 109.
- WEB_1. (2010). Cluster of Differentiation. www.sciencegateway.org (12.11.2009)

ÖZGEÇMİŞ

1984 yılında Denizli-Bekilli ilçesinde doğdum. Orta Öğrenimimi Denizli Lisesi Yabancı Dil Ağırlıklı Bölümünde tamamladıktan sonra, 2003 yılında Denizli Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimime başladım. 2007 yılı Haziran ayında bölüm ikincisi olarak eğitimimi tamamladım. 2007-2008 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Yabancı Diller Yüksekokulu'ndaki bir senelik İngilizce dil eğitimimin ardından, 2008 yılı Eylül ayında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimime başladım.

Bilimsel Toplantılarda Sunulan Sözlü Bildiriler:

Gok, D., Abban, G. (2010) Embriyonik Kök Hücre Belirteçleri SSEA-1, Oct 3/4, Nanog'un Ergin Fare Endometriyumundaki Ekspresyonu ve Yerleşimi. 17-20 Mayıs 2010, X. Ulusal (Uluslararası Katılımlı) Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, İzmir-Çeşme, sözlü sunu (bildiri).

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Yayınlar:

Satiroglu Tufan, N. L., Dodurga, Y., Gok, D., et al. (2010) RNA interference-mediated URG4 gene silencing diminishes cyclin D1 mRNA expression in HepG2 cells. Genetic Molecular Research 2010 August 10; 9 (3):1557-67.

Ödüller:

Tufan, C. A., Kıter, E., Tezcan, B., Serter, S., Gok, D., Cetinkaya, A. (2010) Dose dependent effect of C-type natriuretic peptide signaling in glycosaminoglycan synthesis during TGF-β1 induced chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells (Türk Histoloji ve Embriyoloji Derneği Bilimsel Araştırma İkincilik Ödülü, X. Ulusal Türk Histoloji ve Embriyoloji Kongresi, 17-20 Mayıs 2010 Çeşme).

Dursun, B., Abban, G., Kuçukatay, V., Tufan, L., Dodurga, Y., Guçlu, A., Gok, D., Gundogdu, G. (2011) Ratlarda Yüksek Doz N. Asetilsisteinin Sisplatin-Aracılı Akut Böbrek Hasarına Karşı Koruyuculuğu: Oksidatif Stres, Caspase Sinyal Yolakları ve VEGF Ekspresyonunun Etkisi (13. Ulusal Hipertansiyon ve Böbrek Hastalıkları Kongresi sözlü bildiri birincilik ödülü, 22 Mayıs 2011).